

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BMPR1A'NIN PLAZMA HÜCRELERİNİN GELİŞİMİNE ETKİSİNİN VE
GERMİNAL MERKEZ DİNAMİKLERİNDEKİ ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Selda KARAASLAN

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2021**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BMPR1A'NIN PLAZMA HÜCRELERİNİN GELİŞİMİNE ETKİSİNİN VE
GERMİNAL MERKEZ DİNAMİKLERİNDEKİ ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Selda KARAASLAN

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
DOKTORA TEZİ**

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. A. Lale DOĞAN

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Mary M. TOMAYKO

ANKARA

2021

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bmpr1a'nın Plazma Hücrelerinin Gelişimine Etkisinin ve Germinal Merkez
Dinamiklerindeki Öneminin Araştırılması

Dr. SELDA KARAASLAN

Danışman: Prof. Dr. A. Lale DOĞAN

İkinci Danışman: Doç. Dr. Mary M. TOMAYKO

Bu tez çalışması **26.03.2021** tarihinde jürimiz tarafından **“Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı”** nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Ayşegül ÜNER*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Vedat BULUT*
(Gazi Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Ayşegül ATAK YÜCEL*
(Gazi Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Hande CANPINAR*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Gürcan GÜNAYDIN*
(Hacettepe Üniversitesi)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Diclehan ORHAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- ✗ Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

18/04/2021

SELDA KARAASLAN

i

ⁱ“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Tez Danışmanlarım Prof. Dr. A. Lale DOĞAN ve Doç. Dr. Mary M. TOMAYKO danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Dr. Selda KARAASLAN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince çalışmalarında bana rehberlik eden ve her konuda destek olan tez danışmanlarım Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan ve Doç. Dr. Mary M. Tomayko'ya,

Tez komite toplantılarında önemli fikir katkıları olan ve beni motive eden komite üyesi hocalarım Doç. Dr. Gürcan Günaydın ve Prof. Dr. Ayşegül ATAK'a,

Doktora derslerim sırasında kendilerinden çok şey öğrendiğim ve her zaman yardımcı olmaya açık olan değerli hocalarım Emekli Öğretim Üyesi Hocamız Prof. Dr. Dicle Güç, Prof. Dr. Ayşegül Üner, Prof. Dr. Güneş Esendağlı, Doç. Dr. Hande Canpınar, Doç. Dr. Füsün Özmen, Prof. Dr. Aytekin Akyol'a

Yale'de çalışmalarım sırasında projeye büyük katkıları olan, hem deneylerime yardımcı olan hem de güzel bir çalışma ortamı oluşturan değerli arkadaşlarım Srividhya Venkatesan'a, Begoña Lainez'e, Klair, ve Klevi'ye

Laboratuvar ortamını paylaştığımız ve ekipmanlarını kullanmamız konusunda her zaman anlayışlı olan Dr. Ruth Halaban ve Antonietta'ya

Başaracağıma inandığını hep hissettiren ve enerji kaynağım olan oda arkadaşım Tevhide Betül İçli'ye

Bu zorlu süreçte hep yanımda olan ve yol gösteren Denizhan Özdemir'e

Üzerimde sonsuz emeği olan ve beni her koşulda destekleyen ağabeyim Selim ve eşi Gökçe Karaaslan, annem Aliye ve babam İlhan Karaaslan'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

ÖZET

KARAASLAN S., BMPR1A'nın Plazma Hücrelerinin Gelişimine Etkisinin ve Germinal Merkez Dinamiklerindeki Öneminin Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı Doktora Tezi, Ankara, 2021. Bone morfogenetik protein reseptör 1A (BMPR1A) sinyal yolağı erişkin ve embriyonik kök hücrelerde aynı zamanda erişkin lenfoid hücrelerde kendini yenileme, çoğalma ve farklılaşmayı düzenler. Bu çalışmada, B hücrelerinde kondisyonel *Bmpr1a* kaybı olan transgenik fareleri ve yeni *Bmpr1a*.IRES.EGFP fareleri kullanarak BMPR1A'nın germinal merkez dinamiklerini ve kemik iliği plazma hücre kompartmanının oluşumunu düzenlediğini gösterdik. C57Bl/6J (B6) farelerde, *Bmpr1a* mRNA'sının germinal merkez B hücreleri (GMBH), hafıza B hücreleri (HBH) ve kemik iliği plazma hücreleri (KİPH) içinde yüksek düzeyde olduğunu saptadık. B hücre-spesifik *Bmpr1a* kaybı olan farelerde, GMBH kompartmanı boyutunun kontrol farelerin % 77'sine düştüğünü ve IgG1⁺ KİPH kompartmanının kontrol grubunun % 34'üne gerilediğini saptadık. Benzer şekilde, yüksek afiniteli IgG1 ve orta afiniteli IgM antikorları serumda azaldı. T-bağımlı cevapta BMPR1A'nın önemine rağmen, T-bağımsız cevapta BMPR1A sinyali gerekli değildi. Sınıf-değişim mekanizması da *Bmpr1a* yokluğunda etkilenmedi. İlginç şekilde, *Bmpr1a* ifadesi Xbp1, IRF-4 ve Blimp1 ifadesi yüksek olan germinal merkez B hücre alt grubuna özgüydü. *Bmpr1a*.eGFP fare çalışmaları *Bmpr1a* ifadesinin germinal merkez B hücrelerinde zaman içinde arttığını ve KİPH popülasyonunun bir alt-grubunda *Bmpr1a*'nın yüksek düzeyde olduğunu gösterdi. Genel olarak, bu çalışma BMPR1A sinyalinin germinal merkez dinamiklerinin düzenlenmesinde ve T-bağımlı cevapta kemik iliği plazma hücresi oluşumunda rolü olduğunu gösterdi.

Anahtar Kelimeler: BMPR1A, BMP sinyal yolağı, B hücre immün cevabı, dalak plazma hücresi, germinal merkez reaksiyonları, kemik iliği plazma hücresi, kemik morfogenetik reseptör 1a

Bu çalışma, NIH tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

KARAASLAN S., Investigation of The Effect of BMPR1A in Plasma Cell Development and Its Importance in Germinal Center Dynamics. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Ph.D. Thesis in Tumor Biology and Immunology Program, Ankara, 2021. The bone morphogenetic protein receptor 1A (BMPR1A) signaling pathway regulates self-renewal, proliferation, and differentiation in embryonic and adult stem cells as well as in adult lymphoid cells. Here, using transgenic mice with conditional deletion of *Bmpr1a* in B cell and novel *Bmpr1a*.IRES.EGFP reporter mice, we demonstrate that BMPR1A signaling regulates germinal center dynamics and establishment of bone marrow plasma cell compartment. In C57Bl/6J (B6) mice, *Bmpr1a* mRNA was upregulated among germinal center B cells (GCBC), memory B cells (MBC) and bone marrow plasma cells (BMPC). In mice with B-cell specific *Bmpr1a* deficiency, the size of the GCBC compartment were reduced to 77 % that of wildtype control mice and the size of IgG1⁺ BMPC compartment were diminished to 34 % that of controls. Similarly, high affinity IgG1 and moderate affinity IgM antibodies in serum were decreased. Despite the importance of BMPR1A in T-dependent response, T-independent immune response didn't require the BMPR1A signaling. The class switch mechanism was also not affected in the absence of *Bmpr1a*. Interestingly, *Bmpr1a* expression was unique to a subset of germinal center B cells which has high Xbp1, IRF-4, and Blimp1 expression. *Bmpr1a*.eGFP mice studies showed that the expression of *Bmpr1a* in GCBC increases over time and *Bmpr1a* is upregulated in a subset of BMPC population. Overall, this study shows that BMPR1A signaling plays a role in modulating the germinal center dynamics and the formation of T-dependent bone-marrow plasma cells.

Keywords: BMPR1A, BMP signaling pathway, bone marrow plasma cells, bone morphogenetic protein receptor 1a, B cell immune response, germinal center reactions, splenic plasma cell

This work was supported by NIH.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Adaptif İmmün Yanıt ve B Hücre İmmün Cevabı	4
2.1.1 Germinal Merkez B Hücreleri	6
2.1.2 Plazma Hücre Gelişimi	9
2.2 Kemik Morfogenetik Protein Reseptör 1A	11
2.2.1 Kemik Morfogenetik Protein Reseptör 1A and İmmün Hücre Gelişimi	13
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	16
3.1. Fare Modelleri ve Kohortun Sağlanması	16
3.1.1. Farelerin Aşılması	17
3.2. Dalak Hücrelerinin ve Kemik İliği Hücrelerinin İzolasyonu	17
3.3. Akım Sitometri ve Çalışmada Kullanılan Antikorlar ve Ajanlar	18
3.4. PCR ve Kantitatif PCR (qPCR) testleri	20
3.4.1. Floks (Fx) Allelinin Rekombinasyon Etkinliğinin Hesaplanması	22
3.5. Elispot Deneyleri	23
3.6. ELİSA Deneyleri	24
3.7. İn-vitro Kültür Deneyleri	26
3.8. Damlacık-temelli Tek-hücre RNA Sekans Analizi	26

3.9. İstatistik Analizler	27
4. BULGULAR	28
4.1. Germinal Merkez B Hücrelerinde ve Hafıza B Hücrelerinde Bmpr1a mRNA Düzeyi	28
4.2. Dalak Plazmablastlarında, Dalak Plazma Hücrelerinde, Kemik iliği Plazmablastlarında ve Kemik İliği Plazma Hücrelerinde Bmpr1a mRNA Düzeyi	29
4.3. Kemik İliği Plazmablastlarında ve Kemik İliği Plazma Hücrelerinde Bmpr1a mRNA Düzeyinin Antijenik Aktivasyon ile Değişiminin İncelenmesi	30
4.4. Bmpr1a ^{fx/fx} CD19.Cre ^{+/-} Farelerde Bmpr1a Allel Rekombinasyon Spesifikliğin ve Etkinliğinin İncelenmesi	32
4.5. B hücre-spesifik Bmpr1a Kaybının Germinal Merkez B Hücre ve Plazma Hücre Kompartmanlarına Etkisinin İncelenmesi	36
4.6. Bmpr1a'nın Germinal Merkez Reaksiyonları Sırasında Gerçekleşen Sınıf Değişimi Mekanizmasına Etkisinin İn-vitro İncelenmesi	39
4.7. B-hücre Spesifik Bmpr1a Kaybının Serum Antikor Seviyesine Etkisinin Araştırılması	42
4.8. Bmpr1a'nın T-bağımsız B hücre Cevabında Rolünün İncelenmesi	43
4.9. Germinal Merkez Alt Populasyonlarında Bmpr1a Transkripsiyon Dağılımının Tek-hücre RNA Sekans Analizi Yöntemi ile İncelenmesi	44
4.10. Bmpr1a'nın Plazma Hücre Farklılaşmasındaki Etkisinin İn-vitro Araştırılması	48
4.11. Bmpr1a Ekspresyonun Zaman İçinde Değişiminin <i>Bmpr1a.eGFP</i> Fare Modeli ile İncelenmesi	51
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	60
7. KAYNAKLAR	
8. EKLER	
Ek-1: Çalışma arkadaşlarının deneylere katkıları	
Ek-2: Orijinallik Raporu	
Ek-3: Dijital Makbuz	

SİMGELER VE KISALTMALAR

AECM	AminoEtilKarboksiMetil
ActR-II	Aktivin tip II reseptör
ActR-IIB	Aktivin tip IIB reseptör
AICDA	Aktivasyon uyarılmış sitidin deaminaz
ALK1	Aktivin reseptör benzeri kinaz-1
AMP	Adenozin Monofosfat
APRIL	Çoğalma uyarıcı ligand
BACH2	<i>BTB domain and CNC homolog 2</i>
BAFF	B-hücre aktive edici faktör
BAMBI	Kemik morfogenetik protein ve aktivin membran-bağlı inhibitör
BCIP	5-bromo-4-kloro-3 indolil fosfat
Bcl6	B-hücre lenfoma 6
BCR	B Hücre Reseptörü
Blimp-1	B lenfosit uyarıcı maturasyon protein 1
BMP	Kemik Morfogenetik Protein
BMPR-	Kemik Morfogenetik Protein Reseptör
BMPR1A	Kemik Morfogenetik Protein Reseptör 1A
<i>Bmpr1a</i> geni	<i>Kemik morfogenetik protein reseptör 1A geni</i>
BSA	Sığır serum albümin
°C	Derece santigrat
CCR-	C-C Motif Kemokin Reseptör
CD40L	CD40 Ligandı
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CGG	Tavuk gamma globulini
Co-Smads	Ortak partner Smad
COVID-19	Koronavirüs Hastalığı
Chd	Chordin
Cre-	Cre rekombinaz enzimi aracılı

CREB/ATF	Siklik AMP cevap eleman bağlayıcı protein/aktivasyon transkripsiyon faktörü
CXCR-	Kemokin Reseptör
CXCL	Kemokin Ligand
FKBP1A	FK506-bağlayıcı reseptör protein 1A
Fx	Floks
GMBH	Germinal Merkez B Hücreleri
HBH	Hafıza B Hücreleri
HPRT	Hipoksantin fosforiboziltransferaz
Ig-	İmmüoglobulin
IL-	İnterlökin
IRES-	İç Ribozom Giriş Bölgesi
IRF4	Interferon düzenleyici faktör 4
IRF8	Interferon düzenleyici faktör 8
kg	Kilogram
Kİ	Kemik iliği
KİPH, KİPC	Kemik iliği Plazma Hücreleri
LPS	Lipopolisakkarid
mRNA	Mesajcı RNA
ml	Mililitre
Neo/KanR	Neomisin/Kanamisin rezistansı
ng/ml	Nanogram/mililitre
NKT	Doğal Öldürücü T Hücreler
nm	Nanometre
Nog	Noggin
NP-	4-hidroksi 3-nitrofenilasetil hapteni
OD	Optik densite
PAX5	Paired Box Protein 5
PBS	Fosfatla tamponlanmış saline
PB	Plazmablast

PC	Plazma Hücreleri
qPCR	Kuantitatif PCR
RAG1/RAG2	Rekombinaz enzim kompleksi
R-Smads	Reseptör-regüle Smad
SOST	Sklerostin
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü- β
Tdt	Terminal deoksinükleotidil transferaz
Tsg	Twisted gastrulasyon
$\mu\text{g/ml}$	Mikrogram/mililitre
μl	Mikrolitre
UMAP	Tek-form Çoğaltma Yaklaşımı ve Projeksiyonu
WT	Doğada bulunan tip
<i>Xbp-1</i>	X-bağlayıcı protein 1
3' UTR	Kodlanmayan 3 primer ucu
2019-nCoV	2019 yeni-tip koronavirüs

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. B hücre gelişimi ve farklılaşması. (27)'den uyarlanmıştır.	6
3.1. ELISpot deney basamakları	24
3.2. ELISA deney basamakları	25
4.1. Germinal merkez B hücrelerinde ve hafıza B hücrelerinde Bmpr1a mRNA ekspresyonunun naif B hücrelere göre qPCR yöntemi ile karşılaştırılması	29
4.2. Dalak plazmablastlarında (Dalak PB), dalak plazma hücrelerinde (Dalak PC), kemik iliği plazmablastlarında (KİPB), kemik iliği plazma hücrelerinde (KİPH) Bmpr1a mRNA ekspresyonunun naif B hücrelere göre qPCR yöntemi ile karşılaştırılması	30
4.3. Bmpr1a mRNA düzeyi çalışmaları için B hücre alt tiplerinin akım sitometri ile ayrıştırılma stratejisi	31
4.4. İmmünizasyon sonrası izole edilen kemik iliği plazmablastlarında (D31-33 KİPB) ve kemik iliği plazma hücrelerinde (D31-33 KİPC) Bmpr1a mRNA ekspresyonunun immünize edilmeyen kemik iliği plazmablast (D0 KİPB) ve plazma hücrelerine (D0 KİPC) göre qPCR ile karşılaştırılması	32
4.5. Bmpr1a ^{fx/fx} CD19.Cre ^{+/-} farelerde Bmpr1a allel rekombinasyonunun B hücre spesifikliğinin ve etkinliğinin incelenmesi.	34
4.6. Bmpr1a ^{fx/fx} CD19.Cre ^{+/-} farelerde Bmpr1a allel rekombinasyonunun B hücre spesifik olduğunu saptamak için yapılan akım sitometri deneylerinde hücrelerin fenotipik ayrıştırılma stratejisi	35
4.7. İmmünize edilen Bmpr1a ^{fx/fx} CD19.Cre ^{+/-} ve Bmpr1a ^{WT/WT} CD19.Cre ⁺ farelerde antijen spesifik germinal merkez hücrelerinin (CD95 ^{hi} CD38 ⁻ NIP ⁺ Igk ^{neg}) toplam B hücreler arasındaki yüzdelерinin belli zamanda aralıklarında değerlendirilmesi	36
4.8. Dalak ve kemik iliğindeki plazma hücrelerinin/plazmablastların Bmpr1a geni eksikliğindeki değişiminin Elispot testi ile Bmpr1a ^{fx/fx} CD19.Cre ^{+/-} (açık halka, kesik çizgi) ve CD19.Cre ^{+/-} (koyu siyah halka, düz çizgi) farelerde değerlendirilmesi	38
4.9. Kemik iliğindeki plazma hücrelerinin toplam kemik iliği hücreleri arasındaki yüzdesinin Bmpr1a geni eksik olan farelerde WT farelere göre akım-sitometri ile karşılaştırılması	39
4.10. BMPR1A'nın B hücre gelişimi sırasında gerçekleşen sınıf değişimi mekanizması üzerindeki etkisinin araştırılması	41

- 4.11.** Yüksek afiniteli (NP2 bağlayan) ve düşük afiniteli (NP19 bağlayan) IgG1 ve IgM serum antikor seviyelerinin Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-} ve CD19.Cre^{+/-} farelerde ELISA testi ile karşılaştırılması 43
- 4.12.** BMPR1A'nın T-bağımsız B hücre cevabına etkisinin EliSpot deneyi ile araştırılması 44
- 4.13.** Bmpr1a^{fx/fx} CD19.Cre^{+/-} (Bmpr1a Fx/Fx) ve CD19.Cre^{+/-} (WT) kontrol farelerden ayrıştırılan hücrelerin tek-hücre RNA sekanlanslaması sonucunda transkriptik özelliklerine göre UMAP ile kümelere ayrıştırılması 45
- 4.14.** Bmpr1a^{fx/fx} ve WT kontrol farelerden tek-hücre gen analizi sonucunda oluşan kümelerin içerdiği hücre sayısı ve yüzde dağılımı 46
- 4.15.** Tek-hücre RNA sekans analizi sonucunda Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-} (Bmpr1a Fx/Fx) ve CD19.Cre^{+/-} (WT) farelerde oluşan germinal merkez alt-kümelerindeki Bmpr1a ifadesinin dağılımı 47
- 4.16.** Bilinen transkripsiyon faktörlerinin kümelerdeki ifadesinin değerlendirilmesi ile CD19.Cre^{+/-} WT farelerde küme 5'in transkripsiyon özelliklerinin ve ilişkili olduğu hücre grubunun saptanması 48
- 4.17.** BMPR1A'nın dalak naive B hücrelerinden plazma hücrelerine farklılaşmasına etkisinin araştırılması 50
- 4.18.** Germinal merkez hücrelerinde eGFP floresanının yüksek Bmpr1a ifadesi ile ilişkili olduğunun gösterilmesi 52
- 4.19.** Germinal B hücrelerinde Bmpr1a ifadesinin akım sitometri kullanılarak Bmpr1a.EGFP farelerinde GFP floresan analizi ile izlenmesi 53
- 4.20.** Kemik iliği plazma hücreleri (KİPH) ve plazmablastlarında (KİPB) Bmpr1a ifadesinin akım sitometri ile Bmpr1a.EGFP farelerinde analizi 55

TABLULAR

Tablo		Sayfa
3.1.	Çalışmada kullanılan antikorlar	19
3.2.	Çalışmada kullanılan primerler	21

1. GİRİŞ

Enfeksiyonlara karşı etkili, güçlü ve yüksek kalitede immün cevap oluşturabilmek ve bu immün yanıtın tekrarlanabilirliği sağlıklı yaşamın önemli bir kriteridir. Uzun süre dolaşımında kalan antikorlar, kemik iliğinde bulunan uzun ömürlü plazma hücresi, hafıza B hücresi ve hafıza T hücresinden oluşan immünolojik hafıza; doğal immünitenin ve aşırıya bağlı immün yanıtın temelini oluşturmaktadır.

T-bağımlı antijene maruziyetten sonra gerçekleşen B-T hücre etkileşimi etkin bir immün yanıt için önemli bir aşamadır. Bu etkileşim sonucunda, antijen ile aktifleşen B hücreler çoğalmaya başlar ve üç ayrı yol ile farklı hücre tiplerine yönlendirilir: ektrafoliküler antikör sentezleyen hücreler, germinal merkez-bağımsız hafıza B hücreleri ve germinal merkeze giren hücreler (1). Foliküler alanda gerçekleşen etkileşim sonucunda çoğalan B hücreleri farklılaşarak çok miktarda, düşük afiniteli antikör üreten, kısa ömürlü plazmablastlara dönüşür (2). Bu erken immün yanıt sırasında bazı hücreler antikör sentezleyen uzun ömürlü hücrelere de dönüşebilir ve uzun süreli antikör titresine katkı sağlar (3). Mutasyona uğramamış, düşük afiniteli ve klasik hafıza belirteçlerini az miktarda bulunduran germinal merkez bağımsız hafıza B hücreleri de erken immün yanıt sırasında ektrafoliküler alanda üretilir (4, 5). Birkaç gün sonra etkileşim içinde olan bazı B ve T hücreleri Bcl6 ekspresyonuna başlar, kemokin ve kemokin reseptör ekspresyonu değişir ve foliküle göç eder (6). Burada çoğalmaya devam eden hücreler büyüyen germinal merkezi oluşturur (7). Germinal merkezin koyu zon bölgesinde hızla çoğalan B hücreler, somatik hipermutasyona uğrar ve antijene farklı afiniteleri olan hücreler üretilir (8). Akabinde açık zonda foliküler T-yardımcı hücreleri ve foliküler dendritik hücrelerle etkileşim sonucunda afinite bağımlı seçim gerçekleşir (8).

Sonuçta, tam olarak anlaşılabilen bir mekanizmayla germinal merkez B hücreleri, plazma hücrelerine ve hafıza B hücrelerine farklılaşır (9, 10). Plazma hücreleri, antijenlere yeniden maruz kalma durumunda ilk savunma hattı olarak konağı koruyan antikörlerin devamlılığını sağlar. Savunma için yeterli antikör bulunmadığında, hafıza B hücreleri yüksek afiniteli yeni antikörler üretmek için aktifleşir (11).

Germinal merkez reaksiyonlarının en üst noktasında germinal merkez B hücreleri çok sayıda bulunurken, hafıza B hücresi ve plazma hücre sayısının az olması, farklılaşmayı tetikleyen olayların nadir olduğu düşüncesini uyandırır. Bu olaylar çok iyi anlaşılammıştır. T hücre etkileşiminin bu farklılaşmada yapıcı olduğu bilinmektedir. CD40L sinyalinin in vivo ortamda germinal merkez B hücrelerinin hafıza hücre fenotipine dönüşümüne öncülük ettiği daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (12). T hücreler tarafından üretilen IL-10, IL-2, CD40L, CD24 gibi sitokinler hafıza B ve plazma hücresine farklılaşmayı etkilemektedir (13).

Daha önce yapılan çalışmalarda, germinal merkez mikroçevresinin hafıza B hücresi ve plazma hücresi gelişimini etkilediği gösterilmiştir (14, 15). Ancak bu sürecin nasıl gerçekleştiği tam olarak aydınlatılamamıştır. Hafıza B hücreleri ve plazma hücresi kompartmanlarına seçilimin farklı bir süreç olduğu anlaşılmış ancak bunu belirleyen kriterlerin neler olduğu anlaşılammıştır. Hafıza B hücrelerini daha iyi anlamak amacıyla Tomayko ve ark. (16) tarafından daha önce yapılan gene ekspresyon profilendirme çalışmalarında, hafıza B hücreleri ile onların naif ve germinal merkez hücre öncüleri arasında gen ekspresyonunda farklılıklar olduğu ortaya konmuştur. Kök hücrelere kendini yenileme ve farklılaşma niteliği sağlayan genlerin, hafıza B hücrelerinde artmış olduğu saptanmıştır (16). Bu bulgu, hafıza B hücrelerinin sekonder kök hücrelere benzer uzun ömürlü olma, kendini yenileme ve asimetric farklılaşma özellikleri olduğunu öne süren diğer çalışmaları destekleyicidir (17, 18). Bu genler arasında, kemik morfogenetik protein reseptör1a (bone morphogenetic protein receptor 1a, BMPR1A) önemlidir, çünkü hem insan hem de fare hafıza B hücrelerinde arttığı farklı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (16, 19).

BMPR1A, Smad molekülleri aracılığı ile sinyal iletimini gerçekleştiren transmembran serin/treonin kinaz reseptörüdür. Kemik morfogenetik protein (Bmp) ailesi üyelerinin BMPR1A reseptörüne bağlanması sonucu aktiveşen sinyal yolağı, hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler (20, 21). Çeşitli Bmp agonist ve antagonistleri tarafından uyarılan Bmp sinyal yolağının, B hücre cevabının şekillenmesinde, plazma hücre farklılaşmasında ve hafıza B hücresi varlığını sürdürmesinde önemli rol oynadığı farklı çalışmalarda öne sürülmüştür (22-25). In-vitro çalışmalar, insan naif ve hafıza B hücrelerinde Bmp sinyalinin uyarılması sonucunda, plazma hücre farklılaşmasının ve CD40L/IL21 aracılı immünoglobulin

üretimini etkilendiğini göstermiştir (22). Ayrıca, Bmp7'nin in-vitro kültür çalışmalarında naif, hafıza B ve germinal merkez B hücrelerinde apoptozisi uyardığı saptanmıştır (23).

