



**AKUT MİYELOİD LÖSEMİDE EKSOZOM KÖKENLİ
MİKRORNA'LARIN ARAŞTIRILMASI**

Sümbül GEZER

**TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ ANABİLİM
DALI (TIP)
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Bahadır BATAR

2025-TEKİRDAĞ

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKUT MİYELOİD LÖSEMİDE EKSOZOM KÖKENLİ
MİKRORNA'LARIN ARAŞTIRILMASI

Sümbül GEZER

1208209201

TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ ANABİLİM DALI (TIP)

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Bahadır BATAR

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Sema Sırma EKMEKÇİ

Bu Tez TÜBİTAK 1002 A Hızlı Destek Programı kapsamında 223S280 proje numarası ile ve
TÜBİTAK 1002 B Hızlı Destek programı kapsamında 124S471 proje numarası ile
desteklenmiştir.

Tez No: 2023 / 255

2025- TEKİRDAĞ

KABUL VE ONAY

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı (Tıp) Doktora Programı
çerçevesinde Doç. Dr. Bahadır Batar danışmanlığında yürütülmüş bu çalışma,
aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

12/06/2025

Jüri Başkanı

İmza

Üye

İmza

Üye

✓

İmza

Üye

✓

İmza

Üye

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Sümül
Geyik'in, "Akut Miyeloid Lösemide Eksozom Kökenli mikroRNA'ların
Araştırılması" başlıklı tezi 12/06/2025 günü saat 13:30'da Namık Kemal Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca
değerlendirilerek kabul edilmiştir.

İmza

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca koşulsuz şartsız desteğini esirgemeyen, yenilikçi yaklaşımlar, yeni fikirlerle ufkumu açan ve beni yönlendirerek akademik olarak ilerlememi teşvik eden, değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. a,

Lisansüstü eğitimimin başından beri bilgi ve birikiminden hep faydalandığım, bana duyduğu güven ve inançla bu yolda ilerlememi destekleyen, bilim kadını ve insan olarak örnek aldığım değerli eş danışman hocam sayın Prof. Dr. 'ya,

Yine lisansüstü eğitimimin başından beri, beni kendi öğrencilerinden hiçbir zaman ayırmayıp bilgi, birikim ve imkanlarıyla arkamda duran kıymetli hocam sayın Prof. Dr. 'ya,

Doktora dönemimde desteği ve teşvikleriyle ilerlememde büyük katkısı olan hocam sayın Prof. Dr. a,

Doktora döneminde tanıştığım, değerli ekip arkadaşlarım ve diğer arkadaşlarıma,

Moral, malzeme ve cihaz desteklerini esirgemeyen kıymetli hocam Sayın Doç. ve öğrencileri Dr.

Teknik desteklerinden dolayı sayın Doç. Dr. 'a,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı hocalarımız ve öğrencilerine; Doç. ve öğrencilerine,

Genetik

Kasap

Beni yetiştiren ve her zaman destekleyen anne ve babama,

Ve en büyük şansım, en değerli varlıklarım, her koşulda yanımda ve arkamda olan, yıllardır okuyan bir eşe ve anneye sabreden, manevi destek ve çalışma azmi kaynaklarım, kıymetlilerim, Sevgili eşim ve

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Finansal destekleri için TÜBİTAK'a ve Tekirdağ Lösemi Derneği'ne teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Gezer, S. Akut Miyeloid Lösemide Eksozom Kökenli mikroRNA'ların Araştırılması, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Doktora Tezi, Tekirdağ, 2025.

Akut miyeloid lösemi (AML), miyeloid hematopoietik hücrelerin heterojen ve agresif bir malignitesidir. AML için mevcut tedavi protokollerine ek olarak yeni biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. Eksozomlar, hücreler arası sinyalizasyonda görevlidir, taşıdıkları mikroRNA'lar (miRNA) AML gelişimini ve ilerlemesini sağlayabilirler. Bu çalışmada, AML'de miRNA-21, miRNA-124, miRNA-126, miRNA-335 ve miRNA-370'in eksozomal ifadelerinin hasta klinik seyri ile ilişkisinin incelenmesi amaçlandı. Biyobelirteç olabilme potansiyeli incelendi. Öncelikle hastalar, sağlıklı kontroller ve hücre soylarından izole edilen eksozomlar transmisyon elektron mikroskobu, western blot ve eksozom kantitasyonu yöntemiyle karakterize edildi. Hasta ve sağlıklı kontrollerden izole edilen eksozomlardaki miRNA ifadeleri RT-qPCR yöntemi ile analiz edildi. Mann Whitney U Testi ile eksozomal miRNA-124, miRNA-126 ve miRNA-370 ifadesinin hasta ve sağlıklı kontrollerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu gösterildi (sırasıyla, $p=0,042$, $p=0,029$ ve $p=0,037$). miRNA-124 ve miRNA-370 ifadesinin sağlıklılarda, miRNA-126 ifadesinin ise hastalarda daha yüksek seviyelerde olduğu tespit edildi. Eksozomal miRNA'lar ile sağkalım arasındaki ilişki Kaplan Meier yöntemi ile analiz edildi. miRNA-126 artmış ifadesinin ve miRNA-335'in azalmış ifadesinin daha kötü sağkalımla ilişkili olduğu gösterildi. NB4 ve HL60 AML hücreleri ve HEK 293T kontrol hücreleri miRNA-124 mimik ve miRNA-126 inhibitör uygulaması ile modüle edildi ve CCK8 yöntemi ile canlılık analizi yapıldı. Bir tümör baskılayıcı olan miRNA-124 mimik transfeksiyonu sonucunda NB4 ve HL60 hücrelerinde canlılığın azaldığı gösterildi (sırasıyla, %42 ve %41). HEK 293T hücrelerinde ise canlılığın %300 arttığı tespit edildi. Onkogenik bir miRNA olan miRNA-126, inhibitörü ile susturulduğunda da NB4 ve HL60 hücrelerinde canlılığın azaldığı (sırasıyla, %54 ve %44), HEK 293T hücrelerinde ise canlılığın %175 arttığı belirlendi. Sonuçlarımız miRNA'larının etkilerinin hücre tipine göre farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu miRNA'ların AML'de yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmesinde kullanımı değerlendirilebilir.

Anahtar kelimeler: AML, eksozom, miRNA

ABSTRACT

Gezer, S., Investigating the Exosome-Derived MicroRNAs in Acute Myeloid Leukemia, Tekirdag Namık Kemal University, Institute of Health Science, Department of Tumor Biology and Immunology, Doctoral Thesis, Tekirdag, 2025.

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous and aggressive malignancy of myeloid hematopoietic cells. In addition to current treatment protocols for AML, new biomarkers are needed. Exosomes are involved in intercellular signaling, and the microRNAs (miRNAs) they carry may drive the development and progression of AML. In this study, the relationship between exosomal expressions of miRNA-21, miRNA-124, miRNA-126, miRNA-335 and miRNA-370 in AML and the clinical course of patients was investigated. First, exosomes isolated from patients, healthy controls and cell lines were characterized by transmission electron microscopy, western blot and exosome quantification methods. miRNA expressions in exosomes isolated from patients and healthy controls were analysed by RT-qPCR. Mann Whitney U Test showed that there were statistically significant differences in exosomal miRNA-124, miRNA-126 and miRNA-370 expressions between patients and healthy controls ($p=0.042$, $p=0.029$ and $p=0.037$, respectively). It was found that miRNA-124 and miRNA-370 expressions were higher in healthy individuals, while miRNA-126 expression was higher in patients. The relationship between exosomal miRNAs and survival was analysed by Kaplan Meier method. It was shown that increased expression of miRNA-126 and decreased expression of miRNA-335 were associated with worse survival. NB4 and HL60 AML cells and HEK 293T control cells were modulated with miRNA-124 mimic and miRNA-126 inhibitor application, and viability analysis was performed by CCK8 method. As a result of miRNA-124 mimic transfection, which is a tumor suppressor, it was determined that viability decreased in NB4 and HL60 cells (42% and 41%, respectively), while viability increased by 300% in HEK 293T cells. When miRNA-126, an oncogenic miRNA, was silenced with its inhibitor, it was determined that viability decreased in NB4 and HL60 cells (54% and 44%, respectively), while viability increased by 175% in HEK 293T cells. Our results revealed that the effects of miRNAs differ according to cell type. The use of these miRNAs in the development of new treatment approaches in AML can be evaluated.

Keywords: AML, exosome, miRNA

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLolar DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kanser.....	4
2.1.1. Kanser ve tümör mikroçevresi	6
2.2. Hematopoez.....	7
2.3. Lösemiler.....	7
2.3.1. Lösemi Tümör Nişi	10
2.4. Akut Miyeloid Lösemi	11
2.4.1. AML Epidemiyolojisi	12
2.4.2. AML'nin Etiyolojisi.....	13
2.4.3. AML'nin Sınıflandırılması	13
2.4.4. AML'nin FAB Sınıflandırılması.....	14
2.4.5. AML'nin WHO Sınıflandırması	14
2.4.6. AML'de Sitogenetik Değişimler ve Gen Mutasyonları.....	16
2.4.8. AML'de Epigenetik Modifikasyonlar.....	17
2.4.9. AML'nin Tanısı	17
2.5. Hücre Dışı Veziküller	19
2.5.1. Hücre dışı veziküllerin sınıflandırılması.....	20
2.6. Eksozomlar	21

2.6. 1. Eksozomların Yapısı	24
2.6.2. Eksozom Biyogenezi	26
2.6.3. Eksozomların Etki Mekanizmaları	28
2.6.4. Kanserde Eksozomlar	29
2.6.5. AML’de Eksozomlar	32
2.7. miRNA’lar.....	34
2.7.1. miRNA biyogenezi	35
2.7.2. miRNA’ların düzenleyici Roller.....	36
2.7.3. Kanserde miRNA düzensizliği	37
2.7.4. miRNA-21.....	38
2.7.5. miRNA-124.....	40
2.7.6. miRNA-126.....	41
2.7.7. miRNA-335.....	42
2.7.8. miRNA-370.....	43
2.7.9. AML’de miRNA’lar	44
2.8. AML’de eksozom kökenli miRNA’lar.....	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	47
3.1. Gereç	47
3.1.1. Kullanılan Hücre Soyları	47
3.1.2.Kullanılan Kitler ve Kimyasallar	47
3.1.2.Kullanılan Cihazlar	49
3.2. Yöntem	50
3.2.1. AML hastalarından ve sağlıklı kontrollerden kan örneği alınması ve eksozom izolasyonu.....	50
3.2.2. Plazma hazırlığı	50
3.2.3. Kan plazmasından eksozom izolasyonu	50
3.2.4. Kültüre edilen Hücrelerden Eksozom İzolasyonu	51
3.2.5. Eksozomdan arındırılmış FBS hazırlığı.....	52
3.2.7. Transmisyon Elektron mikroskobu ile eksozomların görüntülenmesi	55
3.2.8. Western blot analizi	56
3.2.9. Eksozom Kantitasyonu	58
3.2.10. RT-qPCR ile miRNA ifade analizi	60

3.2.11. miRNA izolasyonu.....	60
3.2.12. cDNA sentezi	61
3.2.12. Primer tasarımı ve RT-qPCR	63
3.2.13. Hücre soylarında miRNA modülasyonları.....	64
3.2.14. miRNA mimik ve inhibitörlerinin yeniden süspansiyonu	64
3.2.15. Hücrelerin Hazırlığı ve Transfeksiyonu.....	64
3.2.16. miRNA modülasyonlarının hücre sağkalımı üzerine etkisi	68
3.2.17. İstatistiksel analiz.....	68
4. BULGULAR	70
4.1. Hastaların ve sağlıklı Kontrollerin genel özellikleri	70
4.2. Eksozomların karakterizasyonu	72
4.2.1. TEM ile eksozomların görüntülenmesi.....	72
4.2.2. Western blot ile TSG101 proteinin gösterilmesi	75
4.2.3. Eksozomların Kantitasyonu	77
4.3. RT-qPCR ile eksozomal miRNA ekspresyonlarının gösterilmesi	79
4.3.1. RT qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi	79
4.3.2. Hücresel ve Eksozomal miRNA'ların Karşılaştırılması	87
4.3.3. Hastalarda eksozomal miRNA'lar ile sağkalım arasındaki ilişki .	88
4.4. Hücre soylarında miRNA ekspresyonları ve modülasyon deneyleri...	90
4.4.1. Hücre soylarının RT-qPCR Sonuçlarının Analizi.....	90
4.4.2. Hücre modülasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi	95
4.4.3. Modüle edilmiş hücrelerde sağkalım analizi sonuçlarının değerlendirilmesi	96
4.4.4. RT-qPCR sonuçları ile CCK8 canlılık analizi sonuçlarının karşılaştırılması.....	97
5. TARTIŞMA	99
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	112
KAYNAKLAR	114
EKLER	124
EK 1- Etik Kurul Onayı	
EK 2- Özgeçmiş	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABL1	ABL Protoonkogen 1
ALL	Akut lenfoid lösemi
AML	Akut miyeloid lösemi
APL	Akut promiyelositik lösemi
ASXL1	Ek cinsiyet tarakları benzeri 1
ATCC	Amerikan Tıp Kültür koleksiyonu
BCR	Kırılma noktası küme bölgesi
CAR	Kimerik antijen reseptörü
CEBPA	CCAAT/Enhancer-Bağlayıcı protein alfa
CPX	Karboksi peptidaz
CR	Remisyon oranı
DEK	DEK proto onkogen
DNMT3A	DNA-metiltransferaz 3A
DOT1L	Epidermal büyüme faktörü
ELN	Avrupa Lösemi Ağı
EMT	Epitelyal mezenkimal geçiş
EV	Hücre dışı vezikül
EORTC	Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Örgütü
ESCRT	Endozomal sıralama kompleksi
FAB	Fransız -Amerikan-İngiliz
FLT3	FMS-benzeri tirozin kinaz 3
GATA2	Endotelyal transkripsiyon faktör 2
HDAC	Histon deasetilaz
HSCT	Hematopoetik kök hücre nakli
HSP	Isı şok proteini
IDH1/2	İzositrat dehidrogenaz ½
ILV	İntraluminal veziküller
ISK2	Kazal tip serin proteaz inhibitör 2
ITD	İç Ardışık Tekrarlar
KIR	Katil-hücre immünoglobulin benzeri reseptör;
KIT	Protoonkogen reseptör kinaz

KLL	Kronik lenfoid lösemi
KML	Kronik miyeloid lösemi
KMT2A	Lizin metiltransferaz 2A
LSC	Lösemik kök hücre
MDS	Miyelodisplastik sendrom
MECOM	Miyelodisplastik sendromu ilişkili protein
miRNA	MikroRNA
MISEV	Ekstraselüler veziküllerin çalışmaları için asgari bilgi
MKL1	Megakaryoplastik lösemi (Translokasyon) 1
ML	Miyeloid lösemi
MLL	Karışık soylu lösemi
MLLT3	Süper Uzama Kompleksi Alt Birimi
MMP	Matriks metalloproteaz
MPN	Miyeloproliferatif neoplazm
mTOR	Rapamisinin mekanik hedefi
MRD	Minimal rezidual hastalık
MV	Mikroveziküller
MVC	Multiveziküler cisimler
NPM1	Nukleofosmin 1
NTA	Nano partikül izleme analizi
RISC	miRNA kaynaklı susturma kompleksi
SEC	Boyut dışlama kromatografisi
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 1. Dünya genelinde sık görülen kanserlerin insidans ve ölüm oranının cinsiyete bağlı değişimi (GLOBOCAN 2022)	4
Şekil 2.1. 2. Tümör mikroçevresi hücreleri (Visser ve diğ. 2023'den uyarlanmıştır)	6
Şekil 2.2. 1.Hematopoeze genel bakış (Jagannathan 2013)	7
Şekil 2.3. 1. Normal hematopoez ve insan akut miyeloid lösemisinin hiyerarşik modeli (https://med.stanford.edu/majetilab.html).	8
Şekil 2.3. 2. 2022-2030 yılları arasında tüm kanserlerden tahmini ölüm sayısı, Her iki cinsiyet, yaş [0-85+] Türkiye (GLOBOCAN 2022).....	9
Şekil 2.3. 3. 2022-2030 yılları arasında lösemi kaynaklı tahmini ölüm sayısı, Her iki cinsiyet, yaş [0-85+] Türkiye (GLOBOCAN 2022).....	9
Şekil 2.3. 4. Lösemi alt grupları (Khwaja ve diğ 2016).....	10
Şekil 2.4. 1. Dünya genelinde yaşa göre standardize edilmiş AML yeni vaka ve ölüm oranları (https://seer.cancer.gov/statfacts/)	12
Şekil 2.4. 2. AML, WHO ve FAB sınıflandırması (WHO sınıflandırmasının beşinci baskısına dayanmaktadır) (Khoury ve diğ. 2022).	15
Şekil 2.4. 3. AML'deki gen mutasyonları (Kistagari ve diğ. 2020)	17
Şekil 2.6. 1. Eksozomların oluşumu ve salınımının TEM görüntüsü (Wang ve diğ. 2002)	22
Şekil 2.6. 2. Eksozom yapısı (Grung ve diğ. 2021'den uyarlandı)	25
Şekil 2.6. 3. Eksozom biyogenezi (Gurung ve diğ. 2021'den uyarlanmıştır).	27
Şekil 2.6. 4. Eksozomların hedef hücre tarafından içselleştirilmesi (Ginini ve diğ. 2022'den uyarlanmıştır)	29
Şekil 2.6. 5. AML kökenli eksozomların taşıdıkları yüzey belirteçleri (Boiyadzis ve diğ. 2016).	33
Şekil 2.7. 1. miRNA sentezinin klasik ve alternatif yolları (Shang ve diğ. 2023).	36
Şekil 2.7. 2. Kanser gelişimi ve ilerlemesi üzerine miRNA etki mekanizmaları (Yousefnia ve Negahdary, 2024)	37
Şekil 2.7. 3. miRNA-21 geninin insan kromozomu üzerindeki konumu (Gene CaRNA).	39

Şekil 2.7. 4. miRNA-124 geninin insan kromozomu üzerindeki konumu (GeneCaRNA).....	40
Şekil 2.7. 5. miRNA-126 geninin insan kromozomu üzerindeki konumu (GeneCaRNA).....	41
Şekil 2.7. 6. miRNA-335 geninin insan kromozomu üzerindeki konumu (GeneCaRNA).....	43
Şekil 2.7. 7. miRNA-370 geninin insan kromozomu üzerindeki konumu (GeneCaRNA).....	44
Şekil 2.8. 1. AML hücrelerinden köken alan eksozomların etkileri (Amin ve diğ 2022)	45
Şekil 3.2. 1. Eksozom izolasyonu adımları ve eksozom pellet görüntüsü.....	51
Şekil 3.2. 2. Eksozomdan arındırılmış FBS hazırlığı aşamaları.	52
Şekil 3.2. 3. TEM ekranında grid görüntüsü ve karbon kaplı grid yapısı	55
Şekil 3.2. 4. Protein standartlarının hazırlanması	56
Şekil 3.2. 5. Standartların (STD) ve hasta örneklerinin (ÖRN) plakada yerleşimi	59
Şekil 3.2. 6. Hücrelerin mikroskopik görüntüsü ve mimik transfeksiyonu için oluşturulan gruplar	66
Şekil 3.2. 7. Hücrelerin mikroskopik görüntüsü ve miRNA inhibitör transfeksiyonu için oluşturulan gruplar	67
Şekil 4.1. 1. Hastalarda sağkalım ve lökosit sayısı arasındaki ilişki	71
Şekil 4.2. 1. Hastalara ait eksozomların TEM görüntüleri (n=20)	73
Şekil 4.2. 2. Sağlıklı kontrollere ait eksozomlarının TEM görüntüleri (n=4)	73
Şekil 4.2. 3. Hücre soylarından izole edilen eksozomların TEM görüntüsü	74
Şekil 4.2. 4. THP1 hücre soyunda MVB ve içlerindeki ILV TEM görüntüsü	75
Şekil 4.2. 5. 20 hastanın ve 20 sağlıklı kontrolün western blot ile tespit edilen eksozomal TSG101 protein bantları	76
Şekil 4.2. 6. Hücre soylarının western blot ile eksozomal TSG101 protein bantları ve hasta ve sağlıklı kontrol örnekleriyle karşılaştırılması (H1: Hasta, S1: Sağlıklı kontrol)	77
Şekil 4.2. 7. Eksozom standart eğri grafiği	78

Şekil 4.3. 1. Hasta ve Sağlıklı kontrollerde miRNA-21'in $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması	82
Şekil 4.3. 2. Hasta ve Sağlıklı kontrollerde miRNA-124'in $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması	83
Şekil 4.3. 3. Hasta ve Sağlıklı kontrollerde miRNA-126'nin $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması	84
Şekil 4.3. 4. Hasta ve Sağlıklı kontrollerde miRNA-335'in $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması	85
Şekil 4.3. 5. Hasta ve Sağlıklı kontrollerde miRNA-370'in $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması	86
Şekil 4.3. 6. Hastalarda hücreSEL ve eksozomal miRNA'ların $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması (h:hücreSEL miRNA, e: eksozomal miRNA)	88
Şekil 4.3. 7. Eksozomal miRNA126 ile sağkalım arasındaki ilişki.....	89
Şekil 4.3. 8. Eksozomal miRNA 335 ile sağkalım arasındaki ilişki.....	90
Şekil 4.4. 1. NB4 hücre soyunda hücreSEL ve eksozomal miRNA'ların $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması	93
Şekil 4.4. 2. HL60 hücre soyunda hücreSEL ve eksozomal miRNA'ların $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması	93
Şekil 4.4. 3. THP1 hücre soyunda hücreSEL ve eksozomal miRNA'ların $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması	94
Şekil 4.4. 4. HEK 293 T hücre soyunda hücreSEL ve eksozomal miRNA'ların $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması	94
Şekil 4.4. 5.Hücre canlılıklarının karşılaştırılması.....	97

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. 1. Kanserin temel özellikleri (Hanahan 2022).....	5
Tablo 2.4. 1. AML’de, FAB sınıflandırılması (Seiter ve diğ. 2011)	14
Tablo 2.4. 2. AML FAB Alt Tipleri İle İmmünolojik Yüzey Belirteçleri İlişkileri	18
Tablo 2.4. 3. Genetik anomalilerin durumun prognozla ilişkisi (Döhner ve diğ. 2022).	19
Tablo 2.5. 1. EV Alt Sınıfları (Sheta ve diğ. 2023)	21
Tablo 3.1. 1. Kullanılan kitler ve kimyasal maddeler	48
Tablo 3.1. 2. Kullanılan cihaz ve teçhizatlar	49
Tablo 3.2 1. Eksozom kantitasyon standartlarının hazırlanması	59
Tablo 3.2 2. Kullanılan miRNA primer dizileri	60
Tablo 3.2 3. cDNA sentez karışımı içeriği.....	62
Tablo 3.2 4. RT primer karışımı.....	62
Tablo 3.2 5. RT primer, dNTP ve RNA karışımının içeriği	62
Tablo 3.2 6. RT-qPCR reaksiyon karışımı	63
Tablo 3.2 7. RT-qPCR reaksiyon koşulları.....	63
Tablo 3.2 8. miRNA hedefli / hedefsiz mimic ve transfeksiyon ajanı karışımları	66
Tablo 3.2 9. miRNA hedefli / hedefsiz inhibitör ve transfeksiyon ajanı karışımları	67
Tablo 4.1. 1. Hastaların demografik ve klinik özellikleri	70
Tablo 4.1. 2. Hastalarda ve sağlıklı kontrollerde yaş ortalamalarının cinsiyete göre dağılımı	72
Tablo 4.2. 1. Hasta ve sağlıklı kontrollerin eksozomal proteinlerin konsantrasyonları ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (BCA assay sonuçları).....	76
Tablo 4.2. 2. Hücre soylarının eksozomal proteinlerin konsantrasyonları ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (BCA assay sonuçları)	76
Tablo 4.2. 3. Örneklerin absorbans değerleri, μL ’deki ve kullanılan örnek miktarındaki eksozom sayıları.....	78

Tablo 4.3. 1. AML hastalarının ve sağlıklı kontrollerin eksozomal miRNA ifadesi ortalamaları	79
Tablo 4.3. 2. Hasta ve sağlıklı kontrollerde miRNA ifade düzeylerinin Mann Whitney U Testi ile karşılaştırmaları	80
Tablo 4.3. 3. Hasta ve Sağlıklı kontrollerde miRNA ifade düzeylerinin korelasyon analizi	80
Tablo 4.3. 4. Hasta miRNA ifade düzeylerinin yaş gruplarına göre karşılaştırılması	81
Tablo 4.3. 5. Grupların miRNA-21 medyan ve güven aralıkları karşılaştırmaları	82
Tablo 4.3. 6. Grupların miRNA-124 medyan ve güven aralıkları karşılaştırmaları	83
Tablo 4.3. 7. Grupların miRNA-126 medyan ve güven aralıkları karşılaştırmaları	84
Tablo 4.3. 8. Grupların miRNA-335 medyan ve güven aralıkları karşılaştırmaları	85
Tablo 4.3. 9. Grupların miRNA-370 medyan ve güven aralıkları karşılaştırmaları	86
Tablo 4.3. 10. Hasta hücrelerinin ve eksozomlarının miRNA ifade düzeylerinin Spearman Korelasyon Testi Sonuçları	87
Tablo 4.3. 11. Hasta hücrel ve eksozomal miRNA'larının Mann Whitney U Testi ile karşılaştırma sonuçları	87
Tablo 4.3. 12. Kaplan Meier analizi Log-rank testi p değerleri	89
Tablo 4.4. 1. Hücre soylarında ve eksozomlarda miRNA ifadeleri ($2^{-\Delta Ct}$)	91
Tablo 4.4. 2. Tüm hücrelerde hücrel ve eksozomal miRNA düzeylerinin Mann Whitney U Testi ile karşılaştırılması	91
Tablo 4.4. 3. NB4, HL60 ve THP1 hücre soylarında hücrel ve eksozomal miRNA düzeylerinin Mann Whitney U Testi ile karşılaştırılması	91
Tablo 4.4. 4. Hücre soylarında hücrel ve eksozomal miRNA'ların $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri	92
Tablo 4.4. 5. MiRNA-124 mimik ve miRNA-126 inhibitör uygulanan hücrelerin $2^{-\Delta Ct}$ değerleri	95

Tablo 4.4. 6. Mimik ve inhibitör uygulanan grupların $\Delta\Delta C_t$ ve $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri	95
Tablo 4.4. 7. CCK8 Sağkalım analizi absorbans değerleri ortalamaları	96
Tablo 4.4. 8. Hücre gruplarındaki canlılık değişimleri	96
Tablo 4.4. 9. RT-qPCR sonuçları ile absorbans canlılık analizi sonuçlarının karşılaştırılması	97



1. GİRİŞ

Akut miyeloid lösemi (AML), kemik iliğindeki olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin kontrolsüz büyümesinden kaynaklanan agresif bir kan kanseridir. AML, %24'lük beş yıllık sağkalım ve sadece 8,5 aylık ortalama sağkalım oranı ile yüksek bir ölüm oranına sahiptir (Shallis ve diğ. 2019). AML, klonal bir hematopoietik kök hücre bozukluğu olup genetik, biyolojik ve klinik olarak heterojendir. AML'de, kemik iliği nişlerinde bulunan tedaviye dirençli lösemik kök hücrelerden kaynaklandığı düşünülen tedavi sonrası nüks oranları yüksektir. Bu nedenle kanser tedavisinde önemli bir zorluk olmaya devam etmektedir. Hematopoietik kök hücreleri AML'ye dönüşüme teşvik eden birçok çevresel ve genetik risk faktörü tespit edilmiştir. Bunlar arasında yaş, öncül hematolojik hastalıklar ve genetik bozukluklar, virüs enfeksiyonu, radyasyon ve çeşitli kimyasallara maruz kalma gibi etmenler bulunur (Kouchkovsky vd., 2016). AML'deki başlıca ilerletici mutasyon hedefleri arasında DNA metilasyonları, kromatin modifikasyonu, RNA eklenmesi, transkripsiyon, sinyal iletimi, kohezin düzenlemesi ve DNA onarımında yer alan moleküller bulunur. Mutasyonlar sıklıkla spesifik hastalık fenotipi, ilaç yanıtı ve klinik sonuçlarla ilişkili olduğundan hastalığın daha iyi yönetimi için AML genetiğini iyi bilmek gereklidir (Ogawa vd., 2018; Tanaka vd., 2019).