Özet olarak, tüm bu çalışmalar germinal merkez hücre reaksiyonlarında, hafıza B hücresi ve plazma hücresi oluşumunda BMP sinyal yolağının etkili, kritik bir rolü olduğu hipotezini desteklemektedir. BMPR1A daha önce B hücre cevabında çok az çalışılmış olup germinal merkez B hücreleri ve plazma hücresi üzerindeki etkisini gösteren in-vivo çalışmalar sınırlıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adaptif İmmün Yanıt ve B Hücre İmmün Cevabı

Güçlü bir immün sistem hematopoetik kök hücrelerden farklılaşan ve dolaşıma katılan lökositler aracılığıyla oluşur. Enfeksiyonlara karşı dengeli bir immün yanıtın oluşturulması ise genetik ve çevresel faktörlerin etkisinde gerçekleşir. Adaptif immün özellikler genetik faktörlerden daha çok etkilenirken, doğal immün yanıt çevresel faktörlerden daha çok etkilenir. Özellikle, diyet, mikrobiyom ve enfeksiyonlar gibi çevresel faktörler doğal öldürücü T hücreler (NKT), $\gamma\delta$ T hücreler, monositler ve B1 hücreler üzerinde etkiliyken; dendritik, B2 hücre, CD4 ve CD8 hücreler genetik faktörlerden daha çok etkilenir (26).

Adaptif immün sistem içinde sınıflandırılan B hücrelerin pek çok önemli rolleri vardır. Antijen sunma, sitokin sentezleme, lenf dokularını oluşturma ve daha çok bilindiği gibi antijene bağlanan antikorları sentezleme bu görevlerden bazılarıdır (27). Antijen spesifik antikorlar, yapıları birbirinin aynı olan ağır zincir ve hafif zincirlerden oluşur. Bu zincirlerdeki değişken bölgeler spesifik antijenleri bağlama özelliğine sahipken, sabit bölgeler immün sistemin diğer elemanları ile etkileşir (28).

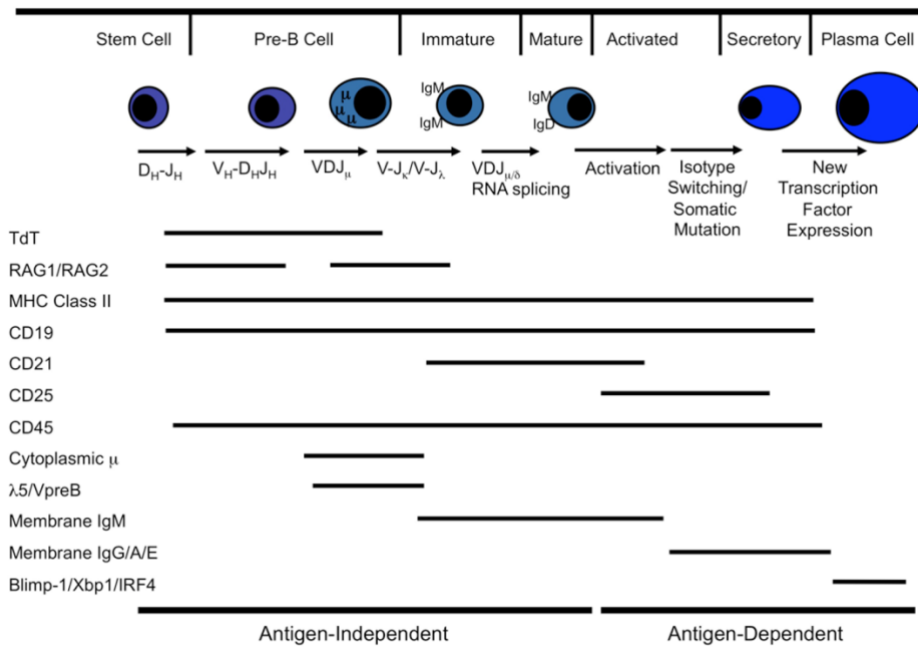
Kemik iliğinde B hücreler kök hücrelerden IL-7 etkisinde farklılaşır ve IgM/IgD yüzey ifadesi taşıyan olgun B hücrelerine dönüşürler. Bu gelişim sürecinde B hücreler rekombinaz enzim kompleksi (RAG1/RAG2) aracılığı ile peş peşe ağır ve hafif zincir düzenlemesi sürecinden geçer. Bu süreçte aktif olan terminal deoksiniükleotidil transferaz (Terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) enzimi de rastgele nükleik asit eklemeleri yaparak V(D)J rekombinasyonuna ek olarak bağlantı bölgelerine değişkenlik ekleyerek B hücre antikorlarına daha da çeşitlilik kazandırır (**Şekil 2.1**, (29)).

B hücreler buldukları yere göre farklı alt gruplara ayrılır. Olgun B hücrelerin çoğu foliküllerde bulunur ve foliküler B hücreler olarak adlandırılır. Dalakta kırmızı ve beyaz pulpa arasına yerleşen marjinal zon hücreleri, periton ve plöral kavitelere bulunan B1 hücreleri de diğer B hücre gruplarından. Uzun ömürlü, aktive olmamış, sessiz (*quiescent*) foliküler B hücreleri PAX5 (paired box protein 5), PU.1, interferon düzenleyici faktör 8 (IRF8), BACH2 (BTB domain and CNC homolog 2) eksprese

ederken, antijenler tarafından aktive olan B hücreleri bunlara ek olarak düşük düzeyde IRF4 ifade eder. Marjinal zon ve B1 hücreleri de foliküler B hücreler gibi PAX5, PU.1-IRF8, BACH2 ifade ederler. Bu hücrelerin farklı özelliği ise kendilerini yenileyebilmeleridir (30). İlginç olarak PAX5'in sadece sessiz B hücrelerde değil, germinal merkez ve hafıza B hücrelerinde de eksprese olması B hücrelerinin farklı alt grup ve gelişim basamaklarındaki global bir belirteç olduğunu göstermektedir. Bunun yanında PAX5 plazma B hücre farklılaşması sırasında yok olur (31).

Antijenle etkileşen B hücreler antijenin yapısına bağlı olarak ve bunun sonucunda T hücrelerden gelen yardıma bağlı olarak farklı immün cevaplar oluşturur. B hücre yüzey reseptörlerinin (BCR) T-bağımlı antijenle etkileşmesi sonucu kısmen aktifleşen B hücreler dalakta T-B hücre sınırına göç eder, çoğalır ve T hücrelerle etkileşir. Dalakta T-B hücre sınırında ya da lenf nodlarında foliküller arası alanda etkileşmeye devam eden B ve T hücrelerinde Bcl6 transkripsiyonel baskılayıcı faktör artışı olur ve bununla beraber diğer küçük moleküllerle etkileşen reseptörler ifade edilir. Sonuçta çoğalan hücreler foliküle göç ederek germinal merkezi oluşturur (32).

B hücre cevabı T hücre yardımı olmadan da gerçekleşebilir. Monomer halinde olan antijenler T hücrelerden sentezlenen ko-uyaran sitokinler olmadığında B hücre aktivasyonu sağlayamazken, bakteriyel lipopolisakkarit gibi bazı polimer yapıdaki polisakkaritler ve proteinler B hücrelerin antikorlarını birbirine bağlayarak immün yanıt oluşturur. Bu yanıtta oluşan antikorlar somatik mutasyona uğramadığı için daha zayıf şekilde antijenlere bağlanma gücüne sahiptir (29).



Şekil 2.1. B hücre gelişimi ve farklılaşması. (29)'den uyarlanmıştır.

2.1.1. Germinal Merkez B Hücreleri

Enfeksiyonlara karşı savaşta aşının önemi uzun yıllar önce anlaşılmış ve ortaya çıkan her yeni enfeksiyon etkili bir aşı geliştirmenin kritik bir basamak olduğunu bize hatırlatmıştır. 2019-nCoV olarak adlandırılan yeni bir virüsün COVID-19 pandemisine yol açması etkili ve hızlı bir aşı ile sağlanacak koruyucu immünitinin ne kadar önemli olduğunu tekrar göstermiştir (33). Çoğu başarılı aşı etkin koruma için yüksek afiniteli antikorların oluşturulduğu immün cevabı temel alır. Bu cevabın kilit taşları T hücreler ve uyardıkları B hücrelerin çoğalması ile oluşan germinal merkezlerdir (34). Bu nedenle germinal merkez reaksiyonlarını ve sonucunda oluşan uzun ömürlü plazma hücresi ve hafıza B hücrelerini anlamak önemlidir.

Aşı antijenlerinin vücuda girmesi ile beraber, 'tehlike sinyalleri' monositleri ve antijen sunucu hücre grubunun önemli üyeleri olan dendritik hücreleri aşı bölgesine çağırır. Burada antijenlerle etkileşen olgunlaşmamış dendritik hücreler hızlı bir olgunlaşma sürecinden geçerek yüzey moleküllerini değiştirirler. Bu hücreler tarafından hücre içine alınan antijenler lenfatikler aracılığı ile lenf nodlarına ve kan

aracılığı ile dalağa taşınır. Burada dendritik hücreler T ve B hücreleri ile etkileşime geçer ve onları uyarır (35).

Enfeksiyon ya da aşılama ile lenf nodlarına ve dalağa ulaşan antijenlere karşı temel olarak üç farklı yanıt oluşturulur: ektrafolliküler cevap, erken hafıza B hücrelerine farklılaşma ve germinal merkez reaksiyonları (1). İlk adımda ektrafolliküler alanda hızlı bir şekilde B hücreleri çoğalır, sınıf-değişimi mekanizmasından geçer ve antikor sentezleyen kısa ömürlü plazma hücrelerine farklılaşır (10). Bu cevap sırasında somatik hipermutasyon olarak adlandırılan yüksek afiniteleri antikorların sentezlenmesinde önemli olan mekanizma çok etkin işlemediği için oluşan plazma hücreleri düşük/orta afinitelidir (1). Antijenik uyarım sonrası dalakta ve lenf nodlarında antijene özgü B hücrelerinin çoğaldığı ve farklılaştığı dinamik yapılar oluşur. Germinal merkez olarak adlandırılan bu yapılarda, T hücre ve folliküler dendritik hücrelerin yardımıyla B hücrelerin antikor sınıf-değişimi, afinite olgunlaşması, çoğalması ve seçilmesi gerçekleşir. Sonuçta antijene özgü yüksek afiniteli B hücreleri uzun ömürlü plazma hücrelerine ve hafıza B hücrelerine farklılaşır.

Germinal merkez temelde koyu (*dark*) ve açık (*light*) zon olarak adlandırılan iki ayrı kompartmandan oluşur. Koyu zonda yüksek düzeyde CXCR4 ifadesi olan sentroblastlar CXCL-12 sentezleyen retiküler hücre ağı ile etkileşir, çoğalır ve somatik hipermutasyona uğrar (11, 36). Sonucunda oluşan CXCR-5 eksprese eden sentrositler, CXCL-13 sitokinin olduğu açık zona göç eder (11). Açık zonda sentrositler foliküler dendritik hücrelerde bulunan antijenleri yakalayarak T-yardımcı hücrelerine sunarlar. T-yardımcı hücrelerle arasındaki etkileşim sonucunda yaşam sinyallerini alan sentrosit hücreleri 'pozitif seçim' ile yeniden koyu zona girerek tekrar çoğalma ve somatik mutasyona uğrayarak afinitesi daha yüksek olan hücrelere dönüşürler (37). Bu sırada antijenle yeterince etkileşmeyen ve hasarlı BCR reseptörü taşıyan B hücreleri ile kendi antijenlerimize karşı reaktif olan B hücreleri negatif seleksiyona uğrar ve apoptoza gider (38). Aynı zamanda açık zondaki sinyallere bağlı olarak hücrelerin bir kısmı plazma hücresi ve hafıza B hücresi kompartmanlarına seçilir. Bu kompartmanlara seçilen hücreler koyu zona girer ve tekrar açık zona dönmeden T hücre-koyu zon sınırından germinal merkezi terk eder (38, 39).

Germinal merkez reaksiyonları sırasında gerçekleşen pozitif ve negatif seçim, plazma ve hafıza B hücresi kompartmanlarına farklılaşma gibi olaylar germinal merkez hücrelerinin kaderini belirleyen kritik basamaklardır. Germinal merkez hücrelerinin gelişimleri sırasında kendi kendilerini yenilemeleri, farklılaşmaları ve kader seçimi mekanizmalarını kullanması germinal merkez hücrelerinin kök-hücre gibi özellikleri olduğu düşüncesini uyandırır. Bununla ilişkili olarak Bcl6 geninin germinal merkez B hücrelerinde ifade edildiği ve germinal merkez B hücrelerine kendini yenileme özelliği sağladığı daha önce öne sürülmüştür (17).

Naif B hücrelerden germinal merkez B hücrelerine, sonrasında plazma hücresi ve hafıza B hücrelerine dönüşümünde hücrelerde oluşan transkripsiyonal farklılıklar ilgi çekicidir. Germinal merkez ve plazma hücreleri ayırt edilebilir transkripsiyon özelliklerine sahipken, naif ve hafıza B hücreleri benzer transkripsiyon özellikleri taşır (16, 40). *Ets1*, *Klf2*, *Klf3*, *Foxp1* ve *Notch2* gibi genler hem hafıza hem de naif B hücrelerde artmış olarak gözlenir (40). Bu genlerin her iki grupta da apoptozu ya da hücre bölünmesini önleyici rollerinin olabileceğini düşündürür.

Hafıza B hücrelerinin önemli bir özelliği antijene cevap verdikten sonra uzun süre canlılıklarını sürdürerek aktif olmadan kalabilmeleridir. Ancak naif B hücrelerden farklı olarak, hafıza B hücreleri uzun süre yaşayabilmek için *BAFF* ve *APRIL* sinyallerine bağlı değildir (41). Hafıza B hücrelerinin uzun süre korunmasını sağlayan özelliklerinden biri de kendini yenilebilmesidir. Bu özellikleri bakımından erken hematopoietik kök hücrelere benzerler. Hafıza B hücreleriyle hematopoietik kök hücreler arasındaki bu benzerlik daha önce yapılan çalışmalarda genetik bakımdan desteklenmiştir. Hafıza B hücrelerinde naif B hücrelere göre artmış olan transkriptlere bakıldığında bunların uzun-dönem hematopoietik kök hücrelerde kısa-dönem hematopoietik kök hücrelere göre daha çok bulunduğu, bu genlerin artmış ifadesinin uzun dönem yaşam kapasitesiyle doğru orantılı olduğu saptanmıştır (19) Bhattacharya D, ve ark. (40) *Klf9*, *Ski*, *Mll3*, *Pml*, *Tcf4*, ve *Bmi1* gibi hematopoietik kök hücrelerde artmış ekspresyonu olan transkripsiyonel düzenleyici faktörlerin hafıza B hücrelerinde de artmış olduğunu saptamıştır. Tüm bu bulgular germinal merkez dinamiklerinin ve sonucunda oluşan hafıza B hücrelerinin ve plazma hücrelerinin oluşumunun karmaşık ve pek çok bilinmeyenle örülü olduğunu destekler.

2.1.2. Plazma Hücre Gelişimi

Antikor sentezleyen hücreler olarak adlandırılan plazmablastlar ve plazma hücreleri humoral immün sistemin kilit taşı olarak görev yapar. Plazmablastlar periferik lenfoid organlarda ektrafoliküler alanda oluşturulur. Kısa süreli yaşayan, dolaşıma katılan ve görece olarak düşük seviyede antikor sentezleyen bu hücreler erken evre immün cevapta önemlidir (30). Germinal merkezden çoğalan ve kemik iliğindeki nişlerinde uzun süre canlı kalan ve dolaşıma katılmayan hücreler ise uzun-süreli plazma hücreleri dediğimiz grubu oluşturur (42).

B hücrelerinin farklılaşmasında son aşama olan plazma hücrelerinin germinal merkezde farklılaşma mekanizması, farklılaşan plazma hücrelerinin kemik iliğindeki ve diğer organlardaki nişlerine göç etmesinde etkili sinyaller ve nişlerinde uzun süre canlılıklarını sürdürmede gerekli yaşam sinyalleri uzun yıllardır çalışma konusu olmuştur. Bu süreçte germinal merkezde plazma hücre farklılaşmasını tetikleyen genlerin ve transkripsiyon faktörlerinin değişimlerinin aydınlatılması kritik olmuştur. B lenfosit uyarıcı maturasyon protein 1 (*B lymphocyte induced maturation protein 1, Blimp-1*)'nin keşfi de bu noktada önemli bir dönüm noktasıdır (43). Bununla beraber X-bağlayıcı protein 1 (*X-box binding protein 1, Xbp-1*) ve interferon düzenleyici faktör 4 (*interferon regulatory factor 4, IRF-4*) transkripsiyon faktörlerinin analizi de plazma hücre farklılaşmasını anlamaya ışık tutmuştur. Blimp-1, *Prdm1* geni tarafından kodlanan ve terminal B hücre farklılaşmasında rol alan bir faktördür (44). Irf-4 *Igk* geni rekombinasyonu, sınıf-değişim mekanizması, germinal merkez kaderinin belirlenmesi ve plazma hücresi farklılaşması gibi olaylarda rol alır (45). Xbp-1 osteoblast, kondroblast, karaciğer gibi çeşitli organlarda bulunan CREB/ATF (cyclic AMP response element binding protein/activating transcription factor) ailesi transkripsiyon faktörlerindedir. Önemli olarak Xbp-1 plazma hücre farklılaşmasının son yolağını düzenler ve eksikliğinde antikor sentezi azalır (46). Plazma hücre farklılaşmasını tetikleyen faktörler yanında B hücre gelişimini ve canlılığını destekleyen ve plazma hücre farklılaşmasını baskılayan faktörleri anlamak da kritiktir. *Pax5, Bcl6, Bach2* ve *MITF* bunların başında gelir (45). Pax5, lenfosit öncü hücrelerin B hücre kaderine yönlendirilmesini tetikledikten sonra B hücre gelişiminin farklı basamaklarında ve alt gruplarında sabit seviyede ekspresyon olur (31, 47). Geçici olarak

düşük seviyede *IRF-4* ifadesi *Bcl6* ve *AICDA* (aktivasyon uyarılmış sitidin deaminaz) ifadesi artışını ve germinal merkez B hücre farklılaşmasını sağlar. Yüksek seviyede devamlı artmış *IRF-4* ise daha aşağı yolağındaki *Blimp1* 'i uyarır. Blimp-1 ekspresyonu plazma hücrelerinin farklılaşmasını uyaran sinyaller gönderir ve *Xbp-1* ifadesini uyarır. Bununla beraber, *IRF-4/Blimp1* pozitif besleme lupu *PAX5*'i baskılar, *Xpb1* ifadesini uyarır bu da akabinde antikor sentezini sağlar (39, 48). Tanımlanmış olan bu plazma hücre farklılaşma mekanizmasına daha ayrıntılı bakıldığında ise plazma hücre farklılaşması için Blimp-1 ifadesinin şart olmadığı görülmüştür. Blimp-1 tam bir plazma hücre farklılaşması ve yüksek düzeyde antikor sentezi için gerekirken, erken evre plazma kaderine yönlendirilme sırasında kritik değildir. Plazma hücresi-öncesi olarak (*pre-plasma cell*) adlandırılan popülasyonda Blimp1 ifadesi olmaksızın, Pax5 ve Bcl6 ifadesinin az olduğu ve plazma hücresi farklılaşmasının gerçekleştiği saptanmıştır (30, 48).

B hücre devamını sağlayıcı faktörler ile plazma hücre farklılaşmasını sağlayan faktörler arasında denge bozukluğu olduğunda B hücreden plazma hücre farklılaşması geçişi etkilenir ve sonuçta geç-aşama B hücre lenfomaları gelişebilir. Kısmi olarak plazma hücre farklılaşması taşıyan bu agresif lenfomaları tanımlamakta ve gruplamakta yukarıda bahsedilen markerler (Blimp-1, Xbp-1, Pax-5, CD138) kullanılır (49).

Germinal merkezde plazma hücrelerinin farklılaşması transkripsiyon faktörlerinin düzenlemesi yanında zamansallıkla da ilişkilidir. Germinal merkezin farklılaşarak oluşturduğu diğer bir hücre grubu olan hafıza B hücreleri plazma B hücrelerine göre daha erken evrede açık zondaki düşük afiniteli hücrelerden oluşur. Bu nedenle hafıza B hücreleri daha az mutasyona sahiptir ve daha düşük afinitelidir. Buna karşın plazma hücreleri germinal merkezde daha uzun süre kalır ve somatik hipermutasyonların birikimi yüksek afiniteli hücrelerin oluşumunu sağlar (39, 50).

Germinal merkezden plazma farklılaşması sırasında plazma hücre kaderine yönlenen hücrelerin plazmablast aşamasından geçerek mi plazma hücresi olduğu yoksa germinal merkezden doğrudan plazma hücresi olarak çıktığı soru işareti olarak kalmıştır. *Blimp1*, post-mitotik plazma hücrelerinde yüksek düzeyde ifade olurken, plazmablastlarda orta düzeyde ifade olur (51). Blimp-1'in yeni immünize edilmiş farelerin kanında dolaşan plazma hücrelerinde orta seviyede ifade olması, bunun

yanında kemik iliği plazma hücrelerinde yüksek düzeyde ifade olması germinal merkezden çıkan hücrelerin plazmablast aşamasından geçerek kemik iliğine yerleştiğini düşündürmektedir (52) .

Germinal merkezden gelişen plazma hücrelerinin başta kemik iliği olmak üzere vücuttaki immün dokulara nasıl yerleştiği ve uzun süre canlılıklarını nasıl korudukları pek çok araştırmanın konusu olmuştur. Hafıza B hücrelerinden ve naive hücrelerden farklılaşma olmadan ve DNA sentezi olmadan daha önce oluşan plazma hücreleri uzun süre canlılıklarını sürdürebilir (53). Plazma hücrelerinin uzun ömürlü olması ve canlılıklarını sürdürebilmesi kendi iç mekanizmaları yanında kemik iliği, sekonder lenf nodları, mukoza gibi nişlerdeki dışarıdan gelen uyarılarla mümkündür (54). Çoğalma uyarıcılı ligand (APRIL), IL-6, B-hücre aktive edici faktör (BAFF), CD44 ve CXCL12 uzun ömürlü ve kısa ömürlü plazma hücrelerinin canlı kalmasını destekler (54). CCR9 ve CCR10 plazmablastların ince ve kalın bağırsak mukozasına yerleşmesini sağlarken, APRIL bağırsak lamina propriasında plazma hücrelerinin yaşamasını destekler. Deride oluşan inflamasyon plazma hücrelerinin sayısı ile beraber APRIL, BAFF gibi plazma hücresi canlılık faktörlerinin de artmış ifadesini tetikler (55, 56).

2.2. Kemik Morfogenetik Protein Reseptör 1A

Kemik morfogenetik protein reseptör 1A geni (*Bmpr1a* geni), kemik morfogenetik proteinlere (Bmp) ve Bmp antagonistlerine bağlanan transmembran serin/treonin kinaz reseptörünü kodlar. Kemik morfogenetik proteinler TGF- β , aktivin/inhibin, Nodal gibi proteinlerle beraber TGF- β süper ailesinin bir üyesidir. TGF- β süper ailesi proteinlerinin ortak özelliği ise serin/treonin kinaz reseptörlerine bağlanarak Smad bağımlı ya da bağımsız sinyal yollarını uyarmalarıdır. TGF- β ailesi içinde yer alan Bmp proteinleri BMP tip 1 ve tip 2 serin/treonin kinaz reseptörlerine bağlanır. Bmp tip 1 reseptörleri beşe ayrılır: ALK1 (*Avcr11*), ALK2 (*ActR1A*), ALK3 (*BMPR1-A*), ALK4 (*ActR1b*) ve ALK6 (*BMPR1-B*). Bmp tip 2 reseptörleri ise üçe ayrılır; aktivin tip II reseptör (aktivin type II receptor, *ActR-II*), aktivin tip IIB reseptör (aktivin type IIB receptors (*ActR-IIB*) ve *BMPR-2*. Tip 1 reseptörleri ligandlarına bağlandıklarında, tip 2 reseptörü ile tetramize olurlar (57). Tip

2 reseptörlerinin devamlı aktif kinaz bölgeleri tip 1 reseptörleri fosforiller ve aktifleştirir. Sonuçta, tip 1 reseptörleri de hücre içinde bulunan reseptör-regule Smad (receptor-regulated Smads, R-Smads) lardan Smad 1, 5 ve 8'i fosforiller. Reseptör R-Smad (Smad1/5/8)'lar ortak partner Smad (common-partners Smads, Co-Smads) olarak adlandırılan Smad 4 ile kompleks oluşturur. Oluşan kompleks hücre çekirdeğine girer ve burada Smad bağlayıcı elemanlar olarak bilinen DNA'daki belli sekanslara bağlanarak; Runx, Menin, YY1 gibi proteinlerle fiziksel olarak etkileşerek; Hoxc-8 and Msx1 gibi homeobox proteinleri ile etkileşerek, transkripsiyonel ko-aktivator ya ko-süpresörleri toplayarak hedef genlerin transkripsiyonunu etkiler. Sonuçta, Bmp sinyal yolağı hücre farklılaşması, çoğalma, hücre kaderi gibi olaylarla ilgili genleri etkileyerek kritik biyolojik olaylarda rol alır (20).

1960'larda kemik oluşumunu uyaran proteinler olarak keşfedilen Bmp'ler Bmp2/4, Bmp 5/6/7/8, Bmp9/10 ve Bmp 12/13/14 (GDF 5/6/7) olarak alt gruplara ayrılır(21). BMPR1A'nın bu ligandlardan BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, BMP10, BMP12, BMP13, BMP14'e bağlandığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (57). BMP yolağı sadece agonistlerle değil, Bmp antagonistleri, inhibitör SMAD'lar yalancı reseptörler ile de düzenlenir. Twisted gastrulation (Tsg), Chordin (Chd), Noggin (Nog), Dan family, Gremlin, Sclerostin (SOST) Bmp antagonistleri arasında sayılabilir. Bu proteinler Bmp-reseptör etkileşimini Bmp agonistlerinin epitoplarmı bloklayarak ya da onlarla yarışarak engeller (57). Bunun yanında BAMBİ olarak adlandırılan yalancı reseptör (pseudoreceptor) de serin/treoninin kinaz reseptörlerine bağlanarak BMP sinyalinin regülasyonunda rol alır. Tip 1 reseptörlerine yapısal olarak benzer olmakla beraber hücre içi kısmı bulunmayan bu reseptör tip 1 ve tip 2 reseptörleri ile etkileşerek BMP sinyalini inhibe eder (58, 59). Hücre içinde ise inhibitör- SMAD'lar, PP1 ve PP2 gibi fosfotazlar, FK506-bağlayıcı reseptör protein 1A (FKBP1A) Bmp sinyalinin negatif olarak düzenleyicileri olarak görev alır (21). BMP reseptörlerinin hücre dışında ve hücre içinde pek çok faktör ile düzenlenmesi, bu faktörlerin farklı hücrelerde ifadesinin değişmesi BMP sinyal yolağının görüldüğünden daha karmaşık olduğunu ve rollerinin anlaşılması için pek çok çalışmanın yapılması gerektiğini gösterir.

2.2.1. Kemik Morfogenetik Protein Reseptör 1A and İmmün hücre gelişimi

Zaman içinde Bmp'lerin rolü daha iyi anlaşıldıkça, sadece kemik oluşumunda değil embriyogenezde de rolleri olduğu fare gen-baskılama (knock-out) modelleri ile gösterilmiştir. Sadece embriyogenezde değil pek çok organ sisteminde hücre büyümesi, apoptoz, farklılaşma gibi olaylarda görev aldığı ve erişkin doku homeostazını etkilediği saptanmıştır (60-62). Örneğin; Bmp-7'nin böbrek, göz ve ekstremitelerde gelişiminde, Bmp-4, -7, -14'ün üreme sistemi gelişiminde, Bmp-2, -3, ve -7'nin kıkırdak yenilemesinde etkili olduğu gösterilmiştir (63).

Bmp'lerin TGF- β gibi hematopoetik sistemde de rolü olduğu bilinmektedir (64). Yapılan çalışmalar sınırlı kalmakla birlikte, Bmp'lerin hematopoietik kök hücre gelişimi, lenfoid hücre gelişimini ve olgun immün hücre gelişimini etkilediği gösterilmiştir. Bmp'ler embriyonik kök hücrelerin ve özellikle insan kord kanındaki hematopoietik kök hücrelerin kendilerini yenilemesi ve farklılaşmasında rol alır (65). Bmp-2, -4 ve -7 proteinleri hematopoietik kök hücrelerin çoğalmasını, yüzey reseptörlerini ve farklılaşmasını doz bağımlı olarak etkiler (66). Bmp2 ve Bmp7 yüksek konsantrasyonlarda insanda nadir bulunan bir hematopoietik kök hücre grubunun (CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻) çoğalmasını önlerken, Bmp-4 düşük konsantrasyonlarda bu hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarır (66).

Bmp'lerin bağlandığı Bmp reseptörlerinin hematopoetik kök hücrelerde ya da bunların kemik iliğinde nişlerini oluşturan hücreler tarafından ifade edildiğine dair çalışmalar mevcuttur. İnsan kordon kanından ve kemik iliğinden elde edilen hematopoietik kök hücrelerde BMPR-1A (ALK-3) and BMPR1-B (ALK-6) ve onların etkileştiği Smad -1,-4,-5 molekülleri eksprese edilir (66). Kemik iliğinde hematopoetik kök hücre nişinin bir üyesi olan osteoblastlar tarafından eksprese edilen BMPR1A, hematopoietik kök hücrelerin gelişimini etkiler (65).

İnsan tonsil hücrelerinden elde edilen B hücre alt grupları değerlendirildiğinde, Bmp7'nin artmış ekspresyonu görülür (23). Bmp-7'nin normal germinal merkez hücrelerinde ve lenfoma hücre dizilerinde ifadesi gözlenirken, Bmp-6'in ise bu hücreler tarafından daha düşük düzeyde ekspresyonu görülür (24). Ayrıca, insan B hücrelerinde tip I ve tip II Bmp reseptörleri eksprese olur (25). Germinal merkez B

hücrelerinde Bmp tip 1 reseptörlerinden ALK2'nin yüksek seviyeleri saptanırken naïve B hücrelerindeki seviyenin daha düşük olduğu bulunmuştur. Hafıza B hücrelerinde ise her iki grup reseptör yüksek bulunmuştur (23).

Bmp sinyal yolağının hematopoietik kök hücreler yanında olgun immün hücre gelişimini ve homeostazını etkilediği bilinmektedir. Bmp-6, in-vitro koşullarda anti-IgM ile uyarılan insan naïve B hücrelerinin (CD19⁺ CD27⁻) ve hafıza B hücrelerinin (CD19⁺ CD27⁺) çoğalmasını noggin antagonisti ile geri döndürülebilir şekilde baskılar, aynı zamanda hafıza B hücrelerinin apoptozunu uyarır (25). Benzer şekilde, naïve ve hafıza B hücreleri Bmp-7 aracılı apoptoza yatkındır.

Bmp-2, -4, -6 ve -7 insan naïve B ve hafıza B hücrelerinden CD40/IL-21 aracılı IgA, IgM, IgG immunoglobulin uyarımını baskılar (22). Buna ek olarak Bmp-6, CD40/IL-21 aracılı Xbp1 artışını inhibe ederek hafıza B hücrelerinden plazma hücre farklılaşmasını baskılar (22). CD40/IL-21 ile uyarılan GMBH'lerinde Bmp-7'nin apoptozu uyardığı ve bunun BMPR1A tip 1 reseptör Alk2/3'ten ziyade Alk4 ya da 5 aracılı olduğu saptanmıştır (23). Sonuçta, Bmp-7'nin germinal merkez hücrelerinin yaşamını sürdürmesinde negatif etki ettiği saptanmıştır (23).

Normal sağlıklı hücreler yanında lenfoma, lösemi ve multiple myelom gibi immün sistemin hastalıkları incelendiğinde Bmp proteinlerinin ve reseptörlerinin farklı ekspresyonları görülmüştür. Bmp-6 transkriptleri normal aktif insan B hücrelerinde saptandığı gibi diffüz büyük B hücre lenfomalarda da artmış düzeylerde tespit edilmiştir (67). Bmp6 normal ve hastalıklı kemik iliği plazma hücrelerinde eksprese olmakta ve bu hücrelerdeki ekspresyonu prekürsör hücreler olan hafıza B hücreleri ve poliklonal B hücrelerine göre anlamlı olarak daha fazladır. BMP reseptörlerinin ve bu sinyal yolağında rol alan SMAD'ların da kemik iliği plazma hücrelerinde ve multiple myelom hücrelerinde ifadesinin olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda Bmp6'in insan myelom hücre dizilerini ve multiple myelom hücrelerinde çoğalmayı inhibe ederken apoptozu uyardığı saptanmıştır (68). Bmp reseptörlerinden Alk-3 ve Alk-6 ya bağlanan Bmp4'ün bazı insan myelom hücrelerinde çoğalmayı önlerken apoptozu uyardığı gösterilmiştir (69). Bmp 5-6 ve 7'nin myelom hücrelerinde apoptozu uyardığı ve çoğalmayı önlediği saptanmıştır (70).

Daha önce yapılan gen ekspresyon profilendirme çalışmalarında, hafıza B hücreleri ile naïf B hücreler arasında gen ekspresyonunda farklılıklar olduğu ortaya

konmuştur. Embriyonik ve somatik kök hücelere kendini yenileme ve farklılaşma niteliği sağlayan genlerden biri olan BMPR1A'nın, Balb/c ve C57BL6/Ka farelerden ayrıştırılan hafıza B hücrelerinde güçlü bir şekilde eksprese olduğu saptanmıştır (16, 40). Aynı zamanda, BMPR1A sinyal yolağı elemanları mRNA'larının da hafıza B hücrelerinde bir miktar eksprese olduğu bulunmuştur (16). Yapılan çalışmalar BMPR1A'nın sadece farelerde değil insan hafıza B hücrelerinde de artmış düzeyde ifadesi olduğunu göstermiştir (71).

Kemik morfojenetik proteinlerinin ve reseptörlerinin olgun immün hücrelerdeki, özellikle germinal merkez, hafıza B hücreleri ve plazma hücrelerindeki etkisi in-vitro çalışmalarla sınırlı kalmıştır (16, 22, 70). Bu nedenle, kemik morfojenetik reseptörlerinin germinal merkez hücrelerindeki ve plazma hücrelerinde gelişimlerini anlamak için yapılacak in-vivo çalışmalar önem taşır. Bu nedenle, bu çalışmada B hücrelerde kemik morfojenetik reseptör 1A'sı eksik olan fare modeli kullanarak, BMPR1A'nın germinal merkez hücre dinamiklerindeki önemini ve plazma hücre gelişimindeki etkisini daha önce yapılan çalışmalar ışığında inceledik.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Yale Üniversitesi, Dermatoloji Departmanında Tomayko Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1.Fare modelleri ve kohortun sağlanması

Bütün çalışmalar NIH'in Laboratuvar Hayvanları Kullanımı ve Bakımı Rehberi (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health)'ne uygun şekilde yapılmıştır. Çalışmanın yapılabilmesi için Yale Enstitüsel Hayvan Bakım ve Kullanımı Komitesi (Yale Institutional Animal Care and Use Committee)'nden onay alınmıştır. Bmpr1a^{fx/fx} farelerde Bmpr1a geninin ekson 2 (yakın zamanda ekson 4 olarak değiştirildi) bölgesi LoxP ile çevrilidir (72). Bmpr1a kondisyonel alleli taşıyan Bmpr1a^{fx/fx} fareler, Jackson Laboratuvar (Bar Harbor, USA)'dan satın alınmış C57Bl/6J (B6) fareler ile 10 jenerasyon eşleştirildikten sonra B6 genetik özellikli Bmpr1a^{fx/fx} fareler elde edilmiştir. Bunların kendi aralarında çiftleştirilmesi homozigot Bmpr1a^{fx/fx} fareler oluşmasını sağlamıştır. CD19.Cre fareler Jackson Laboratuvar (Ban Harbor, USA)'dan satın alınmıştır. Bmpr1a^{fx/fx} CD19.Cre^{+/-} fareler Bmpr1a^{fx/fx} fareler ile CD19.Cre^{+/-} farelerin eşleştirilmesi ile oluşturulmuştur. CD19 geninde klonlanmış Cre geni olan farelerin B hücrelerinde CD19 transkripsiyonu gerçekleştiğinde Cre rekombinaz da üretilmekte ve Cre rekombinaz enzimi akabinde Bmpr1a'nın LoxP çevrili exon 2 bölgesini rekombine ederek Bmpr1a genini baskılamaktadır (72, 73). Böylece Bmpr1a^{fx/fx} CD19.Cre^{+/-} farelerde B hücre spesifik Bmpr1a kaybı gerçekleşmektedir. Çiftleşme için olmayan B6 fareler National Cancer Institute'den satın alınmıştır. Bmpr1a.eGFP fare modeli Tomayko laboratuvarında oluşturulmuştur. Kısaca, Bmpr1a'nın durma kodonu içeren Ekson 8-9-10 bölgesi ve 3'-UTR bölgesi fare Bmpr1a geninden çoğaltılmış ve pEASY-FLOX vektörüne sol kol ve sağ kol olarak Bmpr1a-EGFP hedef vektörü oluşturmak için klonlanmıştır. Bu hedef vektörde IRES-EGFP-Neo/KanR DNA bölgesi Bmpr1a'nın homolog gen kolları ile çevrilidir. PvuI ile linear hale getirilen hedef vektör B6 embriyonik hücrelere elektroporasyon ile transfer edilmiştir. Transfekte edilmiş dirençli embriyonik hücreler seçilmiş ve hedef vektörün başarılı rekombinasyonu PCR

ile doğrulanmıştır. Bu embriyonik hücre klonları B6 blastosistlerine enjekte edilmiş ve CD1 yalancı-hamile farelere implante edilmiştir. Oluşturulan vektörü germline olarak taşıyan fareler transgenik Actin-Cre farelerle çaprazlanmış ve Neo kaset bölgesi Cre-rekombinaz ile çıkarılmıştır. Sonuçta, Bmpr1a geni başlangıç kodonunun kontrolü altında Bmpr1a ve eGFP sentezleyen fareler oluşturulmuştur (ref: yazım aşamasında olan makale).

3.1.1. Farelerin aşılması

T-bağımlı cevap için alüminyumda presipite edilen 50 mikrogram NP32 (4-hidroksi-3-nitrofenilasetik)- chicken gamma-globulin (NP-CGG) kullanılmıştır (16). Bu antijenik sıvı periton içine enjekte edilmiş ve fareler belli zaman aralıklarında immün cevap için değerlendirilmiştir.

T-bağımsız cevap için fareler 100 mikrogram 4-hidroksi-3-nitrofenilasetik AminoEtilKarboksilMetil-Fikol (NP53-AECM-Ficoll, Biosearch Technologies) 100 mikrolitre fosfatla tamponlanmış saline (PBS) içinde çözölen karışım ile aşılmasıdır. Fareler periton enjeksiyonu sonrasında 5. günde deney için kullanılmıştır.

3.2. Dalak hücrelerinin ve kemik iliği hücrelerinin izolasyonu

Aşılana fareler uygun koşullarda imha edildikten sonra dalak tam olarak farelerden çıkarılmıştır. Çıkarılan dalak 70 µm naylon meş ve şırınga yüzeyi yardımı ile ya da iki lam camı arasında ezilerek hücreler ayrıştırılmış ve %2 FBS ile karıştırılarak süspansiyon haline getirilmiştir. Kemik iliği ayrıştırılması için farelerin arka bacak kemikleri kaslardan ayrıştırılmıştır. Kemik başları kesilmiş ve altında delikler oluşturulan küçük tüplere konmuştur. Küçük tüpler 3000 RPM'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra tüpün altındaki küçük delikten sadece hücreler geçmiş ve bu hücreler dıştaki büyük tüpte toplanmıştır. Sonuçta %2 FBS ile karışık hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Elde edilen hücrelerden kırmızı kan hücreleri ACK lizis solüsyonu (Lonza, USA) ile ayrılmış ve seri yıkama işlemlerinden sonra Neuber hemisitometrisi ve tripan mavisi kullanılarak sayılmıştır. Hücre sayımı sonunda her

bir fareden elde edilen dalak ve kemik iliği hücreleri 120×10^6 hücre /ml olacak şekilde PBS ile karıştırılmıştır.

3.3. Akım Sitometri ve Çalışmada Kullanılan Antikorlar ve Ajanlar

Akım sitometrisi çalışmaları için dalaktan veya kemik iliğinden elde edilen beyaz kan hücre solüsyonundan 3×10^6 hücre/25 mikrolitre alınmış ve 96-kuyucuklu plakalara konulmuştur. UV-Zombie Fikse edilebilir canlılık kiti (UV-Zombie Fixable Viability Kit, Biolegend, USA) ile 20 dk karanlık, oda sıcaklığında boyanmış ve 1x PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra uygun konstrasyonlarda hazırlanan antikor karışımları eklenmiş ve 25-40 dk karanlıkta, 4 °C'da inkübe edilmiştir. Deney planına uygun olarak hazırlanan antikor paneli ile boyanan hücreler akım sitometrisi ile analiz edilmiştir. Antikorlar üretici firma tarafından önerilen aralıkta dilusyon çalışmalarında saptanan en uygun konsantrasyon kullanılarak eklenmiştir. Kullanılan antikorlar ve önemli ajanlar tabloda listelenmiştir (**Tablo 3.1.**).

Hücrelerin akım sitometri okumaları LSRII (BD İmmunositometri Sistemleri) gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin akım sitometri ile ayrıştırılması ise BD FACS AriaII kullanılarak yapılmıştır. Veriler FlowJo kullanılarak hücre yüzdesi ya da medyan floresan yoğunluğu (MFI) saptamak üzere analiz edilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan antikorlar

HEDEF	KLON	RENK	ÜRETİCİ
Kappa	187.1	Pacific Blue	Tomayko Lab
CD19	1D3.2	Pacific Blue	Tomayko Lab
NIP		APC	Tomayko Lab
Streptavidin		Alexa-647 Alexa-488	Tomayko Lab
IgG ₁	A85-1	Fitc	BD Biosciences (San Jose, CA)
CD38	90	PE, biotin	BD Biosciences (San Jose, CA)
CD45R/B220	RA3-6B2	APC/Cy7	BD Biosciences (San Jose, CA)
CD19	1D3	APC/Cy7	BD Biosciences (San Jose, CA)
CD95/Fas	Jo2	PE/Cy7, PE, BV-421	BD Biosciences (San Jose, CA)
CD138/syndecan	281-2	Biotin	BD Biosciences (San Jose, CA)
Streptavidin		PE/Cy7, APC/Cy7	BD Biosciences (San Jose, CA)
CD19	1D3	APC/Cy7	BD Biosciences (San Jose, CA)
Kappa	187.1	V450	BD Biosciences (San Jose, CA)
CD38	90	AF700	eBioscience, Inc. (San Diego, CA)
TCR β	H57-597	PE/Cy7 APC/Cy7	Biolegend, Inc. (San Diego, CA)
CD11b	M1/70	APC/Cy7, Brilliant Violet, Fitc	Biolegend, Inc. (San Diego, CA)
I-A/I-E	M5/114.15.2	Fitc, PE	Biolegend, Inc. (San Diego, CA)
CD38	90	PE, PE/Cy7	Biolegend, Inc. (San Diego, CA)
CD4	RM4-4	PE/Cy7	Biolegend, Inc. (San Diego, CA)
CD8a	53-6.7	PE/Cy7	Biolegend, Inc. (San Diego, CA)
TER-119	TER119	PE/Cy7	Biolegend, Inc. (San Diego, CA)
F4/80	BM8	PE/Cy7	Biolegend, Inc. (San Diego, CA)

CD138/ syndecan	281-2	PE	Biologend, Inc. (San Diego, CA)
Ly-6A/E (Sca-1)	D7	BV605	Biologend, Inc. (San Diego, CA)
CD45R/B220	RA3-6B2	APC, Fitc, APC/Cy7	Biologend, Inc. (San Diego, CA)
IgD	11-26c-2a	APC/Cy7	Biologend, Inc. (San Diego, CA)
IgG1	RMG1-1	Fitc	Biologend, Inc. (San Diego, CA)
CD19	6D5	BV605	Biologend, Inc. (San Diego, CA)
CD4	GK1.5	PE	Biologend, Inc. (San Diego, CA)
Ly6G	1A8	APC	Biologend, Inc. (San Diego, CA)
IgE	RME-1	Fitc	Biologend, Inc. (San Diego, CA)
Zombie UV™ fixable viability kit			Biologend, Inc. (San Diego, CA)
Ethidium monoazide (EMA)			Invitrogen (Carlsbad, CA)
Propidium iodide (PI)			Invitrogen (Carlsbad, CA)
F(ab') ₂ fragment goat anti-human IgG		PE	Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA)

3.4. PCR ve Kantitatif PCR (qPCR) testleri

Farelerin genotiplemesi için fare hücrelerinden elde edilen DNA'lar Kappa Taq DNA Polimeraz PCR Kitleri (Sigma-Aldrich, ABD) çoğaltılmış ve elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülmüştür. RNA qPCR deneyleri için izole edilen hücrelerden Qiagen RNAeasy kitleri RNA elde edilmiş, iScript cDNA Sentez Kiti (Biorad, ABD) kullanılarak cDNA oluşturulmuştur. RNA qPCR deneyleri Applied Biosystems™ SYBR™ Green PCR Master Mix kiti (Invitrogen, ABD) kullanılarak Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Sistemleri'nde yürütülmüştür. Normalizasyon için HPRT kullanılmıştır. DNA qPCR deneyleri Applied

Biosystems™ SYBR™ Green PCR Master Miks kiti (Invitrogen, ABD) kullanılarak Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Sistemlerinde yürütülmüştür. Kullanılan primerler tabloda listelenmiştir (**tablo 3.2.**).

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan primerler

Amaç	Primer Adı	Sekans (5'-3')
Bmpr1a genotipleme	Upper Flox F1	CCTGCCTCTTGTTGTTGGT
	Upper Flox R1	TCCCAGGTAGCTGGAAGAGT
	Fx4	TGGCTACAATTTGTCTCATGC
CD19.Cre genotipleme	CD19.8	AATGTTGTGCTGCCATGCCTC
	CD19.9	GTCTGAAGCATTCCACCGGAA
Bmpr1a mRNA qPCR	Exon-1 F	CAGCAGGACCAGTCATTCAA
	Exon-2 R	CTGGCTTCTTCTGGTCCAAG
HPRT mRNA qPCR	HPRT F	ACCTCTCGAAGTGTGGATACAG
	HPRT R	CCTCGTATTTGCAGATTCAACTT
Bmpr1a ^{fx} rekombine olmayan allelin qPCR ile çoğaltılması	Upper Flox F1	CCTGCCTCTTGTTGTTGGT
	Upper Flox R1	TCCCAGGTAGCTGGAAGAGT
Bmpr1a ^{fx} rekombine allelin qPCR ile çoğaltılması	Upper flox F1	CCTGCCTCTTGTTGTTGGT
	Fx4	TGGCTACAATTTGTCTCATGC
Bmpr1a WT allelin qPCR ile çoğaltılması	Before Stop F1	GCTCACCACACTCTGTTTGC
	After Stop R1	GCTAATCCCACCCATTCTT
Embriyonik hücrede gen entegrasyonunun doğrulanması	Genomic F	GGCTGCCATAAAGGAATGAA
	IRES R	TACGCTTGAGGAGAGCCATT
	Right Arm F	CTAAAGCGCATGCTCCAGAC
Yeni doğan farelerin genotipleme	Genomic R	ATGCTCCAGGACTTTCCAGA
	BefSTOP F	GCTCACCACACTCTGTTTGC
	IRES R	TACGCTTGAGGAGAGCCATT

3.4.1. Floks (Fx) Allelinin Rekombinasyon Etkinliğinin Hesaplanması

Bmpr1a^{fx} allele rekombinasyon etkinliğini, diğer bir tabirle toplam Bmpr1a allelleri arasında Bmpr1a rekombine allel yüzdesini, hesaplamak için yapılan deneylerde 3 çeşit primer seti ile DNA qPCR deneyleri gerçekleştirilmiştir. Üst floks F1 (Upper flox F1) ve Üst floks R1 (Upper flox R1) olarak adlandırılan primerler Bmpr1a^{fx} rekombine olmayan alleli saptamak için kullanılmış ve 200 baz-çifti PCR ürünü oluşturmuştur. Üst floks F1(Upper flox F1) ve Fx4 primerleri Bmpr1a^{fx} rekombine alleli saptamak için kullanılmış ve 270 baz-çifti PCR ürünü oluşturmuştur. Son olarak, Bmpr1a geninin Cre-rekombinasyonundan etkilenmeyen Exon 11 bölgesine bağlanan Durma kodonu öncesi F1 (Before Stop F1) ve Durma Kodonu sonrası R1 (After Stop R1) primerleri ile Bmpr1a alleli çoğaltılmıştır. Bundan elde edilen CT değerleri toplam Bmpr1a allelleri ve örnekler arasındaki başlangıç DNA miktarlarını ayarlamak için kullanılmıştır. Farklı hücrelerdeki Bmpr1a^{fx} allellerinin göreceli rekombinasyonu her bir örnekteki Bmpr1a^{fx}-rekombine olmayan allelin Bmpr1a^{fx} rekombine allele göre yüzdesi ile hesaplanmıştır. Karşılaştırmalı CT yöntemi kullanılarak aynı örnekteki Bmpr1a^{fx}-rekombine olmayan allelin Bmpr1a^{fx}-rekombine allele göre ifadesi (R) saptanmıştır (74). Bmpr1a-rekombine olmayan allelin yüzdesi matematiksel olarak $[R/(R+1)] * 100$ formülü ile hesaplanmıştır. Bmpr1a allelin göreceli yüzde kaybı aynı örnek için Bmpr1a^{fx} rekombine allel yüzdesine eşittir ve $[100 - (\text{Bmpr1a}^{\text{fx}} \text{ rekombine olmayan allel yüzdesi})]$ formülü ile hesaplanmıştır. Bu hesaplama Bmpr1a^{fx/fx} farelerin bütün hücrelerinde %100 Bmpr1a^{fx/fx} alleli taşıması ve Bmpr1a^{fx/fx} CD19.Cre^{+/-} farelerde, Cre aracılı rekombinasyon sonrası Bmpr1a^{fx}- rekombine olan ve rekombine olmayan allellerinin toplamının hala %100 olmasına dayanmaktadır.

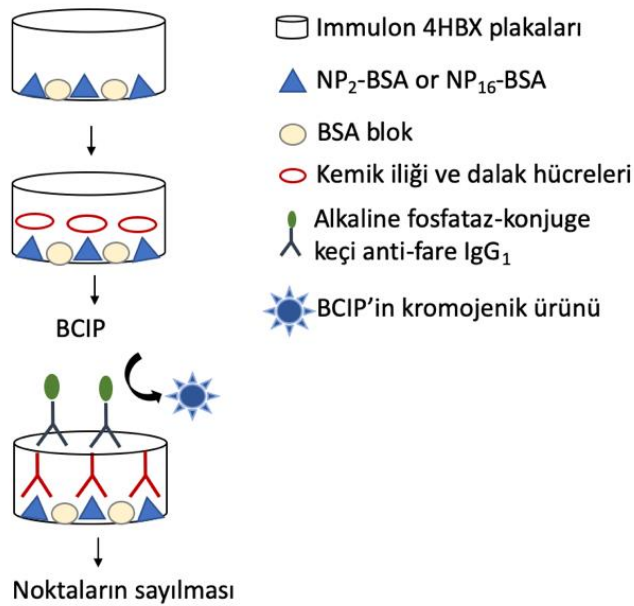
3.5. Elispot Deneyleri

NP16 ve NP2-BSA antikör üreten hücrelerin sayısını saptamakta kullanılan ELISpot deneylerinin basamakları daha önce tanımlanmıştır (15) ve şekilde şematize edilmiştir (**şekil 3.1.**). T-bağımlı cevap için kısaca aşağıdaki basamaklar izlenmiştir:

- 1- İmmulon 4HBX plakalar (Fisher Scientific, ABD) PBS içinde 5 µg/ml NP16 ve NP2-BSA ile kaplanmıştır.
- 2- Spesifik olmadan bağlanan antikörler 1X PBS içinde %1 BSA ile yıkanmıştır.
- 3- Lenfosit süspansiyonu alınan hücreler üçlü tekrarlı olacak şekilde ekilmiştir.
- 4- Seri olarak dilüsyon edildikten sonra 37 °C'de 5 saat inkübe edilmiştir.
- 5- Daha sonra yıkanan kuyucuklara alkalın fosfataz bağı- anti-IgG1 ikincil antikörü (Southern Biotech, ABD) eklenmiştir.
- 6- 5-bromo-4-kloro-3 indolil fosfat (BCIP, Southern Biotech, ABD) eklendikten sonra renk değişimi gözlenmiş ve oluşan noktalar mikroskop altında sayılmıştır.
- 7- 25-50 nokta/kuyucuk olan kuyucuklar saptanmış ve buradaki nokta sayısı dilüsyon faktörü ile çarpılarak antikör üreten hücre sayısı saptanmıştır.