AML teşhisi için, kapsamlı bir hasta öyküsü ile fiziki muayene, görüntüleme bulguları ve kan laboratuvar değerleri dahil ilgili klinik veriler elde edilmelidir. AML için mevcut tedavi protokollerinin çoğu, tedavi sınıflandırmasına katkıda bulunan prognostik faktörlere dayanmaktadır. Ancak, AML'nin heterojen yapısı nedeniyle tedavi seçimi ve yanıtı bu tür klasik parametrelerle güvenilir bir şekilde tahmin edilemeyebilir. Bu nedenle son yıllarda AML hücrelerinden salınan eksozomların analizi gibi yöntemler yeni teşhis, prognoz, tedavi seçim ve yanıt-tahmin belirteçleri olarak değerlendirilebilir (Li vd., 2023).

Farklı hücre türleri, birbirleriyle hücre dışı veziküller (EV) aracılığıyla iletişim kurabilirler. Bu amaçla, sinyal molekülleri, köken aldıkları hücreler tarafından alıcı hücreleri uzun veya kısa mesafelerde EV'ler aracılığıyla etkilerler. Hedef hücre konumuna ve mesafesine bakılmaksızın, sinyal moleküllerinin hücre zarına bağlı yüzey reseptörlerine bağlanmasıyla spesifik sinyal yolları başlatılır (Dezhakam vd., 2023).

Eksozomlar EV'lerin alt gruplarından en çok çalışıldılar. Kendilerine özgü biyogenez yolları, hücre zarlarından oluşmaları sayesinde alıcı hücre tarafından daha iyi tolere edilebilmeleri, ilaç taşıyıcı olarak kullanılabilmesi, immün modülasyonu sağlayabilmeleri, önemli molekülleri doğal olarak taşıyabilmeleri ve hücre-hücre etkileşiminde görevli olmaları eksozomların teşhis, hastalık ilerlemesi ve tedavide önemli moleküller olduğunu göstermektedir (Edgar vd., 2016).

Kanser hücreleri genellikle normal hücrelerden daha fazla eksozom üretirler ve kanser hücrelerinden türetilen eksozomlar hem yerel hem de uzak mikro ortamları değiştirmek için güçlü bir kapasiteye sahiptirler (Zhang ve Yu. 2019).

MikroRNA'lar (miRNA) evrimsel olarak korunan küçük kodlayıcı olmayan 18-24 nükleotid uzunluğunda RNA'lardır ve esas olarak hedef mRNA'nın baskılanması, transkripsiyon sonrası gen regülasyonu veya translasyonun düzenlenmesi gibi önemli fizyolojik etkilere sahiptirler. miRNA'ların lipoproteinler, çözünür proteinler ile kompleksler halinde veya eksozomlarda kapsüllenmiş olarak çeşitli vücut sıvılarına salındığı keşfedilmiştir. Eksozom ile ilişkili miRNA'lar ve diğer moleküler bileşenler, kan dolaşımı aracılığıyla alıcı hücrelere götürülebilirler (Li L vd.,2023). Kanserli hastaların plazmasında biriken eksozomlar, tümör hücrelerinin vekilleridirler (Boyiadzis ve diğ,2016).

Bu tez projesinin öncelikli amacı, AML hastalarında, sağlıklı kontrollerde ve AML hücre soylarında eksozomların saflaştırılarak bu eksozomların taşıdıkları miRNA kargolarının hasta klinik seyriyle ve hücre genetik özellikleriyle ilişkisini araştırmaktır. Ayrıca bu belirlenen miRNA'lar farklı AML alt sınıflarını temsil eden hücre soylarında modifiye edilerek sağkalım ile ilişkisini incelenmesi de tez projesinin bir diğer amacıdır. Hedef miRNA'ların, prognoz ve sağkalım ile ilişkisinin belirlenmesi yeni tedavi hedeflerinin tanımlanmasına olanak sağlayacaktır.

Bu nedenle çalışmamızda, AML hastalarının ve sağlıklı kontrollerin kanlarından, AML hücre soylarından ve kontrol hücre soylarından eksozom izole edilerek taşıdıkları kargolardan miRNA'lar incelendi. AML'de ilaç direnci ve tedavi yanıtı ile ilişkili olduğu düşünülen ancak daha önce eksozomal içerikte incelenmemiş olan miRNA-21, miRNA-124, miRNA-126, miRNA-335 ve miRNA-370 hedeflendi. Bildiğimiz kadarıyla daha önce, bu miRNA'ların AML hastalarından, sağlıklı kontrollerden ve hücre soylarından izole edilen eksozomlardaki ifade profillerinin

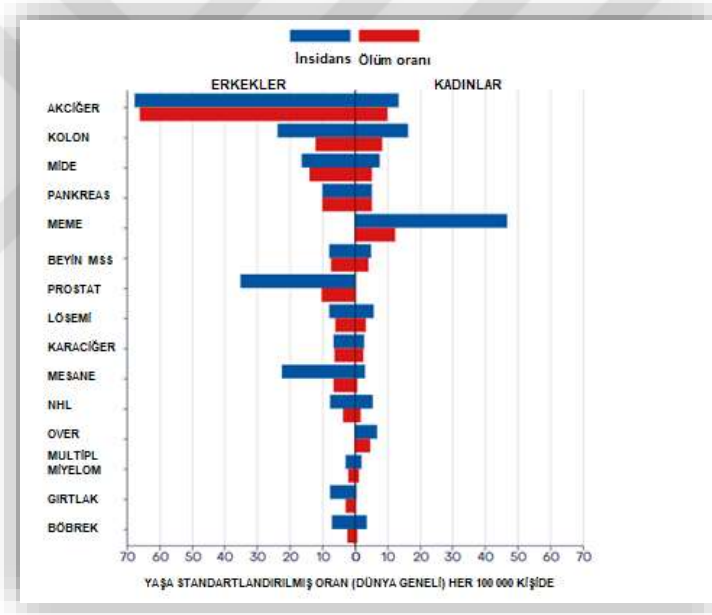
birbirlerine göre durumlarını karşılaştırmalı olarak inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca çalışmamızda, AML hücre soylarından NB4, THP1 ve HL60'ta ve sağlıklı kontrol hücresi olarak HEK 293T hücre soylarında, sağkalım üzerinde olası etkisi bulunan miRNA'lar modüle edilerek hücresel yanıt durumları hastalardaki sağkalım verileri ile karşılaştırıldı. Bu sayede ilgili hedef eksozomal miRNA'ların potansiyel biyobelirteç ve tedavi hedefi olma rolü araştırıldı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin normallikten neoplastik büyüme durumlarına doğru ilerlerken işlevsel yetenekler geliştirmesidir ve dünya çapında önde gelen ölüm nedeni olarak küresel bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. GLOBOCAN istatistiklerine göre 2022 yılında 20 milyon yeni kanser vakası ve 9,7 milyon kanser ölümü tahmin edilmiş olup her ikisi de artış eğilimindedir. Yine aynı verilere göre her iki cinsiyet ve tüm yaş grupları referans alındığında lösemiler sıklık bakımından 13. ölüm oranı bakımından da dünya genelinde 10. sıradadır (Şekil 2. 1.1) (Bray ve diğ. 2022).



Şekil 2.1. 1. Dünya genelinde sık görülen kanserlerin insidans ve ölüm oranının cinsiyete bağlı değişimi (GLOBOCAN 2022)

Douglas Hanahan ve Robert Weinberg, 2000 yılında normal hücrelerin kötü huylu hücrelere çok aşamalı dönüşümünü düzenleyen altı temel kuralı kavramsallaştırmışlardır (Hanahan ve Weinberg 2000). 20 yıldan fazla bir sürede yapılan güncellemelerle bu altı orijinal ayırt edici özellik 14'e çıkarılmıştır (Tablo 2.1.1) (Hanahan 2022).

Tablo 2.1. 1. Kanserin temel özellikleri (Hanahan 2022'den uyarlandı).

AYIRT EDİCİ ÖZELLİKLER		
1. Versiyon	Kendi kendine büyüme sinyali oluşturma Büyümeyi inhibe edici sinyallere duyarsızlık, Programlanmış hücre ölümünden kaçınma, Sınırsız replikatif potansiyel, Sürekli anjiyogenez Doku istilas ve metastaz	
ETKİNLEŞTİRİCİ ÖZELLİKLER		
2. Versiyon	Kendi kendine büyüme sinyali oluşturma Büyümeyi inhibe edici sinyallere duyarsızlık, Programlanmış hücre ölümünden kaçınma, Sınırsız replikatif potansiyel, Sürekli anjiyogenez Doku istilas ve metastaz	Tümör gelişimini Teşvik Eden inflamasyon Genom Kararsızlığı ve Mutasyon
3. Versiyon	Kendi kendine büyüme sinyali oluşturma Büyümeyi inhibe edici sinyallere duyarsızlık, Programlanmış hücre ölümünden kaçınma, Sınırsız replikatif potansiyel, Sürekli anjiyogenez Doku istilas ve metastaz	Tümör Gelişimini Teşvik Eden İnflamasyon Genom Kararsızlığı ve Mutasyon Hücre yaşlanması Hücre Metabolizmasının Düzensizleştirilmesi Bağışıklıktan kaçış Fenotipik esneklik gelişimi Epigenetik yeniden programlama Polimorfik mikrobiyomlar

Ayırt edici özellikler, belirli özelliklerin birbirleriyle nasıl etkileşime girdiklerini ve normal hücrelerin kötü huylu tümörlere nasıl dönüşebileceğini açıklayan bir dizi kriteri ifade eder. Bu özelliklerin ilk altı tanesi kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelerden farkını ortaya koymaktadır. Tümör etkinleştirici özellikler yıllar içinde tespit edilerek bu ayırt edici özellikler eklenmiştir (Hanahan 2022). Bu özellikler birlikte, kanser hücrelerinin hücre büyümesini ve bölünmesini düzenleyen, normal kontrollerden kaçmasına izin vererek bölünmeye ve çoğalmaya devam etmelerini, yakındaki dokuları istila edebilen ve vücudun diğer bölgelerine yayılabilen bir tümör oluşturmalarını sağlar.

2.1.1. Kanser ve tümör mikroçevresi

Kanser, tümör hücreleri ve kanserli olmayan çok sayıda hücreden oluşan ve dönüştürülmüş, dinamik bir hücre dışı matrise gömülü karmaşık ekosistemleri temsil eder. Tümör mikroçevresi (TMÇ) hücreleri Şekil 2.1.2.'de gösterilmiştir.

Bağımsızlık hücreleri				Stromal hücreler ve matris	Vasküler hücreler
Adaptif bağışıklık hücreleri	Miyeloid bağışıklık hücreleri		Adaptif ve doğuştan gelen bağışıklığın arayüzündeki bağışıklık hücreler		
CD8 ⁺ T hücreleri	Makrofajlar	Mast hücreleri	NK hücreleri	Kanserle ilişkili fibroblastlar	Kan damar endotel hücreleri
CD4 ⁺ T hücreleri	Nötrofiller	Eozinofiller	Değişmez NK T hücreleri	ECM	Lenfatik EC'ler
Tregler	Monositler	Miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler	Gama delta T hücreleri	Yağ hücreler	Perisitler
B hücreleri	DC'ler	Trombositler	Doğuştan gelen lenfositler	Nöronlar ve sinirler	

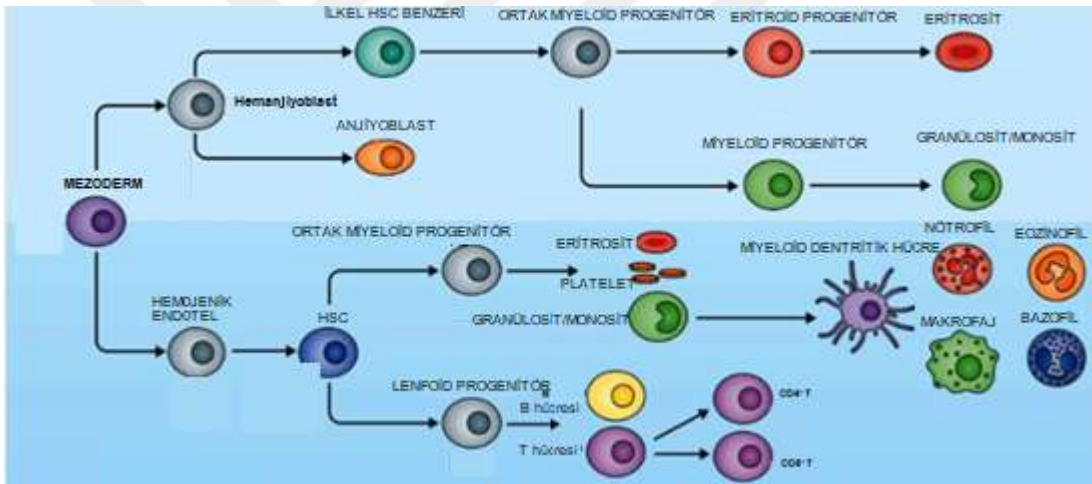
Şekil 2.1. 2. Tümör mikroçevresi hücreleri (Visser ve diğ. 2023'den uyarlanmıştır)

Tümör mikroçevresi, çeşitli bağışıklık hücresi tipleri, kanserle ilişkili fibroblastlar, endotel hücreleri, perisitler ve ek olarak doku yerleşik hücre tiplerini içerir. Bu konak hücrelerin kanser patogenezinde kritik roller oynadıkları bilinmektedir. TMÇ'nin hücresel bileşimi ve işlevsel durumu, tümörün ortaya çıktığı

organa, kanser hücrelerinin içsel özelliklerine , tümör evresine ve hasta özelliklerine bağlı olarak büyük ölçüde farklılık gösterebilir (Visser ve diğ. 2023).

2.2. Hematopoez

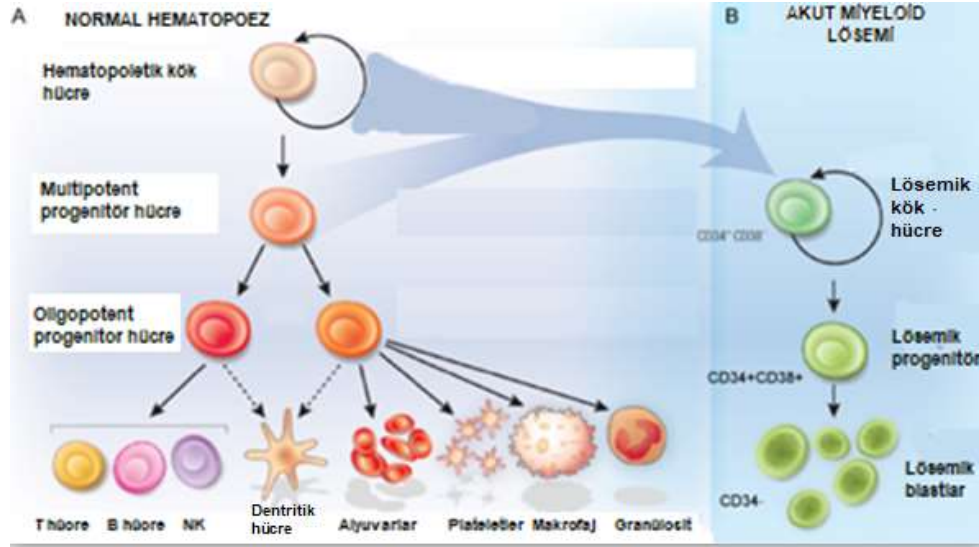
Hematopoez kan hücrelerinin oluşumu, gelişimi ve farklılaşması dahil olmak üzere tüm kan hücrelerinin üretimidir. Prenatal hematopoez, yumurta sarısı kesesinde, ardından karaciğerde ve sonra da kemik iliğinde gerçekleşir. Yetişkinlerde hematopoez, kemik iliği ve lenfatik dokularda ortaya çıkar. Her tür kan hücresi pluripotent olan öncül hücrelerden türer. Hematopoez vücuttaki dolaşımdaki kan hücrelerinin seviyelerini korumak için hayat boyu sürekli gerçekleşen bir metabolik olaydır (Şekil 2.2.1.) (Jagannathan 2013).



Şekil 2.2. 1. Hematopoeze genel bakış (Jagannathan 2013)

2.3. Lösemiler

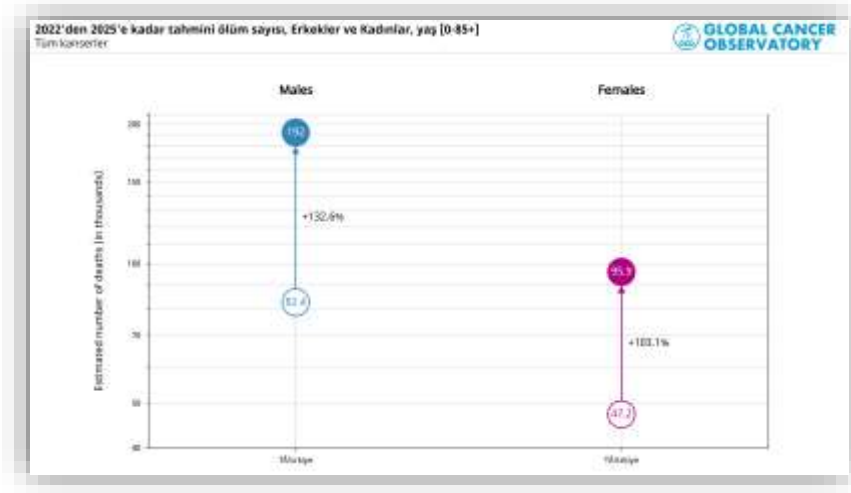
Lösemiler hematopoezin anormal bir şekilde gerçekleşmesiyle olgunlaşmamış akyuvarların kontrolsüz bir şekilde çoğalıp çok yüksek oranda birikmesi sonucu oluşan hematolojik malignitelerdir. Olgunlaşmamış hücrelerinin oranındaki bu artış normal lökosit hücrelerinin oranının azalmasına ve fonksiyonlarının baskılanmasına neden olmaktadır. Buna bağlı olarak, hastalarda sık tekrarlayan enfeksiyon, ateş, kilo kaybı, pıhtılaşma problemleri gibi semptomlar kendini göstermektedir (Chennamadhavuni ve diğ. 2023). Normal hematopoez ile AML'de hematopoez Şekil 2.3.1'de verildi (<https://med.stanford.edu/majetilab.html>).



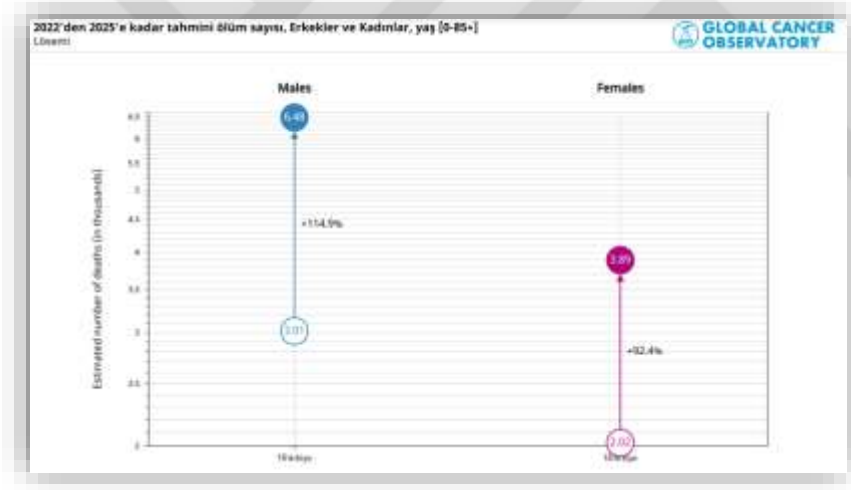
Şekil 2.3. 1. Normal hematopoez ve insan akut miyeloid lösemisinin hiyerarşik modeli (<https://med.stanford.edu/majetilab.html>).

Yaşlanma ve çoklu stres faktörleri, kemik iliği nişindeki hematopoietik kök hücreleri ve öncül hücreleri, somatik DNA mutasyonlarını yatkın hale getirir. Lösemik kök hücrelerde, bu mutasyonlar hematopoietik kök hücrelerin sessizliğini ve çoğalmasını (*FLT3*, *RAS*, *P53*, *c-KIT* ve *STAT3*), kendini yenilemesini ve farklılaşmasını (*NPM1*, *RUNX1*, *CEBPA* ve diğer miyeloid transkripsiyon faktörleri) ve epigenetik düzenlemesini (*DNMT3A*, *DNMT3B*, *DNMT1*, *TET1*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*) kontrol eden genlerde kademeli bir şekilde edinildiğinde AML ortaya çıkar (O'Reilly ve diğ. 2021).

Türkiye’de 2022 yılında lösemi insidansı her iki cinsiyette 100,000’de 6,8 iken ölüm oranı da 4,7 olarak tespit edilmiştir . Kadınlarda lösemi insidansı ve ölüm oranı sırasıyla 100,000’de 5,7 ve 3,5 iken erkeklerde lösemi insidansı ve ölüm oranı sırasıyla 100,000’de 8,1 ve 6,3 tür. Türkiye’de lösemiler sıklık ve ölüm oranı bakımından tüm kanserler arasında 10. Sıradadır. 2022 yılı istatistiklerine göre lösemiye bağlı ölümler erkeklerde 3014, kadınlarda 2020’dir (Globocan 2022). Şekil 2.3.2. ve Şekil 2.3.3.’te 2022-2025 yılları arasında Türkiye popülasyonundaki sırasıyla tüm kanser kaynaklı ve lösemi kaynaklı tahmini ölüm sayıları verilmiştir.