T-bağımsız hücre cevabı için yapılan ELISpot deneylerinde de benzer adımlar takip edilmiştir. Farklı olarak, plakalar sadece NP19 ile kaplanmış ve keçi anti-fare IgM (Southern Biotech, ABD) ve keçi anti-fare IgG (Southern Biotech, ABD) kullanılmıştır.

ELISpot deneyleri



Şekil 3.1. ELISpot deney basamakları.

3.6. ELİSA Deneyleri

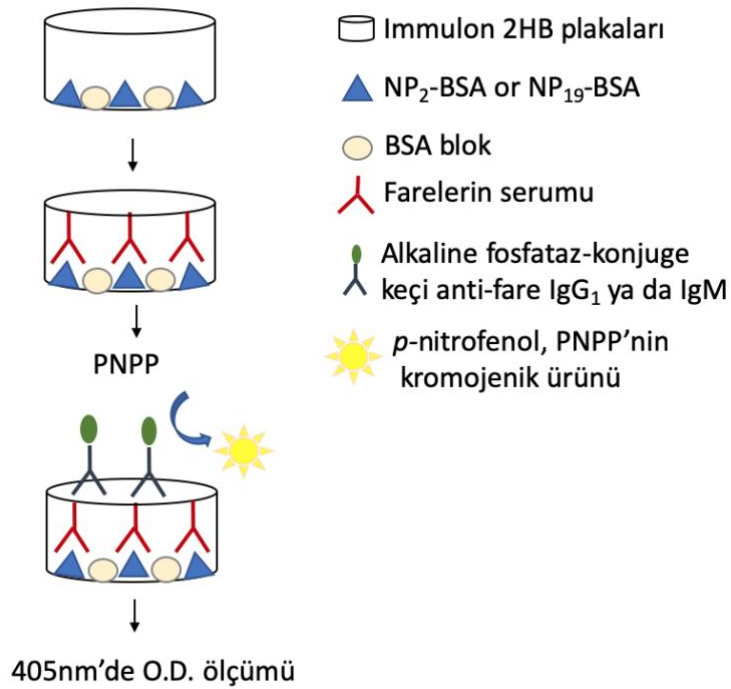
NP19 ve NP2 Elisa deneyleri için aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir.

Basamaklar **şekil 3.2**'de şematize edilmiştir.

- 1- İmmulon 2HB (Fisher Scientific, ABD) plakaları PBS içinde 5ug/ml NP16 ve NP2-BSA ile kaplanmış ve gece 4°C'de inkübe edilmiştir.
- 2- Spesifik olmayan bağlanma antikorlar PBS içinde %1 BSA, %0,05 sodyumazit ile ve PBS içinde %0,05 Tween-20 ile yıkanmıştır.
- 3- Farelerden alınan kan 3000 RPM'de 20 dakika sanrifuje edildikten serum toplanmış ve kuyucuklara ikili tekrarlı ekilmiştir. Seri olarak dilusyonlar yapılmıştır.
- 4- Standardlar da benzer şekilde ekilmiş ve seyreltilmiştir. Standart olarak 1D1-4 hücre dizisinden gelen anti-NP IgG1 lambda hibridomaları (NP19-IgG1 için), IgM tranfektoma hücre dizileri (NP19 IgM için) ve yüksek afiniteli anti-NP fare IgM (NP2 IgM için)'leri kullanılmıştır. Arka plandaki floresanı değerlendirebilmek için negatif kontrol kuyucuklarına serum eklenmemiştir.
- 5- Plakalar 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir.

- 6- Daha sonra yıkanan kuyucuklara anti-fare IgG1-alkalin fosfataz konjuge ikincil antikoru (Southern Biotech, ABD) ve keçi anti-fare IgM (Southern Biotech, ABD) eklenmiştir.
- 7- P-nitrofenil fosfat (PNPP, Fisher Scientific, ABD) eklendikten sonra renk değişimi gözlenmiştir.
- 8- Optik densite (OD) 405 nm'de ölçülmüştür. Standartların ilk kuyucuğundaki OD 1.0'e ulaştığındaki değerler kullanılmıştır.
- 9- Elisa analizi GraphPad Prizm uygulamasında dört parametrelili lojistik eşitlik (4PL eşitliği) kullanılarak standartlara bağlı oluşturulan eğri grafiğine göre yapılmıştır.

ELISA deneyleri



Şekil 3.2. ELISA deney basamakları.

3.7. İn-vitro Kültür Deneyleri

Dalak hücreleri daha önce tariflendiği şekilde farelerden steril koşullar altında çıkarılmış ve %10 FCS, %1 soydum pruvat, %1 esansiyal olmayan aminoasitler, 50 µM 2-merkaptoethanol, 100U/ml penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 kültür medyası ile süspansiyon haline getirilmiştir. 2×10^5 hücre, 1 ml medya içinde 24-kuyucuklu plaklara ekilmiş ve %5 CO₂, 37 °C’de 3 gün inkube edilmiştir. Sınıf-değişimi mekanizmasını uyarmak için hücreler kültür koşullarında 10 µg/ml anti-CD40 (Klon FGK4.5/FGK45, BioxCell, ABD) ve 10 ng/ml fare-rekombinan IL-4 (STEMCELL Technologies Inc, ABD) ile ya da 15 µg/ml LPS (Sigma-Aldrich, ABD) ve 10 ng/ml IL-4 ile uyarılmıştır. 3 gün sonunda toplanan hücreler IgG1 ve IgE analizi için akım sitometri ile değerlendirilmiştir. Plazma hücre farklılaşmasını uyarmak için benzer kültür koşullarında 10 µg/ml anti-CD40 (Klon FGK4.5/FGK45, BioxCell, ABD), 10 ng/ml anti-fare-rekombinant IL-4 (STEMCELL Technologies Inc, ABD) ve 2 ng/ml anti-fare rekombinant IL-5 (R&D Systems, ABD) ile uyarılan hücreler 3. gün ve 4.-6. günler arasında toplanmış ve plazma hücre antikorları ile boyanarak plazma hücre yüzdesi akım sitometri ile değerlendirilmiştir.

3.8. Damlacık-temelli tek-hücre RNA sekans analizi

NP-CGG ile immünize edilen $Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-}$ ve $CD19.Cre^{+/-}$ kontrol farelerinden immunizasyon sonrası 11. günde dalak hücreleri daha önce anlatıldığı gibi ayrıştırıldı. Her bir grup için 4 fareden elde edilen dalak hücreleri gruplanmış canlı/ölü hücre belirteci olan UV-zombi ve germinal merkez hücre belirteci olan anti-CD19, NIP, anti-kappa, anti-CD95, anti-CD38 antikorlarıyla ile boyanarak germinal merkez B hücreleri (UV-zombie⁻ CD19⁺ NIP⁺ Kappa⁻ CD95⁺ CD38^{low/med}) akım sitometri yöntemi ile BD FACSAriaII’da ayrıştırıldı. Ayrıştırılan hücreler mikroskop altında manual olarak ve otomatik hücre sayım makinesinde sayıldığında >% 90 canlılık kriterini sağladığı ve tek hücre olarak birbirlerinden ayrı şekilde solusyonda dağıldığı doğrulandı. Ayrıştırılan hücreler 10X Chromium sistemi (10X Genomics) kullanılarak Tek-Hücre Gen Analizine tabi tutuldu. cDNA kütüphaneleri (*cDNA library*) üretici firmanın talimatları doğrultusunda Chromium Tek-Hücre 3’Ajan kiti (Chromium

Single-Cell 3' Reagent Kit (v2 Chemistry)) kullanılarak Yale Kanser Genom Merkezinde gerçekleştirildi. 10X Genomics tek gen hücre barkodları ile etiketlenmiş cDNA'ler Illumina HiSeq2500 Rapid Run platformunda sekanslandı. Veri setinin ilk işlenmesi ve gen ekspresyonu çıkarımı CellRanger (v2.1.0) kullanılarak tamamlandı. Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-} ve kontrol fareleri için iki veri seti ayrı tutulmuştur ve kalite kontrol aşamaları ve daha ileri analiz Seurat paketi (**v3.1**, **ref.**²⁵) R v3.6.1 (**ref.**²⁶)'nde gerçekleştirilmiştir. Yeterli RNA taşıyan hücreler >200 gen kriteri ile seçildi. Non-spesifik sinyalden ayırt etmek için ise minimum 3 hücrede ifade edilen genler analize dahil edildi. Normalize edilen veri süpervize olmaksızın PCA işlemine tabi tutuldu.

3.9.İstatistiksel Analizler

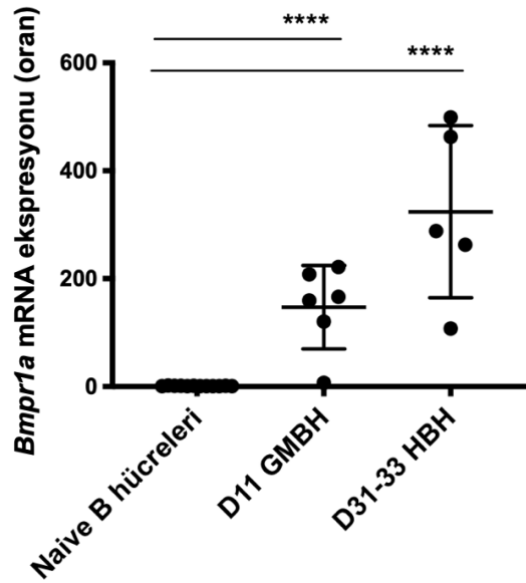
Çalışmadaki veri setleri GraphPad Prism 7 ya da 8 kullanılarak ANOVA, Student's t-test (paired ya da unpaired) istatistikler testleri ile değerlendirilmiş ve $p < 0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Germinal Merkez B Hücrelerinde ve Hafıza B hücrelerinde Bmpr1a mRNA Düzeyinin Naif B Hücrelere Göre Karşılaştırılması

Daha önce yapılan çalışmalarda, hafıza B hücreleri ile naif B hücreler arasında gen ekspresyonunda farklılıklar olduğu gösterilmiştir (16). Embriyonik ve somatik kök hücrelere kendini yenileme ve farklılaşma niteliği sağlayan genlerden biri olan Bmpr1a'nın, Balb/c farelerden ayrıştırılan hafıza B hücrelerinde güçlü bir şekilde eksprese olduğu saptanmıştır (16). Aynı zamanda, BMPR1A sinyal yolağı elemanları mRNA'larının da hafıza B hücrelerinde bir miktar eksprese olduğu bulunmuştur (16). T-bağımlı immün cevap sırasında naïve B hücrelerin aktivasyonu ile gelişen germinal merkez B hücrelerinde (GMB) ve onların farklılaşmasıyla oluşan hafıza B hücrelerinde (HBH) Bmpr1a mRNA seviyesini incelemek için B6 farelerde NP-CGG periton içine aşılandı. İmmünizasyon sonrası (i.s.) 11. günde dalak hücreleri izole edildi ve germinal merkez B hücreleri (UV-zombie⁻, APCCy7-CD19⁺, BV421-CD95⁺, AF700-CD38⁻) akım sitometri ile ayrıştırıldı. 31.-33. günler arasında izole edilen dalak hücrelerinden IgG1⁺ hafıza B hücreleri (UV-zombie⁻, APC-Cy7-B220⁺, APC-NIP⁺, V450-Kappa⁻, PECy7-CD38⁺, FITC-IgG1⁺) ayrıştırıldı. Naif B hücreler (UV-Zombie⁻, APC-B220⁺, APCCy7-IgD⁺, PECy7-CD38⁺, PE-CD95⁻) immunize edilmemiş fare dalağında akım sitometri yöntemi ile izole edildi. Bu hücrelerin akım sitometri ile ayrıştırılma stratejisi **şekil-4.3'**te gösterilmiştir.

Bmpr1a mRNA ekspresyonu oranının, germinal merkez B hücrelerinde naif B hücrelere göre ortalama $147,3 \pm 31,64$ olduğu saptandı ($p < 0,05$). Hafıza B hücrelerinde naïve B hücrelere göre Bmpr1a mRNA ekspresyonu oranı ortalama $324,1 \pm 71,34$ olarak saptandı ($p < 0,05$) (**Şekil 4.1**). Bu sonuç Bmpr1a mRNA'sının germinal merkez B hücrelerinde ve hafıza B hücrelerinde yüksek düzeyde olduğunu gösterdi.



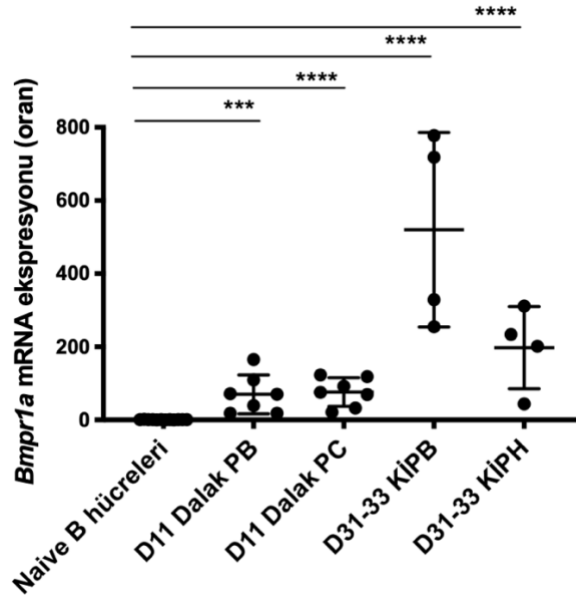
Şekil 4.1. Germinal merkez B hücrelerinde ve hafıza B hücrelerinde Bmpr1a mRNA ekspresyonu oranının naif B hücrelere göre qPCR yöntemi ile karşılaştırılması (Noktalar tek bir fareden alınan ya da birden fazla farenin hücrelerinin bir araya toplanması ile elde edilmiş örnekleri teslim eder).

4.2. Dalak Plazmablastlarında, Dalak Plazma Hücrelerinde, Kemik İliği Plazmablastlarında ve Kemik İliği Plazma Hücrelerinde Bmpr1a mRNA Düzeyinin Naif B Hücrelere Göre Karşılaştırılması

T-bağımlı immün cevabın diğer elemanları olan plazma hücrelerinde Bmpr1a ifadesini değerlendirmek amacıyla NP-CGG ile immünize edilen B6 farelerinden dalak hücreleri immünizasyon sonrası 11. günde, kemik iliği hücreleri 31.-33. günler arasında izole edildi. Dalak ve kemik iliği plazmablastları (UV-Zombie⁻, APCCy7-IgD⁻, PECy7-Dump⁻, PE-CD138⁺, BV605-Sca-1⁺, APC-B220⁺); dalak ve kemik iliği plazma hücreleri (UV-Zombie⁻, APCCy7-IgD⁻, PECy7-Dump⁻, PE-CD138⁺, BV605-Sca-1⁺, APC-B220⁻) akım sitometri yöntemi ile **şekil-4.3.'te** gösterildiği gibi ayrıştırıldı. Hücrelerden elde edilen RNA'da Bmpr1a mRNA düzeyi saptandı.

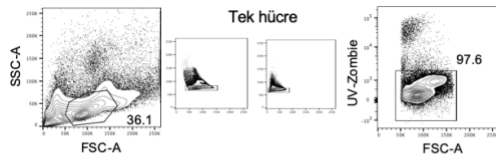
Naif B hücrelerinde Bmpr1a mRNA ekspresyonu oranının dalak plazmablastlarında (Dalak PB), dalak plazma hücrelerinde (Dalak PC), kemik iliği plazmablastlarında (KİPB), kemik iliği plazma hücrelerinde (KİPH) naif B hücrelere göre ortalama sırasıyla $70,36 \pm 20,07$, $76,34 \pm 14,81$, $519,9 \pm 133$, $197,7 \pm 56,13$

olduğu saptandı ($p < 0,05$) (Şekil-4.2). Bu bulgular BMPR1A'nın plazmablastlarda ve plazma hücrelerinde naif B hücrelere göre artmış olduğunu gösterdi.

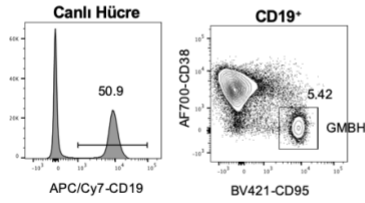


Şekil 4.2. Dalak plazmablastlarında (Dalak PB), dalak plazma hücrelerinde (Dalak PC), kemik iliği plazmablastlarında (KİPB), kemik iliği plazma hücrelerinde (KİPH) Bmpr1a mRNA ekspresyonu oranının naif B hücrelere göre qPCR yöntemi ile karşılaştırılması

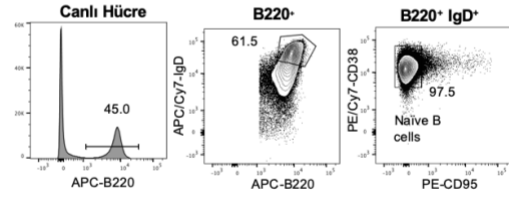
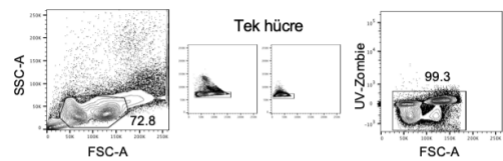
GMBH, Dalak Plazmablast ve Plazma Hücreleri



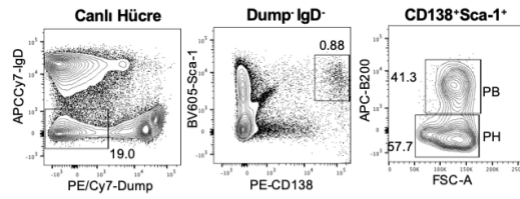
11. Gün GMBH



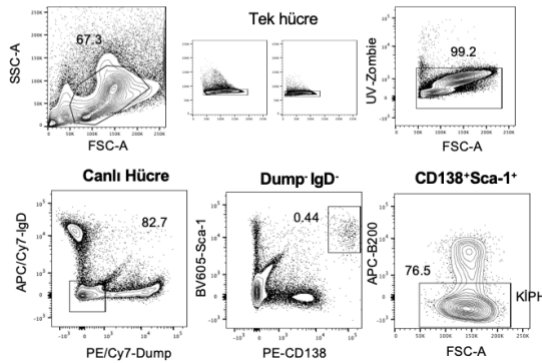
İmmünize edilmemiş Dalak B Hücreleri



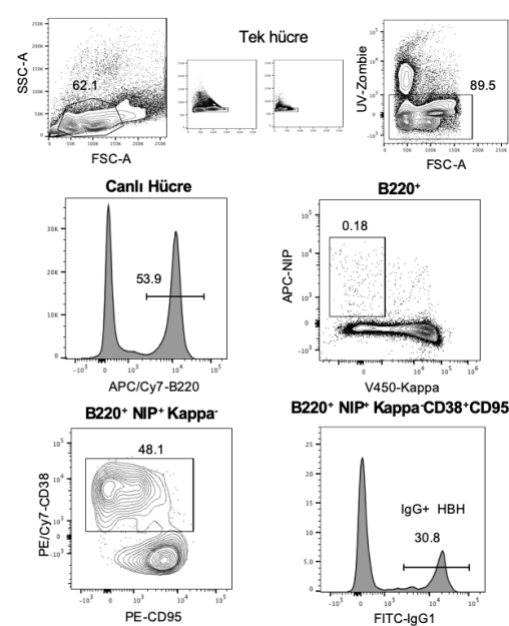
11.Gün Dalak Plazmablast ve Plazma Hücreleri



31.- 33. Gün KİPH



31. - 33. Gün HBH



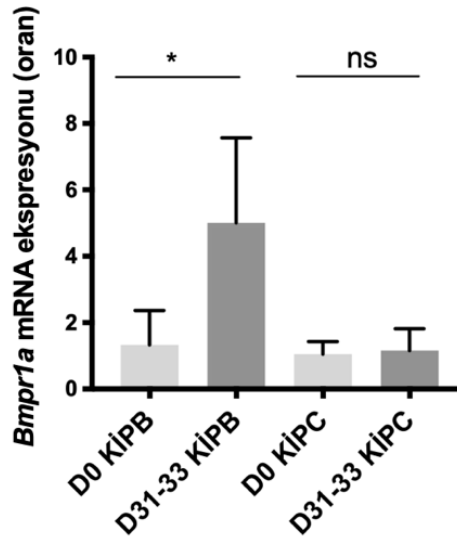
Şekil 4.3. Bmpr1a mRNA düzeyi çalışmaları için B hücre alt tiplerinin akım sitometri ile ayrıştırılma stratejisi

4.3. Kemik İliği Plazmablastlarında ve Kemik İliği Plazma Hücrelerinde Bmpr1a mRNA Düzeyinin Antijenik Aktivasyon ile Değişiminin İncelenmesi

NP-CGG ile immünize edilmemiş B6 farelerin (D0) kemik iliği izole edildi. Kemik iliği plazmablastları (UV-Zombie⁻, APCCy7-IgD⁻, PECy7-Dump⁻, PE-CD138⁺, BV605-Sca-1⁺, APC-B220⁺) ve kemik iliği plazma hücreleri (UV-Zombie⁻, APCCy7-IgD⁻, PECy7-Dump⁻, PE-CD138⁺, BV605-Sca-1⁺, APC-B220⁻) akım sitometri yöntemi ile ayrıştırıldı. Elde edilen hücrelerden RNA elde edildi ve cDNA

oluşturuldu. Aşılama sonrası 31-33. günler arasında izole edilen kemik iliği plazma hücresi ve plazmablastlardan elde edilen örnekler ile beraber qPCR analizi yapıldı.

İmmünizasyon sonrası 31.-33. günde ayrıştırılan kemik iliği plazmablastlarında *Bmpr1a* mRNA ekspresyonu oranının, immünize edilmemiş farelerden elde edilen kemik iliği plazmablastlarına göre $5,01 \pm 1,282$ ($p < 0,05$) olduğu saptandı (Şekil.4.4). Kemik iliği plazma hücrelerinde ise *Bmpr1a* mRNA düzeyinin immünizasyon sonrası anlamlı bir değişim göstermediği tespit edildi. Bu bulgu, plazmablastlarda antijenik aktivasyon ile *Bmpr1a* mRNA seviyesinin arttığını gösterdi.