Şekil 2.3. 2. 2022-2030 yılları arasında tüm kanserlerden tahmini ölüm sayısı, Her iki cinsiyet, yaş [0-85+] Türkiye (GLOBOCAN 2022)

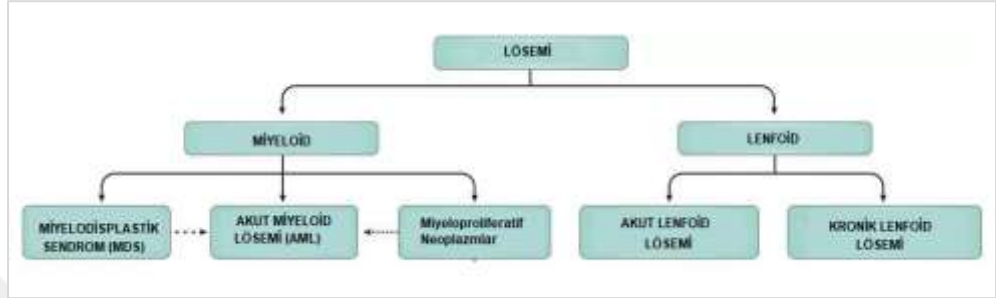


Şekil 2.3. 3. 2022-2030 yılları arasında lösemi kaynaklı tahmini ölüm sayısı, Her iki cinsiyet, yaş [0-85+] Türkiye (GLOBOCAN 2022)

Somatik mutasyonlar AML gelişimini yönlendirir. Lösemi hücrelerinin epigenetik durumu, kemik iliği mikroçevresi, normal hematopoietik hücrelerin sağlığı ve diğer özellikler de lösemi biyolojisi için önemlidir. Lösemi, kendini yenileme ve neoplastik klonu yayma kapasitesine sahip hematopoietik kök ve öncül hücrelerde somatik mutasyonların seri ediniminden gelişir. Mutasyonların oluşumu, periferik kanda görülen klonal hematopoez olarak adlandırılan genişletilmiş

bir hücre klonuna yol açabilir. Bu durum, yaşla birlikte yaygınlığı artan ve sık görünen bir pre-malign durumdur. (Dohner ve diğ. 2022).

Lösemiler köken aldıkları hücre tipine göre lenfoid ve miyeloid; sağkalım ve olgunlaşma özelliklerine göre de akut veya kronik olarak gruplara ayrılırlar (Şekil 2.3.4.).



Şekil 2.3. 4. Lösemi alt grupları (Khawaja ve diğ 2016)

2.3.1. Lösemi Tümör Nişi

AML, hematopoezde görülen hiyerarşiye benzer bir hiyerarşiye sahip kanser kök hücrelerinin bir örneğidir. Normal hematopoez, kemik iliği mikroçevresi ile hematopoietik kök hücreler arasında karmaşık çift yönlü etkileşimler gerektirir. Bu etkileşimler, normal hematopoietik kök hücre durgunluğunun sürdürülmesi için kritik öneme sahiptir ve bozulmalar hematopoietik kök hücrelerin kendini yenilemesini etkileyebilir. Sınırsız kendini yenileme özelliğine sahip olan lösemik kök hücreler bu homeostatik mekanizmaları ele geçirebilir, kemoterapi sırasında tedaviye dirence ve hastalığın nüksetmesine katkıda bulunabilir (Lane ve diğ. 2009).

Hematopoietik kök hücre havuzunun bir bireyin ömrü boyunca sürdürülmesi için, çoğu hematopoietik kök hücre, herhangi bir anda yalnızca küçük bir popülasyonun bölünmesiyle durgunluk halindedir. Hematopoietik kök hücre sessizliği hem içsel hem de dışsal, niş odaklı mekanizmalar tarafından kontrol altında tutulur. AML’de lösemik hücreler, hematopoietik kemik iliği nişini ele geçirir. Bu AML hücreleri, kemoterapiye dirençlidir. Tedaviden sonra hastalığı yeniden oluşturabildikleri için, genellikle sessiz lösemik kök hücreler veya lösemi başlatan hücreler olarak adlandırılırlar.

2.4. Akut Miyeloid Lösemi

AML, kemik iliğinde ve periferik kanda olgunlaşmamış miyeloid öncüllerin (miyeloblastlar) biriktiği hematopoietik kök hücrelerin anormal büyümesi ve farklılaşmasıyla karakterize edilen kötü huylu bir hastalıktır. Olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin aşırı çoğalması ve hayatta kalmasıyla ortaya çıkan AML, mutasyonlar ve kromozomal yeniden düzenlemeler de dahil olmak üzere bir dizi genetik anormallüğün sonucudur. Olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin bu çoğalması, kırmızı kan hücreleri, trombositler ve beyaz kan hücreleri gibi terminal olarak farklılaşmış benzerlerinin normal üretiminin önüne geçer (Khjava ve diğ. 2016; Ferrara ve diğ. 2013). AML’de, kontrolsüz ve aşırı çoğalma, miyeloid öncül hücrelerin bozulmuş farklılaşması, kemik iliğinde, periferik kanda ve diğer dokularda lösemik blastların genişlemesine yol açar. Bu durum fizyolojik hematopoezin yerini alarak anemiye, kanamaya ve enfeksiyonlara neden olur (Li ve diğ. 2023).

Hematopoietik kök hücreleri AML’ye dönüşüme teşvik eden birçok çevresel ve genetik risk faktörü tespit edilmiştir. Bunlar arasında yaş, öncül hematolojik hastalıklar ve genetik bozukluklar, virüs enfeksiyonu, radyasyon ve çeşitli kimyasallara maruz kalma gibi etmenler bulunur (Kouchkovsky ve diğ. 2016). AML, erişkinlerde en sık görülen akut lösemidir. İnsidansı yaşla artmaktadır.

AML'deki başlıca ilerletici mutasyonel hedefler arasında DNA metilasyonları, kromatin modifikasyonu, RNA eklenmesi, transkripsiyon, sinyal iletimi, kohezin düzenlemesi ve DNA onarımında yer alan moleküller bulunur. Mutasyonlar sıklıkla spesifik hastalık fenotipi, ilaç yanıtı ve klinik sonuçlarla ilişkilidir ve bu nedenle hastaların daha iyi yönetimi için AML genetiğini iyi bilmek gereklidir (Ogawa ve diğ. 2018; Tanaka ve diğ. 2019).

AML semptomları, normal kemik iliğinde lösemik hücrelerin artışına bağlı olarak gelişir. Yorgunluk, kolay morarma, nefes darlığı, kanama ve artmış enfeksiyon riski görülebilir. Fizyolojik hematopoez ile ilerleyen AML ile savaşmak için çeşitli immün terapötik hücresel, antikör bazlı veya kemoterapötik stratejiler geliştirilmiştir (örn. kontrol noktası blokajları, kimerik antijen reseptörü (CAR)-T hücre terapileri, aşılar ve immün modüle edici hipometile edici ajanlar). Ancak, AML'de birçok immünosupresif mekanizmanın etkisizleştirilmesi için etkili terapilerin geliştirilmesindeki zorluklar hala devam etmektedir.

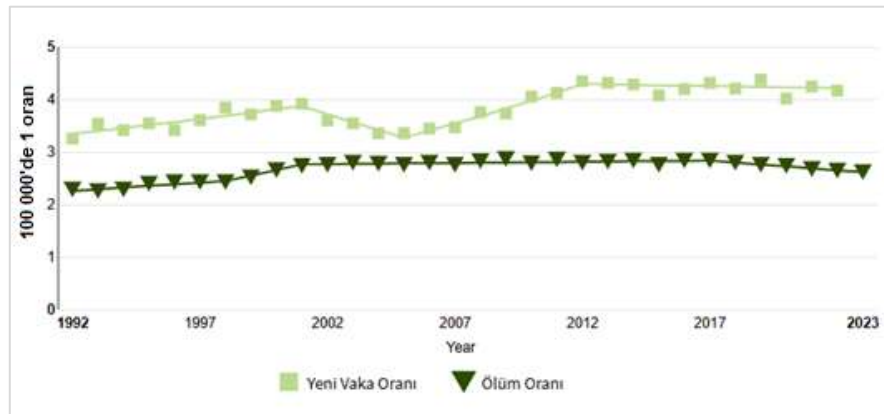
AML'ler, hızlı başlangıçlı, ilerleyici ve sıklıkla kemo-dirençli hastalık ile ilişkili örtüşen hematolojik neoplazmalardır. Teşhis sırasında, AML sınıfı ve risk grubu tespiti tedavi kararları için kritik öneme sahiptir. Birçoğu tekrarlayan kromozom anormalliklerinin bir sonucu olan minimum blast yüzdesi gerektirmeyen AML'nin $t(8;21)(q22;q22.1)$, $inv(16)(p13.1;q22)$, $t(16;16)(p13.1;q22)$ ve $t(15;17)(q24;q21)$ olmak üzere üç spesifik alt tipi bulunur (O'Reilly vd., 2021; Arber vd., 2016).

2.4.1. AML Epidemiyolojisi

AML sık görülmemekle birlikte ölüm oranı yüksek son derece malign neoplazmdır. AML, çocuklarda akut lösemi vakalarının %15-20'sini temsil ederken, yetişkinlerde yaklaşık %80'dir. Yenidoğan ve yetişkinlerde lösemnin majör formudur, ancak bebeklik ve ergenlik döneminde vakaların küçük bir kısmını temsil eder. En sık yaşlı yetişkinlerde görülür. Daha genç yaş grubunun sağkalım oranı yüksektir, ancak yaşlı hastalarda prognoz kötü seyreder (Kantarjian ve diğ. 2021).

AML, yetişkinlerde lösemilerin yaklaşık üçte birini ve tüm kanserlerin yaklaşık %1'ini oluşturur. Amerikan Kanser Derneği'nin 2025 yılı için Amerika Birleşik Devletleri'ndeki akut miyeloid lösemi tahminlerine göre 22.010 kişiye AML teşhisi konulması ve çoğunluğu yetişkin olan yaklaşık 11.090 kişi AML nedeniyle kaybedileceği hesaplanmıştır (cancer.org).

2019-2023 yılları arasında AML vakalarındaki göreceli sağkalım %32,9'dur. Tanı anında ortalama yaş 69'dur. AML yaşa göre standardize edilmiş veriler, yeni vaka oranının yılda 100.000'de 4,3, ölüm oranının da yılda 100.000'de 2,7 olduğunu göstermektedir (Şekil 2.4.1.).



Şekil 2.4. 1. Dünya genelinde yaşa göre standardize edilmiş AML yeni vaka ve ölüm oranları (<https://seer.cancer.gov/statfacts/>)

2.4.2. AML'nin Etiyolojisi

AML gelişimi birçok çevresel ve genetik risk faktörüne bağlıdır. Yaş, öncül hematolojik hastalıklar ve genetik bozukluklar, virüs enfeksiyonu, radyasyon ve çeşitli kimyasallara maruz kalma bu risk faktörlerindendir. Hematopoetik öncül hücrelerin AML hücrelerine dönüşümü çok adımlı bir süreçtir. İyonlaştırıcı radyasyon, çeşitli kimyasallar, benzen gibi etkenler, alkalize edici ajanlar ve formaldehit ve enfeksiyonlar lökemogenezi uyarabilir. Belirli kimyasallara maruziyetin çok olduğu mesleklerde lösemi görülme oranı artar. Örneğin tekstil sanayinde çalışanların lösemiye yakalanma riski toplumun geneline göre daha fazladır. Ancak AML vakaları, herhangi bir ajana maruz kalma olmaksızın *de novo* olarak da ortaya çıkabilir (Tebbi 2021). AML, altta yatan hematolojik bozukluğu olan hastalarda veya önceki tedavinin bir sonucu olarak da ortaya çıkabilir. Topoizomeraaz II ve platinyum türevi kemoterapi tedavisi uygulanan hastalarda, radyasyona maruziyetine bakılmaksızın, ileride AML'ye yakalanma riskinin toplumun geneline göre çok belirgin oranda arttığı tespit edilmiştir (Pendleton ve diğ. 2014)

2.4.3. AML'nin Sınıflandırılması

AML tanısı ve sınıflandırması, 2022 yılında yeni önerilen Dünya Sağlık örgütü (WHO) kriterleri ve hematopoietik neoplazmların Uluslararası Konsensüs Sınıflandırması (ICC) (WHO 2022 ve ICC 2022) ile önemli ölçüde değişmiştir. Her iki sistem de hassas tanı ve prognozu kolaylaştırmak, tedaviyi iyileştirmek ve AML için yenilikçi klinik çalışmaların tasarlanmasına olanak sağlamak için klinik, moleküler/genetik, morfolojik ve immünofenotipik parametrelerin entegrasyonunu sağlamıştır. En dikkat çekici değişiklik, AML'yi tanımlamak için kullanılan blast sayısıdır. WHO 2017'de AML tanısı için, kemik iliğinde ve/veya kanda %20 veya daha fazla blast oranı gerekmektedir. Ancak WHO 2022, listelenen tanımlayıcı genetik anormallikleri olan tüm AML'ler için AML tanısı için %20 blast oranı sınırını artık ortadan kaldırmıştır (*BCR::ABL1* füzyonu olan AML, *CEBPA* mutasyonu olan AML ve hala %20 blast gerektiren diğer/nadir tanımlanmış genetik değişiklikler hariç) (Khoury ve diğ.2022).

2.4.4. AML'nin FAB Sınıflandırılması

AML'yi alt tiplere ayırmak için kullanılan ana sistemlerden ikisi: Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) sınıflandırması ve daha yeni olan WHO sınıflandırmasıdır. FAB sınıflandırma sistemi, farklı AML türleri arasında ayırım yapmak için geliştirilmiş ilk sınıflandırma sistemidir (Tablo 2.4.1.) (Seiter ve diğ. 2011).

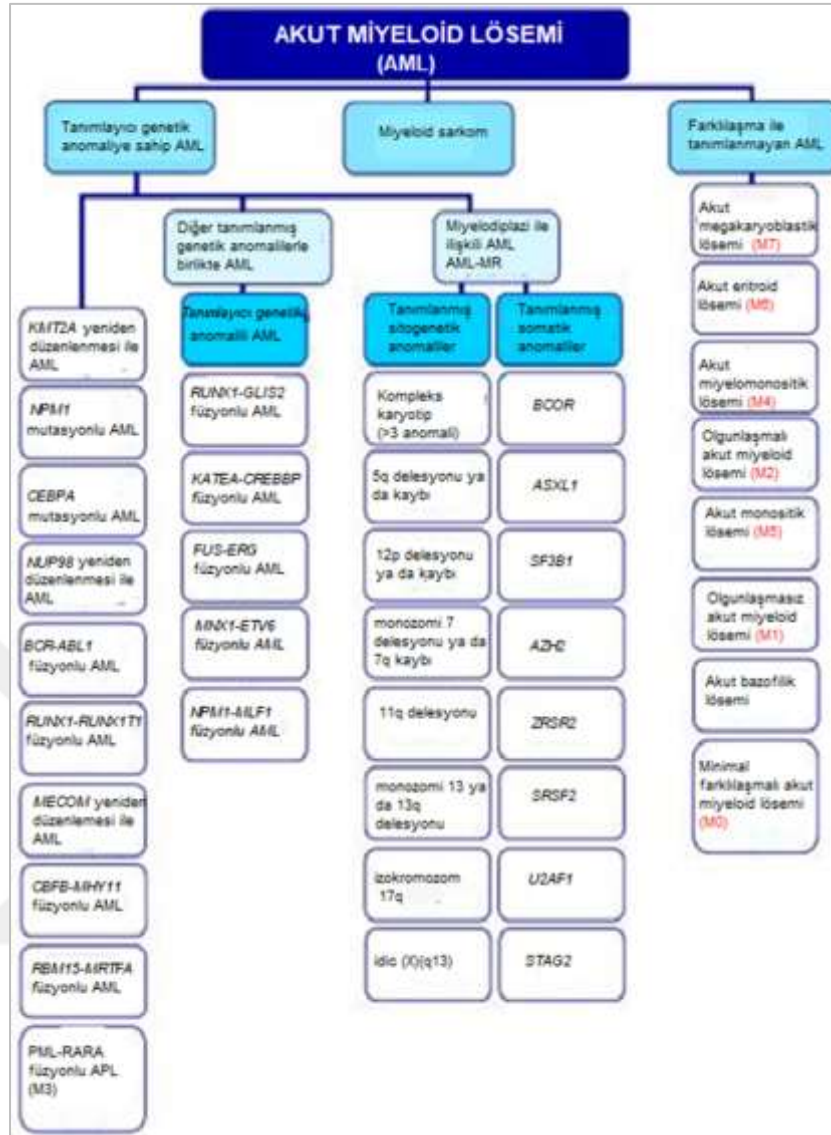
Tablo 2.4. 1. AML'de, FAB sınıflandırılması (Seiter ve diğ. 2011)

FAB sınıfı	Sınıflandırmanın açılımı	Sitogenetik
M0	Akut miyeloblastik lösemi, minimal farklılaşmış	
M1	Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloblastik lösemi	
M2	Farklılaşmış miyeloblastik hücreli AML	t (8; 21) (q22; q22), t (6; 9)
M3	Promiyelositik veya akut promiyelositik lösemi (APL)	t (15; 17)
M4	Akut miyelomonositik lösemi	inv (16) (p13q22), del(16q)
M4eo	Eozinofili akut miyelo-monositik	inv (16), t (16; 16)
M5	Akut monoblastik lösemi (m5a) veya akut monositik lösemi (m5b)	del (11q), t (9; 11), t (11; 19)
M6	Eritrolösemi (m6a) ve çok nadir saf eritroid lösemi (m6b) dahil olmak üzere akut eritroid lösemi	
M7	Akut megakaryoblastik lösemi	t (1; 22),

Klinik ortamda, ilk olarak FAB sınıflandırması kullanılır. Çünkü AML tipinin hızlı bir ön değerlendirilmesine olanak tanır. 1976 yılında geliştirilen FAB sınıflandırması, lösemik hücrelerin morfolojik ve sitokimyasal özelliklerine dayanarak sekiz alt türü (M0 ile M7 arasında) tanımlar (Seiter ve diğ. 2011).

2.4.5. AML'nin WHO Sınıflandırması

Son olarak 2022'de yayınlanan WHO sınıflandırmasının beşinci revizyonu genetik anormallikleri de içerir ve AML'yi hastalığın klinik sonucunu tanımlayan temel mutasyonlara ve genetik değişikliklere göre 32 alt türe ayırır (Khoury ve diğ. 2022). WHO 2022 AML sınıflandırılması Şekil 2.4.2'de verilmiştir.



Şekil 2.4. 2. AML, WHO ve FAB sınıflandırması (WHO sınıflandırmasının beşinci baskısına dayanmaktadır) (Khoury ve diğ. 2022).

Sınıflandırma yapısı, iyi huyludan kötü huyluya doğru bir çerçeveyi takip eder. Sınıflandırma için belirlenmiş tanı kriterlerinin çoğu korunur. Ancak son derece hassas minimal rezidüel hastalık (MRD) değerlendirme tekniklerinin öneminin daha fazla anlaşılması ve eşzamanlı moleküler değişikliklerin etkisi de mevcut uygulamada yer almaktadır. Böylece hasta yönetimini ve tedavi kararlarını etkileyen faktörleri yansıtmaktadır (Khoury ve diğ. 2022).

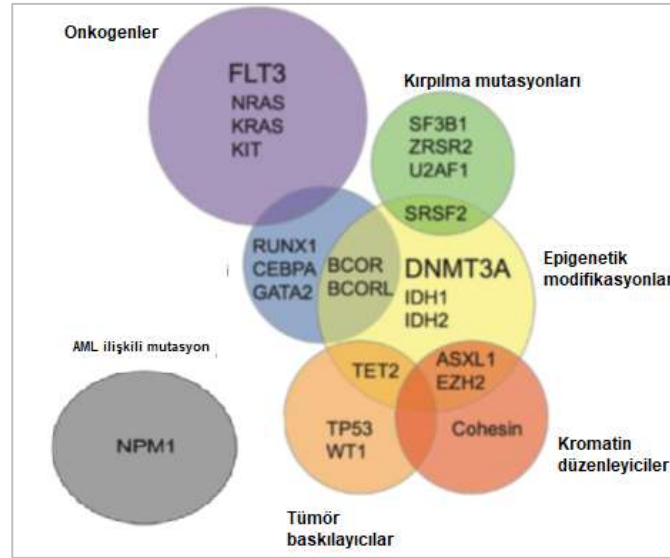
Ancak, en son WHO sınıflandırmasında hem farklılaşma modelleri hem de genetik sapmalar dikkate alınmıştır. WHO sınıflamasının dördüncü revizyonu ve FAB sınıflandırmasını birleştirerek daha işlevsel bir hale getirilmiştir. Sonuç olarak, FAB sınıflandırmasında kullanılan özgül M0–M7 etiketleri, WHO sınıflandırmasının dahil

edilmesiyle bile klinik vakaları tanımlamak için kullanılmaya devam edecektir (Khoury ve diğ. 2022).

2.4.6. AML’de Sitogenetik Değişimler ve Gen Mutasyonları

AML’de t(8;21) *AML1-ETO*, t(15;17) *PML-RAR α* , del(11q23) ve inv(16) *CBFB-MYH11* en sık rastlanan sitogenetik anomalilerdir. Hastalarda t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1;q22) ve t(15;17) kromozom anomalilerinin bulunması düşük nüks ile ilişkilendirilmişken, kromozom 5 ve 7’deki değişimler düşük sağkalım ve düşük tedavi yanıtı ile ilişkilendirilmiştir (Kumar ve diğ. 2011).

Somatik mutasyonlar AML gelişimini yönlendirir. Lösemi hücrelerinin epigenetik durumu, kemik iliği mikroçevresi, normal hematopoietik hücrelerin sağlığı ve diğer özellikler de lösemi biyolojisi için önemlidir. Lösemi, kendini yenileme ve neoplastik klonu yayma kapasitesine sahip hematopoietik kök ve öncül hücrelerde somatik mutasyonların seri edinimi sonucu meydana gelir. Mutasyonların başlatılması, periferik kanda görülen klonal hematopoez adı verilen genişletilmiş bir hücre klonuna yol açabilir. Bu, yaşla birlikte yaygınlığı artan sıklığı fazla bir pre-malign durumdur. *DNMT3A*, *TET2* ve *ASXL1*’deki gibi bazı mutasyonlar klonal hematopoezde daha yaygın ve lösemi gelişiminin nispeten erken dönemlerinde görülür. *FLT3*, *NRAS* ve *RUNX1*’deki mutasyonlar dahil diğer mutasyonlar lösemi gelişiminin daha sonraki aşamalarında kazanılma eğilimindedir. Lösemi gelişimini yönlendiren mutasyon kombinasyonları, mutasyona uğramış genler arasındaki biyolojik iş birliği ve karşılıklı etkileşim ile mümkündür (Dohner ve diğ. 2022). AML ‘deki gen mutasyonları Şekil 2.4.3’ de verilmiştir.



Şekil 2.4. 3. AML'deki gen mutasyonları (Kistagari ve diğ. 2020)

2.4.8. AML'de Epigenetik Modifikasyonlar

Epigenetik modifikasyonlar, DNA'da herhangi bir değişim olmadan gen ifadesinin değişimine neden olan modifikasyonlardır. DNA metilasyonu, kodlamayan RNA'lardaki modifikasyonlar ve histon modifikasyonları en yaygın olan düzenlemelerdir. Epigenetik düzenlemeler hematopoez, hücre farklılaşması ve çoğalması gibi karmaşık mekanizmalarda rol aldıkları için lösemi gelişimine katkı sağlayabilir. AML hastalarının yaklaşık %45'i normal karyotiplidir. Bu durum göz önüne alındığında epigenetik modifikasyonların önemi anlaşılabilir. AML'de epigenetik kavramı ilk olarak 1987 yılında kalsitonin geninin 5' düzenleyici bölgesinde bir DNA metilasyonunun tespiti ile ortaya çıkmıştır. Bu değişim, devam eden tedaviyi olumsuz etkileyip lösemi hücrelerinin tedaviye karşı direnç geliştirmesine neden olmuştur. Miyeloproliferatif neoplazmlar (MPN), MDS ve AML örneklerindeki genom keşif çalışmaları, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarında rol oynayan *DNMT3A*, *TET2*, *WT1*, *IDH1* ve *IDH2* gibi genler dahil olmak üzere epigenetik düzenleyicilerde tekrarlayan somatik mutasyonları tanımlamıştır (Goldman ve diğ. 2019).

2.4.9. AML'nin Tanısı

AML hastalarında anemiyle ilişkili solukluk ve halsizlik, çarpıntı, çabuk yorulma ve nefes darlığı gibi semptom ortaya çıkabilir. Trombositopeniye bağlı olarak

gelişen devam eden kanamalar tanı anında hastaların yaklaşık yarısında bulunan hastalığın erken bulgularındandır. Laboratuvar incelemelerinde AML’li hastaların kan değerleri hastadan hastaya büyük farklılıklar gösterir. Çok sayıda alt gruba ayrılan ve genellikle her alt grubun tedavisi farklı olan AML için tanı anında hastalığın alt gruplarının da tespiti çok önemlidir. AML’nin tanısında ilk aşamada hastanın klinik bulguları, yaşı ve genel sağlık durumu gibi klasik parametreler değerlendirildikten sonra kan testi ve kemik iliği biyopsisi yapılarak daha spesifik AML bulguları taranır. t(8;21), t(15;17) ya da inv(16) gibi sitogenetik değişikliklerin bulunması AML blast oranına bakılmaksızın AML tanısı için yeterlidir. Hastaya AML tanısı konulduktan sonra flow sitometri ile tespit edilen yüzey antijenlerine göre AML alt tipi tespit edilerek uygun tedavi seçimi yapılır (Corbu ve diğ. 2014). AML yüzey antijenleri Tablo 2.4.2. de gösterilmiştir.