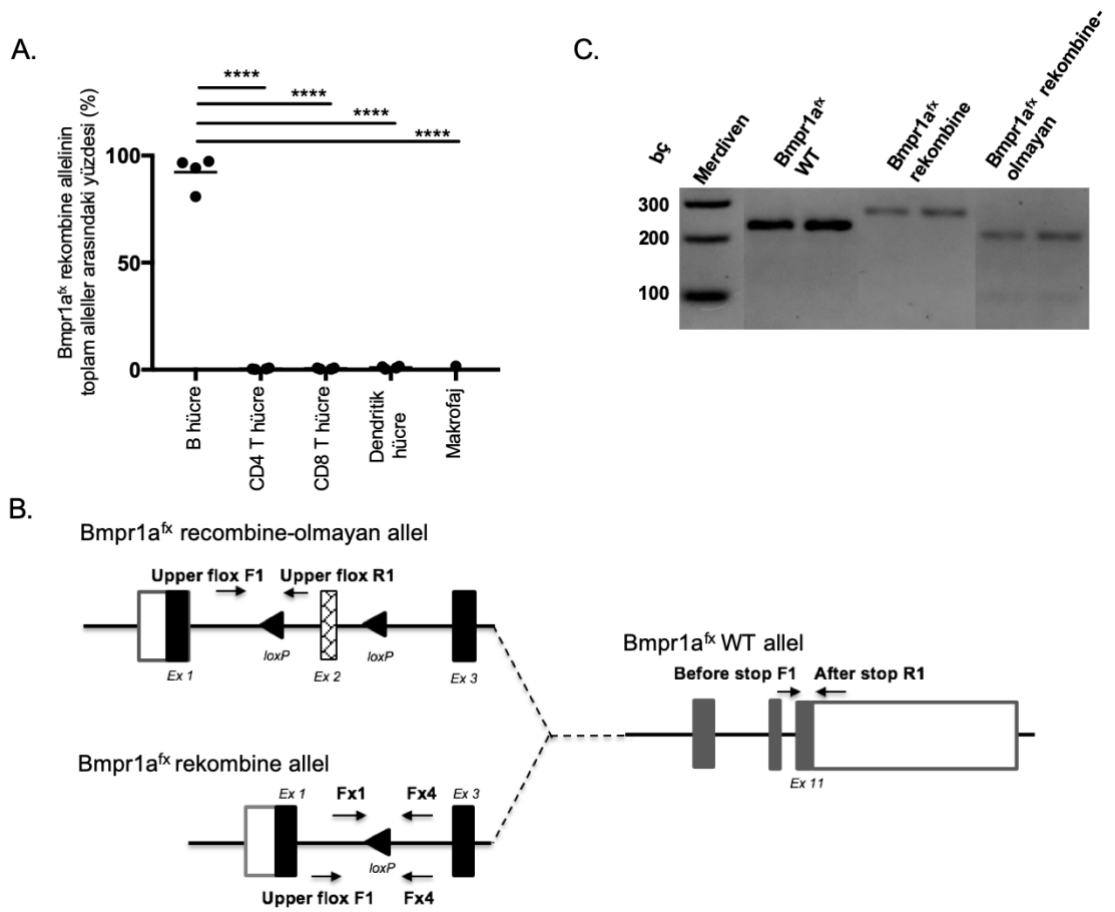
Şekil 4.4. İmmünizasyon sonrası izole edilen kemik iliği plazmablastlarında (D31-33 KİPB) ve kemik iliği plazma hücrelerinde (D31-33 KİPC) *Bmpr1a* mRNA ekspresyonunun immünize edilmeyen kemik iliği plazmablast (D0 KİPB) ve plazma hücrelerine (D0 KİPC) göre qPCR ile karşılaştırılması

4.4. *Bmpr1a*^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-} Farelerde *Bmpr1a* Allel Rekombinasyon Spesifikliğinin ve Etkinliğinin İncelenmesi

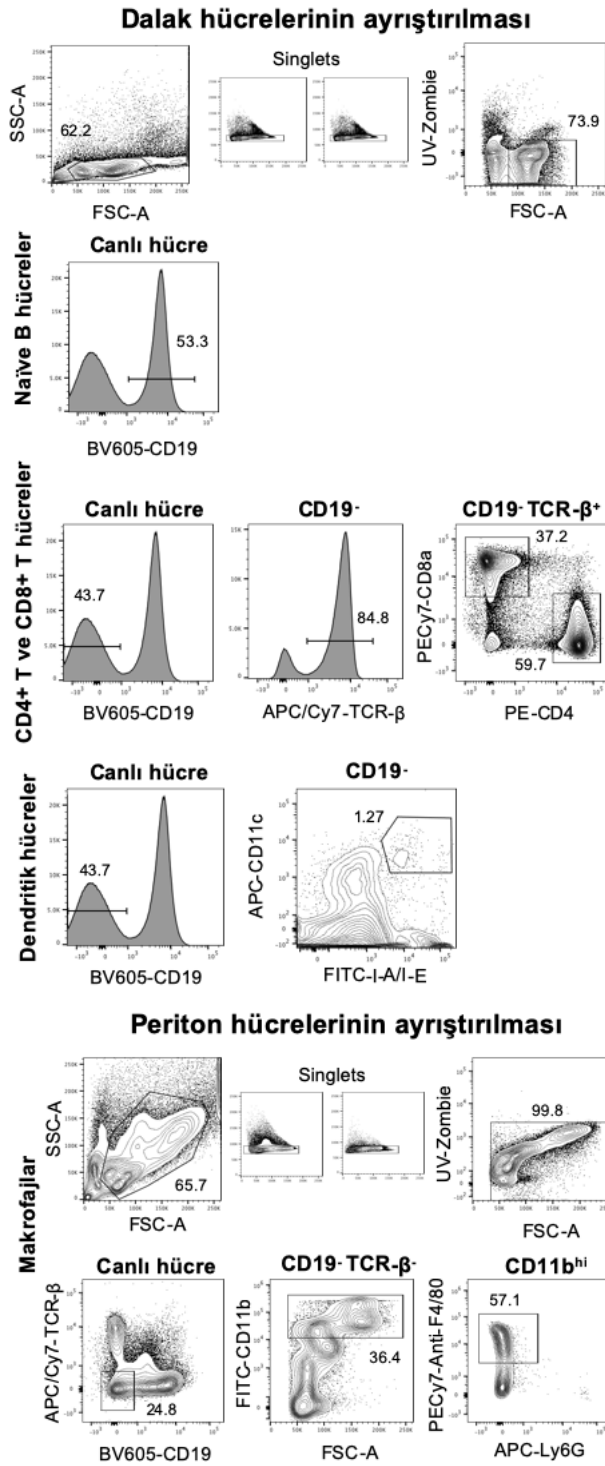
Bu tez çalışmasında *Bmpr1a*'nın germinal merkez B hücrelerindeki önemini anlamak için *Bmpr1a* geni eksik olan fareler ile geni tam olan fareler karşılaştırılmaktadır. Ancak *BMPR1A* embriyonik gelişim açısından önemli olduğu için *Bmpr1a*-geni baskılanmış fare modelinin kullanılması mümkün değildir. Bu

nedenle *Bmpr1a* geni spesifik olarak sadece B hücrelerinde baskılanmış olan *Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-}* fare modeli kullanılmıştır. Bu farelerin *Bmpr1a* geni, exon-2 bölgesinin her iki tarafında *Lox-P* bulundurmaktadır. B hücreleri *CD19* sentezi ile beraber *Cre* ürettiklerinde, *Cre* enzimi exon-2 bölgesini çevreleyen *Lox-P* bölgelerini rekombine ederek exon-2 bölgesini kesmektedir (**şekil-4.5B**). Bunun sonucunda oluşan *Bmpr1a^{fx}* rekombine alleli fonksiyonel değildir. Kontrol olarak Jackson laboratuvarından satın alınan *CD19.Cre^{+/-}* fareler kullanılmıştır.

Bmpr1a^{fx} allelinde, *Cre* aracılı *Lox-P* rekombinasyonunun B hücre spesifik olup olmadığını ve bu rekombinasyonun etkinlik düzeyini incelemek amacıyla immünize olmayan 7-12 haftalık *Bmpr1a^{fx/fx} CD19.Cre^{+/-}* farelerden dalak B hücreleri, *CD4⁺* T hücreler, *CD8⁺* T hücreler, dendritik hücreler ve peritoneal makrofajlar akım sitometri ile ayrıştırılmıştır. Bu popülasyonların akım sitometri ile ayrıştırılma stratejisi **şekil-4.6'da** gösterilmiştir. Bu hücrelerden DNA elde edilmiş ve *Bmpr1a* rekombine olmuş (*Bmpr1a^{fx}* rekombine allel), olmamış (*Bmpr1a^{fx}* rekombine-olmayan allel) ve kontrol allelerinin (*Bmpr1a^{fx}* WT allel) seviyesi, ayrıştırılan popülasyonlarda saptanmıştır. Bunun için 3 ayrı qPCR reaksiyonu kullanılmıştır. qPCR deneylerinin optimizasyonu yapılmış ve % 90 üzerinde etkinlikle çalışan primerler seçilmiştir. *Bmpr1a*'nın rekombinasyonu sonrası oluşan allelin (*Bmpr1a*-rekombine allel), *Bmpr1a* rekombine olmuş ve olmamış toplam alleller (*Bmpr1a* rekombine allel+*Bmpr1a* rekombine-olmayan allel) arasındaki yüzdesi hesaplanarak *Cre*-rekombinasyonunun etkinliği saptanmıştır (**şekil-4.5A**). Bu PCR reaksiyonları sonrası oluşan PCR ürünleri agaroz jelinde yürütülerek doğrulanmıştır (**şekil-4.5C**). Bu deneyler sonucunda, *Bmpr1a* alleli rekombinasyonunun B hücre spesifik olduğu, sadece B hücrelerinde gerçekleştiği ve diğer hematopoetik hücre popülasyonlarında *Bmpr1a* allelinin rekombine olmadan normal olarak bulunduğu doğrulanmıştır. B hücrelerindeki *Bmpr1a* rekombinasyonunun etkinliğine bakıldığında, immünize edilmeyen farelerin B hücrelerinde %95 olarak *Bmpr1a* rekombinasyonunun gerçekleştiği saptanmıştır (**şekil-4.5A**).



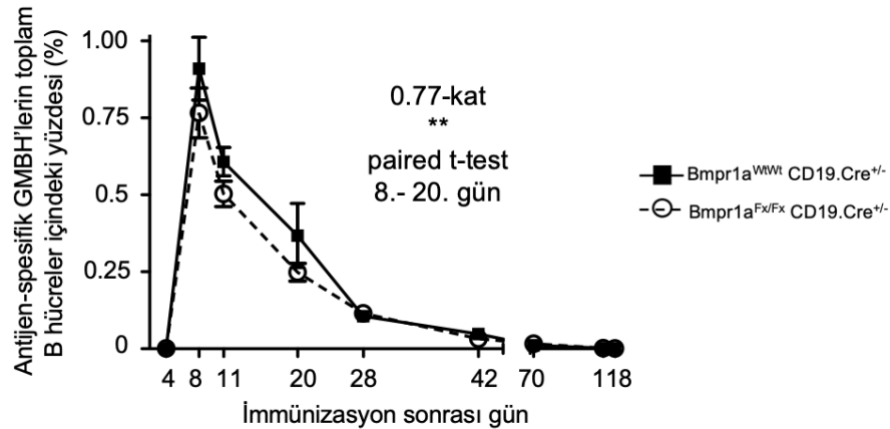
Şekil 4.5. Bmpr1a^{fx/fx} CD19.Cre^{+/-} farelerde Bmpr1a allel rekombinasyonunun B hücre spesifikliğinin ve etkinliğinin incelenmesi. (A) Bmpr1a^{fx} rekombine allelin toplam alleller arasındaki yüzdesinin farklı hücre tiplerinde analizi. (B) Bmpr1a^{fx} rekombine, rekombine-olmayan ve WT allel'in şematik gösterimi. (C) PCR reaksiyonlarında elde edilen allellerin agaroz-jel görüntüleri



Şekil 4.6. $Bmpr1a^{fx/fx}$ $CD19.Cre^{+/-}$ farelerde $Bmpr1a$ allel rekombinasyonunun B hücre spesifik olduğunu saptamak için yapılan akım sitometri deneylerinde hücrelerin fenotipik ayrıştırılma stratejisi

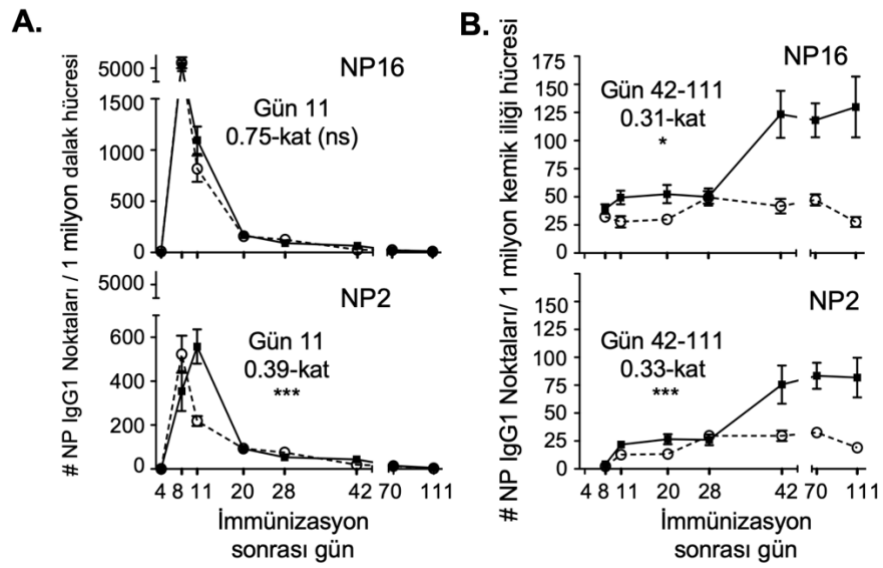
4.5. B hücre-Spesifik Bmpr1a Kaybının Germinal Merkez B Hücre ve Plazma Hücre Kompartmanlarına Etkisinin İncelenmesi

Kemik morfogenetik protein reseptör 1A (BMPR1A) aktivasyonunun B hücre cevabındaki fonksiyonel rolünü anlamak için NP-CGG ile aşılamanın Bmpr1a^{fx/fx} CD19.Cre^{+/-} ve CD19.Cre^{+/-} kontrol farelerde germinal merkez B hücreleri ve plazma B hücre kompartmanlarının büyüklüğü değerlendirildi. Antijen-spesifik GMBH hücreleri NIP⁺ Igk⁻ CD95^{hi} CD38⁻ CD19⁺ belirteçleri kullanılarak akım sitometri ile belli zaman aralıklarında değerlendirildi. İmmünizasyon sonrası 8.-20. günler arasında antijen spesifik germinal merkez B hücresi sıklığının Bmpr1a geni eksik olan farelerde anlamlı olarak % 23 azalarak Bmpr1a-geni tam olan farelerin % 77'sine düştüğü saptandı (oran: 0,77 kat, p=0,0087, **şekil 4.7**). Daha sonraki evrelerinde ise kontrol fareler ile deney grubu arasında anlamlı fark saptanmadı. Bu sonuç Bmpr1a eksikliğinde germinal merkez hücrelerinin oluşumunda bir miktar azalma olduğunu gösterdi.

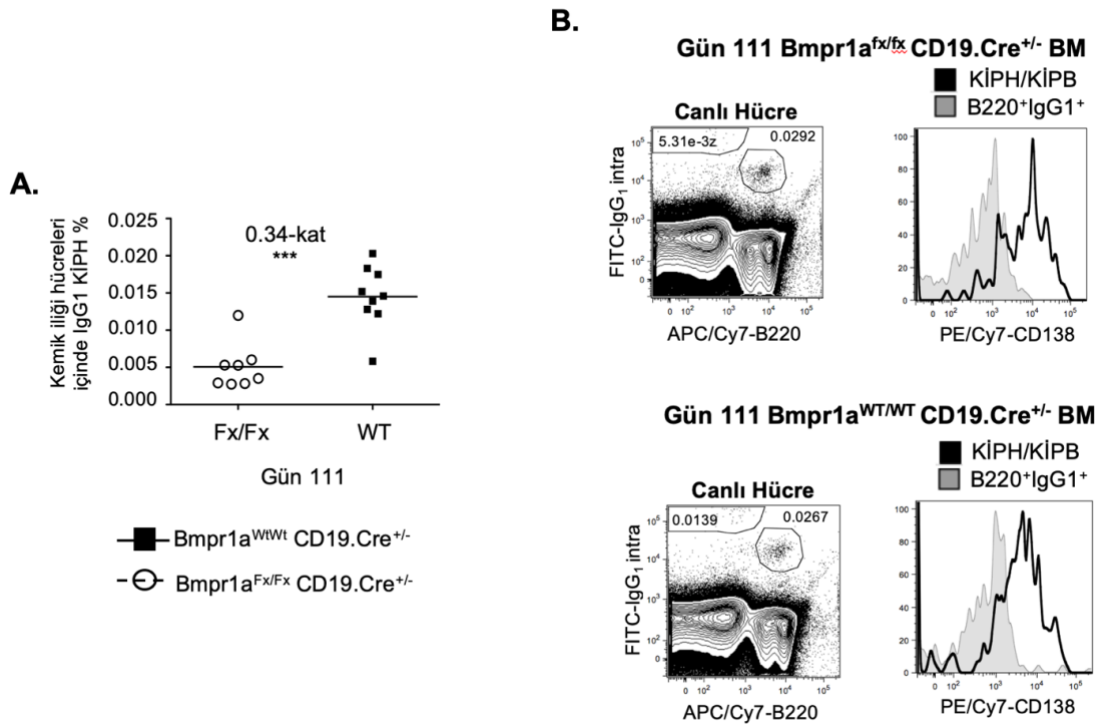


Şekil.4.7. İmmünize edilen Bmpr1a^{fx/fx} CD19.Cre^{+/-} ve Bmpr1a^{WT/WT} CD19.Cre^{+/-} farelerde antijen spesifik germinal merkez hücrelerinin (CD95^{hi} CD38⁻ NIP⁺ Igk^{neg}) toplam B hücreler arasındaki yüzdelерinin belli zamanda aralıklarında değerlendirilmesi.

BMPR1A kaybının plazma hücrelerine etkisini anlamak için Bmpr1a-geni eksik olan fareler ile WT kontrol farelerin oluşturduğu antikör üreten plazma hücreleri Elispot deneyi ile belli zaman aralıklarında değerlendirildi. Yüksek afiniteli IgG1 üreten NP2-kemik iliği plazma hücrelerinin 8. günden itibaren Bmpr1a eksikliğinde daha az olduğu saptandı (**şekil 4.8B**). Daha da belirgin olarak 42.-111. günler arasında, yüksek afiniteli IgG1 üreten NP2-kemik iliği plazma hücrelerinin Bmpr1a kaybı olduğunda %67 az oluşarak kontrol farelerin 0,33 katına azaldığı saptandı (**şekil 4.8B**). Düşük afiniteli IgG1+ NP16-KİPH sayılarının da benzer şekilde Bmpr1a-geni eksik olan farelerde kontrol farelerin 0,31 katına düştüğü (%69 azalma) saptandı (**şekil 4.8B**). İmmünizasyon sonrası 111. günde kemik iliğinden elde edilen hücrelerde yapılan akım sitometri çalışması da Bmpr1a-eksik farelerdeki IgG1 plazma hücresi yüzdesinin WT farelerdekine oranının 0,34-kat olduğunu gösterdi. (**şekil 4.9A**). Akım sitometri ile kemik iliği plazma hücrelerinin ayrıştırılma stratejisi **şekil 4.9B**'de gösterilmiştir. Dalakta bulunan düşük afiniteli IgG1 üreten NP-16 plazmablast/plazma hücreleri değerlendirildiğinde ise iki fare grubu arasında anlamlı fark tespit edilmedi (**şekil 4.8A**). Dalaktaki düşük afiniteli plazma hücreleri erken evrede ektrafoliküler alanda üretildiği için bu sonuç T-bağımsız olarak ilerlediği bilinen ektrafoliküler yanıtın Bmpr1a geni eksikliğinde etkilenmediğini düşündürmektedir. Buna karşın 11. günde germinal merkez cevabı ile oluşturulan ve kemik iliğindeki plazma hücrelerinin öncüleri olduğu düşünülen yüksek afiniteli NP2 dalak plazma hücrelerinin Bmpr1a-yolağı aktif olmayan farelerde % 61 azalma ile WT farelerin 0,39-katına düştüğü saptandı (**şekil 4.8B**). Beraber değerlendirildiğinde bu sonuçlar ile Bmpr1a'nın germinal merkezden çıkan sınıf-değişimi gerçekleşmiş olan IgG1 dalak plazma hücrelerinin ve de uzun ömürlü IgG1 kemik iliği plazma hücrelerinin oluşumunda gerekli olduğu sonucuna varılabilir.



Şekil 4.8. Dalak ve kemik iliğindeki plazma hücrelerinin/plazmablastların *Bmpr1a* geni eksikliğindeki değişiminin Elispot testi ile *Bmpr1a^{fx/fx} CD19.Cre^{+/-}* (açık halka, kesik çizgi) ve *CD19.Cre^{+/-}* (koyu siyah halka, düz çizgi) farelerde değerlendirilmesi.



Şekil 4.9. Kemik iliğindeki plazma hücrelerinin toplam kemik iliği hücreleri arasındaki yüzdesinin Bmpr1a geni eksik olan farelerde WT farelere göre akım-sitometri ile karşılaştırılması. (A) Bmpr1a^{fx/fx} CD19.Cre^{+/-} (açık halka, kesik çizgi) ve CD19.Cre^{+/-} (koyu siyah halka, düz çizgi) farelerdeki yüzdelere karşılaştırılması. (B) İki fare grubundan alınan kemik iliği plazma hücreleri/plazmablastlarını (KİPH/KİPB) gösteren örnek akım sitometri grafikleri.

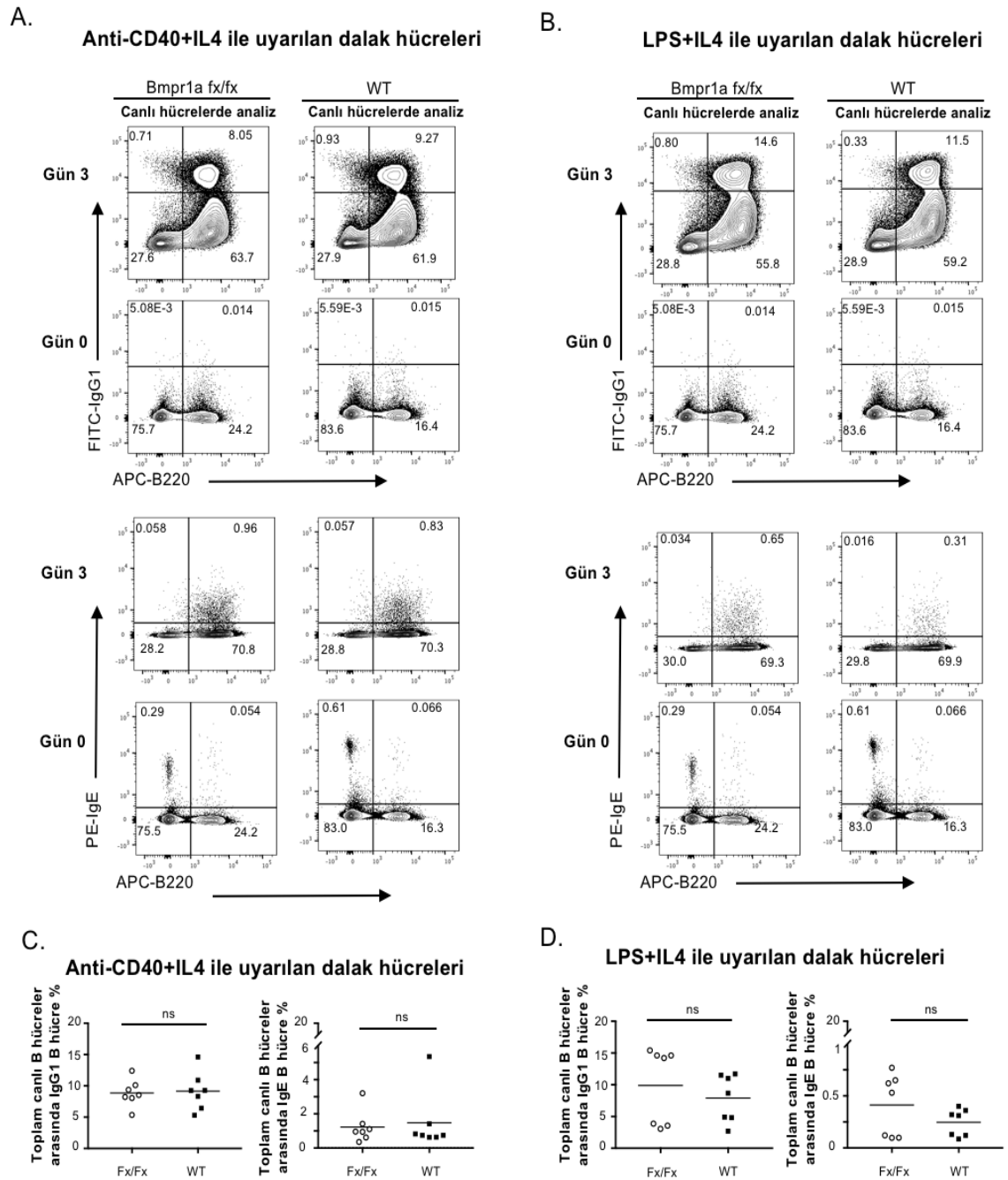
4.6. BMPR1A'nın Germinal Merkez Reaksiyonları Sırasında

Gerçekleşen Sınıf Değişimi Mekanizmasına Etkisinin İn-vitro İncelenmesi

BMPR1A kaybı olduğunda IgG1 sınıf-değişimi gerçekleşmiş plazma hücrelerinin önemli düzeyde negatif etkilendiği gösterildi. Bu deneylerde Bmpr1a^{fx/fx} CD19.Cre^{+/-} fareler ile CD19.Cre^{+/-} fareler karşılaştırıldığında, Bmpr1a geninin yokluğunda farelerde antijene özgü IgG1 plazma hücre sayısının ortalama 3 kat daha az olduğu saptandı. T-bağımlı B hücre yanıtı, germinal merkez reaksiyonları ve germinal merkezden plazma hücre farklılaşması sırasında sınıf değişimi mekanizması önemlidir. Sınıf değişimi gerçekleşmiş IgG1⁺ plazma hücrelerinin Bmpr1a eksikliğinde azalmasının kısmen de olsa Bmpr1a eksikliğinin sınıf-değişimi

mekanizmasını sekteye uğratması nedeniyle olup olmadığını saptamak için Bmpr1a'nın sınıf değişimi mekanizması üzerindeki etkisi incelendi. Bunun için Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-} fareler ile CD19.Cre^{+/-} farelerden izole edilen dalak hücreleri hücre kültürü ortamında 3 gün boyunca T-bağımlı cevapta etkin uyarılardan anti-CD40+IL4 ya da T-bağımsız cevapta etkin uyarılardan LPS+IL4 ile inkübe edildi. İlgili situmulasyon faktörleriyle uyarılan hücrelerin IgG1 ve IgE üreten B hücrelere dönüşüp dönüşmediğini göstermek için 0. gün ve 3. gün toplanan dalak hücreleri akım sitometri analizi için antikorla boyandı. IgG1 üreten B hücrelerinin (UV-Zombie⁻ IgG1⁺B220⁺) ve IgE üreten B hücrelerinin (UV-Zombie⁻ IgE⁺B220⁺) toplam B hücreler arasındaki yüzdesinin Bmpr1a^{fx/fx}CD19Cre^{+/-} farelerde CD19.Cre^{+/-} farelere göre anlamlı değişim göstermediği saptandı (**Şekil 4.10C** ve **Şekil 4.10D**).