Tablo 2.4. 2. AML FAB Alt Tipleri İle İmmünolojik Yüzey Belirteçleri İlişkileri

FAB SINIFI	AML yüzey belirteçleri										
	CD11b	CD14	CD33	Glikoforin	CD41	CD42	CD61	HLA-DR	CD13	CD15	CD34
M0									+		+
M1/M2								+		+	+
M3/M3V	+								+	+	+
M4/M5	+	+	+					+	+	+	+
M6				+				+	+		+
M7					+	+	+	+	+		+

AML için mevcut tedavi protokollerinin çoğu, tedavi sınıflandırmasına katkıda bulunan prognostik faktörlere dayanmaktadır. Ancak, AML’nin heterojen yapısı nedeniyle tedavi seçimi ve yanıtı bu tür klasik parametrelerle güvenilir bir şekilde tahmin edilemeyebilir. Bu nedenle yeni teşhis, prognoz, tedavi seçim ve yanıt-tahmin belirteçlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllardaki sağlık teknolojileri alanındaki gelişmeler, lösemik hücrelerin sitomorfoloji veya karyotipleme sınırının ötesinde saptanmasını sağlamıştır. AML hücrelerinden salınan eksozomların analizi de bu önemli gelişmelerdendir (Li vd., 2023).

WHO ve FAB sınıflandırılmasının yanı sıra hastaların mutasyon durumlarına ve sitogenetik değişimlere göre hastanın prognozu iyi orta ve kötü olarak

sınıflandırılır. Bu prognoz durumları ile genetik özelliklerin ilişkisi Tablo 2.4.3'te verilmiştir.

Tablo 2.4. 3. Genetik anomalilerin durumun prognozla ilişkisi (Döhner ve diğ. 2022).

ELN 2022 Risk Sınıflandırması (İlk Tanı anında genetiğe göre)	
Risk kategorisi	Genetik Anormallik
İYİ	t (8; 21) (q22; q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv (16) (p13.1;q22) veya t (16; 16) (p13.1;q22); <i>CBFBMYH11</i> FLT3 -ITD olmadan mutasyona uğramış NPM1 bZIP mutasyona uğramış <i>CEBPA</i>
ORTA	Mutasyonlu NPM1 ve FLT3 -ITD yüksek FLT3 -ITD'li yabancı tip NPM1 t (9; 11) (p21.3; q23.3); <i>MLLT3::KMT2A</i> Olumsuz veya olumsuz olarak sınıflandırılmayan sitogenetik ve/veya moleküler anormallikler
KÖTÜ	t(6;9)(p23.3;q34.1)/<i>DEK::NUP214</i> t(v;11q23.3)/<i>KMT2A</i>-yeniden düzenlenmesi t(9;22)(q34.1;q11.2)/<i>BCR::ABL1</i> t(8;16)(p11.2;p13.3)/<i>KAT6A::CREBBP</i> inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2, MECOM(EV11)</i> t(3q26.2;v)/<i>MECOM(EV11)</i>-yeniden düzenlenmesi Monosomi 5 or del(5q);-7; -17/abn(17p) Kompleks karyotip, monosomal karyotip <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ve/veya ZRSR2</i> mutasyonu <i>TP53</i> mutasyonu

2.5. Hücre Dışı Veziküller

Farklı hücre türleri, hücrel homeostazı sürdürmek için fiziksel temas ve parakrin (sinyal molekülleri ile) mekanizmalarını kullanarak birbirleriyle iletişim kurarlar. Parakrin aktivite gereği, hücreler, farklı hücre alt popülasyonlarındaki çeşitli etkileri düzenleme, koordine etme ve senkronize etme potansiyeline sahip belirli sinyal biyomolekülleri salarlar. Bu amaçla, sinyal molekülleri, köken aldıkları hücreler tarafından üretilir ve alıcı hücreleri uzun veya kısa mesafelerde etkilemek için hücre dışı veziküllere (EV'ler) salınırlar. Hedef hücre konumuna ve mesafesine bakılmaksızın, sinyal moleküllerinin hücre zarına bağlı yüzey reseptörlerine bağlanması üzerine spesifik sinyal kaskadları başlatılır. EV'lerin, doku içindeki sinyal

moleküllerinin transferinde kilit oyuncular olduğu gösterilmiştir (Dezhakam ve diğ. 2023).

EV'ler karmaşık yükleri sayesinde, köken aldıkları hücrenin durumunu yansıtabilir ve diğer hücrelerin işlevlerini ve fenotiplerini değiştirebilir. Bu özellikler, güçlü biyobelirteç ve terapötik potansiyele işaret eder. EV'ler, tüm hücre tipleri salınan, lipit çift katmanlı zarla çevrili, nano ile mikro boyutlu parçacıklardır. 'Ekstraselüler Vezikül Çalışmaları İçin Minimum Bilgi' (MISEV) yönergelerine göre, 'EV terimi hücrelerden salınan, bir lipit çift tabakasıyla sınırlanan ve kendi başlarına çoğalamayan (yani işlevsel bir çekirdek içermeyen) parçacıkları ifade eder. Bu veziküller hücre-hücre iletişimde aracı görevi gören proteinler, nükleik asitler ve metabolitler dahil olmak üzere çeşitli biyolojik olarak aktif makromoleküller taşırlar (Welsh ve diğ. 2024).

EV kargoları genellikle patofizyolojik biyobelirteçlerdir. Yerel ve uzak dokularda alıcı hücre kaderlerini değiştirirler. Klasik olarak EV'ler eksozomlar, mikroveziküller ve apoptotik cisimler olarak sınıflandırılmaktaydı, ancak son çalışmalar otofajik EV'leri, stresli EV'leri ve matris veziküllerini keşfedilmesiyle EV sınıflandırılması genişletilmiştir. Otofaji, büyük ölçüde EV biyogenezi ve salınımında rol oynar. Otofagozom, amfizomlar oluşturmak için endozomlarla birleşebilir ve bu daha sonra otofajik EV'ler olarak salgılanırlar (Jeppesen ve diğ. 2019).

2.5.1. Hücre dışı veziküllerin sınıflandırılması

EV'ler biyogenez mekanizmalarına (eksozom, mikrovezikül, apoptozom ve otofajik EV), konseptlerine (onkozom, matris vezikül, stres EV ve migrazom) ve boyutlarına (küçük EV ve büyük EV) göre sınıflandırılırlar (Sheta ve diğ 2023) .

Eksozomlar, üç adımda üretilen endozom kökenli EV'lerdir. Bu üç adım: biyogenez, taşıma ve salınımdır. Mikroveziküller, plazma membranından doğrudan dışarı doğru tomurcuklanma ve dökülme yoluyla oluşur. Apoptotik cisimler apoptoz sürecinde üretilir. Bu üç klasik EV tipi, biyogenez mekanizmalarına göre birbirini dışlar. Ancak, eksozomları, mikrovezikülleri ve diğer EV tiplerini ayırmak için ileri tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır (Tablo 2.5.1) (Sheta ve diğ 2023).

Tablo 2.5. 1. EV Alt Sınıfları (Sheta ve diğ. 2023)

Kategori	İsim	EV Sınıfı	Boyut	Belirteçler	Biyogenez
Eksozom	Klasik eksozom	Küçük EV	40-150 nm	CD63, CD9, CD81	MVB
	Klasik olmayan eksozom	Küçük EV	40-150 nm	CD63/CD9/CD81-negatif	MVB
Mikrovezikül	Klasik mikrovezikül	Büyük EV	~150-1000 nm	Annexin A1, ARF6	Plazma zarı dökülmesi
	Büyük onkozom	Büyük EV	1-10 µm	Annexin A1, ARF6	Plazma zarı dökülmesi
	ARMM	Küçük EV	~40-100 nm	ARRDCD1, TSG101	Plazma zarı dökülmesi
Apoptojik EV	Apoptojik cisim	Büyük EV	1-5 µm	Annexin V, PS	Apoptozis
	Apoptojik vezikül	Küçükten Büyüğe EV	~100-1000 nm	Annexin V, PS	Apoptozis
Otofajik EV	Otofajik EV	Küçükten Büyüğe EV	40-1000 nm	LC3B-PE, p62, dsDNA/Histonlar	Otofagozom-endozom füzyonu (Amfizom)
Stresli EV (Stresli)	Stresli EV	Küçükten Büyüğe EV	40-1000 nm	HSP90, HSP'ler	Plazma zarı dökülmesi, otofaji
	Hasarlı EV	Küçükten Büyüğe EV	40-1000 nm?	Fibronectin, Proteoglikanlar	Matriks bağlanması ve serbest bırakılması
Ekzomer	Nano parçacık	EV olmayan	~35-50 nm	HSP90, HSP'ler	Stres
Veziküler olmayan parçacıklar	Nano parçacık	EV olmayan	~70 nm	Fibronetin, dsDNA/Histonlar, MVP, HSP'ler	Bilinmiyor, Hücre ölümü

(EV: hücre dışı vezikül, MVB: Multiveziküler cisim, ARMM (ARRDC1): Arrestin domaini içeren protein, HSP: Isı şok proteinleri, PE: Fikoeritrin, ARF6: ATP ribozilasyon faktörü 6, TSG101:Tümör duyarlılık geni 101)

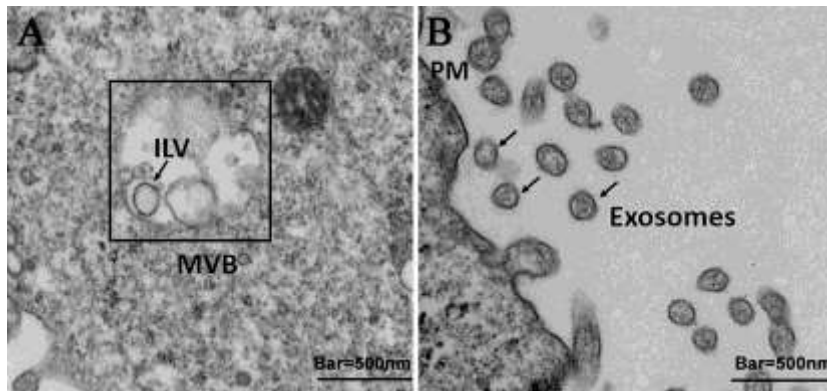
Yakın tarihli çalışmalarda, Ekzo-S (40-80 nm) ve Ekzo-L (80-150 nm) olarak adlandırılan küçük ve büyük eksozomlar keşfedilmiştir. Ekzo-L, CD9 içerirken, Ekzo-S, CD63 içermektedir (Sheta ve diğ 2023).

2.6. Eksozomlar

“Eksozom” terimi, endozom ve ekzositoz terimlerinin birleştirilmesi ile ortaya çıkmıştır. Eksozomlar, sinyal moleküllerini aktaran ve sağlık ve hastalıkta hücreler arası iletişimdeki önemli rolleri nedeniyle büyük öneme sahip zarla çevrili EV’lerdir. Eksozomlar, miRNA’lar, büyüme faktörleri ve sitokinler dahil olmak üzere zengin

molekül kargolarını aktararak birçok kanser hücresinin hayatta kalmasına ve kemoterapiye dirençli olmasına katkı sağlar. Eksozomlar, çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanan ve serum, plazma, idrar, semen, tükürük, bronşiyal sıvı, beyin omurilik sıvısı, anne sütü, amniyon sıvısı, sinoviyal sıvı, gözyaşı, lenf, safra ve mide asidinde keşfedilen, zarla çevrili hücre dışı veziküllerdir. Köken aldıkları hücrelerine bağlı olarak, belirli bir kargo bileşimi eksozomlara paketlenir ve bu kargolar alıcı hücrelere ulaştığında hücresel değişikliklere yol açar. Eksozomların kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda rol oynayan hücre-hücre iletişimini düzenleyerek fizyolojik ve patolojik süreçleri düzenler (Sheta ve diğ 2023; Amin ve diğ. 2022).

Eksozomlar, multiveziküler cisimlerin (MVC) içeri doğru tomurcuklanmasından kaynaklanan intralüminal veziküllerden (ILV) oluşur. TEM ile 30-200 nm arasında değişen çaplarda gözlenirler (Kowal ve diğ. 2014). Eksozomlar ilk olarak retikülositlerin olgun kırmızı kan hücrelerine dönüşümü çalışmalarında salgılanan atık ürünleri olarak keşfedilmiştir. Bununla birlikte, eksozomlar yakın zamanda, MVC içinde oluşan ve daha sonra sitoplazmik membranla birleşerek hücre dışı boşluğa salınan intralüminal veziküller (ILV'ler) olarak tanımlanmıştır (Wang ve diğ. 2019). Eksozom oluşumu ve salınımı ile ilgili TEM görüntüsü Şekil 2.6.1'de verilmiştir.



Şekil 2.6. 1. Eksozomların oluşumu ve salınımının TEM görüntüsü (Wang ve diğ. 2019)

Kanser hücreleri genellikle normal hücrelerden daha fazla eksozom üretir ve kanser hücrelerinden türetilen eksozomlar hem yerel hem de uzak mikro ortamları değiştirmek için güçlü bir kapasiteye sahiptir. Eksozom yapısı heterojendir ve

yüzeylerinde; serin membran lipidleri, kolesterol, sfingolipid, gliserofosfolipid, sifingomyelin, seramid, köken aldığı hücrenin plazma membranında bulunan özgün proteinler ve yüzey belirteçleri taşırlar. Reseptörlerle diğer hücreler tarafından tanınıp hücre içine alınabilirler. İçlerinde ise, hücreler arası haberleşme ve sinyal iletimini sağlayan, nükleik asitler, proteinler, miRNA, mRNA, nükleoproteinler, çeşitli enzimler ve DNA bulundurabilirler (Kowal vd., 2014). Yüzeyde ise CD9, CD63, CD81, CD82 ve CD53 en yaygın belirteçlerdir. ALG2-etkileşimli protein X (ALIX), tümör duyarlılığı gen 101 proteini (TSG101) ve proteozom bileşeni HSC10 açısından zengindir (Thery vd., 2009).

Kanser hücreleri genellikle normal hücrelerden daha fazla eksozom üretir ve kanser hücrelerinden türetilen eksozomlar hem yerel hem de uzak mikro ortamları değiştirmek için güçlü bir kapasiteye sahiptir (Zhang 2019). Eksozomlar hem verici hem de alıcı hücreyi etkileyebilirler. Eksozom ilişkili RNA'lar, miRNA'lar, proteinler, DNA'lar ve metabolitler, otokrin ve parakrin sinyalleme yoluyla alıcı hücrelerin kaderini değiştirebilirler; eksozomal proteinler, bir otokrin yol aracılığıyla eksozom salan hücreleri etkileyebilir, ayrıca eksozomal DNA, hücre hayatta kalmasını doğrudan değiştirebilir (Konoshenko vd., 2018). Tümör hücresi süpernatantlarından izole edilen eksozomlarla ilgili çalışmalar, eksozomların ana hücrede bulunan spesifik proteinler, lipidler ve nükleik asitler açısından zenginleştiğini göstermektedir. Bu durum, eksozom biyogenezinin rastgele bir süreç olmadığını göstermektedir (Villarroya-Beltri vd., 2014). Tümör hücrelerine ait olağanüstü bilgilere sahip eksozomal kargonun, ana tümör hücrelerinde metabolik ve proteomik profillerdeki herhangi bir değişikliği yansıtabileceği bilinmektedir. Bu nedenle, eksozomlar, farklı tümör tiplerine sahip hastalarda spesifik biyobelirteçler olarak prognostik, tanısal ve terapötik unsurlar olarak değerlendirilebilir (Dezhakam vd., 2023).

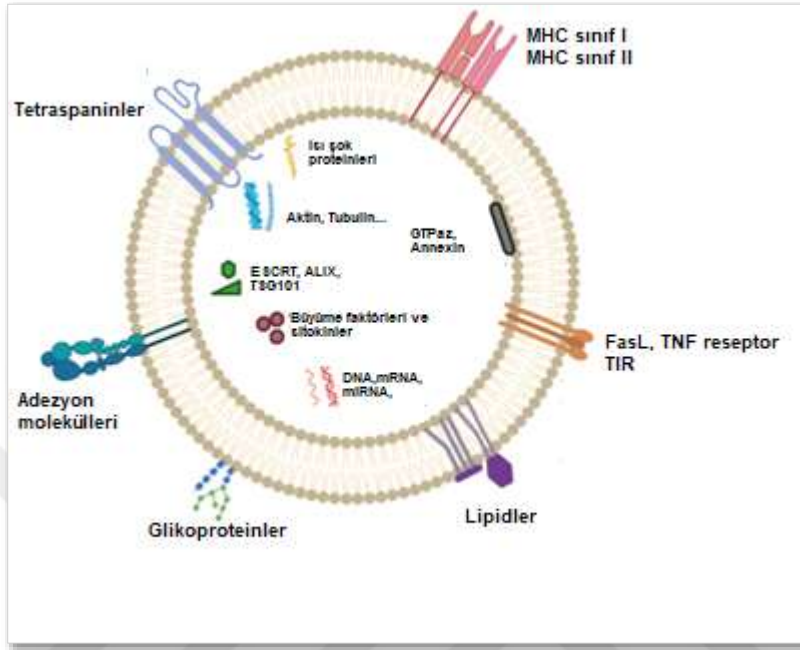
Tümör nişi içinde eksozom alışverişi, tümör hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar ve infiltrate bağışıklık hücreleri gibi farklı hücre türleri arasında gerçekleşebilir. Tümör hücresinden türetilen eksozomlar, alıcı habis hücrelerde spesifik aktiviteyi belirleyebilir, hücrelerinin metabolik durumunu yeniden glikolize programlayarak maligniteye ve tümör hücresi direncine yol açabilir. Eksozomların hipoksik ve anoksik koşullar altında salınması, makrofajlar gibi bağışıklık hücrelerinde fenotip kaymasını teşvik edebilir (Dezhakam vd., 2023). Kanser

hücrelerinden türetilen eksozomlar, alıcı hücrelerin kanser istilası ve metastazı için önemli bir süreç olan epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) teşvik edebilir (You vd., 2015). Birincil tümörler, metastatik bölgeleri hazırlamak için sitokinler veya eksozomlar gibi sistemik sinyalleri serbest bırakır. Yayılmış kanser hücreleri için bu ön-metastatik nişlerin yapılanmasında eksozomların önemine ve tümör hücresinden türetilen eksozomların, lenf düğümlerini veya akciğer dokusunu, melanom hücrelerinin metastatik kolonizasyonu için uygun nişler haline getirdiğine dair raporlar bulunmaktadır (Rana vd., 2013; Hoshino vd.,2015).

2.6. 1. Eksozomların Yapısı

Eksozomlar, multiveziküler cisimlerin (MVC) zarlarından kaynaklanır ve elektron mikroskobu altında 30-200 nm arasında değişen çaplarda gözlenirler. Eksozom yapısı heterojendir ve yüzeylerinde; serin membran lipidleri, kolesterol, sfingolipid, gliserofosfolipid, sfingomyelin, seramid, köken aldığı hücrenin plazma membranında bulunan özgün proteinler ve yüzey belirteçleri taşırlar. Üzerlerinde taşıdıkları reseptörlerle diğer hücreler tarafından tanınıp hücre içine alınabilirler. Eksozomlar içlerinde ise; hücreler arası haberleşme, sinyal iletimleri rollerinde kullanılmak üzere, nükleik asitler, proteinler, miRNA, mRNA, nükleoproteinler, çeşitli enzimler ve DNA bulundurulabilirler (Kowal ve diğ. 2014). Yüzeyde CD9, CD63, CD81, CD82 ve CD53 en yaygın belirteçlerdir. Ayrıca kök hücre belirteci EpCAM, CD44 varyantları ve CD133 gibi proteinler de bulunabilir. Eksozomlar, ALG2-etkileşimli protein X (ALIX), tümör duyarlılığı gen 101 proteini (TSG101) ve proteozom bileşeni HSC10 açısından zengindir (Thery ve diğ. 2009). Bununla birlikte, CAM-1 (CD54) ve integrin alfa M (CD11b) adhezyon moleküllerine sahiptirler. Bazı deneyler, blast kaynaklı eksozomların CD63, CD123, c-FLT-3/CD135, CD34 ve Kit/CD117 gibi miyeloid blast belirteçlerini içerdiğini belgelemiştir. Eksozomların lipid içeriği, fosfatidilserin, lizobisfosfatidik asit, kolesterol, sfingomyelin , seramid ve prostaglandinleri içerir. Lipid bileşenleri eksozomların özel sertliğini düzenler. Ek olarak, eksozomlar çevresel stresle ilişkili hücresel süreçte önemli bir role sahip olan HSP60, HSP70 ve HSP90 gibi HSP'leri içerirler. Aslında, HSP'ler protein katlanması ve taşınmasıyla işbirliği yapar, HSP90 ifadesi, tümör hücrelerinin

sıklıkla hipoksi, asidoz, metabolik ve besin eksikliği gibi stres koşulları altında olması nedeniyle birçok kanser hücresinde artar (Raposo ve diğ. 2013). Şekil 2.6.2’de bir eksozomun yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.6. 2. Eksozom yapısı (Grung ve diğ. 2021’den uyarlandı)

Bununla birlikte, şu anda EV'lerden çok sayıda yeni hastalık ve patofizyolojik durum biyobelirteci geliştirilmektedir. Uzun kodlamayan RNA (lncRNA), miRNA, halkasal RNA (circRNA) ve PIWI ile etkileşen RNA (piRNA) dahil olmak üzere kodlamayan RNA'lar, biyobelirteç ve işlevsel RNA olarak bulunurlar. EV'ler hücre-hücre iletişimde aracı görevi gören proteinler, nükleik asitler ve metabolitler dahil olmak üzere çeşitli biyolojik olarak aktif makromoleküller taşırlar (Welsh ve diğ. 2024).

Eksozom izolasyonu, MISEV yönergelerine göre diferansiyel santrifüjleme ve ardından ultra santrifüjleme, yoğunluk gradyan santrifüjleme, boyut dışlama kromatografisi (SEC), afinite bazlı yöntemler ve membran filtrasyonu gibi çeşitli metodolojilerle elde edilebilirler. EV konsantrasyonu, saflığı ve kargo bileşimi, kullanılan izolasyon tekniğine bağlı olarak değişebilir. Bu nedenle, izole edilmiş EV'leri karakterize etmek, nanopartikül izleme analizi (NTA) ve TEM kullanılarak değerlendirilebilen boyut, konsantrasyon ve morfolojileriyle başlamak üzere esastır.

Eksozom kargo ve yüzey moleküllerinin karakterizasyonu, proteomik, transkriptomik, lipidomik, western-blot ve akış sitometrisi dahil olmak üzere farklı tekniklerle gerçekleştirilebilir (Yakimchuk 2015; Welsh ve diğ. 2024).

Eksozomların bileşenleri, köken aldıkları hücreler, fizyolojik ve patolojik durum ve epigenetik değişikliklerle doğrudan ilişkilidir. Eksozomlar, donör hücre tiplerini gösteren bir grup özel protein, lipit, haberci RNA (mRNA), miRNA ve nükleik asit taşırlar. Eksozom veritabanının (<http://www.exocarta.org>) son güncelleme kayıtları, eksozomların 9769 protein, 3408 mRNA, 2838 miRNA ve 1116 lipit dahil olmak üzere çeşitli bileşenler içerdiğini göstermiştir.

2.6.2. Eksozom Biyogenezi

Eksozomlar, hücreler arası iletişimin hayati bir aracı olarak tanımlanan lipit çift tabakalı kapsüllenmiş parçacıklardır. Klasik olarak, en az iki ana EV kategorisi vardır: Eksozomlar ve mikroveziküller (MV'ler). Bu iki EV alt tipi, boyutlarına göre sınıflandırılırlar; eksozomlar 30-200 nm çapındadır ve MV'ler genellikle eksozomlardan daha büyüktür (100-1000 nm çapında). Ayrıca, eksozomlar ve MV'ler biyogenez mekanizmalarında farklılık gösterirler. MV'ler, özellikle hücre büyümesi sırasında, fizyolojik koşullarda hücrelerden salgılanırlar ve EV'ler, plazma membranının doğrudan tomurcuklanmasıyla üretilirler (Amin ve diğ. 2022).

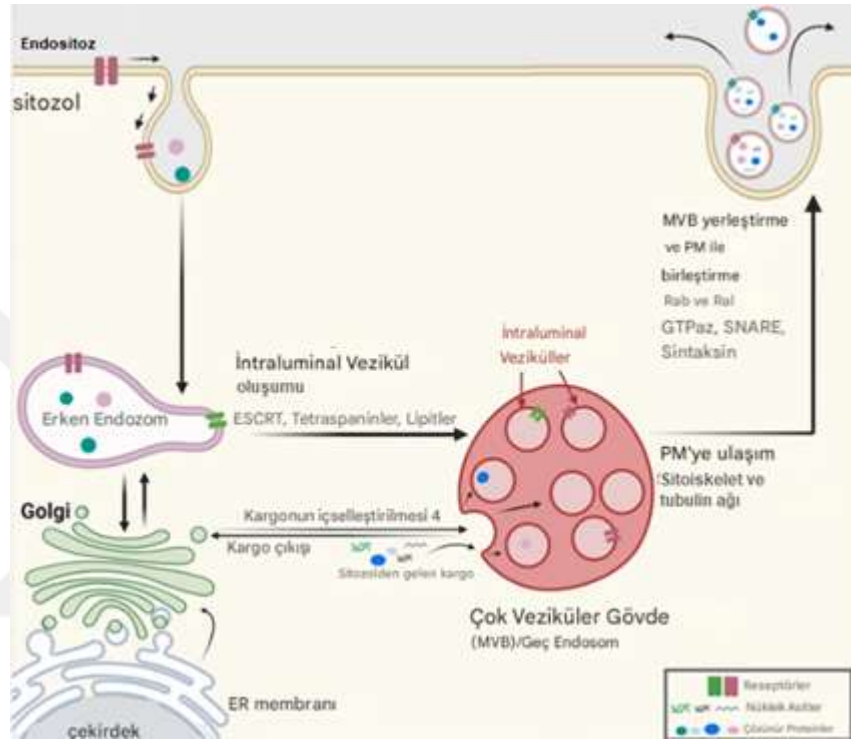
Eksozomlar özel biyogenez mekanizması gösterirler. Eksozom oluşumunun ilk aşaması, erken endozom oluşturmak için hücre zarının içe tomurcuklanmasını içerir. Eksozomları oluşturacak olan MVC biyogenezi için, proteinler trans-Golgi ağından taşınırlar veya hücre yüzeyinden içselleştirilirler. Bu proteinler sitozolik bölgelerinde ubiquitinlenir; ancak, tüm proteinlerin erken eksozomlarla kaynaşması için ubiquitinlenmeye ihtiyacı yoktur. Bunu izleyen olgunlaşma süreci sırasında, erken endozomlar geç endozomları oluşturmak üzere kaynaşır ve bunun sonucunda endozomal membranın lümene doğru invaginasyonu ve MVC'lerde intralüminal veziküllerin (ILV'ler) oluşumu gerçekleşir. Geç endozomal membrandan zarla çevrili veziküllerin koparılması, ILV'ler olarak adlandırılır ve geç endozom bundan sonra MVC'dir. Seramid, eksozom veziküllerinin MVC'lere tomurcuklanmasını tetikler. Vezikül birikiminden sonra, MVC'lerin izleyebileceği birkaç yol vardır;

1. Parçalanma için lizozoma yönlendirilebilirler,

2. Trans golgi ağına geri dönebilirler.

3. Plazma membranıyla kaynaşarak eksozom salgılanması olarak bilinen ILV'lerin salınmasına neden olabilirler (Sheta ve diğ 2023).

Eksozom biyogenezi mekanizmalar Şekil 2.6.3'te gösterilmiştir (Gurung ve diğ. 2021).



(PM: Plazma membranı)

Şekil 2.6. 3. Eksozom biyogenezi (Gurung ve diğ. 2021'den uyarlanmıştır).

Eksozomların biyogenezi, taşıma için gerekli endozomal sıralama kompleksi (ESCRT) mekanizmasına bağımlı ve ESCRT'den bağımsız olmak üzere iki mekanizma tarafından yönlendirilmektedir. ESCRT mekanizması beş temel ESCRT kompleksinden oluşur: ESCRT-0, -I, -II, -III ve Vps4. ESCRT mekanizması, ESCRT-0'ın ubiquitinlenmiş içerikleri tanımladığı ve bunları endozomal membrana sınıflandırdığı birkaç bileşen içerir. ESCRT-I ve ESCRT-II kompleksleri, ILV'leri üretmek için içe doğru tomurcuklanma sürecini başlatır. Ancak, ESCRT-III bu süreci yeni ILV'lerin salınımını indükleyerek sonlandırır. Ayrıca, seramidler, ADP ribozilasyon faktörü 6, sfingozin-1-fosfat, sfingolipidler, ısı şoku proteinleri

ve tetraspanin ailesi dahil olmak üzere ESCRT'den bağımsız mekanizmalar eksozomların biyogenezinde önemli roller oynar (Henne ve diğ. 2011).

Eksozomal biyogenezin indüksiyonu, ısı şoku proteinleri (HSP'ler), hipoksi, DNA hasarı, yükselmiş hücre içi kalsiyum , trombin ve hücre dışı ATP gibi çeşitli hücrel süreçlerle düzenlenir (Amin ve diğ. 2022) .

2.6.3. Eksozomların Etki Mekanizmaları

Hücreden salınan eksozomlar, yakındaki alıcı hücreler tarafından yönlendirilir ve alınır veya biyolojik sıvılar yoluyla uzak bölgelere gider oradaki hedef hücreleri etkiler. Eksozomlar, hedef hücreler tarafından zarların doğrudan füzyonu, ligand-reseptör etkileşimleri veya endositoz yoluyla internalizasyon yoluyla alınabilir (Amin ve diğ 2022).

Eksozomlar esas olarak hedef hücre aracılığıyla içselleştirilir ve ardından içerik salgılanır. Örneğin, eksozomal yük RNA ise hücrel sinyalleme başlatmak için RNA türlerinin alıcı hücre tarafından içselleştirilmesi gerekir. Ancak, eksozomal membrana bağlı veya çözünür FasL ve TRAIL hücrel tepkileri için reseptör ligand ilişkisi yeterlidir (McKelvey ve diğ. 2013).

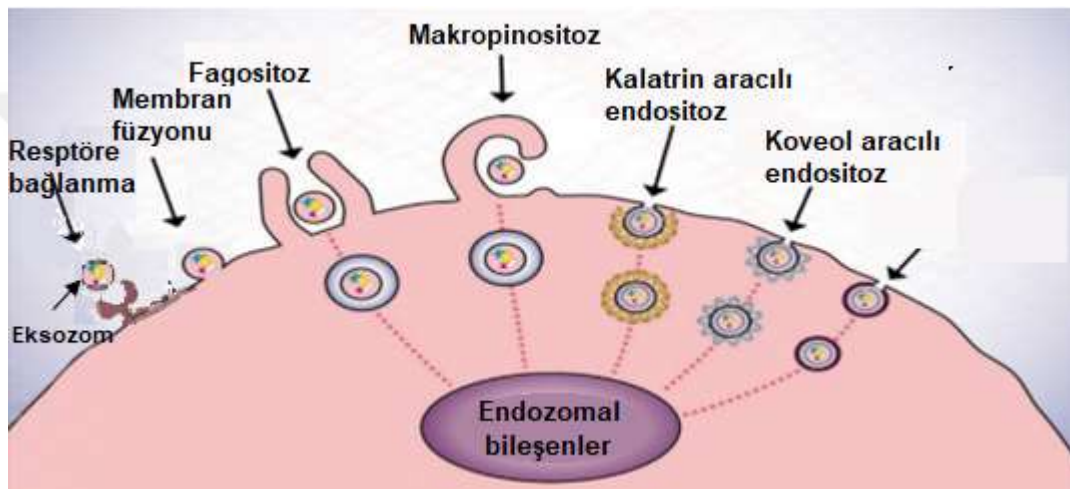
Klatrin aracılı endositoz, klatrin kaplı veziküller oluşturarak transmembran içeriğinin ve ligandların kontrollü eklenmesi ve içselleştirilmesi için aşamalı bir birleşimdir. Klatrin aracılı endositoz için önemli kargo olan transferrin reseptörlerinin tümör hücrelerinde aşırı ifade edildiği ve eksozom alımını desteklediği gösterilmiştir (Gurung ve diğ. 2021).

Aktin aracılı bir mekanizma olan fagositozun eksozom internalizasyonunun başka bir yolu olduğu öne sürülmüştür. Literatüre göre, makrofajlar/monositler gibi profesyonel fagositik hücreler, lösemi kaynaklı eksozomların internalizasyonunda profesyonel olmayan fagositik hücrelerden daha etkilidir (Feng ve diğ. 2010).

Ayrıca, eksozomlar alıcı hücre üzerinde doğrudan etkileşim yoluyla etkilerini gösterebilirler. Hücre dışı boşluktaki alıcı hücrenin zarına bağlanabilirler ve ligand-reseptör etkileşimi yoluyla aşağı akış sinyalleme kaskadlarını tetikleyebilirler. TNF, FasL ve TRAIL ifade eden dendritik hücrelerden salgılanan eksozomların kanser hücrelerindeki TNF reseptörlerine bağlandığı ve apoptozun kaspaz başlatılmasını aktive ettiği bildirilmiştir. Eksozomlar, bu nano veziküllerin plazma membranı ile

birleşebilir ve kargolarını doğrudan alıcı hücrelerin sitozolüne salgılayabilirler (Fu ve diğ. 2020).

EV'lerin hedef hücelere etki mekanizmaları reseptör aracılı ya da içselleştirilme yoluyla gerçekleşebilir. Hücre tipine bağlı olarak birden fazla endositotik yolla hücreler tarafından içselleştirildiği gösterilmiştir. Bunlar, Fagositoz makropinositoz, klatriin aracılı endositoz, koveol-bağımlı endositoz, caveolin-1 ve lipid sal aracılı endositozdur (Şekil 2.6.4) (Ginini ve diğ. 2022).



Şekil 2.6. 4. Eksozomların hedef hücre tarafından içselleştirilmesi (Ginini ve diğ. 2022'den uyarlanmıştır)

2.6.4. Kanserde Eksozomlar

Kanser hücresi kökenli eksozomların bağışıklık baskılanmasında, bağışıklık kaçınmasında ve immünoterapi direncinde önemli roller oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle, sıcak tümörleri (immün yanıt oluşturan) soğuk tümörlere (immün yanıt oluşturmayan) dönüştürürler. Ayrıca kanser kökenli eksozomlar, EMT, kemoterapi direnci, tümör matriksi üretimi, biyolojik bariyerlerin yıkımı, anjiyogenez, lenf anjiyogenez ve metastatik niş oluşumu dahil olmak üzere hücresel dönüşümü desteklemek için bağışıklık sistemi dışındaki hücreleri etkilerler (Eguchi ve diğ. 2022).

Tümör hücresi süpernatantlarından izole edilen eksozomlarla ilgili çalışmalar, eksozomların ana hücrede bulunan spesifik proteinler, lipidler ve nükleik asitler

açısından zenginleştğini göstermektedir. Bu durum, eksozom biyogenezinin rastgele bir süreç olmadığını göstermektedir (Villarroya-Beltri vd., 2014). Tümör hücrelerine ait olağanüstü bilgilere sahip eksozomal kargonun, ana tümör hücrelerinde metabolik ve proteomik profillerdeki herhangi bir değişikliği yansıtabileceği bilinmektedir. Bu nedenle eksozomlar, farklı tümör tiplerine sahip hastalarda özgün biyobelirteçler olarak prognostik, tanısal ve terapötik unsurlar olarak düşünülebilirler (Dezhakam vd., 2023).

Tümör nişi içinde eksozom alışverişi, tümör hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar ve infiltrate bağışıklık hücreleri gibi farklı hücre türleri arasında gerçekleşebilir. Eksozomların hipoksik ve anoksik koşullar altında salınması, makrofajlar gibi bağışıklık hücrelerinde fenotip kaymasını teşvik edebilir (Dezhakam vd., 2023). Kanseri hücrelerinden türetilen eksozomlar, alıcı hücrelerin kanser istilası ve metastazı için önemli bir süreç olan EMT'ye neden olabilir. Birincil tümörler, metastatik bölgeleri hazırlamak için sitokinler veya eksozomlar gibi sistemik sinyalleri serbest bırakır (You vd., 2015). Eksozom ilişkili RNA'lar, miRNA'lar, proteinler, DNA'lar ve metabolitler, otokrin ve parakrin sinyallemeye yoluyla alıcı hücrelerin kaderini değiştirebilir; eksozomal proteinler, bir otokrin yol aracılığıyla eksozom salan hücreleri etkileyebilir, ayrıca eksozomal DNA, hücre hayatta kalmasını doğrudan değiştirebilir (Konoshenko vd., 2018).

Kanser hücrelerinden türetilen eksozomlar, kan endotel hücrelerini ve lenf endotel hücrelerini düzenleyerek tümör anjiyogenezini, ekstrasvazasyonunu ve intravazasyonunu teşvik ederler. Miyeloid türevli baskılayıcı hücreler ve düzenleyici T (Treg) hücreleri gibi immünoşüpresif hücrelerin işlevlerinin farklılaşmasını teşvik ederler. Çeşitli hücre tiplerinin farklılaşmasını veya polaritesini etkileyerek protümörjenik, immünoşüpresif, anti-inflamatuar ve kemoterapiye dirençli fenotiplere dönüşmesini sağlarlar. Dendritik hücrelerde (DC) ve öldürücü T hücrelerinde apoptozu uyarırlar ve doğal öldürücü (NK) hücreleri devre dışı bırakırlar. Bu nedenle, tümör eksozomları immünoterapiye yanıt vermeyen veya daha az yanıt veren "soğuk" tümörlerin oluşturulmasına neden olabilirler. Sonuç olarak, tümörle ilişkili hücreler ve kanser hücreleri, bağışıklık baskılayıcı ve dirençli bir mikroçevre oluşturmak için eksozomlar aracılığıyla karşılıklı olarak iletişim kurabilirler (Sheta ve diğ. 2023).

Kanser hücrelerinden türetilen eksozomlar, alıcı hücrelerin kanser istilası ve metastazı için önemli bir süreç olan EMT'yi teşvik edebilir. HIF1a, matris metalloproteinaz 13 (MMP13), kazein kinaz II a (CKIA), anneksin A2 ve membran proteini 1 (LMP1) gibi eksozomlar tarafından iletilen birçok EMT faktörünün, alıcı hücrelerin metastatik özelliklerine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (You ve diğ. 2015). Birincil tümörler, metastatik bölgeleri hazırlamak için sitokinler veya eksozomlar gibi sistemik sinyalleri serbest bırakır. Yayılmış kanser hücreleri için bu ön-metastatik nişleri inşa etmede eksozomların önemi, tümör hücresinden türetilen eksozomların, lenf düğümlerini veya akciğer dokusunu, melanom hücrelerinin metastatik kolonizasyonu ve büyümesi için uygun nişler haline getirdiğine dair raporlar bulunmaktadır (Rana ve diğ. 2013; Hoshino ve diğ. 2015).

Önemli araçlar olarak, kanser hücreleri tarafından salgılanan eksozomlar hem kodlayan hem de kodlamayan RNA'ların yanı sıra bir tümör nişinin ve mikro ortamın oluşumunu ve homeostazını etkileyebilecek proteinleri içerirler. Ayrıca, kanser kök hücreleri tarafından salınan dolaşımdaki eksozomlar, kanser kök hücreleri için terapötik hedefler olarak hareket edebilen veya kanser teşhisi için umut verici sıvı biyopsi biyobelirteçleri olarak hizmet edebilir. Kanser nüksü veya terapi direnci ile ilişkili belirteçler taşıyabilirler (Luo ve diğ. 2021).

Kanserli hastaların plazmasında biriken eksozomlar, tümör hücrelerinin vekilleri gibi görünmektedirler. Gerçekten de AML hücre hatları tarafından üretilen eksozomlarla ilgili çalışmalar, bunların bölgesel moleküler profiller taşıdıklarını ve tümör hücrelerinin zarında bulunanları taklit eden benzersiz bir zar molekülü seti taşıdıklarını göstermiştir (Boyiadzis ve diğ. 2016).

Kanser araştırmaları ve tedavi geliştirmedeki önemli ilerlemelere rağmen cerrahi, genellikle kemoterapi ve radyoterapi ile tamamlanan kanser tedavisinde birincil yöntem olmaya devam etmektedir. Ancak bu geleneksel yaklaşımlar özgüllükten yoksundur ve hastalarda önemli hematolojik toksisiteye ve doku fonksiyon bozukluğuna neden olabilir. Buna karşı, immünoterapi son on yılda kanser tedavisini dönüştürmüştür. Ancak, tümörler arası ve tümör içi heterojenlik, tümör mutasyon yükü, farklı hastalar arasında mutasyonların düzensizliği, kanser türleri ve evrelerindeki farklılıklar, çeşitli tedavi geçmişleri ve tümörün doğal immünosüpresif yapısı hastalarda yanıt oranını düşürür. Bu nedenle, spesifik bağışıklık tepkilerini

indükleyebilen ve mevcut bağışıklık baskılayıcı mekanizmaları aşabilen yeni ve gelişmiş immünoterapilerin geliştirilmesine yönelik karşılanmamış klinik bir ihtiyaç hâlâ mevcuttur. Eksozomlar, immünoterapinin etkinliğini ve güvenliğini artırmak için adaylardır. Benzersiz yapıları, küçük boyutları, yapılandırılabilir bileşimleri, hücre/doku tropizmi ve hücreler arası iletişimde yer almaları eksozomların ön plana çıkmasına yol açmıştır. Geleneksel nano-ilaç taşıma sistemlerinin aksine, eksozomlar daha iyi biyouyumluluk, kan dolaşımında daha uzun bir ömür ve daha düşük sistemik toksisite sergileyebilirler (Coelho ve diğ. 2015).

2.6.5. AML’de Eksozomlar

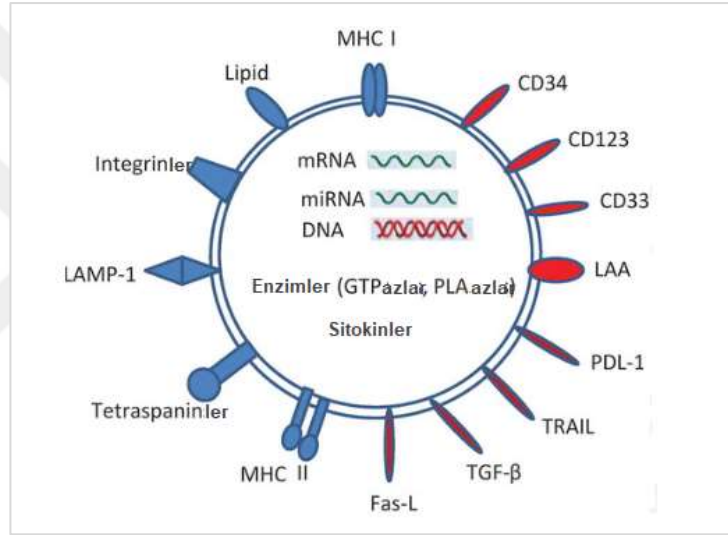
Hematolojik malignitelerde, tümör veya immün hücre kaynaklı EV’ler kemik iliği ortamını yeniden programlayabilirler, anti-lösemik immün yanıtı baskılayabilirler veya aktive edebilirler, ilaç direncini modüle edebilirler ve bu nedenle immünoterapilere müdahale edebilirler. Hasta serumlarından toplanan EV’lerin bileşimi, hastalık evresi, ilaç ve/veya immünolojik direnç veya immün terapilere yanıt ile ilişkili olabilir (Li ve diğ. 2023).

AML’de lösemik hücre popülasyonu oldukça heterojendir. Lösemik kök hücreler, refrakter veya nüksetmiş AML’nin gelişimine katkıda bulunan, kök özellikleri ve kendi kendini yenileme kabiliyetine sahip önemli bir lösemik hücre alt kümesidir. Eksozomlar, sabit durum ve patolojik koşullar altında hücreler arası iletişim ve malzeme alışverişinde yer alan biyoaktif maddeleri içeren hücre dışı keseciklerdir. Çalışmalar, eksozomların kemik iliği nişindeki lösemik kök hücreler, lösemik blastlar ve stromal hücreler arasındaki moleküler karışmaya aracılık ettiğini ve lösemik kök hücre bakımını ve AML ilerlemesini desteklediğini bildirmiştir. Eksozomların AML’de klinikte biyolojik belirteçler, terapötik hedefler ve taşıyıcılar olarak potansiyel uygulamaları araştırılmaktadır (Li ve diğ. 2023).

Prensip olarak, lösemik nüksetme ile ilişkili hasta plazmasındaki eksozomların protein, lipid, miRNA, mRNA veya DNA profilleri tanımlanabilir. Bu profillerin tanısal/prognostik değeri daha sonra prospektif klinik çalışmalarda doğrulanabilir. Burada, eksozomlar tüm bu molekülleri içerdiğinden, AML’de MRD’nin gelecekteki biyobelirteçleri rolünü üstlenebilir (Boyiadzis ve diğ 2016; Mendes ve diğ 2024).

AML tedavisindeki son gelişmelere rağmen, tekrarlayan nüksler ve ilaç direnci lösemi tedavisindeki en büyük zorluklardan biri olmaya devam etmektedir. Lösemik

kök hücreler, çevrelerindeki mikro ortamı yani kemik iliği nişini kendi avantajlarına kullanma konusunda dikkate gelişmiş yeteneğe sahiptir. Bu yeniden şekillendirme süreci, eksozom aracılı iletişim yoluyla düzenlenebilir. Lösemik kök hücrelerin hayatta kalmalarını, sağlıklı hematopoietik kök hücrelerin nişlerinden çıkararak normal kan hücrelerinin üretimini engellemelerini ve kontrolsüz ilerlemeyi desteklemek için hematopoietik nişleri önemli ölçüde değiştirmelerine olanak sağlar. Ayrıca, Lösemik kök hücrelerin kemoterapiden kaçması, niş içinde hareketsiz ve tespit edilemeden kalması ve daha sonra nüksetme ile yeniden ortaya çıkması için temel oluşturur (Mendes ve diğ. 2024; Amin ve diğ. 2022).



Şekil 2.6. 5. AML kökenli eksozomların taşıdıkları yüzey belirteçleri (Boiyadzis ve diğ. 2016).

AML'de, plazmadan türetilen eksozomlar, normal hücreden türetilmiş eksozomlara kıyasla farklı bir protein yükü içerirler. Blast türevli eksozomlar, tetraspaninler gibi geleneksel eksozom belirteçlerine ek olarak membranla ilişkili TGF-β1 ve miyeloid blast markerları, CD34 ve CD117 içermektedir (Şekil 2.6.5.) (Boiyadzis ve diğ. 2016). Yapılan çalışmalarda AML kökenli eksozomların kemik iliği mikroçevresinde lösemik kök hücre korunmasında, lösemik hücre dönüşümünde, bağışık hücrelerinin baskılanmasında ve ilaç direncinde etkili olduğu gösterilmiştir. Eksozom içeriğindeki kargolar tüm bu süreçlerin yönetilmesinde kilit rol oynar.

2.7. miRNA'lar

İlk olarak 1993 yılında tanımlanmış olan mikroRNA'lar (miRNA'lar), yaklaşık 22 nükleotidden oluşan, Argonaute (Ago) protein ailesiyle ilişkili, kodlamayan RNA molekülleridir. miRNA'lar hem hayvanlarda hem de bitkilerde çok çeşitli biyolojik süreçlerde önemli rollere sahiptirler. Baz eşleşmesi yoluyla Ago'yu belirli hedef mRNA'lara yönlendirirler ve bu durum da mRNA deadenilasyonu, translasyon baskılaması ve/veya mRNA kesilmesiyle sonuçlanır. Her bir miRNA, yüzlerce protein kodlayan geni düzenleyebilir ve böylece hücrel yanıtın sağlamlığını ve uyarlanabilirliğini artırabilir (Wightman ve diğ 1993).

miRNA'lar hedef mRNA'nın baskılanması, transkripsiyon sonrası gen regülasyonu veya translasyonun düzenlenmesi gibi önemli fizyolojik etkilere sahiptirler. miRNA'ların lipoproteinler ve çözünür proteinler ile kompleksler halinde veya EV'lerde kapsüllenmiş olarak çeşitli vücut sıvılarına salındığı keşfedilmiştir. EV ile ilişkili miRNA'lar ve diğer moleküler yükler, uzun mesafeli hücreden hücreye iletişimde önemli bir rol oynayan kan dolaşımı yoluyla alıcı hücrelere götürülebilirler (Li ve diğ 2023).

miRNA genleri, insanlarda en bol bulunan gen ailelerinden birini oluştururlar. miRNA veritabanı miRBase'in (sürüm 22.1) 1.907 insan miRNA genini kataloglamıştır (Kozamara ve diğ 2019).

miRNA genleri tipik olarak genomun protein kodlamayan bölgelerinde bulunurlar; bazıları protein kodlayan genlerin ve kodlamayan genlerin intronlarının bir parçası olarak veya daha nadir olarak da protein kodlayan genlerin ekzonları olarak transkripsiyona uğrarlar. İnsan miRNA'larının %50'sinden fazlası intronik bölgelerde bulunurlar ve intronların miRNA evriminin odak noktası olduğu düşünülür (Meunier ve diğ, 2013).

Klasik miRNA genlerinin transkripsiyonu, RNA polimeraz (Pol) II tarafından gerçekleştirilir, ancak tRNA'lardan türetilenler gibi bazı miRNA'lar RNA Pol III tarafından transkripsiyona uğrarlar. miRNA gen transkripsiyonunun hızı ve zamanı hücrede sıkı bir şekilde kontrol edilir ve çeşitli gelişimsel, fizyolojik ve patolojik süreçlerle ilişkilidir. miRNA'ların transkripsiyonel düzenlemesi esas olarak birçok miRNA için gözlemlenen önemli biyolojik bir olaydır. Ancak, miRNA düzeyi ile

transkripsiyon seviyeleri arasında sınırlı korelasyon, miRNA biyogenezinde transkripsiyon sonrası mekanizmaların önemini vurgulamaktadır (Kim ve diğ. 2025).

Şu anda miRNA profillemesi için kullanılan başlıca yöntemler dizileme teknolojileri, mikrodizi analizi ve eş zamanlı PCR tabanlı yaklaşımlardır.