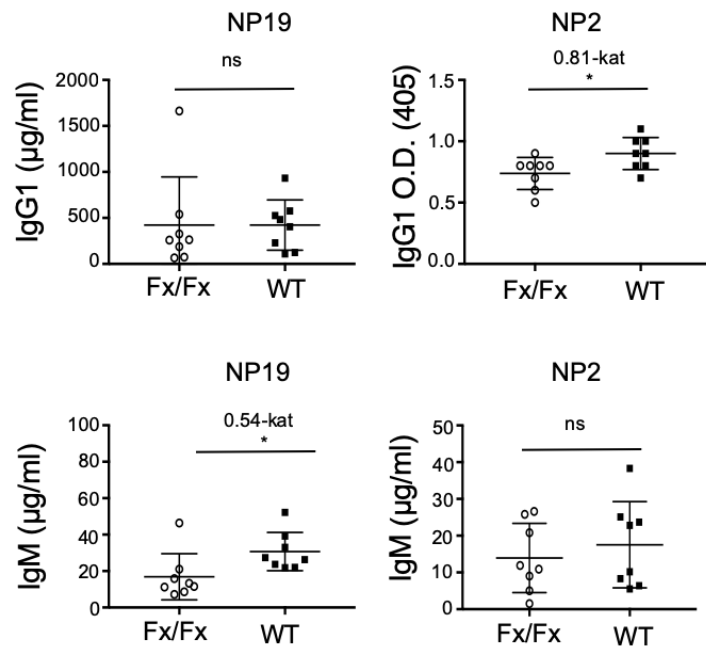
Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-} farelerdeki B hücrelerindeki sınıf-değişimi mekanizması normal şekilde ilerlemektedir. Uyarılan dalak hücrelerinin akım sitometri ile 0. ve 3. günde analizinde görüldüğü gibi her iki grupta IgG1, IgE izotiplerine dönüşüm gerçekleşmektedir (**Şekil 4.10A** ve **Şekil 4.10B**). Bu bulgu, Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-} fareler ile CD19.Cre^{+/-} fareler arasında plazma hücresi sayısı farklılığının sınıf-değişimi mekanizmasındaki bir sorundan ötürü kaynaklanmadığını göstermektedir. Bu sonuç, naif B hücrelerden germinal merkez hücrelerine ve plazma hücrelerine farklılaşmada Bmpr1a'nın sınıf-değişimi mekanizmasından bağımsız olarak rol alması ihtimalini güçlendirmektedir.



Şekil 4.10. *Bmpr1a*'nın B hücre gelişimi sırasında gerçekleşen sınıf değişimi mekanizması üzerindeki etkisinin araştırılması. (A) Anti-CD40+IL4 ile uyarılan dalak hücrelerinin akım sitometri ile analiz edilme yolu. (B) LPS+IL4 ile uyarılan dalak hücrelerinin akım sitometri ile analiz edilme yolu. (C) (D) İlgili ajanlarla uyarılan dalak hücrelerinin 3 gün sonra IgG1 ve IgE üreten B hücrelere dönüşüm yüzdesinin *Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-}* ile *CD19.Cre^{+/-}* farelerde karşılaştırılması.

4.7. B-hücre Spesifik *Bmpr1a* Kaybının Serum Antikor Seviyesine Etkisinin Araştırılması

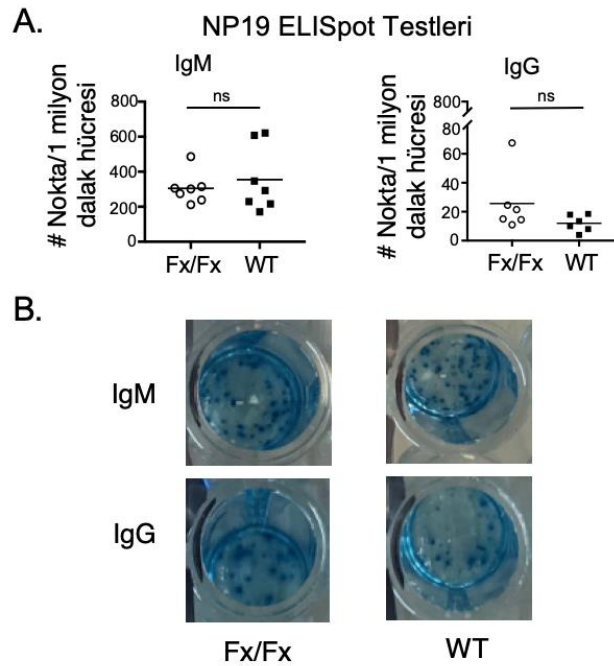
Bmpr1a geni eksik olan farelerde ($Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-}$), *Bmpr1a* geni tam olan farelere göre ($CD19.Cre^{+/-}$) kemik iliğinde bulunan ve antikor üreten uzun ömürlü plazma hücre sayılarının istatistiksel olarak anlamlı oranda ortalama %65 azalma olduğu Elispot deneyleri ile gösterilmiştir. Bu azalma NP-CGG immünizasyonu sonrası 8. günde saptanabilmekte ve 42.-118. günler arasında daha belirgin olarak gözlenmekteydi. Uzun ömürlü kemik-iliği plazma hücre kaybından kaynaklı serum antikor seviyesinde bir azalma olup olmadığını saptamak için ELISA deneyleri yapıldı. NP-CGG ile immunize edilen $Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-}$ ve $CD19.Cre^{+/-}$ farelerden immünizasyon sonrası 125. ya da 139. günlerde serum toplandı. ELISA deneyleri ile serumdaki NP antijeni spesifik IgG1 ve IgM antikor seviyeleri saptandı (**şekil 4.11**). *Bmpr1a* eksik-B hücresi olan farelerde ($Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-}$) NP2 bağlayan yüksek afiniteli IgG1 serum seviyesinin daha düşük konsantrasyonlarda olduğu saptandı (göreceli O.D. 0,81-kat, $p=0,0260$). Orta ve düşük afiniteli olan, NP19 bağlayan IgG1 serum seviyesinin iki grup arasında farklı olmadığı saptandı. Yüksek afiniteli NP2 bağlayan serum IgM seviyesi de iki grup arasında anlamlı oranda farklı değildi. Buna karşın, NP19 spesifik IgM seviyesi $Bmpr1a^{fx/fx} CD19.Cre^{+/-}$ farelerin serumunda kontrol farelerin 0,54-katı olarak saptandı ($p=0,032$). Bu sonuçlar, *Bmpr1a* eksikliğinde farelerde uzun dönemli antijen spesifik IgG1 ve IgM düzeylerinin daha az olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.11. Yüksek afiniteli (NP2 bağlayan) ve düşük afiniteli (NP19 bağlayan) IgG1 ve IgM serum antikor seviyelerinin $Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-}$ ve $CD19.Cre^{+/-}$ farelerde ELISA testi ile karşılaştırılması

4.8. BMPR1A'nın T-bağımsız B hücre cevabında rolünün incelenmesi

BMPR1A eksikliğinde düşük afiniteli dalak plazma hücrelerinin etkilenmediği saptanmıştı. Düşük afinite plazma hücreleri çoğunlukla ektrafoliküler alanda T-bağımsız yanıt ile oluşturulduğundan, BMPR1A'nın T-hücre bağımsız immün cevaptaki etkisi ve erken evrede ektrafoliküler bölgede üretilen dalak plazmablastları ve plazma hücrelerinin üretimi Elispot deneyleri ile belirlendi. Özetle, NP₅₃-AECM-Ficoll ile immunize edilen $Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-}$ ve kontrol $CD19.Cre^{+/-}$ farelerden dalak hücreleri immunizasyon sonrası 5. günde izole edildi. Antikor oluşturan hücreler Elispot yöntemi ile sayıldı. $Bmpr1a$ -eksik olan farelerde ve kontrol farelerde IgM ve IgG üreten plazma hücre sayılarının istatistiksel olarak farklı olmadığı saptandı. Bu sonuç, BMPR1A'nın germinal merkez dışında, ektrafoliküler alanda meydana gelen, T-bağımsız hücre cevabında etkili olmadığını gösterdi (şekil 4.12).

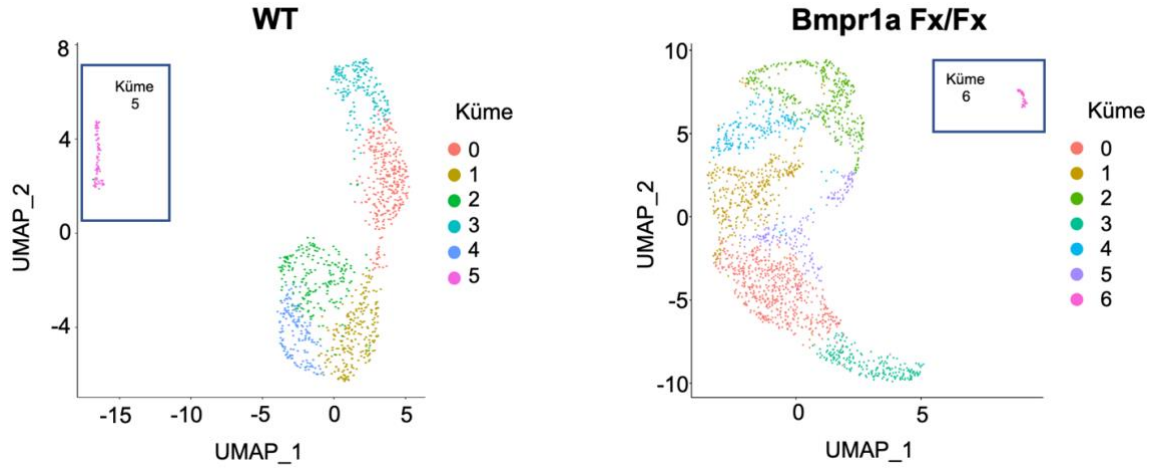


Şekil 4.12. Bmpr1A'nın T-bağımsız B hücre cevabına etkisinin EliSpot deneyi ile araştırılması

4.9. Germinal Merkez Alt Populasyonlarında Bmpr1a Transkripsiyon Dağılımının Tek-hücre RNA Sekans Analizi Yöntemi ile İncelenmesi

Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-} ve CD19.Cre^{+/-} kontrol fareleri NP-CGG ile immunize edildikten sonra 11. günde germinal merkez B hücreleri (CD19⁺ NIP⁺ Kappa⁻ CD95⁺) akım sitometri yöntemi ile ayrıştırıldı ve tek-hücre RNA sekanslaması ile transkriptomik özellikleri değerlendirildi. CellRanger (v2.1.0) kullanılarak işlenen veri setinde Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-} farelerden 1969 hücre ve hücre başına 1347 medyan gen elde edilirken, CD19.Cre^{+/-} farelerden 1153 hücre ve hücre başına medyan 1535 gen olacak şekilde veri elde edildi. Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-} ve kontrol fareleri için iki veri seti ayrı olarak Seurat paketi (v3.1, ref.²⁵) R v3.6.1 (ref.²⁶)'nde normalize edilerek veri süpervize olmaksızın PCA işlemine tabi tutuldu. Sahip oldukları ortak genlere göre UMAP haritasında hücreler alt kümelere ayrıldı. Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-} farelerden elde edilen hücreler 7 kümeye, CD19.Cre^{+/-} farelerden elde edilen hücreler ise 6 kümeye ayrıştı (şekil 4.13). Bunlar arasında özellikle dikkat çeken

CD19.Cre^{+/-} kontrol farelerdeki küme 5, Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-} farelerdeki küme 6 diğer hücrelerden daha uzakta bir noktada gruplandı.



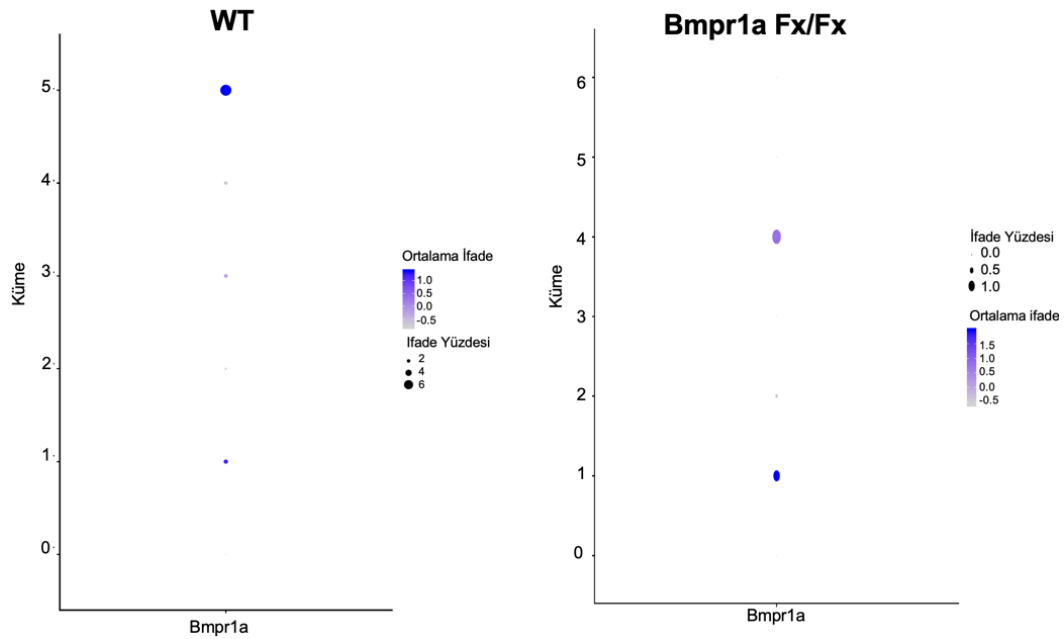
Şekil 4.13. Bmpr1a^{fx/fx} CD19.Cre^{+/-} (Bmpr1a Fx/Fx) ve CD19.Cre^{+/-} (WT) kontrol farelerden ayrıştırılan hücrelerin tek-hücre RNA sekanlanslaması sonucunda transkriptomik özelliklerine göre UMAP ile kümelere ayrıştırılması

Bmpr1a^{fx/fx} CD19.Cre^{+/-} ve CD19.Cre^{+/-} farelerde kümelerdeki hücre sayısı ve yüzde dağılımı incelendiğinde küme 5 kontrol farelerde toplam hücrelerin %5,90'ını oluştururken, Bmpr1a^{fx/fx} farelerde küme 6 toplam hücrelerin %2,03'ünü oluşturdu. Özetle, Bmpr1a geni B-hücrelerinde eksik olan farelerde ve WT farelerde benzer şekilde diğer kümelerden uzakta toplanan ve benzer transkripsiyon özelliği taşıyan bu kümedeki hücrelerin yüzdesinin Bmpr1a eksikliği olan farelerde WT farelere göre %66 azaldığı saptandı (**şekil 4.14**).

WT			Bmpr1a Fx/Fx		
Küme	Hücre sayısı	Yüzde dağılımı	Küme	Hücre sayısı	Yüzde dağılımı
0	311	26.97	0	572	29.05
1	232	20.12	1	381	19.35
2	206	17.87	2	362	18.38
3	185	16.05	3	217	11.02
4	151	13.10	4	212	10.77
5	68	5.90	5	185	9.40
Toplam	1153	100.00	6	40	2.03
			Toplam	1969	100

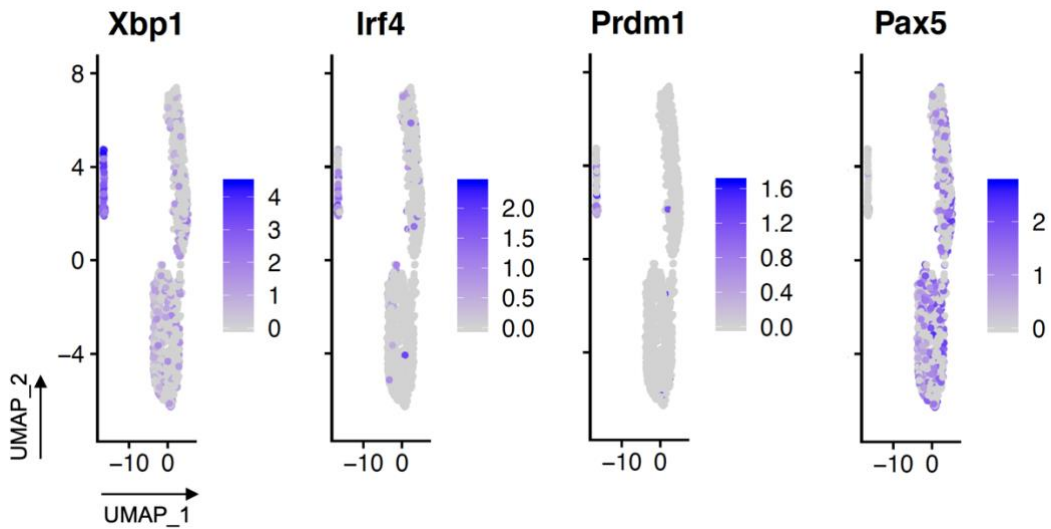
Şekil 4.14. Bmpr1a^{fx/fx} ve WT kontrol farelerden tek-hücre gen analizi sonucunda oluşan kümelerin içerdiği hücre sayısı ve yüzde dağılımı.

Daha önce yapılan qPCR deneylerinde Bmpr1a mRNA'nın germinal merkez hücrelerinde naif B hücrelere göre yüksek düzeyde ifadesinin olduğu gösterildi. Germinal merkez hücreleri birbirinden küçük farklılıklar taşıyan farklı hücre popülasyonlarından oluşan heterojen bir hücre grubudur. Daha önce yapılan mRNA qPCR çalışması germinal merkezde bulunan tüm hücrelerden elde edilen toplam RNA'ya göre analiz edildiğinden alt gruplar arasındaki Bmpr1a ifade farklılığını açığa çıkarmakta yetersiz kalmıştır. Bmpr1a mRNA ifadesinin germinal merkez alt gruplarındaki dağılımını incelemek amacıyla tek hücre RNA sekanslaması sonucunda ayrıştırılan kümelerdeki Bmpr1a ifadesi karşılaştırıldı. CD19.Cre^{+/-} WT kontrol farelerinde küme 5'in Bmpr1a ekspresyon düzeyinin diğer hücrelerden daha yüksek olduğunu ve küme 5'teki hücrelerin %6'sının ortalamanın üzerinde Bmpr1a ifade ettiğini saptandı. Bmpr1a^{fx/fx} CD19.Cre^{+/-} farelerde ise benzer özellikte olan küme 6'nın Bmpr1a ifade etmediğini saptandı (**şekil 4.15**). Bu sonuç kontrol farelerdeki küme 5'in germinal merkez reaksiyonları sırasında Bmpr1a ifadesinde kritik olduğunu ve Bmpr1a geni eksik olduğunda Bmpr1a ifadesinin bu kümede azaldığını destekledi.



Şekil 4.15. Tek-hücre RNA sekans analizi sonucunda $Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-}$ ($Bmpr1a$ Fx/Fx) ve $CD19.Cre^{+/-}$ (WT) farelerde oluşan germinal merkez alt-kümelerindeki $Bmpr1a$ ifadesinin dağılımı. İfade yüzdesi olarak tanımlanan nokta büyüklüğü grupta bulunan toplam hücreler arasında $Bmpr1a$ ifade eden hücre yüzdesini göstermekte, ortalama ifade olarak gösterilen renk skalası gen ifadesinin ortalama düzeyini temsil etmektedir.

Son olarak küme 5'teki hücrelerin gen ifadesinin diğer kümelerden nasıl farklılık gösterdiğini anlamak için yapılan diferansiyel gen analizi sonucunda küme 5'teki hücrelerin daha yüksek düzeyde *Xbp1*, *Irf4*, *Prdm1* ifade ederken *Pax5* ifadesinin daha düşük olduğu saptandı (**şekil 4.16**). *Blimp-1* (*Prdm1*), *IRF4* and *XBP1* plazma hücresi ilişkili transkripsiyon faktörleri olarak adlandırılmakta ve fare ve insan plazma hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilmektedir (75). B hücrelerin plazma hücrelerine farklılaşma süreci başladığında B hücre transkripsiyon faktörü PAX-5 azalırken, *Blimp-1* (*Prdm1*), *IRF4* and *XBP1* artmaktadır (30). Bu veriler, artmış *Prdm1*, *IRF-4* ve *Xbp-1* gen ifadesi ve azalmış *Pax-5* ifadesi nedeniyle WT farelerdeki küme 5, $Bmpr1a^{fx/fx}$ farelerdeki küme 6'nın plazma hücresi ilişkili hücre grubu olduğunu işaret etmektedir.

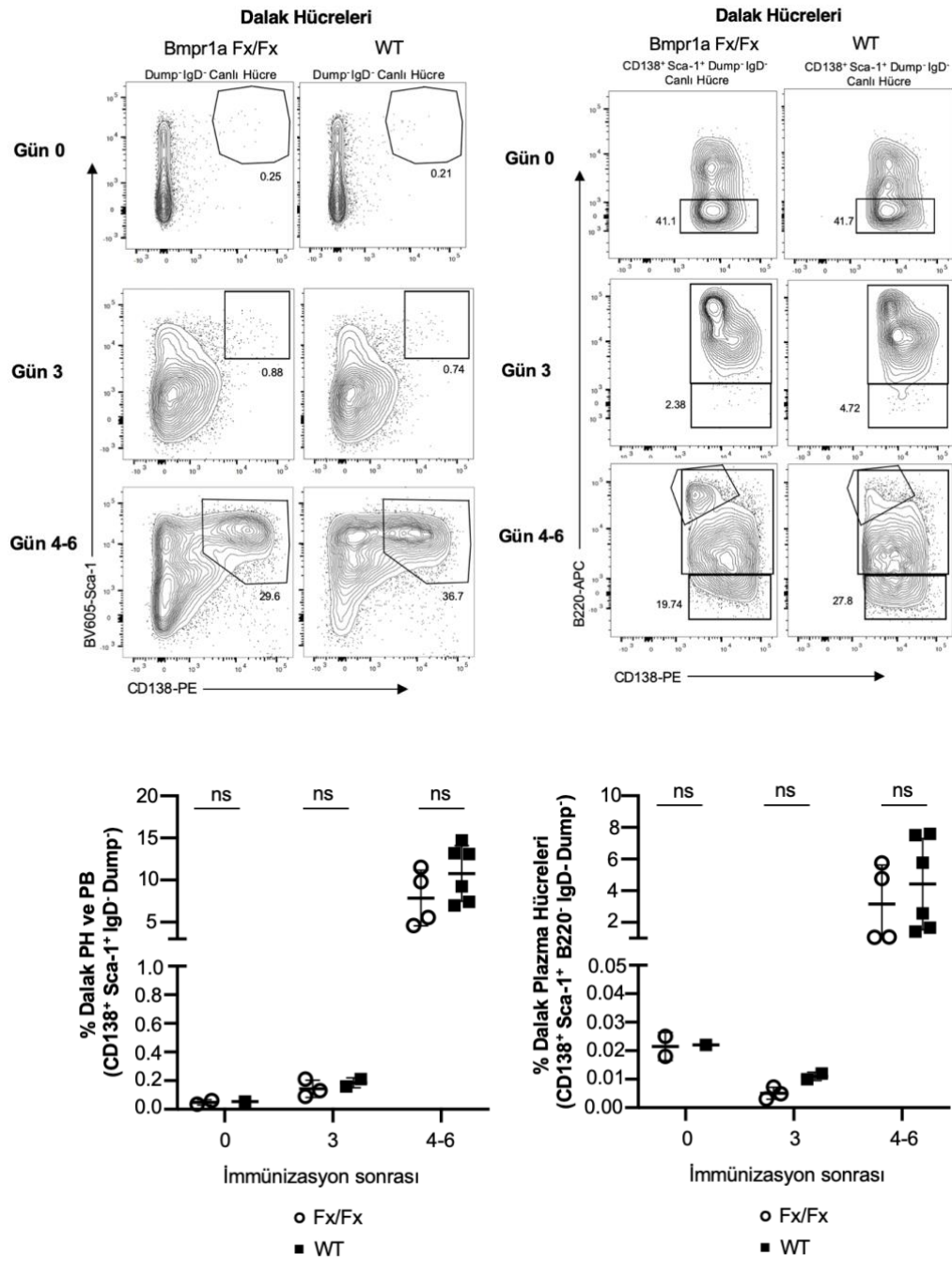


Şekil 4.16. Bilinen transkripsiyon faktörlerinin kümelerdeki ifadesinin değerlendirilmesi ile CD19.Cre^{+/-} WT farelerde küme 5'in transkripsiyon özelliklerinin ve ilişkili olduğu hücre grubunun saptanması

4.10. BMPR1A'nın Plazma Hücre Farklılaşmasındaki Etkisinin İn-vitro Araştırılması

B-hücre spesifik *Bmpr1a* geni eksik olan farelerde IgG1 antikor sentezleyen kemik iliği plazma hücre sayısının immünizasyon sonrası 8. günden itibaren WT farelere göre azalma gösterdiği, bu azalmanın 42.-118. günler arasında daha belirgin olduğu ve anlamlı olarak yaklaşık %65 olduğu daha önce yaptığımız deneylerde gösterilmişti ($p < 0,001$). Bunun yanında dalak plazma hücreleri ve plazmablast kompartmanında *Bmpr1a* eksikliğinde görece olarak bir farklılık gözlenmemişti. Buna karşın, yüksek afiniteli IgG1 dalak hücrelerinin 11. günde *Bmpr1a*^{fx/fx} farelerde WT farelere göre yaklaşık %65 az olması, germinal merkez reaksiyonları sırasında dalakta oluşan ve kemik iliği plazma hücrelerine dönüşebilecek öncü hücrelerin *Bmpr1a* eksikliğinde etkilendiğini göstermiştir. Bu çalışmalar dalaktaki naive B hücrelerinden yüksek afiniteli IgG1+ plazma hücrelerine dönüşümün *Bmpr1a* eksikliğinde sekteye uğradığı ihtimalini doğurmuştur. Bunu test etmek için in-vitro kültür çalışmaları yapılmıştır. 0. günde *Bmpr1a*^{fx/fx} ve WT farelerden dalak naive B hücreleri izole edilmiş ve plazma hücre farklılaşmasını uyaran karışım (anti-CD40, IL-4 ve IL-5) ile inkube edilmiştir (48, 76). 3. günde ve 4.-6. günlerde plazma hücresi yüzey belirteçleri

ile plazma hücrelerine dönüşümde farklılaşma olup olmadığına bakılmıştır. 0. Günde iki fare grubu arasında bir farklılık gözlenmemiş, 3. günde dalak plazma hücreleri ve plazmablastlarının canlı hücreler içindeki yüzdesi birbirine benzer sonuç vermiştir. 4.-6. günde kültürler değerlendirildiğinde $Bmpr1a^{fx/fx}$ farelerde PH/PB sıklığı ortalama % 7,8 ve % 10,7 olarak saptanmıştır (**şekil.4.17**). $Bmpr1a^{fx/fx}$ farelerdeki PH/PB sıklığı WT'lerdeki PH/PB sıklığına oranı 0,72 kat olarak saptansa da bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Benzer şekilde sadece dalak plazma hücrelerinin yüzdesi değerlendirildiğinde 0., 3., ve 4.-6. günler arasında iki grup arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Sonuç olarak, $Bmpr1a$ eksikliğinde naive B hücrelerinden dalakta antikör sentezleyen hücrelere farklılaşmada kısa süreli hücre kültürü çalışmalarında anlamlı farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 4.17. BMPR1A'nın dalak naive B hücrelerinden plazma hücrelerine farklılaşmasına etkisinin araştırılması. (A) Anti-CD40+IL4+IL-5 ile uyarılan dalak hücrelerinden Dump-IgD-CD138+Sca-1+ plazma hücre/plazmablast farklılaşmasının akım sitometri ile analiz edilmesi. (B) Anti-CD40+IL4+IL-5 ile uyarılan dalak hücrelerinden Dump-IgD-CD138+Sca-1+ B220- plazma hücre farklılaşmasının akım sitometri ile analiz edilmesi. İlgili ajanlarla uyarılan dalak hücrelerinin plazma hücrelere dönüşümünün 0. gün, 3. gün ve 4-6. günde değerlendirilmesi (C) dalak

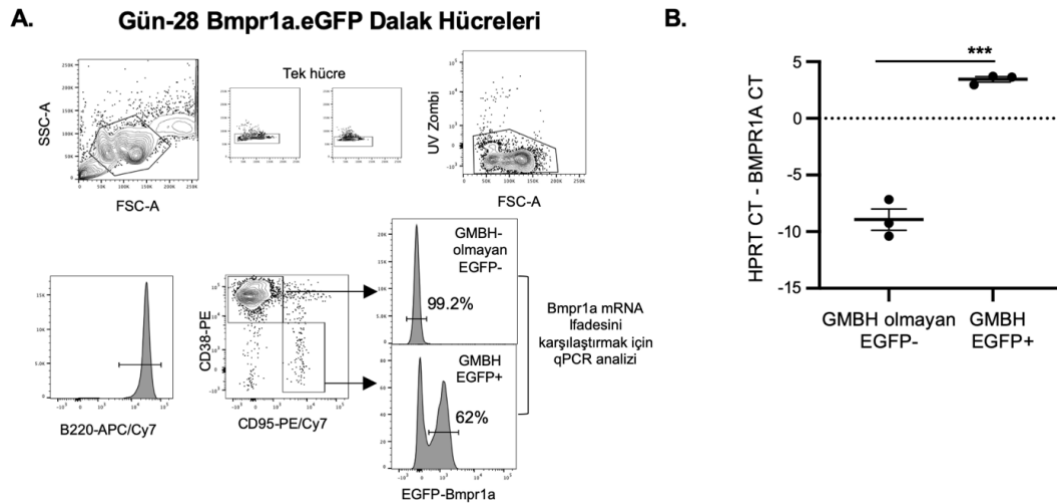
hücreleri içinde plazma hücre/plazmablast yüzdesinin (C) ve dalak hücreleri içinde plazma hücrelerinin yüzdesinin (D) $Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-}$ ile $CD19.Cre^{+/-}$ farelerde karşılaştırılması.