2.7.1. miRNA biyogenezi

miRNA'ların çoğu (omurgalılarda) iki RNaz III enzimini içeren klasik bir yolla üretilir. miRNA sentezi klasik ve alternatif yollarla gerçekleşebilen bir olaydır (Şekil 2.7.1).

Klasik miRNA biyogenezi,

RNA Pol II tarafından transkripsiyona uğrayan birincil bir miRNA (pri-miRNA), çekirdekte Drosha–DGCR8 tarafından kesilir. Elde edilen öncül miRNA (pre-miRNA), nükleer taşıma reseptör ailesinin bir üyesi olan Exportin 5 (Exp5) tarafından sitoplazmaya aktarılır. Dicer, sitoplazmada terminal halkayı keserek bir Ago proteinine yüklenen bir miRNA dubleksini üretir. İkinci ipliğinin çıkarılmasından sonra, tek iplikli olgun miRNA , tamamlayıcı RNA hedeflerini susturmak için işlevsel Ago efektör kompleksini (RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC)) yönlendirir.

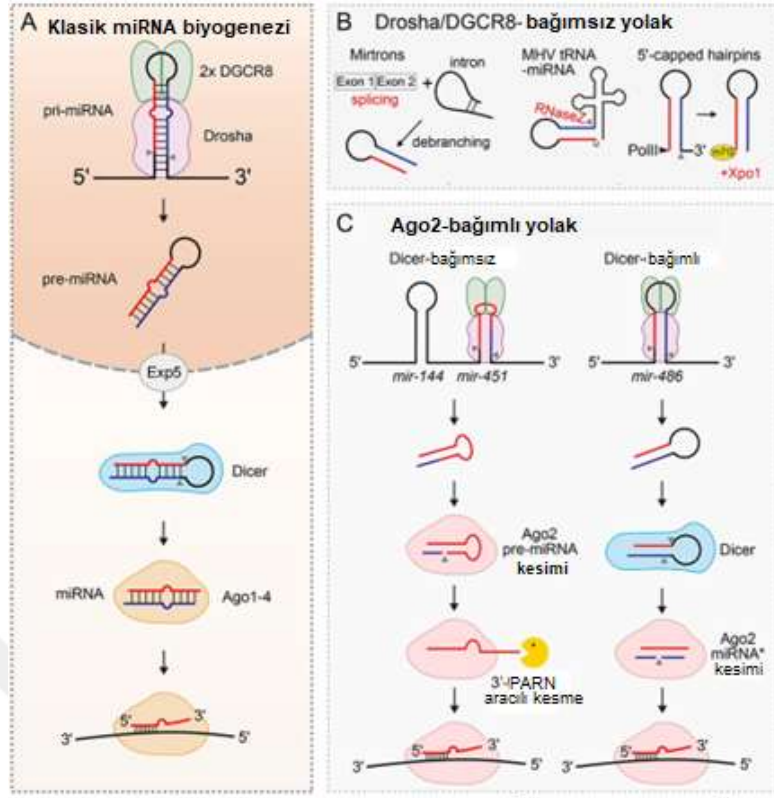
Alternatif miRNA biyogenezi

1. Drosha–DGCR8'den bağımsız pre-miRNA saç tokalarının oluşumunu içeren miRNA biyogenezi.

Ago bağlanması 5'-monofosfat gerektirdiğinden, başlıklı pre-miRNA saç tokalarının Dicer tarafından kesilmesi yalnızca 3' kollarından olgun miRNA üretir.

2. Ago2 bağımlı miRNA'lar.

Drosha'dan bağımsız ve/veya Dicer'dan bağımsız olan ek alternatif miRNA yollarının bilinmesi, işlevsel miRNA'lar üretmek için her iki RNaz III enzimini de verimli bir şekilde atlatan sentetik substratların tasarlanmasını sağlar (Shang ve diğ 2023; Vienberg ve diğ 2017).



Şekil 2.7. 1. miRNA sentezinin klasik ve alternatif yolları (Shang ve diğ. 2023).

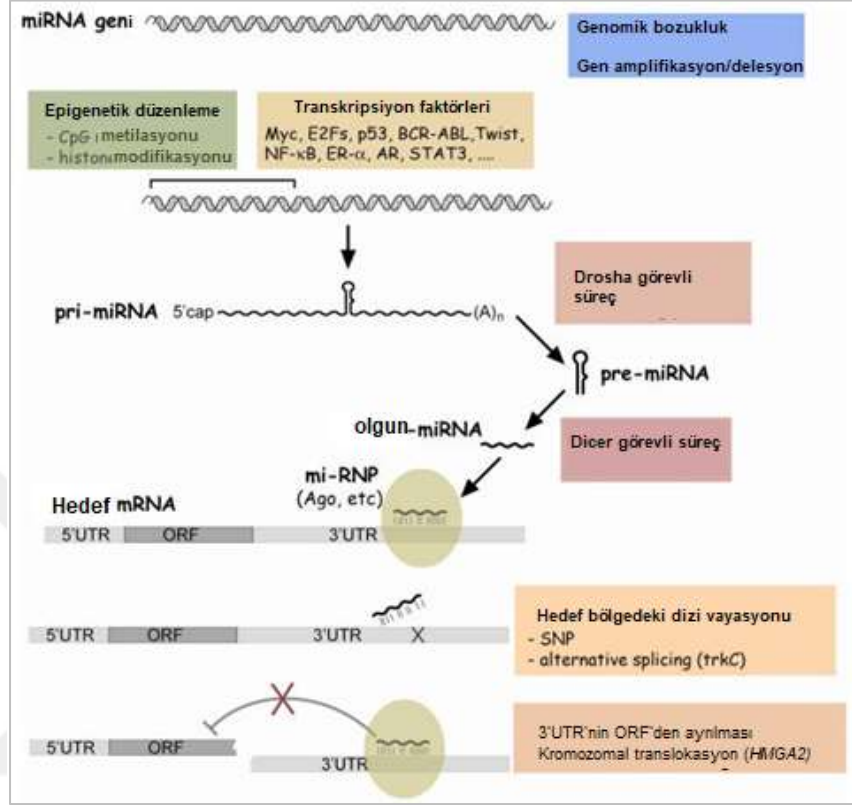
miRNA'lar konak gen transkripsiyonundan bağımsız olarak kendi promotörlerine tabidir (O'Brien ve diğ. 2018).

2.7.2. miRNA'ların düzenleyici Roller

Düzenleyici işlevlerini yerine getirmek için miRNA'lar Ago ailesi proteinleriyle ilişki kurarak miRNA kaynaklı susturma komplekslerinin (RISC) temel çekirdeğini oluştururlar. Bu kompleksler, miRNA'ya kısmen veya tamamen tamamlayıcı diziler içeren mRNA'ların transkripsiyon sonrası susturulmasına aracılık ederler. Hedefler katalitik olarak aktif AGO'lar tarafından kesilir. İnsanlarda yalnızca AGO2 katalitik olarak aktiftir. Kesilmenin mümkün olmadığı durumlarda, AGO proteinleri susturmayı aracılık etmek için ek protein moleküller devreye girer. Susturma, translasyonel baskılama, deadenilasyon ve 5'-3' mRNA yıkımının bir kombinasyonu ile meydana gelir. GW182 proteinleri bu süreçte merkezi bir rol oynar ve en kapsamlı çalışılan AGO işlevsel ortakları arasındadır. miRNA'lar translasyonu da baskırlar. Ancak mekanizması net değildir (Jonas ve diğ. 2015).

2.7.3. Kanserde miRNA düzensizliği

Birçok kanserlerde miRNA'ların düzenlemesi bozulur. miRNA'ların anormal ifadesi çeşitli mekanizmalar yoluyla ortaya çıkabilir (Şekil 2.7.2.).



Şekil 2.7. 2. Kanseri gelişimi ve ilerlemesi üzerine miRNA etki mekanizmaları (Yousefnia ve Negahdary, 2024)

miRNA düzensizliği kanseri gelişimi ve ilerlemesine etkisi aşağıda sıralanmıştır:

1. Genomik bozukluk

Kromozomal bozukluk kanserlerde miRNA düzensizliğinin bir nedenidir. Tümör oluşumuna genellikle delesyon, amplifikasyon ve translokasyon gibi kromozomal sapmalar eşlik eder. miRNA'ların önemli bir kısmının bu kanserlerle ilişkili genomik bölgelere veya kırılgan bölgeleri hedeflediği ortaya konmuştur (Tagawa ve Seto 2005).

2. Epigenetik faktörler

Epigenetik faktörler de miRNA ifadesini etkileyebilir. Birçok kanserde, promotör bölgelerindeki CpG adalarının hipermetilasyonu, tümör baskılayıcı genlerin

kalıtsal transkripsiyonel susturulmasıyla sonuçlanır. DNA metilasyonu gen susturulması, histon modifikasyonu ile yakından ilişkilidir. Silico analizler, miRNA'ya yakın çok sayıda CpG adaları olduğunu gösterilmiştir. Ek olarak, bazı miRNA'lar, DNA metiltransferazların (DNMT) mutasyonu veya histon deasetilaz (HDAC) ile düzenlendiğine dair çalışmalar mevcuttur (Lehmann ve diğ.2008;Scott ve diğ. 2006).

3. Transkripsiyonel düzenleme

Transkripsiyon faktörleri, pri-miRNA'ların transkripsiyonunu aktive ederek miRNA'ları uyarabilir. Dokuya özgü miRNA'ların sentezinin transkripsiyon faktörleri tarafından yönetildiği gösterilmiştir. Transkripsiyon faktörlerinin temel hücresel süreçlerdeki geniş etkisi göz önüne alındığında, birçok onkogenin veya tümör baskılayıcının transkripsiyon faktörü olduğu açıktır. Birçok miRNA-transkripsiyon faktörü ilişkisi bilinmektedir. Bunlar arasında p53, c-Myc ve E2F bulunmaktadır (Lee ve Dutta 2009).

4. miRNA işleme adımlarının düzenlenmesi

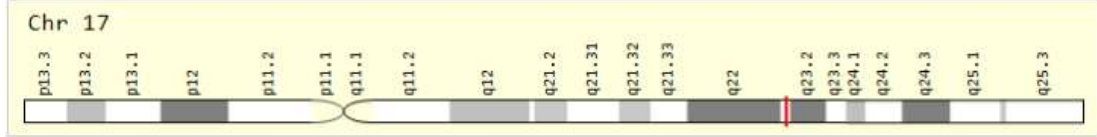
Olgun bir miRNA'nın sabit durum seviyesi, pri-miRNA'nın transkripsiyon oranına ek olarak, öncüllerinin işleme verimliliği ve kararlılığı tarafından belirlenir. miRNA'lar genellikle olgun formun ifadesinde öncüle göre bir oransal farklılık gösterir. Bu durum, miRNA işlenmesinin ve kararlılığının miRNA ifade seviyesini belirleyen önemli faktörler olduğunu göstermektedir. Tümör oluşumu sırasında miRNA'ların anormal ifadesi muhtemelen genellikle transkripsiyon sonrası adımlardaki değişikliklerden kaynaklanmaktadır. miRNA'lar hedef mRNA'larının ifadesini düzenler, böylece miRNA'ların aşırı veya az ifadesinin hedef mRNA'ların protein ürününün sırasıyla ifadesinde azalması veya artması ile sonuçlanması beklenir. Bir miRNA'nın doğrudan hedefi bir onkogen veya bir tümör baskılayıcısı ise doğrudan kanserle ilişkilidir. Evrensel gen ifade profilleri kanserler ve normal dokular arasında karşılaştırıldığında, birçok miRNA ve mRNA'nın düzenlenmesinin bozulduğu görülür. Bu nedenle, tümör oluşumunun veya bir kanserin ilerlemesinin tek bir miRNA'nın değişiminden ziyade, tüm miRNom'daki değişikliklerden kaynaklanması daha olasıdır (Lee ve Dutta 2009).

2.7.4. miRNA-21

miR-21 geni onkomiR olarak fonksiyon gösterir. İnsan kanser türlerinin neredeyse tümünde aşırı ifade edilen miR-21'in PTEN1 ve PDCD4 (programmed cell

death-programlanmış hücre ölümü 4) gibi önemli tümör baskılayıcı genleri hedef aldığı belirlenmiştir. Bu yol aracılığıyla invazyon ve metastazda etkili olduğu bildirilmiştir (Shah ve Calin 2014).

miRNA-21'in genomik lokasyonu 17q23.2'dir (Şekil 2.7.3.) (GeneCaRNA The Human Non coding Gene Database).



Şekil 2.7. 3. miRNA-21 geninin insan kromozomu üzerindeki konumu (Gene CaRNA).

miRNA-21 , gelişim, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve inflamasyon dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik işlev ve hastalıkta önemli bir rol oynar. pri-miRNA-21'i kodlayan gen, TMEM49 geninin intronik bölgesinde yer alır. Pri-miRNA-21 ve TMEM49, transkripsiyonun aynı yönünde örtüşen genler olmasına rağmen, pri-miRNA-21 kendi promotör bölgeleri tarafından bağımsız olarak transkripsiyona uğrar ve kendi poli(A) kuyruğu ile sonlanır. Transkripsiyondan sonra, pri-miRNA-21 sonunda olgun miRNA-21'e işlenir. miRNA-21 ifadesinin hemen hemen tüm kanser tiplerinde etkisi olduğu bulunmuştur ve bu nedenle bir onkomiR olarak tanımlanmaktadır (Kumarswamy ve diğ. 2011).

Kanserde miRNA'ların rolü, neoplastik dokularda çeşitli miRNA'ların ifadesinin bozulduğunu gösteren çeşitli çalışmalar sonucu ortaya çıkmıştır. miRNA-21 ilk olarak çeşitli hücre hatlarında apoptotik baskılayıcı olarak fark edilmiştir. miRNA-21'in onkogenik aşırı ifadesi şu ana kadar analiz edilen kanser tiplerinin çoğunda gösterilmiştir.. Normal hücrede miRNA-21 T hücresi aktivasyonu ve Th1 hücresinin düzenlediği bağışıklık tepkisinin düzenlenmesinde görevlidir. Ancak AML'de tedavi direnci ile ilişkilidir ve tedavi hedefi olmaya adaydır (Vandewallw ve diğ 2021; Fletcher ve diğ 2022).

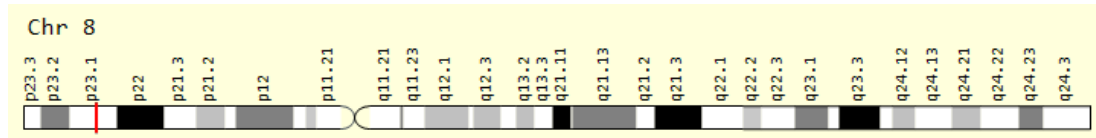
miRNA-21'in STAT3 ile mekanik ilişkisi doğrulanmıştır. *NPM1*, tüm FAB alt tipleri için tedavi seçiminde kullanılabilir olduğu ve *BCL11B*, *KLF5*, *MDM2*, *PDCD4* ve *PTEN* hedefleriyle ilişkisi gösterilmiştir (Moussa ve diğ. 2020; Wang ve diğ 2018).

AML'de miRNA tedavisi hakkında sınırlı veri olması nedeniyle, miRNA terapilerinin AML tedavisinde potansiyel rolü hala belirsizliğini korumaktadır.

2.7.5. miRNA-124

miRNA-124 çeşitli kanserlerde tümör baskılayıcı bir role sahiptir. Çok sayıda çalışma EMT, hücre döngüsü durması , metastaz ve kanser kök hücre oluşumu gibi süreçlerde kesin rollerini göstermektedir. Ancak bazı çalışmalar, miRNA-124'ün otofaji ve çoklu ilaç direnci gibi onkogenik süreçlerde de ikili bir rolü olduğunu göstermiştir. miRNA-124, anormal ifadesi mide kanseri, meme kanseri, hepatoselüler karsinom, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomları, glioblastoma ve diğer maligniteler dahil olmak üzere birçok kanserle ilişkilidir ve oldukça korunmuş bir miRNA'dır. Bu nedenle, tümörleri yönetmek için yeni tedavi stratejileri tasarlamak amacıyla daha fazla araştırma için iyi bir hedef olarak düşünülebilir. MiRNA-124 kanserli ve kanserli olmayan hücrelerde apoptozu da düzenler (Moghadası ve diğ. 2020).

miRNA-124'ün miRNA-124-1, miRNA-124-2 ve miRNA-124-3 olarak adlandırılan ve farklı kromozom konumlarına sahip üç alt tipi vardır. Çalışmamızda kullandığımız miRNA-124-1'in genomik lokasyonu 8p23.1'dir (Şekil 2.7.4.) (GeneCaRNA The Human Non coding Gene Database). miRNA-124-1 AML'de iyi prognozla ilişkilidir (Chen ve diğ. 2014).



Şekil 2.7. 4. miRNA-124 geninin insan kromozomu üzerindeki konumu (GeneCaRNA).

miRNA'ların transkripsiyon sonrası farklı genleri hedef alarak hematopoezi düzenlediği gösterilmiştir. Son zamanlarda, miRNA-124'ün insan kordon kanı CD34(+) hücrelerinde düşük bir seviyede ifade edildiği, ancak bu hücrelerin kültürü ve farklılaşması sırasında önemli ölçüde ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Bu durum hematopoezde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (Liu ve diğ. 2015)

CD4⁺ T hücrelerinde, miRNA-124 ifadesinin azalmasına ve sonuç olarak miRNA-124'ü hedef alan sitokin sinyalleme baskılanır, *STAT1* ve *STAT3* aktivasyonunu inhibe eder, sırasıyla T(H)1 ve T(H)17 hücrelerinin farklılaşmasını baskılar. Tümör mikroçevresinde immünosupresyona aracılık eden önemli bir yol olan

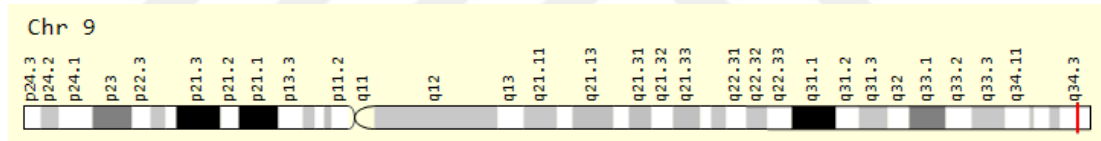
STAT3, miRNA-124'ün T hücresi işlevlerinin düzenlenmesindeki hedefi olarak tanımlanmıştır. miR-124 uygulaması *STAT3* aktivitesini azaltarak bağışıklık baskılanmasını ortadan kaldırabilir veya tersine çevirebilir. miRNA-124, aktive edilmiş form *p-STAT3* dahil olmak üzere *STAT3* ifadesini azaltır gibi görünmektedir (Wei ve diğ. 2013).

miRNA-124, hücre büyümesini baskılama, farklılaşmayı uyarma ve apoptozu teşvik etmedeki rolü nedeniyle bir tümör baskılayıcı olarak önerilmiştir. AML'de eksozomal miRNA-124'ün ifade değişiminin farklı prognostik seyre sahip AML alt gruplarındaki değişiminin tespit edilmesi bu molekülün olası biyobelirteç rolünün belirlenmesi önemlidir (Chen vd., 2014).

2.7.6. miRNA-126

miRNA-126, farklı kanser türlerinde hem tümör baskılayıcı hem de onkogen olarak tanımlanmıştır.

miRNA-126'nın genomik lokasyonu 9q34.3'tür (Şekil 2.7.5.) (GeneCaRNA The Human Non coding Gene Database).



Şekil 2.7. 5. miRNA-126 geninin insan kromozomu üzerindeki konumu (GeneCaRNA)

miRNA-126 özellikle vasküler bozukluklar ve kanser olmak üzere insan hastalıkları bağlamında en kapsamlı şekilde incelenen miRNA'lardan biri olarak ortaya çıkmıştır. miRNA-126, pro-anjiyojenik ve anti-inflamatuar fonksiyonları aracılığıyla vasküler onarımı destekler. miRNA-126 tümör büyümesini ve metastazı çift yönlü olarak düzenler, kardiyovasküler, otoimmün ve metabolik hastalıklar için bir biyobelirteç görevi görür. miRNA-126'nın anjiyogenez, bağışıklık tepkisi, inflamasyon, tümör büyümesi ve metastaz dahil olmak üzere temel fizyolojik ve patolojik süreçleri nasıl düzenlediğini açıklamak için kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Çok sayıda çalışmada miRNA-126'nın T hücreleri ve dendritik hücreler gibi bağışıklık hücrelerinde düzenleyici bir rol oynadığı bildirilmiştir (Guo ve diğ. 2025 ; Cheng ve diğ. 2023).

miRNA -126, lösemik kök hücre sessizliğini korur ve tümör hücresi direncini artırır, hematopoietik kök hücrelerin sessizliğini, ayrıca MDS'de hematopoietik kök hücre devamlılığı ve kendini yenileme yeteneğini korumasını sağlar (Zhang ve diğ. 2018).

miRNA-126'nın hem artmış hem de azalmış ifadeleri, farklı kanser evreleri ve bunların tedavi yanıtları için referans görevi görebilir. Megakaryositik lösemi hücre hatlarında miRNA-126 ifadesi artarken, farklılaşmış megakaryositlerde ve CD34+ progenitör hücrelerde in vitro ifadesi azalır ve bu da megakaryositik lösemide olası rolünü düşündürür (Garzon ve diğ. 2006).

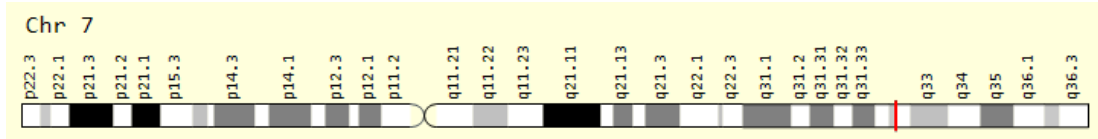
miRNA-126, normal ve kötü huylu hematopoietik kök hücrelerde farklı roller oynar ve farklı hedefleri düzenler ve ilginç bir şekilde, miR-126'nın hem aşırı ifadesi hem de nakavt edilmesi lökomogenezi teşvik eder (Li ve diğ. 2015).

miRNA-126, S/G2/M geçişi ve G0'dan çıkışa etki ettiği düşünülen *PI3K/AKT/MTOR* ve *CDK3*'te birleşen hedeflerin ifadesinin azalması yoluyla hücre döngüsü ilerlemesini düzenleyerek lösemik kök hücre biyolojisine doğrudan bağlıdır. Tanı sırasında yüksek miRNA-126'nın AML de lösemik kök hücre devamına katkı sağladığı ve kemoterapi direnci ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Naldini vd., 2023). Eksozomal miRNA-126'nın da farklı AML alt gruplarındaki ifade düzeyleri karşılaştırmalı olarak incelenmemiştir.

2.7.7. miRNA-335

Dokularda ve hücrelerde miRNA-335'in ifade düzeyi kanser türlerine göre değişir ve kanser prognozu için potansiyel bir biyobelirteç olarak önerilmiştir. Ayrıca, tümör başlangıcında, gelişiminde ve metastazında farklı hedefleri veya yolları düzenleyerek hem onkogen hem de tümör baskılayıcı olarak görev yapabilir. miRNA-335 tümör mikro çevresini ve ilaç duyarlılığını da etkiler. miRNA-335 hücre döngüsü, metastaz ve apoptozda görevlidir. MiRNA-335, uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) ve miRNA'lar gibi çeşitli faktörler tarafından düzenlenir (Ye ve diğ. 2021).

miRNA-335 genomda 7q32.2 konumundadır (Şekil 2.7.6.) (GeneCaRNA The Human Non coding Gene Database).



Şekil 2.7. 6. miRNA-335 geninin insan kromozomu üzerindeki konumu (GeneCaRNA)

Genom çapında bir miRNA mikrodizi araştırmasına göre, miRNA-335'in düşük ifade düzeyi, pediatrik ALL hastalarında daha kötü bir prognoz, daha düşük 5 yıllık olay içermeyen sağkalım oranı ve glukokortikoid direnci ile bağlantılıdır. Ayrıca relaps görülen hastaların kontrole göre, ilaca dirençli hastaların ilaca duyarlı hastalara göre daha düşük miRNA-335-3p seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir (Barrios-Palacios ve diğ. 2023).

miRNA-335'in kemoterapi veya radyasyon tedavisi duyarlılığını düzenlemede rol oynadığını gösteren kanıtlar mevcuttur. miRNA-335, kanser hücrelerinin kanser karşıtı tedaviye olan duyarlılığını düzenler. miRNA-335, *PARP-1*, *POU5F1*, *ROCK1*, *SLAH2*, *CCNB1*, *Bcl-W*, *WBP5*, *C-Met* ve *CPNE1*'in baskılanması yoluyla kanser hücrelerinin kanser karşıtı tedaviye olan duyarlılığını artırır (Cheng ve Shen 2020; Pascal 2018).

miRNA-335, Hedgehog yolunu baskılayarak hücre büyümesini, metastazı ve ilaç duyarlılığını engeller. AKT/mTOR sinyal yolunu baskılayarak hücre büyümesini ve metastaz ilaç duyarlılığını engeller. Hippo yolu aracılığıyla ilaç duyarlılığını ve apoptozu düzenler (Ye ve diğ. 2021).