4.11. $Bmpr1a$ Ekspresyonun Germinal Merkez Reaksiyonları Sırasında ve Sonrasında Oluşan Plazma Hücrelerinde Zaman İçinde Değişiminin $Bmpr1a.eGFP$ Fare Modeli ile İncelenmesi

Germinal merkez B hücrelerinde ve kemik iliği plazma hücrelerinde naive B hücrelere göre artmış $Bmpr1a$ mRNA ifadesinin olmasından ve germinal merkezdeki bir alt grupta $Bmpr1a$ ekspresyonunun saptanmasından yola çıkarak $Bmpr1a$ ifadesinin germinal merkez B hücrelerinde ekspresyonunun zaman içinde değişimi $eGFP$ fare modeli ile incelendi. Bunun için laboratuvarımızda oluşturulan ve test edilen $Bmpr1a-eGFP$ mesajcı (reporter) fare modeli kullanıldı. $eGFP$ fare modeli, ilgili gene entegre olmuş GFP gen bölgesi aracılığı ile ilgili genin sentezlendiği hücreleri floresan ifadesi ile izleme fırsatı sağlar (77). Araştırma odağı olan gen mesajı hücrede sentezlendiğinde bu gene entegre olan $eGFP$ DNA dizisinde de GFP mesajı üretilir. GFP proteini floresan özelliği ile akım sitometride izlenebilir. Kısaca, $Bmpr1a-eGFP$ fare modeli $Bmpr1a$ genine 10. Eksonundan ve durma kodonundan sonra, 3' ifade edilmeyen bölgesi (3' UTR) nden önce IRES- $eGFP$ 'nin klonlanması ile oluşturulmuştur. $eGFP$ gen bölgesi $Bmpr1a$ geninin stop kodonundan sonra entegre olduğu için hücrelerde $Bmpr1a$ normal bir şekilde oluşmakta ve fareler normal özellikte gelişmektedir. Fare embriyo beyinlerinde $Bmpr1a$ ekspresyonu yüksek olduğu için oluşturulan fare modeli 16 günlük embriyo farelerden elde edilen beyin hücrelerinde $Bmpr1a-eGFP$ ekspresyonunun test edilmesi ile doğrulanmıştır.

$Bmpr1a-eGFP$ fare modeli ile ilk etapta yüksek $eGFP$ fluorescent ifadesinin $Bmpr1a$ mRNA ifadesiyle ilişkili olup olmadığı test edildi. Bunun için NP-CGG ile immünizasyon sonrası 28. günde dalak hücrelerinden B hücreleri ayrıştırıldı, bu hücreler antikolarla boyandı ve akım sitometri ile $eGFP$ ifade eden germinal merkez B hücreleri ($CD19^+ CD95^+ CD38^-$) ve $eGFP$ ifade etmeyen germinal merkez B dışında olan hücreleri ($CD19^+ CD95^- CD38^+$) ayrıştırıldı (**şekil 4.18-A**). Bu hücrelerden elde

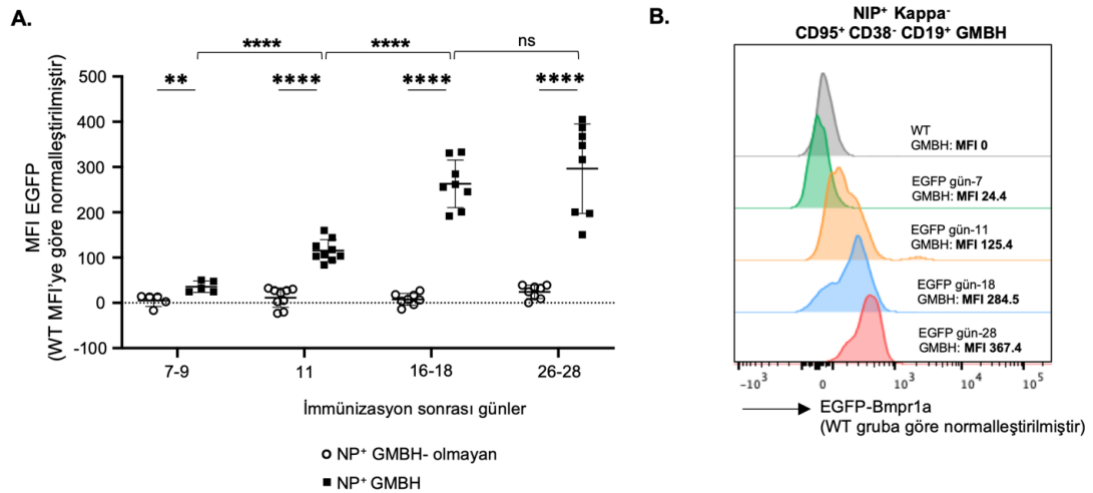
edilen mRNA'ların qPCR ile analizi sonucunda HRPT'ye göre normalize edilmiş Bmpr1a mRNA ifadesinin eGFP-Bmpr1a+ germinal merkez B hücrelerinde eGFP-Bmpr1a- germinal merkez dışı B hücelere göre yüksek olduğu saptandı (**şekil 4.18-B**). Bu bulgu, germinal merkez B hücrelerinde Bmpr1a ifadesinin akım sitometri yöntemi ile Bmpr1a-eGFP fareleri kullanılarak izlenebileceğini doğruladı.



Şekil 4.18. Germinal merkez hücrelerinde eGFP florasanının yüksek Bmpr1a ifadesi ile ilişkili olduğunun gösterilmesi. **(A)** Germinal merkez B hücrelerinin (GMBH) ve germinal B hücresi olmayan hücrelerin eGFP florasan ifadesine göre akım sitometri ayrıştırılma stratejisi. **(B)** EGFP+ GMBH ve EGFP- GMBH olmayan hücrelerde Bmpr1a ifadesinin HPRT'ye göre qPCR analizi ile karşılaştırılması.

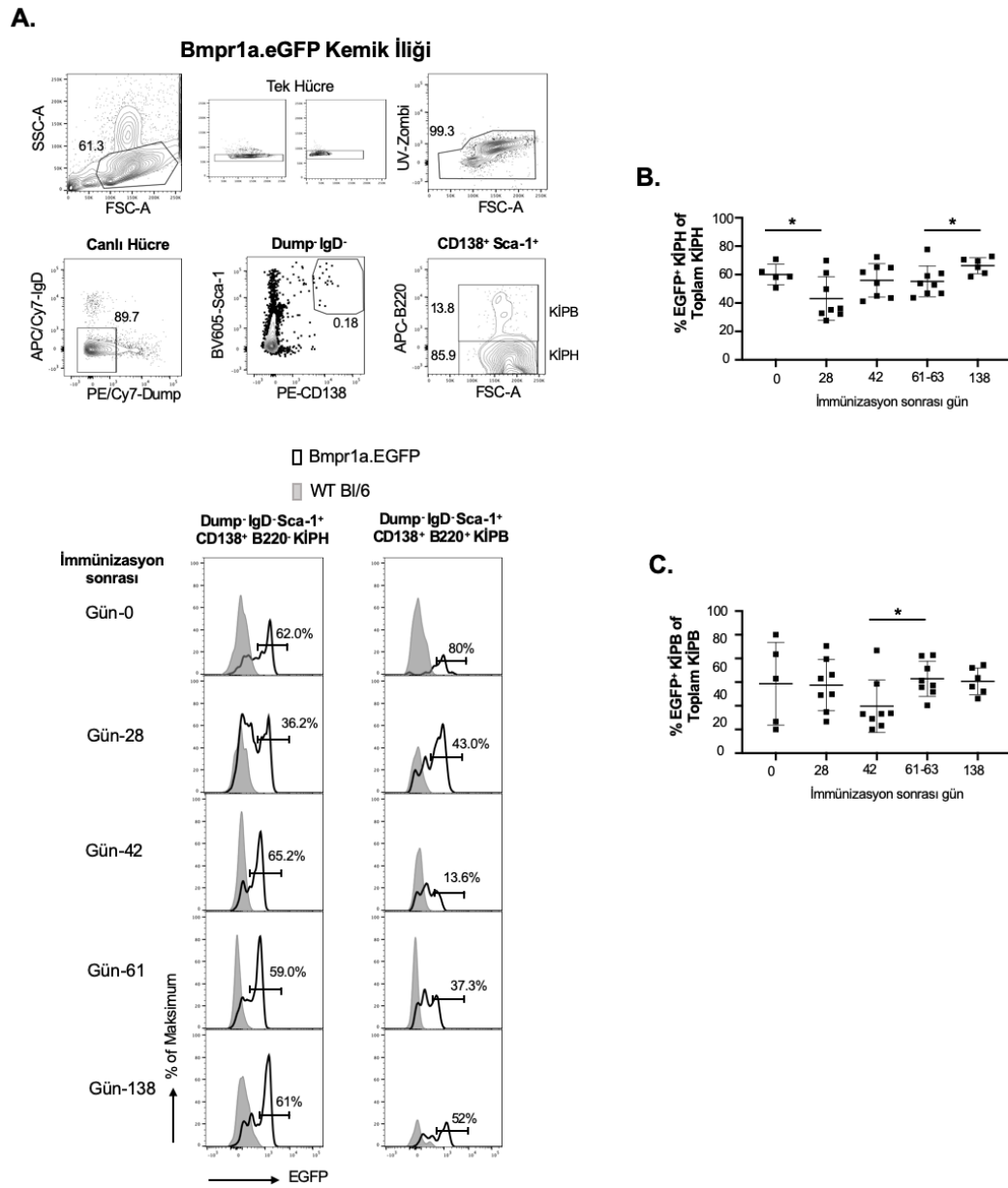
Bmpr1a mRNA düzeyi germinal merkez B hücrelerinde naif B hücelere göre artmış düzeyde ifade olmaktadır. Aynı zamanda Bmpr1a geni eksik olduğunda farelerde germinal merkez B hücrelerinin yüzdesi kontrol farelere göre % 23 azalmaktadır. Bu çalışmalar Bmpr1a ifadesinin germinal merkez B hücrelerinde kritik olduğunu gösterse de Bmpr1a'nın germinal merkez B hücrelerinin hepsi tarafından mı ya da sadece belli bir alt seti tarafından mı sentezlendiği konusu net olarak bilinmemektedir. Daha da önemlisi Bmpr1a'nın germinal merkez hücre döngüsü esnasında zaman içinde ifadesinin nasıl değiştiği bilinmemektedir. Bmpr1a'nın germinal merkezde ifadesinin takibi için Bmpr1a.eGFP^{+/+} ve C57BL/6J WT fareler

NP-CGG ile immunize edilmiştir. İmmünizasyon sonrası 7.-28. günler arasında belli zaman aralıklarında NP⁺ antijen-spesifik GMBH (NP⁺ Kappa⁻ CD95⁺ CD38⁻) ile NP⁺ GMBH-dışı hücreler (NP⁺ Kappa⁻ CD95⁻ CD38⁺) deki eGFP floresan ifadesinin medyan floresan yoğunluğu (MFI) akım sitometri ile değerlendirilmiştir. Arka plandaki floresan ışını, WT farelerdeki MFI'ya bağlı olarak hesaptan çıkarılmıştır. EGFP-Bmpr1a MFI analizi erken germinal merkez reaksiyonlarından itibaren (gün 7) Bmpr1a ifadesinin NP⁺ GMBH'nde NP⁺ GMBH-dışı hücelere göre fazla olduğunu göstermiştir (Şekil 4.19A). Ayrıca germinal merkez reaksiyonları ilerlerken 7.-9. günden 11. güne ve 11. günden 16.-18. güne GMBH'nin Bmpr1a ifadesinde anlamlı bir değişim saptanmıştır. (Şekil 4.19A ve B). 7.-28. günler arasında germinal merkez B hücrelerinde Bmpr1a-eGFP ekspresyonu artarken, germinal merkez dışı hücrelerin Bmpr1a-eGFP ifadesinin zaman noktaları arasında anlamlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır.



Şekil 4.19. Germinal B hücrelerinde Bmpr1a ifadesinin akım sitometri kullanılarak Bmpr1a.eGFP farelerinde eGFP floresan analizi ile izlenmesi. (A) Aşılama sonrası farklı zaman noktalarında ayrıştırılan antijen-spesifik GMBH ve GMBH-olmayan hücrelerde medyan eGFP floresan yoğunluğunun (MFI) WT farelerdeki arka plan floresan yoğunluğu 0 kabul edilerek değerlendirilmesi. (B) Bmpr1a.eGFP ve WT farelerde NP⁺ GMBH'lerinde Bmpr1a-eGFP ifadesinin örnek histogram grafiği.

T-bağımlı antijenik cevap sonucunda oluşan kemik iliği plazma hücrelerinde Bmpr1a ifadesinin dağılımını ve zaman içinde değişimini incelemek için NP-CGG ile immünize edilen Bmpr1a.eGFP^{+/+} and WT BL/6 farelerde immünizasyon sonrası 28.-138. günler arasındaki eGFP medyan floresan yoğunluğu (MFI) değerlendirilmiştir. Kemik iliği plazma hücreleri içinde eGFP ifade eden plazma hücrelerinin sıklığı değerlendirildiğinde immunize edilmemiş farelerde ve immunize edilen farelerde 28.-138. günler arasında plazma hücrelerinin % 43.1- % 66.2'sinde Bmpr1a ifadesi olduğu saptanmıştır (**Şekil 4.20A ve B**). Benzer şekilde, kemik iliği plazmablastları değerlendirildiğinde kemik iliği plazmablastlarının ortalama %19.6-% 42.8'inde Bmpr1a-eGFP ifadesi olduğu saptanmış ve bu zaman noktaları arasında az bir oranda değişkenlik göstermiştir (**Şekil 4.20A ve C**). Bu çalışmalar beraber ele alındığında, KİPH ve KİPB'larının heterojen bir yapıda olduğu, Bmpr1a ifadesinin bu hücrelerin bir alt grubuna özgü olduğu ve zaman içinde çok değişkenlik göstermeksizin ortalama %50'sinde Bmpr1a ekspresyonunun olduğu sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.20. Kemik iliği plazma hücreleri (KİPH) ve plazmablastlarında (KİPB) Bmpr1a ifadesinin akım sitometri ile Bmpr1a.eGFP farelerinde analizi. **(A)** Kemik iliğinden elde edilen plazma hücreleri ve plazmablastlarda gün 0-138 arasında Bmpr1a-eGFP ifade eden hücrelerin örnek akım sitometri grafiği. **(B)** Kemik iliği plazma hücreleri arasında Bmpr1a-eGFP ifadesi olan plazma hücrelerinin farklı zaman aralıklarındaki yüzde analizi. **(C)** Kemik iliği plazmablastları arasında Bmpr1a-eGFP ifadesi olan plazmablastların farklı zaman aralıklarındaki yüzde analizi.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma transmembran serin/treonin kinaz reseptörü olan kemik morfogenetik protein reseptör 1A'nın T-bağımlı B hücre immün cevabındaki etkisine ışık tutmaktadır. Yaptığımız deneyler BMPR1A'nın germinal merkez B hücre dinamiklerinde ve T-bağımlı cevap sonucunda oluşan, uzun ömürlü kemik iliği plazma hücre gelişiminde önemli rol oynadığını gösterdi. Bunun yanında BMPR1A'nın, T-bağımlı cevapta erken evrede üretilen ve düşük afiniteli olan dalak plazma hücrelerinin oluşumunda ve benzer şekilde T-bağımsız hücre yanıtıyla oluşturulan plazmablastların ve plazma hücrelerinin gelişiminde görev almadığı ek çalışmalarla gösterildi.

Bmpr1a geninin daha önceki çalışmalarda hafıza B hücrelerinde artmış ifadesi BALB/c farelerinde gösterilmişti (16). Bu çalışmada C57BL/6 farelerinde de BMPR1A'nın germinal merkez ve hafıza hücrelerinde artmış olduğu saptandı. Daha da önemlisi BMPR1A'nın kemik iliğindeki uzun ömürlü plazma hücrelerinde ve plazmablastlarda artmış mRNA ifadesi olduğu gösterildi. *Bmpr1a.IRES.EGFP* modeli de bu bulguları destekleyerek BMPR1A'nın germinal merkez hücrelerinde zaman içinde artan ifadesini gösterdi. Aynı zamanda germinal merkezden oluşan plazma hücrelerinde *Bmpr1a* ifadesi *Bmpr1a.IRES.EGFP* ile desteklendi. Bu bulgular kemik iliğinde ve lenfoid organlarda *Bmp* agonistlerinin ve antagonistlerinin ifadesinin de olduğu düşünüldüğünde germinal merkez hücrelerinde ve plazma hücrelerinde BMPR1A aracılı aktive olan *Bmp* sinyalinin kritik olduğuna ışık tutmaktadır (78).

Çalışmalarımızda *Bmpr1a* geni eksik olan farelerde germinal merkez hücreleri hafif düzeyde azalırken, kemik iliği plazma hücrelerinin ciddi düzeyde azaldığı gözlemlendi. Serumda uzun süreli antikor seviyesinin sağlanması kemik iliğindeki uzun-ömürlü plazma hücrelerinin ve dalakta üretilen muhtemelen kemik iliği plazma hücrelerinin öncüleri olan kısa ömürlü plazmablast/plazma hücrelerinin işlevselliğine bağlıdır (79). *Bmpr1a* eksikliğinde plazma hücrelerinin kemik iliğinde sayısının azalması, kalan hücrelerin uzun dönemli antikor seviyeleri sağlamakta işlevsel olup olmadığı sorusunu akla getirir. Bu öngörü ile *Bmpr1a* eksik olan fareler ile WT farelerin serumundaki antikor seviyelerine bakıldığında *Bmpr1a*-eksik farelerde WT farelere göre yüksek afiniteli IgG1 antikor seviyesinin hafif düzeyde azaldığı saptandı. Bu kalan plazma hücrelerinin antikor sentezinde işlevsel olduğunu düşündürmektedir.

Germinal merkez reaksiyonları sırasında gerçekleşen sınıf değişimi plazma hücrelerinin antikor üreten aktif makineler olmasında kritik bir aşamadır. CD40, IL-4, LPS gibi uyarıcı faktörlerin yanında, B hücre ve plazma hücrelerinin yaşamını sürdürmesinde rol alan BAFF, APRIL gibi faktörler sınıf değişimini düzenler (41, 80, 81). TGF- β 1'in T-bağımlı cevapta IgA sınıf değişiminin uyarılması için temeldir (82). Bunun aksine TGF- β süperalesinin bir üyesi olarak BMPR1A'nın sınıf değişimini etkilemediği ve BMPR1A eksikliğinde T-bağımlı ve T-bağımsız cevapta IgG1 ve IgE sınıf değişiminin sorunsuz gerçekleştiği gözlenmiştir. Her şartta, mekanizması belirsiz olmakla birlikte BMPR1A'nın plazma hücre kompartmanının oluşumunda önemli olduğu ve eksikliğinde yaklaşık %65 daha az plazma hücresi olduğu in-vivo fare çalışmalarıyla aşıkardır.

Kemik iliği plazma hücre popülasyonlarının oluşumunda pek çok gen rol alır ve bu genlerin eksikliğinde plazma hücre kaybı olur. IRF4'un geçici ifadesi Bcl6 ve AICDA gibi germinal merkez genlerini uyararak germinal merkez oluşmasında etkilidir (83). Bunların bir kısmı germinal merkez reaksiyonlarının başlamasını etkilerken FOXO1, BATF gibi genler germinal merkez iç dinamiklerini ve plazma hücre farklılaşmasını etkilemektedir (84). Bunun yanında CD21/35, IL21R, PDL1 sinyalleri, ICOS, CD80 ve CD19 genlerindeki mutasyonlar oluşan germinal merkez hücrelerinin korunmamasından dolayı erken sonlamasına neden olmaktadır (14, 85-87). Bmpr1a eksikliğinde plazma hücrelerindeki azalmanın germinal merkez hücrelerindeki azalmaya oranla daha fazla olması Bmpr1a eksikliğinin germinal merkez hücrelerinde seçici azalmaya yol açtığını düşünmektedir. Bu seçici etkilenme germinal merkezdeki plazma hücre öncülerinin kaybına yol açıyor olabilir.

Germinal merkez reaksiyonları sırasında plazma hücre öncülerinin oluşumunda BMPR1A'nın rol aldığı hipotezinden yola çıkarak BMPR1A'nın germinal merkezdeki hücrelerinin hepsi tarafından mı yoksa belli alt grubu tarafından mı ifade edildiği sorusunu yanıtlamak kritik olmuştur. Daha önce germinal merkez hücrelerinde yapılan transkriptomik ve immunohistokimyasal çalışmalar açık zonda ve koyu zonda hafıza B hücre, plazma hücre ve yeniden döngüye giren farklı hücre alt gruplarını tanımlamakta yararlı olmuştur (88). Açık zonda Bcl6^{az} IRF4⁺ Cd69⁺ ve CD138^{negatif} / Blimp1^{negatif} olarak tanımlanan hücrelerin en erken plazma hücre grubunu oluştururken, koyu zonda Bcl6'in az ve IRF4, Blimp1'in daha yüksek ifade

olduğu hücreler daha geç evredeki plazma öncülerini oluşturduğu düşünülmektedir (89). Bununla beraber yapılan tek-hücre RNA sekans analizi çalışmaları açık ve koyu zondaki geçiş, germinal merkez alt gruplarındaki heterojenite ve germinal merkezden çıkan hücrelerin kaderinin belirlenmesi gibi konuların aydınlatılmasına katkı sağlamıştır (90). Çalışmalarımızda kontrol fareleri ile yapılan tek hücre gen analizi *Bmpr1a* ifadesinin germinal merkez hücrelerinde homojen dağılmadığını ve *Xbp1*⁺, *Irf4*⁺, *Prdm1*^{hi/mod}, *Pax5*⁺ ekspresyonu ile tanımlanan germinal merkez alt grubuna özgü olduğunu göstermiştir. Bu grup germinal merkezdeki açık zon ya da koyu zon genlerin özelliklerini ayırt edici olarak taşımadığı için bu iki büyük bir alt gruptan birine kategorize etmek mümkün olmamıştır. Farelerde açık zon germinal merkez hücrelerinin alt grubunda *IRF4* ifadesinin olduğu ve bu hücrelerin gerçek germinal merkez hücre olmasından ziyade germinal merkezde bulunan erken evredeki plasmablastlar olması daha önce öne sürülmüştür. Bu göz önüne alındığında *IRF4* ve *Bmpr1a* ifade eden germinal merkez hücrelerinin erken evre plasmablastlar olmaları ihtimal dahilindedir.

Germinal merkez reaksiyonları çoğalan, farklılaşan, apoptoze giden pek çok hücrenin olduğu dinamik bir çevredir. Artan ve azalan genlerin hassas dengesi bu döngünün istikrarlı sürdürülmesi için gereklidir. B hücrelerinin en son farklılaşma evresi olarak kabul edilen plazma hücrelerine dönüşüm sırasında *Blimp1*, *Xbp1* ve *IRF4* transkripsiyonu belirgin hale gelirken, *Pax-5*, *Bcl6* gibi B hücre tanımlayıcı genlerin transkripsiyonu azalmaktadır (39). Bununla beraber *Bmp* yolağının ne zaman aktif olduğu ve *BMPR1A*'nın germinal merkez sırasında nasıl değişkenlik gösterdiğini anlamak kritik olmuştur. Bu amaç için, laboratuvarımızda oluşturulan *Bmpr1a.IRES.eGFP* fare modeli uygun bir araç olmuştur. *Bmpr1a-eGFP* fare modeli kullanılarak germinal merkezin erken evrelerinden itibaren artmaya başlayan *Bmpr1a* ifadesinin gün 16-28 arasında artış göstermesine rağmen bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.