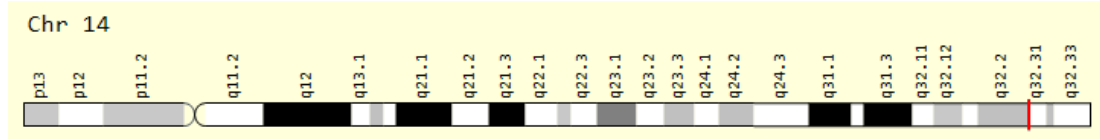
miRNA-335 ve miRNA -21'in AML'de ifadesinin arttığı bildirilmiştir. Ancak kanserdeki net mekanizması bilinmemektedir (Zhang vd., 2022). Eksozomal miRNA-21 ve miRNA-335'in AML alt gruplarındaki ifade farklılıkları hangi yolları düzenleyerek AML patogenezi etkilediğinin aydınlatılmasına yönelik ileri çalışmalar için önemlidir.

2.7.8. miRNA-370

miRNA-370'in ifadesi çeşitli kanser türlerinde düzenlenmesi bozulmuştur ve farklı tümör türlerinde belirgin şekilde değişir. miRNA-370, hücre çoğalması, apoptoz, göç, invazyon ve hücre döngüsü ilerlemesi ve kök hücreliği dahil olmak üzere birden fazla biyolojik süreci düzenleyebilir. Ayrıca, miRNA-370'in tümör hücrelerinin

antikanser tedavilerine verdiği yanıtı etkilediği bildirilmiştir. miRNA-370'in ifadesi birden fazla faktör tarafından modüle edilir (Ye ve diğ. 2023).

miRNA-370 genomda 14q32.31 konumundadır (Şekil 2.7.7.) (GeneCaRNA The Human Non coding Gene Database).



Şekil 2.7. 7. miRNA-370 geninin insan kromozomu üzerindeki konumu (GeneCaRNA)

miRNA-370 ailesi insan genomunun iki ana üyesi miRNA-370-5p ve miR-370-3p'dir. Son zamanlarda çoğu araştırma miR-370-3p üzerine odaklanmıştır. Genel olarak, miR-370 hedef mRNA'larının 3'-UTR'sine spesifik olarak bağlanarak gen ifadesini baskılar ve kanser oluşumunu ve gelişimini düzenlemek için bir onkogen veya tümör baskılayıcı olarak işlev görebilir (Li ve diğ. 2017)

miRNA-370'in düzensizliği çok sayıda kanser türünün patogenezi ve ilerlemesiyle yakından ilişkilidir. Mevcut çalışmalarda miR-370'in çeşitli kanser türlerinde iki yönlü olarak ifadesinin arttığı ya da ifadesinin azaldığı bildirilmiştir. miRNA-370, PIK3/AKT, Wnt/ β -katenin, NF- κ B ve MEK/ERK sinyal yollarına katılarak kanser ilerlemesini düzenleyebilir. Hücre çoğalmasını, apoptozu, göçü ve invazyonu teşvik ederek veya baskılayarak farklı kanser türlerinde onkogenik veya tümör destekleyici rollere sahiptir. miRNA-370, kanser hücre döngüsünün ilerlemesini etkileyebilir ve farklı hedefleri düzenleyerek kanser tedavisini etkiler (Ye ve diğ.2023).

miRNA-370 pediatrik AML'de daha önce prognostik değeri gösterilmiş ancak erişkin AML'de de eksozomal miRNA olarak farklı translokasyonlara sahip AML hastalarında ifade profili araştırılması gereken bir moleküldür (Ali vd., 2022).

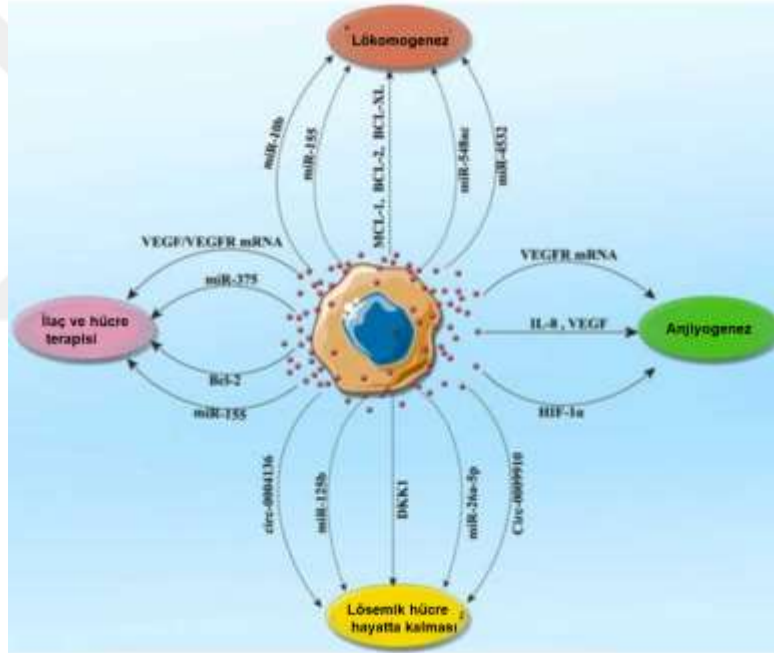
2.7.9. AML'de miRNA'lar

miRNA'ların neredeyse tüm fizyolojik süreçlerde rol oynadığı ve kanser de dahil olmak üzere bir dizi insan hastalığında aktif görev aldığı bilinmektedir. Bu hastalıklarda miRNA'lar onkomirler veya tümör baskılayıcılar olarak hareket edebilirler. Hematolojik maligniteler de bozulmuş miRNA ifadesi birçok farklı hematopoietik soydan gelen kan kanserlerine katkıda bulunur (Fletcher ve diğ. 2022).

Lösemik kök hücreden köken alan miRNA'lar, AML gelişimine önemli bir katkıda bulunur ve hastalığın tekrarlamasında önemli bir rol oynar (Wang ve diğ. 2019).

2.8. AML'de eksozom kökenli miRNA'lar

miRNA'lar, sayısız molekülü hedefleyerek tümörlü dokulardaki çok boyutlu rolleri nedeniyle eksozomların en kritik bileşenlerinden biridir. Çalışmalar, kanser sürecinin ilerlemesi sırasında miRNA'ların tümör gelişiminde ve tümör prognozu için biyobelirteçlerde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. miR-1, miR-15, miR-16, miR-151, miR-375 ve lethal-7 gibi bazı miRNA'ların hematopoez, tümör oluşumu ve anjiyogenezde temel bir işlevi vardır (Şekil 2.8.1.) (Amin ve diğ 2022).



Şekil 2.8. 1. AML hücrelerinden köken alan eksozomların etkileri (Amin ve diğ 2022)

Diğer çalışmalar, eksozomal miR150, miR-155, miR-17-5p, miR-16-5p, miR-18a, Let-7b, miR21-5p, miR320b ve Let-7d'nin multipl miyelom, lösemi ve lenfoma dahil olmak üzere çeşitli hematolojik hastalıklarda biyobelirteç olarak önerildiğini göstermektedir (Amin ve diğ 2022) .

Eksozomların lösemi gelişimini kolaylaştırdığı en önemli mekanizmalardan biri, önemli onkogenik RNA'ların lösemik hücrelere ilerleme özelliklerini değiştirmek için hematopoietik kök hücrelere taşınmasına aracılık etmektir. Örneğin miR-10b içeren eksozomların serum seviyesinin kontrollerle karşılaştırıldığında AML hastalarında ifadesinin arttığı ve AML'nin teşhisi için olası bir biyobelirteç olarak hareket edebileceği gösterilmiştir. Eksozomal miR-4532, *STAT-3* sinyal yolunun uyarılmasıyla CD34 + hematopoietik kök hücrelerin çoğalma kabiliyetini değiştirirler. Ayrıca, bazı çalışmaların sonuçları, AML'den kökenlenen eksozomların, miR-155'i aktararak miyeloid progenitörlerde lökomogenezi uyurabileceğini ortaya koymuştur. Başka bir çalışmada, miR-548ac taşıyan AML hücresi tarafından salınan eksozomlar, *STAT3* aktivasyonunu hedefleyerek CD34 + hematopoietik kök hücrelerin hayatta kalmasını ve hematopoezini baskılama kabiliyeti göstermiştir. Lösemi gelişimi sırasında eksozomların miRNA'ları veya onko-mRNA'ları taşıyarak bir araç görevi gördüğü belirtilmiştir. Bu nano araçlar, kemik iliği nişi özelliklerini AML ilerleme şansını artıracak şekilde değiştirebilir. Eksozomların lösemi gelişimindeki destekleyici rolüne ek olarak, kemoterapi sırasında lösemi hücrelerini koruyabilirler. Örneğin lösemi hücresinden türetilen eksozomlarda taşınan miR-155 ve miR-375'in AML hücreleri için bir kemo direnç durumuna yol açtığı bildirilmiştir (Amin ve diğ. 2022).

Ancak lösemi gelişimine ve ilerlemesine katkısı belirli ölçüde ortaya konmuş bazı miRNA'lar eksozomal olarak daha önce araştırılmamıştır.

Çalışmamızda AML'de daha önce belirli sınırlarda çalışılmış miRNA-21, miRNA-124, miRNA-126, miRNA-335 ve miRNA-370'in eksozom içeriğindeki durumları incelenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Hücre Soyları

Çalışmada kullanılan hücre soyları American Type Culture Collection (ATCC)'den temin edilmiş olup İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneyisel Tıp Araştırmaları Enstitüsü sıvı azot tankında -196 °C'de muhafaza edilmektedir.

Çalışmada kullanılan hücre soylarının özellikleri:

HL60: İnsan, pro-miyoblast hücre soyudur. Periferik kandan elde edilmiştir. Süspanse kültüre edilir. Akut promiyelositik lösemili bir hastadan elde edilmiştir.

%10 FBS ve %1 antibiyotik ile desteklenmiş RPMI medyumda süspanse kültüre edildi. %5 CO₂ içeren ve 37 °C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

%5 konsantrasyonda DMSO içeren medyumda donduruldu.

NB4: İnsan promiyelositik hücre dizisidir. İlk olarak 1989 yılında ikinci kez nükseden Akut promiyelositik lösemili (APL, AML FAB M3) 23 yaşında bir kadının kemik iliğinden alınmıştır.

%20 FBS ve %1 antibiyotik ile desteklenmiş RPMI medyumda süspanse kültüre edildi. %5 CO₂ ve 37 °C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

%5 konsantrasyonda DMSO içeren medyumda donduruldu.

THP1: İnsan monositik hücre dizisidir. Periferik kandan elde edilmiştir. Bir yaşında akut monositik lösemi hastası erkek çocuktan alınmıştır.

%10 FBS ve %1 antibiyotik ile desteklenmiş RPMI medyumda süspanse kültüre edildi. %5 CO₂ ve 37 °C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

% 5 konsantrasyonda DMSO içeren medyumda donduruldu.

HEK 293T : İnsan embriyonik böbrek epitelyal hücresidir. İlk olarak fetustan elde edilmiştir.

%10 FBS ve %1 antibiyotik ile desteklenmiş DMEM medyumda monolayer olarak kültüre edildi. %5 CO₂ ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

%5 konsantrasyonda DMSO içeren medyumda donduruldu.

3.1.2.Kullanılan Kitler ve Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kitler ve kimyasal maddeler Tablo 3.1.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. 1. Kullanılan kitler ve kimyasal maddeler

Malzemeler	Markası
RNA İzolasyon kiti	miRNeasy (Qiagen)
Western görüntüleme kemilüminesans reaktifi	Super signal West Pico Plus Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific)
cDNA Sentez Kiti	First Strand cDNA Synthesis (Thermo)
Eksozom izolasyon kiti	miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit (QIAGEN)
Eksozom izolasyon kiti	Readiprep (AATBIO)
Hücre kültürü medyum	RPMI (Roswell Park Memorial Institute, 1640 Medium) Gibco
Hücre kültürü medyum	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) Gibco
Cell Counting Kit 8 (WST-8 / CCK8)	Abcam
EXOCET Exosome Quantitation Kiti	System Bioscience
FBS	CAPRICORN
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	BIOMATIK
1x PBS (w/o calcium and magnesium)	Wisent Multicell
Penisilin/Streptomisin (10,000 U/mL)	Thermo Fisher Scientific
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific
Lipofectamine RNAimax	Thermo Fisher Scientific
Formvar/Carbon on 400 Mesh Copper	Agar Scientific
Uranil Asetat	Agar Scientific
Gluteraldehit	Agar Scientific
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Biomatik
TSG101 (1. Ab)	Santa Cruz
Goat Anti-Mouse (2. Ab)	Elabscience
RIPA Lysis and Extraction Buffer	Thermo Fisher Scientific
Süt tozu	Thermo Fisher Scientific
iBlot™ Transfer Stack,	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE Bis-Tris	Thermo Fisher Scientific
Ponceau S Boyama Çözeltilisi	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (20X)	Thermo Fisher Scientific
TWEEN 20 (50% Solution)	Thermo Fisher Scientific
Skim Milk Powder	Thermo Fisher Scientific
Pierce BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific
Super signal West Pico Plus Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific
DEPC (Dietilpirokarbonat)	Sigma

3.1.2.Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve teçhizatlar Tablo 3.1.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. 2.Kullanılan cihaz ve teçhizatlar

Cihaz ve teçhizatlar	Markaları
Mikroskop	Olympus
Nanodrop 200	Thermo Fisher Scientific
Light Cycler 480 -II	Roche
Vi-Cell Hücre Sayım Cihazı	Beckman Coulter
Otoklav	ALP CL-40M
İnkübatör	Thermo Electron Corporaiton
PZR Cihazı	Biorad
-80 Derin Dondurucu	Thermo Fisher Scientific
Yatay Çalkalayıcı	IKA
Buz Makinası	Cornelius
Distile Su Cihazı	Milipore
Ultrasantrifüj	Beckman Coulter
Ultrasantrifüj tüpleri	Beckman Coulter
Transmisyon Elektron Mikroskobu	JEOL JEM 1011
Hassas Terazi	Kern
Laminar Akışlı Steril Kabin	Nuanre
Mikrodalga Fırın	Arçelik
iBlot 2 Western Blot Transfer System	ThermoFisher
Nanodrop 2000 Spektrofotometre	Thermo Scientific
Otoklav	Sümer
ChemiDoc Imaging System	BioRad
Santrifüj	Hettich
Sıvı azot tankı	StateBourne
Soğutmalı Masaüstü Santrifüj	Hettich
Su Banyosu	Memmert
Vorteks	Stuart

3.2. Yöntem

3.2.1. AML hastalarından ve sağlıklı kontrollerden kan örneği alınması ve eksozom izolasyonu

Çalışmaya AML tanısı almış 18-80 yaş aralığındaki toplam 20 hasta ve 20 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. Çalışmaya katılan hasta sayısı Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran yaklaşık yılda 25 AML hasta sayısı dikkate alınarak tespit edilmiştir. Hastaların dahil edilme kriterleri arasında, 18-80 yaş aralığında olma, morfolojik, genetik ve immünohistokimyasal olarak AML tanısı almış olma bulunmaktadır. Dışlanma kriterleri ise 18 yaş altı olma, gebelik, daha önce kanser tedavisi almış ve ek bir hastalığa sahip olma gibi durumlardır. Hastalar mevcut demografik ve klinik durumlarına göre sınıflandırılmıştır. Sağlıklı kontrollerin dahil edilme kriterlerinde örnek alma sırasında ve öncesinde kanser geçmişi olmama, kemoterapi almamış olma, immünomodülatör tedavisi görmemiş olma, kronik bir hastalığı olmama ve sürekli kullandığı bir ilaç bulunmama yer almaktadır. Çalışma için “Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu”ndan etik kurul onayı (Etik Kurul Numarası: 2023.121.06.07) alınmıştır.

3.2.2. Plazma hazırlığı

Hastalardan ve sağlıklı kontrollerden “Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu” eşliğinde toplanan 5 mL kandan plazma elde edildi. “miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit (QIAGEN)” serum/plazma ön hazırlık talimatlarına göre eksozom izolasyonu için kullanılacak plazma hazırlandı.

3.2.3. Kan plazmasından eksozom izolasyonu

Eksozom izolasyonu “miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit (QIAGEN)” üretici talimatlarına göre gerçekleştirildi. Eksozom izolasyonu için hasta ve sağlıklı kontrollerden toplanan önceden hazırlanıp -80°C'de muhafaza edilen plazmalar kullanıldı:

1. Plazmadan, düşük trombosit içeriğine sahip hücresiz bir numune elde etmek için, hücreleri, döküntüleri ve trombositleri peletlemek için 15 dakika boyunca 3.000 x g'de santrifüj edildi.
2. Üstteki sıvı yeni bir ependorf tüpe aktarıldı.
3. 1 mL plazmaya 10 µL Trombin (500 U/mL stok konsantrasyonu) eklendi.

4. Vorteks edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
 5. 10.000 x g'de 5 dakika santrifüjlendi.
 6. Üst sıvı yeni bir 2 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
 7. Üzerine 350 µL Çöktürme Tamponu A yavaşça eklendi.
 8. Ardından 4°C'de 60 dakika inkübe edildi.
 9. Sonrasında 20°C'de 5 dakika boyunca 500 x g'de santrifüjlendi.
 10. Üstteki sıvı alındı ve gerekirse ayrı bir analiz için saklandı.
 11. Pelet tekrar kısa bir süre santrifüjlendi ve kalan üstteki sıvı tamamen temizlendi.
 12. Peleti içeren tüpe 270 µL Resüspansiyon Tamponu eklendi ve vorteksleyerek resüspanse edildi. ~300 µL'lik bir son hacimde saflaştırılmış eksozom elde edildi.
- Eksozom kullanılabileceği kadar -80°C'de saklandı.
- Bu adımlar kısaca Şekil 3.2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. 1. Eksozom izolasyonu adımları ve eksozom pellet görüntüsü

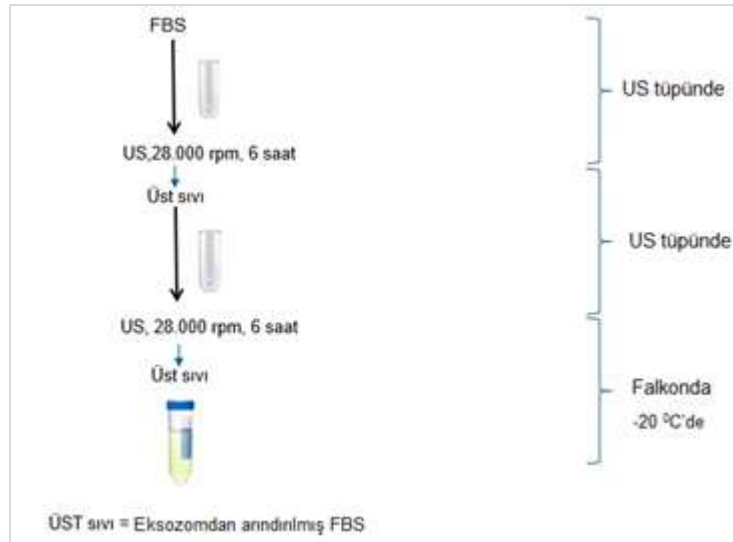
3.2.4. Kültüre edilen Hücrelerden Eksozom İzolasyonu

Çalışmada AML hücre soyları olarak NB4, HL60, THP 1 ve kontrol hücre soyu olarak da HEK 293T kullanıldı. Eksozomdan arındırılmış FBS içeren besiyerinde kültürlenmiş hücrelerden eksozom izolasyonu yapıldı

3.2.5. Eksozomdan arındırılmış FBS hazırlığı

FBS (Capricorn), eksozom ve buna bağlı olarak miRNA kontaminasyonuna neden olmaması için eksozomlardan ultrasantrifüj (US) yöntemi ile arındırıldı. US tüpleri US rotorlarına aktarılan kadar tüm aşamalar hücre kültürü kabininde gerçekleştirildi (Şekil 3.2.2).

1. FBS 35 mL'lik US tüplerine (Beckman Coulter) alındı ve hassas teraziyle ölçüldü. 0,001 farklılık bile US çalışmasını etkileyeceğinden tüm tüpler eşit hacimlerde hazırlandı.
2. Her bir US tüpü 35 mL FBS olacak şekilde karşılıklı denge oluşturabilmesi için 4 tüp oluşturuldu.
3. Önce US cihazında +4 C'de 28.000 rpm olacak şekilde 6 saat santrifüj edildi.
4. Tüpün dibinde 1 mm yukarıdan üst sıvı tamamen alındı. Yeni bir US tüpüne aktarıldı.
5. Yeni tüplerinde dengesini tam olarak ayarlayabilmek için hassas terazi kullanıldı. 34 mL'lik FBS içeren 4 US tüpü hazırlandı.
6. 3. Adım tekrarlandı.
7. Dipte 1 mm mesafe kalacak şekilde üst sıvılar alınıp 50 mL'lik falkonlarda kullanıma kadar -20 C de saklandı



(FBS: Fetal bovine serum, US: ultrasantrifüj)

Şekil 3.2. 2.Eksozomdan arındırılmış FBS hazırlığı aşamaları.

3.2.6.Hücrelerin çoğaltılması

Çalışmada translokasyon bulunmayan, FAB M2 sınıfı AML model hücre soyu olarak HL60, t(15:17) translokasyonlu AML hücre soyu olarak NB4 ve homozigot P53^{-/-} mutant hücre AML hücre soyu olarak da THP1 kullanıldı.

HL60 ve THP1 hücre soyları eksozomdan arındırılmış %10 FBS (Capricorn), 2mM L-glutamin, 100 ünite/mL penisilin ve 100ug/mL streptomisin ile desteklenmiş Roswell Park Memorial Institute,1640 Medium (RPMI, Gibco) medyumda kültüre edildi. NB4 hücre soyu ise eksozomdan arındırılmış %20 FBS, 2mM L-glutamin, 100 ünite/mL penisilin ve 100ug/mL streptomisin ile desteklenmiş RPMI medyumda çoğaltıldı.

HEK 293T hücre soyu eksozomdan arındırılmış %10 FBS, 2mM L- glutamin, 100 ünite/mL penisilin ve 100ug/mL streptomisin ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) medyumda kültüre edildi. Hücreler %5 CO₂ içeren, 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

Hücreler yeterli sayı ve canlılık oranına ulaştığında mililitrede 1 milyon hücre olacak şekilde eksozomdan arındırılmış FBS içeren besiyerine pasajlandı. 48 saat boyunca inkübe edilen hücrelerden süpernatant toplandı (Hong ve diğ. 2014).

Süspanse hücrelerin eksozom izolasyonu için hazırlanması

1. Önceden T25'lik flaskta çoğaltılmış olan HL60, THP1 ve NB4 hücreleri ayrı ayrı 15 mL'lik falkonlara alınarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi
2. Ardından süpernatant uzaklaştırılarak pellet 1 mL eksozomdan arındırılmış FBS içeren RPMI medyumla çözülerek hücre sayımı yapıldı.
3. HL60, NB4 ve THP1 hücre soyları yeniden eksozomdan arındırılmış FBS içeren, antibiyotikli RPMI medyumda mililitrede 1×10^6 hücre ve son hacim 5 mL olacak şekilde pasajlandı.
4. Hücreler %5 CO₂ içeren ve 37°C'lik inkübatörde 48 saat çoğaltıldı.

Aderent hücrelerin eksozom izolasyonu için hazırlanması

1. Önceden T25'lik flaskta çoğaltılmış olan HEK 293T hücrelerinin medyumunu uzaklaştırıldı.

2. Yüzey medyum etkisini gidermek için 1 mL Phosphate buffered saline (PBS, Sigma) ile yıkandı.
3. PBS'in uzaklaştırılmasının ardından hücreleri tutundukları yüzeyden ayırmak için 2 mL tripsin (Sigma) uygulandı.
4. Bir dakika inkübe edildi.
5. Bu sürenin sonunda tripsin etkisini gidermek için 4 mL medyum eklenerek hücrelerin yüzeyden tamamen kalkması için pipetleme yapıldı.
6. Hücrelerin bulunduğu süpernatant 15 mL'lik falkona toplandı ve 1500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.
7. Ardından süpernatant uzaklaştırılarak pellet 1 mL eksozomdan arındırılmış FBS içeren RPMI medyumla çözüldü.
8. Hücre sayımı yapıldı.
9. HEK 293T hücre soyu yeniden eksozomdan arındırılmış FBS içeren, antibiyotikli DMEM medyumda mililitrede 1×10^6 hücre ve son hacim 5 mL olacak şekilde pasajlandı.
10. Hücreler %5 CO₂ ve 37°C'lik inkübatörde 48 saat çoğaltıldı.

Süpernatandan eksozom izolasyonu

Pasajlama işleminden 48 saat sonra hücrelerin süpernatantları toplandı.

- HL60, THP1 ve NB4 hücreleri 15 mL'lik falkonlara alınarak 1500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi ve ardından süpernatant yeni bir 15 mL'lik falkona alındı.
- HEK 293 T hücrelerinin bulunduğu flasktan hücrelerin yüzeyindeki süpernatant dikkatli bir şekilde 15 mL'lik falkona alındı.