Germinal merkez B hücrelerinde ve plazma hücrelerinde *BMPR1A*'nın rolünü anlamak *Bmpr1a*'nın bu hücrelerdeki hedef genlerini anlamakla mümkündür. *Bmpr1a* çeşitli hücrelerde transkripsiyon faktörleri (*Runx*, *Menin*, *YY1*), transkripsiyonel koaktivatör ve inhibitörleri (*p300*, *CBP*, *c-ski*, *SnoN*), *Id* proteinleri hedef alarak çoğalmayı, farklılaşmayı kontrol etmektedir (20). *Bmp-6*'in *CD40/IL-21* ile uyarılan

hafıza B hücrelerinde Xbp1 artışını baskılaması ve plazma hücre farklılaşmasını önlemesi muhtemelen ID1 ve ID3 artışını uyarması ile gerçekleşir (22). Bmp'ler multiple myelom hücrelerinde MYC ifadesini baskılayarak apoptoza neden olmaktadır (91). Germinal merkez reaksiyonları zamanla artan Bmpr1a'nın başka genleri nasıl etkilediği ve bunun plazma hücre öncülerinin oluşması ve seçilimiyle ilgisi yanıt bekleyen konulardır. Bmpr1a-eGFP fare modeli Bmpr1a ifade eden ve etmeyen germinal merkez B ve plazma hücrelerini ayırmak ve gen farklılıklarını karşılaştırmak mümkün hale gelmiştir.

Erişkin kök hücreleri nişlerinde Bmpr1a aktivasyonu aktivatör ve inhibitörlerle sıkı şekilde kontrol edilmektedir. Benzer şekilde germinal merkezde ve kemik iliğinde BMPR1A aktivasyonunun kontrol edilmesi ve bu nişlerin germinal merkez B hücrelerini ve plazma hücrelerini şekillendirmeleri söz konusudur. Bmp yolağı uyarıcı faktörler olan Bmp2,4,6 proteinlerinin, Bmp yolağı baskılayıcı olan Sostdc1 ve Twsgl'nin dalakta, özellikle germinal merkez ilişkili hücreler tarafından artmış düzeyde eksprese olması BMPR1A aktivasyonunun germinal merkezde çeşitli faktörlerle düzenlendiğini düşündürmektedir (78). Bu kontrol mekanizması BMPR1A ifade eden hücrelerden ya da nişlerinden otokrin ve parakrin sinyallerin gönderilmesi ile mümkün olabilir. Benzer otokrin mekanizma akciğer epitelinde üretilen Bmp'lerin BMPR1A aracılığı ile hücreleri kontrol etmesi olarak, tirozine-kinaz inhibitörüne dirençli kronik myeloid lösemide tanımlanmıştır (92, 93).

Sonuç olarak, bu çalışma germinal merkezde ve plazma hücre kompartmanlarının oluşumunda BMPR1A aracılığı ile uyarılan Bmp sinyal yolağının kritik rolü olduğunu göstermektedir. Bmp yolağının erişkin kök hücrelerinin idamesinin sağlanmasında ve farklılaşmasındaki etkisi düşünüldüğünde germinal merkez hücre alt grupları da muhtemelen BMPR1A yolağını benzer şekilde kullanmaktadır. BMPR1A sinyal yolağının tam olarak nasıl düzenlendiğini anlamak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- T-bağımlı immün cevap sırasında naïve B hücrelerin aktivasyonu ile gelişen germinal merkez B hücrelerinde ve onların farklılaşmasıyla oluşan hafıza B hücrelerinde, plazmablastlarda ve plazma hücrelerinde *Bmpr1a* mRNA seviyesinin naïve B hücrelere göre yüksek düzeyde olduğu qPCR deneyleri ile saptandı. Bu deneyler, *Bmpr1a* mRNA ifadesinin T-bağımlı antijen cevabından doğan B hücrelerde artmış olduğunu gösterdi.
- *Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-}* farelerde *Bmpr1a* alleli rekombinasyonunun CD19+ B hücre spesifik olduğu ve CD19- hematopoetik hücre popülasyonlarında *Bmpr1a* allelinin rekombine olmadan normal olarak bulunduğu DNA qPCR çalışmaları ile doğrulandı. B hücrelerdeki *Bmpr1a* rekombinasyonunun etkinliğine bakıldığında, immünize edilmeyen *Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-}* farelerin naif B hücrelerinde %95 olarak *Bmpr1a* rekombinasyonunun gerçekleştiği saptandı.
- *Bmpr1a* geni B hücrelerde eksik olan farelerde T-bağımlı antijen ile uyarım sonrası 8.-20. günler arasında germinal merkez hücrelerinin oluşumunda bir miktar azalma olduğu gözlemlendi. Germinal merkezin daha geç evrelerinde ise kontrol fareler ile deney grubu arasında anlamlı fark saptanmadı.
- *Bmpr1a* eksik-B hücresi olan farelerde yüksek afiniteli ve düşük afiniteli IgG1+ kemik iliği plazma hücrelerinin kontrol farelere göre ortalama %65 azaldığı Elispot ve akım-sitometri deneyleri ile gösterildi. Aynı zamanda, yüksek afiniteli IG1+ dalak plazma hücrelerinin *BMPR1A*-yolağı aktif olmayan farelerde WT farelere göre 11.günde az olduğu saptandı. Buna karşın, dalakta bulunan düşük afiniteli IgG1 üreten plazmablast/plazma hücrelerinde iki fare grubu arasında anlamlı fark tespit edilmedi. Beraber değerlendirildiğinde bu sonuçlar germinal merkezden çıkan sınıf-değişimi gerçekleşmiş olan IgG1 dalak plazma hücrelerinin ve de uzun ömürlü IgG1

kemik iliği plazma hücrelerinin oluşumunda BMPR1A'nın gerekli olduğunu destekledi.

- İn-vitro koşullarda, Bmpr1a eksik-B hücresi olan farelerde IgG1 ve IgE sınıf-değişiminin kontrol grubundaki farelerle benzer sıklıkta gerçekleştiği görüldü. Bu bulgu, BMPR1A'nın B hücre antikör sınıf değişimi için gerekli olmadığını gösterdi.
- Bmpr1a^{fx/fx}CD19.Cre^{+/-} farelerde yüksek afiniteli IgG1 serum seviyesinin ve orta-düşük afiniteli IgM seviyesinin WT farelere göre azaldığı saptandı. BMPR1A eksikliğinde üretilen uzun dönemli antijen spesifik IgG1 ve IgM düzeylerinin daha az olduğuna kanaat edildi.
- T-bağımsız immün cevap sırasında oluşan IgM ve IgG dalak plazma hücre sayılarının Bmpr1a-eksik olan farelerde ve kontrol grubunda istatistiksel olarak farklı olmadığı saptandı. Bu bulgu ile, BMPR1A'nın ektrafoliküler alanda meydana gelen, T-bağımsız hücre cevabında rolü olmadığı sonucunu doğruladı.
- Bmpr1a ekspresyonu germinal merkez alt gruplarında homojen dağılmamakta ve bir alt grupta daha yüksek ifadesinin olduğu gözlenmektedir. Bu hücre grubu yüksek düzeyde *Xbp1*, *Irf4*, *Prdm1* ifade ederken düşük düzeyde *Pax5* ifade etmektedir. Bu veriler, bu hücre grubunun germinal merkezden gelişen plazma hücre grubu ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.
- Bmpr1a ifadesinin germinal merkez hücrelerinde zaman içinde arttığı Bmpr1a.EGFP fare modeli ile gözlenmiştir. Daha da önemlisi, Bmpr1a'nın kemik-iliği plazma hücrelerinin bir alt grubu tarafından ifade edildiği saptanmıştır. Bu bulgular daha önceki sonuçlarla beraber düşünüldüğünde germinal merkez hücreleri gibi plazma hücrelerinin de Bmpr1a ekspresyonu bakımından heterojen olduğu sonucuna varılabilir.

- Özetle, bu çalışma BMPR1A'nın germinal merkez dinamiklerindeki rolünü ve plazma hücrelerinin oluşumundaki etkisini daha iyi anlamaya katkı sağlayarak bu konuda yapılacak daha ileri çalışmalara ışık tutmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Tarlinton D, Victora G. Editorial overview: Germinal centers and memory B-cells: from here to eternity. *Curr Opin Immunol.* 2017;45:v-viii.
2. William J, Euler C, Shlomchik MJ. Short-lived plasmablasts dominate the early spontaneous rheumatoid factor response: differentiation pathways, hypermutating cell types, and affinity maturation outside the germinal center. *J Immunol.* 2005;174(11):6879-87.
3. Bortnick A, Allman D. What is and what should always have been: long-lived plasma cells induced by T cell-independent antigens. *J Immunol.* 2013;190(12):5913-8.
4. Kaji T, Ishige A, Hikida M, Taka J, Hijikata A, Kubo M, et al. Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *J Exp Med.* 2012;209(11):2079-97.
5. Taylor JJ, Pape KA, Jenkins MK. A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J Exp Med.* 2012;209(3):597-606.
6. Kitano M, Moriyama S, Ando Y, Hikida M, Mori Y, Kurosaki T, et al. Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity.* 2011;34(6):961-72.
7. Vinuesa CG, Cyster JG. How T cells earn the follicular rite of passage. *Immunity.* 2011;35(5):671-80.
8. Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity.* 2016;45(3):471-82.
9. Tarlinton DM. Evolution in miniature: selection, survival and distribution of antigen reactive cells in the germinal centre. *Immunol Cell Biol.* 2008;86(2):133-8.
10. Shlomchik MJ, Weisel F. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol Rev.* 2012;247(1):52-63.
11. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(3):137-48.
12. Siepmann K, Skok J, van Essen D, Harnett M, Gray D. Rewiring of CD40 is necessary for delivery of rescue signals to B cells in germinal centres and subsequent entry into the memory pool. *Immunology.* 2001;102(3):263-72.
13. Roy MP, Kim CH, Butcher EC. Cytokine control of memory B cell homing machinery. *J Immunol.* 2002;169(4):1676-82.

14. Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, Sharpe AH, Tomayko MM, Shlomchik MJ. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol.* 2010;11(6):535-42.
15. Conter LJ, Song E, Shlomchik MJ, Tomayko MM. CD73 expression is dynamically regulated in the germinal center and bone marrow plasma cells are diminished in its absence. *PLoS One.* 2014;9(3):e92009.
16. Tomayko MM, Anderson SM, Brayton CE, Sadanand S, Steinel NC, Behrens TW, et al. Systematic comparison of gene expression between murine memory and naive B cells demonstrates that memory B cells have unique signaling capabilities. *J Immunol.* 2008;181(1):27-38.
17. Fearon DT, Manders P, Wagner SD. Arrested differentiation, the self-renewing memory lymphocyte, and vaccination. *Science.* 2001;293(5528):248-50.
18. Anderson SM, Hannum LG, Shlomchik MJ. Memory B cell survival and function in the absence of secreted antibody and immune complexes on follicular dendritic cells. *J Immunol.* 2006;176(8):4515-9.
19. Luckey CJ, Bhattacharya D, Goldrath AW, Weissman IL, Benoist C, Mathis D. Memory T and memory B cells share a transcriptional program of self-renewal with long-term hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(9):3304-9.
20. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(3):251-63.
21. Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* 2014;1(1):87-105.
22. Huse K, Bakkebo M, Oksvold MP, Forfang L, Hilden VI, Stokke T, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit CD40L/IL-21-induced Ig production in human B cells: differential effects of BMP-6 and BMP-7. *Eur J Immunol.* 2011;41(11):3135-45.
23. Bollum LK, Huse K, Oksvold MP, Bai B, Hilden VI, Forfang L, et al. BMP-7 induces apoptosis in human germinal center B cells and is influenced by TGF-beta receptor type I ALK5. *PLoS One.* 2017;12(5):e0177188.
24. Huse K, Bakkebo M, Walchli S, Oksvold MP, Hilden VI, Forfang L, et al. Role of Smad proteins in resistance to BMP-induced growth inhibition in B-cell lymphoma. *PLoS One.* 2012;7(10):e46117.

25. Kersten C, Sivertsen EA, Hystad ME, Forfang L, Smeland EB, Myklebust JH. BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. *BMC Immunol.* 2005;6:9.
26. Mangino M, Roederer M, Beddall MH, Nestle FO, Spector TD. Innate and adaptive immune traits are differentially affected by genetic and environmental factors. *Nat Commun.* 2017;8:13850.
27. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 2008;112(5):1570-80.
28. Dondelinger M, Filée P, Sauvage E, Quinting B, Muyltermans S, Galleni M, et al. Understanding the Significance and Implications of Antibody Numbering and Antigen-Binding Surface/Residue Definition. *Frontiers in Immunology.* 2018;9:2278.
29. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S3-23.
30. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(3):160-71.
31. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol.* 2007;8(5):463-70.
32. Smith KG, Light A, Nossal GJ, Tarlinton DM. The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response. *The EMBO journal.* 1997;16(11):2996-3006.
33. Jeyanathan M, Afkhami S, Smaill F, Miller MS, Lichty BD, Xing Z. Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies. *Nature Reviews Immunology.* 2020;20(10):615-32.
34. Cirelli KM, Crotty S. Germinal center enhancement by extended antigen availability. *Curr Opin Immunol.* 2017;47:64-9.
35. Siegrist C-A. 2 - Vaccine immunology. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, editors. *Vaccines (Sixth Edition).* London: W.B. Saunders; 2013. p. 14-32.
36. Allen CDC, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N, et al. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nature Immunology.* 2004;5(9):943-52.
37. Stebegg M, Kumar SD, Silva-Cayetano A, Fonseca VR, Linterman MA, Graca L. Regulation of the Germinal Center Response. *Front Immunol.* 2018;9:2469.
38. Lau AW, Brink R. Selection in the germinal center. *Curr Opin Immunol.* 2020;63:29-34.

39. Suan D, Sundling C, Brink R. Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center. *Curr Opin Immunol*. 2017;45:97-102.
40. Bhattacharya D, Cheah MT, Franco CB, Hosen N, Pin CL, Sha WC, et al. Transcriptional profiling of antigen-dependent murine B cell differentiation and memory formation. *J Immunol*. 2007;179(10):6808-19.
41. Benson MJ, Dillon SR, Castigli E, Geha RS, Xu S, Lam K-P, et al. Cutting Edge: The Dependence of Plasma Cells and Independence of Memory B Cells on BAFF and APRIL. *The Journal of Immunology*. 2008;180(6):3655-9.
42. Ise W, Kurosaki T. Plasma cell differentiation during the germinal center reaction. *Immunol Rev*. 2019;288(1):64-74.
43. Turner CA, Jr., Mack DH, Davis MM. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell*. 1994;77(2):297-306.
44. Cattoretti G, Angelin-Duclos C, Shaknovich R, Zhou H, Wang D, Alobeid B. PRDM1/Blimp-1 is expressed in human B-lymphocytes committed to the plasma cell lineage. *J Pathol*. 2005;206(1):76-86.
45. Nutt SL, Taubenheim N, Hasbold J, Corcoran LM, Hodgkin PD. The genetic network controlling plasma cell differentiation. *Seminars in Immunology*. 2011;23(5):341-9.
46. Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravalles EM, et al. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*. 2001;412(6844):300-7.
47. Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature*. 1999;401(6753):556-62.
48. Kallies A, Hasbold J, Fairfax K, Pridans C, Emslie D, McKenzie BS, et al. Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity*. 2007;26(5):555-66.
49. Santiago M-M, Ana-Rosa G-M, Socorro-María R-P, Lorena M, Lydia S-V, Giovanna R, et al. Aggressive large B-cell lymphoma with plasma cell differentiation: immunohistochemical characterization of plasmablastic lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with partial plasmablastic phenotype. *Haematologica*. 2010;95(8):1342-9.
50. Weisel FJ, Zuccarino-Catania GV, Chikina M, Shlomchik MJ. A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells. *Immunity*. 2016;44(1):116-30.

51. Kallies A, Hasbold J, Tarlinton DM, Dietrich W, Corcoran LM, Hodgkin PD, et al. Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *J Exp Med*. 2004;200(8):967-77.
52. Blink EJ, Light A, Kallies A, Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM. Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *J Exp Med*. 2005;201(4):545-54.
53. Manz RA, Thiel A, Radbruch A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature*. 1997;388(6638):133-4.
54. Lightman SM, Utley A, Lee KP. Survival of Long-Lived Plasma Cells (LLPC): Piecing Together the Puzzle. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(965).
55. Karaaslan S, Tomayko MM. A Niche for Plasma Cells: The Skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 2019;139(12):2411-4.
56. Wilson RP, McGettigan SE, Dang VD, Kumar A, Cancro MP, Nikbakht N, et al. IgM Plasma Cells Reside in Healthy Skin and Accumulate with Chronic Inflammation. *Journal of Investigative Dermatology*. 2019;139(12):2477-87.
57. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal*. 2011;23(4):609-20.
58. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*. 2010;147(1):35-51.
59. Lowery JW, Brookshire B, Rosen V. A Survey of Strategies to Modulate the Bone Morphogenetic Protein Signaling Pathway: Current and Future Perspectives. *Stem Cells Int*. 2016;2016:7290686.
60. Wagner DO, Sieber C, Bhushan R, Börgermann JH, Graf D, Knaus P. BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. *Sci Signal*. 2010;3(107):mr1.
61. Kishigami S, Mishina Y. BMP signaling and early embryonic patterning. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(3):265-78.
62. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors*. 2004;22(4):233-41.
63. Rahman MS, Akhtar N, Jamil HM, Banik RS, Asaduzzaman SM. TGF-beta/BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res*. 2015;3:15005.
64. Kim SJ, Letterio J. Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia*. 2003;17(9):1731-7.

65. Snyder A, Fraser ST, Baron MH. Bone morphogenetic proteins in vertebrate hematopoietic development. *J Cell Biochem.* 2004;93(2):224-32.
66. Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, et al. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine.* 1999;189(7):1139-48.
67. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002;346(25):1937-47.
68. Seckinger A, Meißner T, Moreaux J, Goldschmidt H, Fuhler GM, Benner A, et al. Bone morphogenetic protein 6: a member of a novel class of prognostic factors expressed by normal and malignant plasma cells inhibiting proliferation and angiogenesis. *Oncogene.* 2009;28(44):3866-79.
69. Hjertner Oy, Hjorth-Hansen H, Börset M, Seidel C, Waage A, Sundan A. Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and induces apoptosis of multiple myeloma cells: Presented in part at the 41st annual meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 1999. *Blood.* 2001;97(2):516-22.
70. Ro TB, Holt RU, Brenne AT, Hjorth-Hansen H, Waage A, Hjertner O, et al. Bone morphogenetic protein-5, -6 and -7 inhibit growth and induce apoptosis in human myeloma cells. *Oncogene.* 2004;23(17):3024-32.
71. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Keller JL, Haddad J, Jr., Miljkovic V, et al. Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(5):2639-44.
72. Mishina Y, Hanks MC, Miura S, Tallquist MD, Behringer RR. Generation of Bmpr/Alk3 conditional knockout mice. *Genesis.* 2002;32(2):69-72.
73. Rickert RC RJ, Rajewsky K. B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(6):1317-8.
74. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.
75. Minnich M, Tagoh H, Bönelt P, Axelsson E, Fischer M, Cebolla B, et al. Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation. *Nat Immunol.* 2016;17(3):331-43.
76. Biajoux V, Natt J, Freitas C, Alouche N, Sacquin A, Hemon P, et al. Efficient Plasma Cell Differentiation and Trafficking Require Cxcr4 Desensitization. *Cell Rep.* 2016;17(1):193-205.

77. Li S, Chen L-x, Peng X-h, Wang C, Qin B-y, Tan D, et al. Overview of the reporter genes and reporter mouse models. *Animal Models and Experimental Medicine*. 2018;1:29-35.
78. Passa O, Tsalavos S, Belyaev NN, Petryk A, Potocnik AJ, Graf D. Compartmentalization of bone morphogenetic proteins and their antagonists in lymphoid progenitors and supporting microenvironments and functional implications. *Immunology*. 2011;134(3):349-59.
79. Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:367-86.
80. Castigli E, Wilson SA, Scott S, Dedeoglu F, Xu S, Lam KP, et al. TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *J Exp Med*. 2005;201(1):35-9.
81. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:261-92.
82. Cerutti A. The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(6):421-34.
83. Ochiai K, Maienschein-Cline M, Simonetti G, Chen J, Rosenthal R, Brink R, et al. Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity*. 2013;38(5):918-29.
84. Inoue T, Shinnakasu R, Ise W, Kawai C, Egawa T, Kurosaki T. The transcription factor Foxo1 controls germinal center B cell proliferation in response to T cell help. *J Exp Med*. 2017;214(4):1181-98.
85. Fischer MB, Goerg S, Shen L, Prodeus AP, Goodnow CC, Kelsoe G, et al. Dependence of germinal center B cells on expression of CD21/CD35 for survival. *Science*. 1998;280(5363):582-5.
86. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, Kallies A, et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med*. 2010;207(2):365-78.
87. Dong C, Temann UA, Flavell RA. Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions. *J Immunol*. 2001;166(6):3659-62.
88. Allen CDC, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity*. 2007;27(2):190-202.
89. Ise W, Fujii K, Shiroguchi K, Ito A, Kometani K, Takeda K, et al. T Follicular Helper Cell-Germinal Center B Cell Interaction Strength Regulates Entry into Plasma Cell or Recycling Germinal Center Cell Fate. *Immunity*. 2018;48(4):702-15 e4.

90. Dufaud CR, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Deconstructing the germinal center, one cell at a time. *Curr Opin Immunol.* 2017;45:112-8.
91. Holien T, Våtsveen TK, Hella H, Rampa C, Brede G, Grøseth LAG, et al. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in multiple myeloma cells by Smad-dependent repression of MYC. *Leukemia.* 2012;26(5):1073-80.
92. Grockowiak E, Laperrousaz B, Jeanpierre S, Voeltzel T, Guyot B, Gobert S, et al. Immature CML cells implement a BMP autocrine loop to escape TKI treatment. *Blood.* 2017;130(26):2860-71.
93. Eblaghie MC, Reedy M, Oliver T, Mishina Y, Hogan BLM. Evidence that autocrine signaling through *Bmpr1a* regulates the proliferation, survival and morphogenetic behavior of distal lung epithelial cells. *Developmental Biology.* 2006;291(1):67-82.

8. EKLER

Ek-1: Çalışma arkadaşlarının deneylere katkıları

Srividhya Venkatesana (Yale Üniversitesi) Şekil 4.1., 4.2., 4.3., 4.4.1., 4.4.2., 4.6., 4.7. 4.11.2. 4.11.3. için farelerden hücre ayrıştırılmasında teknik açıdan yardımcı olmuştur. Mary M. Tomayko (Yale Üniversitesi), Laura J. Contera (Yale Üniversitesi), Eunice Songc (Yale Üniversitesi) ve Mark J. Shlomchik (Pittsburgh Üniversitesi) Şekil 4.5.1., 4.5.2, 4.5.3.'deki deneyleri gerçekleştirerek figürlerin ana hattını oluşturmuştur. Bu tez çalışmasının şekillenmesinde bu deneyler öncü veri olarak kullanılmıştır.

Tek-hücre RNA sekans analizi için hücre ayrıştırılmasında Begoña Laineza yardımcı olmuştur. Klevi Gollosi deneylerin koordinasyonunda ve eleştirisel düşüncede katkı sağlamıştır.

Çalışmada kullanılan Bmpr1a.eGFP fareleri Begona Lainez tarafından Mary Tomayko rehberliğinde oluşturulmuştur.

Begoña Laineza Şekil 4.11.1.'deki verinin üretimine katkı sağlamıştır.



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ORJİNALLİK RAPORU



15.04.2021

Hacettepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

I. ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

Adı:	Selda	Anabilim Dalı:	Temel Onkoloji Anabilim Dalı
Soyadı:	KARAASLAN	Programı:	Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi
Numarası:	N18148443	Danışmanı:	Prof. Dr. A. Lale Doğan
Statüsü:	<input type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora <input checked="" type="checkbox"/> Bütünleşik Doktora		

II. TEZ BİLGİLERİ

Önerilen Tez Başlığı:	BMPR1A'NIN PLAZMA HÜCRELERİNİN GELİŞİMİNE ETKİSİNİN VE GERMİNAL MERKEZ DİNAMİKLERİNDEKİ ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI
-----------------------	--

III. BEYAN

Yukarıda başlığı / konusu gösterilen tez çalışmamın;

- Kapak sayfası,
- Giriş,
- Ana bölümler,
- Sonuç

bölümlerinden oluşan toplam 80 sayfalık kısmına ilişkin, **15.04.2021** tarihinde şahsım / tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından, aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4 olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

- Kaynakça hariç
- Alıntılar hariç / dahil
- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi "Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Ad – Soyad
Selda Karaaslan

İmza

Ek 1: 1 adet; tezin tam başlığını, öğrencinin ad-soyad bilgisini ve dosyanın toplam sayfa sayısını gösterecek şekilde, raporlama işlemi tamamlandıktan sonra alınacak ekran görüntüsü.

Ek 2: Dijital makbuz

IV. DANIŞMAN ONAYI:

UYGUNDUR
Ad – Soyad – İmza
Prof. Dr. A. Lale Doğan

15.04.2021



Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Selda Karaaslan
Assignment title: BMPR1A'NIN PLAZMA HÜCRELERİNİN GELİŞİMİNE ETKİSİNİN ...
Submission title: BMPR1A'NIN PLAZMA HÜCRELERİNİN GELİŞİMİNE ETKİSİNİN ...
File name: Selda_TEZ-son_turnitin.pdf
File size: 4.25M
Page count: 80
Word count: 14,460
Character count: 95,413
Submission date: 15-Apr-2021 11:39AM (UTC+0300)
Submission ID: 1559817685