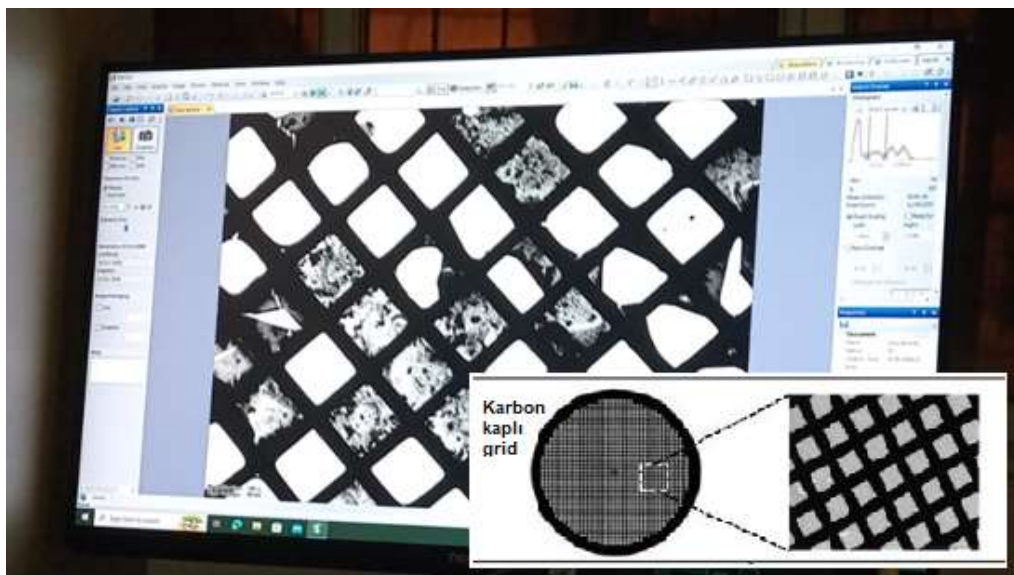
Eksozom izolasyonu “ReadiPrep™ Exosome Isolation Kit (AATBIO)” kullanarak üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildi.

1. 5 mL süpernatant, 5 mL çökeltme tamponu ile karıştırıldı.
2. Örnek gece boyunca 4°C'de inkübe edildi.
3. Ardından süpernatantı uzaklaştırmak için 30 dakika 1500 x g'de santrifüjlendi.
4. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet tekrar 5 dakika aynı koşullarda santrifüj edildi.
5. Süpernatant uzaklaştırılarak çökelti 200 µL PBS içinde yeniden çözdürüldü.
6. Eksozomlar -80 °C'de saklandı.

3.2.7. Transmisyon Elektron mikroskobu ile eksozomların görüntülenmesi

Ekzosomlar transmisyon elektron mikroskobu (TEM) (JEOL, JEM 1011) kullanılarak boyut ve yapı açısından incelendi.

1. Her örnekten 20 μ L ekzosom süspansiyonu 180 μ L PBS ile seyreltildi.
 2. Seyreltilmiş her bir eksozom örneği parafilm üzerine damlalar halinde konuldu.
 3. Her bir damla üzerine karbon kaplı ızgaralara (Formvar/Carbon on 400 Mesh Copper) yerleştirildi ve 3 dakika inkübe edildi.
 4. Ardından karbon kaplı ızgaralar parafilm üzerine damlatılan temiz PBS ile 3 dakika bekletilerek yıkandı.
 5. Daha sonra fiksasyon için gridler parafilm üzerine damlatılmış %2'lik gluteraldehit üzerinde 1 dakika inkübe edildi.
 6. Gridler tekrar 3 dakika PBS üzerinde bekletilerek yıkandı.
 7. Ardından kontrastlama için parafilm üzerine damlatılan 1:9 oranında seyreltilmiş Uranil asetat üzerinde 3 dakika bekletildi.
 8. Sonrasında 3'er dakika her seferinde temiz PBS üzerinde bekletilerek 3 ardışık yıkama yapıldı.
 9. Hafifçe kurutma kağıdına dokundurularak fazla sıvı uzaklaştırıldı.
 10. Izzaralar 80 kV'da TEM ile 60000X büyütmede görüntüledi.
- Gridlerin TEM ekranında görüntüsü ve yapısı Şekil 3.2.3'de verilmiştir.



Şekil 3.2. 3. TEM ekranında grid görüntüsü ve karbon kaplı grid yapısı

3.2.8. Western blot analizi

Protein İzolasyonu

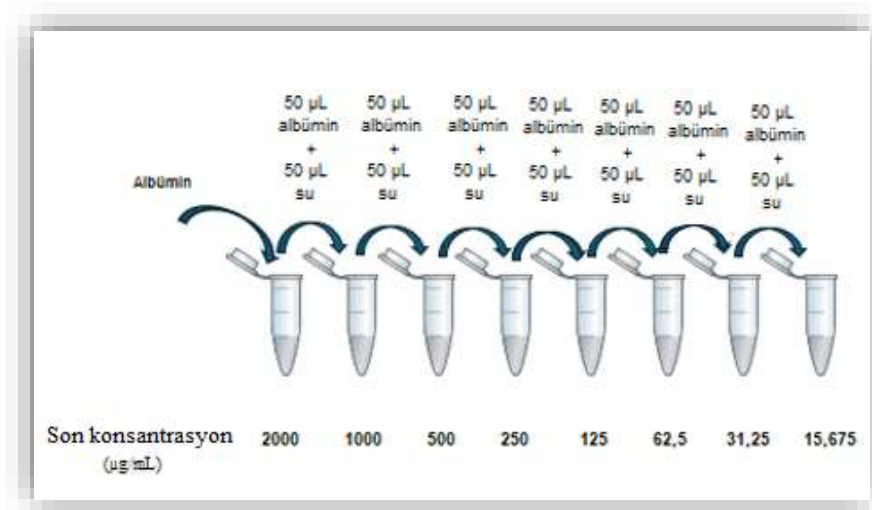
RIPA buffer içinde -80°C 'de saklanan saflaştırılmış eksozomlardan protein izolasyonu ısı şoku yöntemi ile gerçekleştirildi.

1. -80°C dondurucudan alınan eksozom süspansiyonu 42°C 'de çözülüp sıvı azot içerisinde donduruldu.
2. Dondurup çözme işlemi üç defa tekrarlandı.
3. Örnekler 15.000 rpm'de 4°C 'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi.
4. Üst sıvı protein analizinde kullanılabilecek kadar -80°C 'de saklandı.

Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi (BCA Assay)

Eksozomların protein konsantrasyonu “Pierce BCA Protein Assay (Thermo)” kitiyle ölçüldü. Standart olarak kitin içerisinde bulunan 2 mg/mL konsantrasyonlu albüminin seri dilüsyonları kullanıldı.

Albüminin seri dilüsyonları hazırlanırken ilk tüpe 100 μL albümin konuldu. İkinci tüpe 50 μL albümin 50 μL su olacak şekilde konsantrasyon yarıya indirildi. Daha sonraki her bir tüpe bir önceki tüpten 50 μL alınıp üzerine 50 μL su eklenerek toplam 8 standart oluşturuldu (Şekil 3.2.4.).



Şekil 3.2. 4. Protein standartlarının hazırlanması

96 kuyulu kültür flaskına standart ve izolasyonu gerçekleştirilen proteinden replika olacak şekilde 10 µL protein eklendi.

Ardından her bir kuyudaki proteinlerin üzerine 180 µL “Working Reagent” eklenip 37°C’de 45 dakika boyunca örnekler inkübe edildi.

İnkübasyonun ardından örneklerin absorbans değerleri spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda okutuldu.

Albümin standartlarının absorbans değerine göre absorbans/konsantrasyon eğrisi çizilerek örneklerin protein konsantrasyonu hesaplandı.

Western Blot

1. Her bir örnek grubu için 30 µg protein total hacmi 40 µL olacak şekilde “Loading Dye (Thermo Fisher Scientific)” ve “RIPA Lysis and Extraction Buffer (Thermo Fisher Scientific)” ile karıştırılıp 95°C’de 5 dakika boyunca bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlandı.

2. Denatüre proteinler, hazır %4-12 konsantrasyonlu “Bis-Tris jeli (Thermo Fisher Scientific)” yüklendi.

3. Proteinler, 100 voltta yürütüldü.

4. SDS-PAGE’ de yürütülerek proteinlerin büyüklüklerine göre ayrılması işlemi sonrası proteinleri içeren jel “iBlot™ Transfer Stack (Invitrogen) ile iBlot cihazı (Invitrogen) cihazı kullanılarak membrana transfer edildi. Böylece blotlama işlemi ile, jelde büyüklüklerine göre ayrılmış proteinler membrana aktarıldı.

5. Transfer verimliliği “Ponceau S Boyama Çözeltisi (Thermo Fisher Scientific)” ile kontrol edildi.

6. Membran PBS-T (%0,5 Tween-20) içinde %5 yağsız süt tozuyla non spesifik bağlanmaları engellemek amacıyla bloke edildi. Bloklama oda sıcaklığında bir saat yatay çalkalayıcıda gerçekleştirildi.

7. Bloklamadan sonra, TSG101 birincil antikor (tsg 101 Antibody (C-2): sc-7964, Santa Cruz Biotechnology) ile gece boyu orbital çalkalayıcıda +4 °C’ de inkübe edildi.

8. İnkübasyon sonrası primer antikor daha sonra tekrar kullanılmak üzere toplandı.

9. Membranı bağlanmayan birincil antikorlardan arındırmak için membranın üstü kaplanacak şekilde son konsantrasyonda %0,2 Tween 20 içeren TBST (Thermo

Fisher Scientific) eklenerek 10 dakika boyunca oda sıcaklığında yatay çalkalayıcıda çalkalandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.

10. Ardından membrana sekonder antikor (Goat Anti-Mouse IgG(H+L)(peroxidase/HRP conjugated, Elabscience E-AB-1001) uygulandı.

11. Membranı bağlanmayan primer antikorlardan uzaklaştırmak için membranın üstü kaplanacak şekilde son konsantrasyonda %0,2 Tween 20 içeren TBST (Thermo Fisher Scientific) eklenerek 10 dakika boyunca oda sıcaklığında yatay çalkalayıcıda çalkalandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.

12. Proteinleri görüntüleyebilmek için “Super signal West Pico Plus Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) kiti kullanıldı.

13. Son hacim 1 mL olacak şekilde 1:1 oranında kitin içerisinden çıkan “Supersignal West pico luminol ve “Supersignal West Pico Plus stable peroxide” solüsyonları karıştırılıp membranın üzerine eklendikten sonra bir dakika boyunca, karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi.

14. Membran “ChemiDoc Imaging System” (BioRad) ile görüntülendi.

3.2.9. Eksozom Kantitasyonu

Hasta eksozomlarının birim hacimdeki miktarını ölçmek için “EXOCET Exosome Quantitation Kit, System Bioscience” kullanıldı. Örnekler kitin protokolüne göre hazırlandı. Deney üç aşamada gerçekleştirildi.

İlk aşama eksozom örnekleri hazırlanması

Eksozom kantitasyonu için kitin talimatlarına göre 20-100 µg/µL eksozom gerekmektedir. Çalışmada 50 µg/µL eksozom kullanılması amacıyla eksozom izolasyon protokolüne göre (Bölüm 3.2.3.) saflaştırılan eksozomlar reaksiyon başına kullanılacak miktarı belirlemek için hazırlandı.

1. Her bir eksozom peletten 20µL örnek alınıp 80µL lizis tamponuyla toplam hacim 100µL olacak şekilde karıştırıldı.

2. Örnekler 37°C'de 5 dakika inkübe edildi.

3. Ardından 15 saniye vortekslendi.

4. Kalıntıları çöktürmek için 15 dakika 1500 x g'de santrifüjlendi.

5. Üst sıvı buz üzerinde yeni bir ependorf tüpe aktarıldı

6. Daha sonra Bölüm 3.2.8.'deki gibi “Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi (BCA Assay)” yöntemi ile protein ölçümü yapıldı.

İkinci aşama standartların hazırlanması

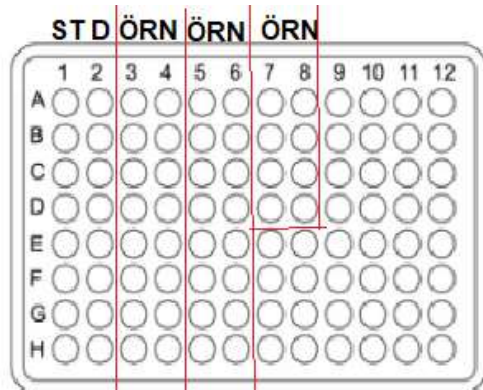
Standartlar kitin talimatına göre steril kitin sağladığı PBS B solüsyonu kullanılarak hazırlandı (Tablo 3.2.1). Ancak standartlar çift çalışılacağı için her bir standarttan iki katı konsantrasyon oluşturuldu.

Tablo 3.2 1. Eksozom kantitasyon standartlarının hazırlanması

Tüp Numarası	PBS-B (µL)	Standart (µL)	Seyreltme Faktörü
1	-	128	1
2	60	60 (Tüp 1'den)	1/2
3	60	60 (Tüp 2'den)	1/4
4	60	60 (Tüp 3'ten)	1/8
5	60	60 (Tüp 4'ten)	1/16
6	60	60 (Tüp 5'ten)	1/32
7	60	60 (Tüp 6'dan)	1/64

Üçüncü aşama Eksozom kantitasyon deneyi

1. Deneye başlamadan hemen önce kitin sağladığı Tampon A ve Tampon B, örnek başına 50 µL'ye 0,5 µL olacak şekilde (100:1 oranında) birleştirildi.
 2. 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 50 µL bu karışımdan eklendi.
 3. İlk iki sütuna sırasıyla standartlar çift olarak eklendi.
 4. Üçüncü sütundan itibaren hasta örnekleri çift olarak eklendi.
 5. Plaka 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
 6. Ardından hemen 405 nm plate okuyucuda okutuldu.
- Plakada okunacak standart ve örneklerin yerleşimi Şekil 3.2.5.'te verilmiştir.



Şekil 3.2. 5. Standartların (STD) ve hasta örneklerinin (ÖRN) plakada yerleşimi

3.2.10. RT-qPCR ile miRNA ifade analizi

Bunun için AML hastalarından, hücre soylarından ve sağlıklı kontrollerden elde edilen eksozomlardan önce total RNA izolasyonu yapıldı.

Spesifik RT primerler kullanılarak sonrasında miRNA-370, miRNA-335, miRNA 21, miRNA124 ve miRNA126 cDNA eldesi sağlandı. Primer tasarımı “sRNAprimerDB” primer tasarım aracı kullanıldı (<http://www.srnaprimerdb.com>) (Tablo 3.2.2.).

cDNA sentezinin ardından RT-qPCR ile miRNA’ların ifade seviyeleri tespit edildi.

Tablo 3.2 2. Kullanılan miRNA primer dizileri

GENLER	PRİMER ADI	Diziler 5'→3'
hsa-miR-21-5p	RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCAACA
	Forward	AAGCGACCTAGCTTATCAGACT
hsa-miR-124-3p	RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTTGGCA
	Forward	AACAATTAAGGCACGCGGTG
hsa-miR-126-3p	RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCGCATT
	Forward	AACAGTGTCGTACCGTGAGTA
hsa-mir-335-3p	RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGGTCAG
	Forward	AGCCAGCGTTTTTCATTATTGC
hsa-miR-370-3p	RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACCAGG
	Forward	AATAGTGCCTGCTGGGGTG
U6	Forward	GTGGACCGCACAAGCTCGCT
	Revers	TTGTTGAACGGCACTGTGTATAGCA
Universal	Revers	GTCGTATCCAGTGCAGGGT

3.2.11. miRNA izolasyonu

miRNA’ların izolasyonu için “miRNeasy (Qiagen)” kullanıldı ve kitin protokolüne uygun olarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

1. Eksozom çözeltisine 700 µL QIAzol Lizis reaktifi eklendi ve pipetaj ve vorteksle homojenize edildi.
2. Homojenat oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
3. Ardından 140 µL kloroform eklenerek tüp 15 saniye vortekslendi.
4. Oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edildi.
5. Sonrasında 4°C'de 15 dakika 12.000 x g'de santrifüj edildi.
6. Homojenat santrifüj sonrası 3 faza ayrıldı.
7. RNA içeren üst faz yeni bir tüpe aktarıldı.

8. Bir buçuk kat etanol (%100) eklendi ve iyice karıştırıldı.
 9. Örnek hızlıca bir RNeasy mini spin kolonuna aktarıldı ve $>8000 \times g$ 'de santrifüj edildi..
 10. Alt sıvı uzaklaştırılarak 700 μL RWT tamponu eklendi ve ardından santrifüj edildi.
 11. Alt sıvı uzaklaştırılarak 500 μL RPE tamponu eklendi ve ardından santrifüj edildi.. Alt sıvı uzaklaştırıldı. Bu adım 2 kez tekrarlandı.
 12. Membranı daha fazla kurutmak için boş olarak $>8000 \times g$ 'de 3 dakika santrifüjlendi.
 13. Kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı ve RNA'yı çözmek için 30 μL RNaz içermeyen su eklendi.
 14. Oda sıcaklığında 15-20 dakika bekletildi.
 15. Ardından $>8000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi
- RNA'ların miktarı Nanodrop-100 spektrofotometre (AllSheng) ile ölçüldü.
RNA örnekleri -80°C 'de saklandı.

3.2.12. cDNA sentezi

cDNA sentezi için “SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen)” kiti kullanıldı. RNA'lar 500ng/ μL olacak şekilde hesaplandı. Kitin protolölüne göre çalışıldı.

1. Öncelikle örnek sayısı kadar cDNA sentez karışımı Tablo 3.2.3'teki gibi hazırlandı.
2. Her bir örneğe ait RNA'lar 500 ng/ μL olacak şekilde hesaplandı.
3. Her bir örnek başına kullanılacak olan RT primerlerden toplam 2 μL olacak şekilde Tablo 3.2.4.'teki gibi hazırlandı.
4. RNA, primerler ve dNTP'ler Tablo 3.2.5.'de ki gibi toplam hacim 10 μL olacak şekilde hazırlandı.
5. RNA, primerler ve dNTP karışımı 65°C 'de 5 dakika inkübe edildi.
6. Ardından 1 dakika buzda tutuldu.
7. Karışımın üzerine 10 μL cDNA sentez karışımı ilave edildi.
8. 50°C 'de 50 dakika ve 65°C 'de 5 dakika inkübe edildi.
9. Daha sonra buza alınıp üzerine 1 μL RNase H eklendi.

10. 37 °C’de 20 dakika inkübasyondan sonra sentezlenmiş olan cDNA’lar -20 °C’de saklandı.

Tablo 3.2 3. cDNA sentez karışımı içeriği

cDNA Sentez Karışımı	Konsantrasyon	Hacim
10x RT Buffer	2X	2 µL
25 mM MgCl ₂	10 mM	4 µL
0,1 M DTT	0,02 M	2 µL
RNaseOUT™ (40 U/µL)	4 U/µL	1 µL
SuperScript® III RT (200 U/µL)	20 U/µL	1 µL
Toplam		10 µL

(Bir örnek için cDNA sentez karışımı (x Örnek sayısı))

Tablo 3.2 4. RT primer karışımı

RNA karışımı	Konsantrasyon	Hacim
miRNA-21 RT Primer (10pmol/ µL)	2 pmol/µL	0,4 µL
miRNA-124 RT Primer (10pmol/ µL)	2 pmol/µL	0,4 µL
miRNA-126 RT Primer (10pmol/ µL)	2 pmol/µL	0,4 µL
miRNA-335 RT Primer (10pmol/ µL)	2 pmol/µL	0,4 µL
miRNA-370 RT Primer (10pmol/ µL)	2 pmol/µL	0,4 µL
Toplam		2 µL

Tablo 3.2 5. RT primer, dNTP ve RNA karışımının içeriği

RNA dNTP karışımı	Konsantrasyon	Hacim
dNTP	1 mM	1 µL
RT Primer	0,4 pmol/µL	2 µL
RNA + DEPC su	500 ng/µL	7 µL
Toplam Hacim		10 µL

(Dietilpirokarbonat (DEPC) su hazırlama: RNazları kovalent olarak modifiye ederek inaktive eder. Bu nedenle RNA çalışmalarında kritik bir adımdır)

3.2.12. Primer tasarımı ve RT-qPCR

AML hastalarının kanlarından, hücre soylarından ve sağlıklı kontrollerden elde edilen eksozomlarda miRNA-370, miRNA-335, miRNA-21, miRNA-124 ve miRNA-126 ifade düzeyleri belirlendi. Kantitatif PCR için LightCycler 480 cihazı (Roche Diagnostic) kullanıldı. Kantitatif PCR için hedef miRNA'lara spesifik primerler kullanılarak PCR yapıldı. Örneklerin miktarının normalizasyonu için U6 kontrol geni kullanıldı. PCR reaksiyonu için "SYBR Green PCR Master Mix (Thermo)" kiti ve 0,5 µl cDNA örneği kullanıldı. Primer dizileri Tablo 3.2.2.'de gösterilmiştir.

SYBR Green PCR master mix, primerler, cDNA ve H₂O ile karışım hazırlandı (Tablo 3.2.6.).

Tablo 3.2.6. RT-qPCR reaksiyon karışımı

Reaksiyon Bileşenleri	Konsantrasyon	Miktar (µL)
SYBR Green (2X)	1X	5
Forward Primer (10pmol/µL)	0.5 pmol/µL	0,5
Reverse Primer (10 pmol/µL)	0.5 pmol/µL	0,5
cDNA	500 ng/µL	0,5
H ₂ O		3,5
Toplam Hacim		10 µL

Tablo 3.2.7'de ki PCR koşullarında RT-qPCR tamamlandı.

Örnekler daha sonra %2'lik agaroz jelde yürütülerek saflık kontrolü yapıldı

Tablo 3.2.7. RT-qPCR reaksiyon koşulları

Basamaklar	Sıcaklık °C	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	95	3 dakika	1
Amplifikasyon	95	15 saniye	40
	60	30 saniye	
	95	5 dakika	
Erime Eğrisi	65	1 dakika	1
	97	-	
Soğutma	4	30 saniye	1

Hedef gen ifadesi değerleri kontrol gen değerlerine göre normalize edildi. Hastalarda ve sağlıklı kontroller arasındaki miRNA'ların göreceli ifade düzeyleri

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile belirlendi (Livak vd., 2001).

$$\Delta Ct = Ct_{Hedef\ gen} - Ct_{Referans\ gen}$$

AML hücresel ve eksozomal miRNA ifadelerinin kontrol hücreye göre değişimi $\Delta\Delta Ct$ yöntemi ile hesaplandı. Kontrol hücreye göre ifade değişimleri kat değişimi olarak belirlendi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{AML\ hücre} - \Delta Ct_{Sağlıklı\ hücre\ (ort)}$$

3.2.13. Hücre soylarında miRNA modülasyonları

AML hastalarının eksozomlarıyla yapılan miRNA analizleri sonucunda bazı miRNA'ların sağkalım ile istatistiksel olarak ilişkili olduğu tespit edildi. Bu nedenle bu miRNA'lar modüle edilerek hücre sağkalımı arasındaki ilişki analiz edildi.

AML hücre soylarında kontrole göre spesifik olarak ifade düşüklüğü ve yüksekliği tespit edilen miRNA'lar modifiye edilerek hücre soylarında sağkalım ile ilişkileri analiz edildi. miRNA seviyeleri, miRNA mimikleri (sentetik çift zincirli RNA) ve miRNA inhibitörleri (sentetik oligonükleotidler) geçici transfeksiyonlarda kullanılarak *in vitro* modüle edildi.

Transfeksiyondan önce hücreler hücre kültür flasklarına ekildi, %70-80 yoğunluğa erişen hücreler hedef miRNA'ları modüle etmek için transfeksiyona tabi tutuldu. Transfeksiyonda "Lipofectamine RNAimax (Thermofisher)" kullanıldı ve kitin protokolüne uygun olarak basamaklar takip edildi. Modülasyonlar kantitatif PCR ile doğrulandı.

3.2.14. miRNA mimik ve inhibitörlerinin yeniden süspansiyonu

Kurutulmuş miRNA'nın tüpün dibinde olduğundan emin olmak için tüp kısa bir süre santrifüj edildi.

20 μ M stok solüsyonu elde etmek için sulandırıldı (5 nmol miRNA için: 250 μ L nükleaz içermeyen su eklendi).

Çözülmüş mimik ve inhibitörler don/çöz döngülerinden korumak için daha küçük hacimlere bölünerek saklandı. Kullanıma kadar -20°C'de saklandı.

3.2.15. Hücrelerin Hazırlığı ve Transfeksiyonu

Hücreler transfeksiyondan önce 6 kuyulu kültür kaplarına alındı. HEK 293 T hücreleri için %70-80 kaplama, THP1, NB4 ve HL60 hücreleri için ise yeterli sayıya gelmeleri beklendi (>500.000 hücre)

- miRNA-124 mimic ile transfeksiyon

miRNA mimikleri, olgun miRNA sentetik çift sarmallı RNA molekülleridir. Bu moleküllerin hücrelere iletilmesi, endojen miRNA sentezini artırabilir. miRNA-124 ifadesinin kontrole göre düşük olduğu AML hücre soyları hedef “hsa-miRNA-124-3p mimic, MedChemExpress, Cat. No.: HY-R00138” mimic ve hedefsiz kontrolleri ile transfekte edildi.. AML hücrelerinde ifade düşüklüğü tespit edilen miRNA’ların ifadesini artırmak için hücreler, 100nM hedef miRNA mimic ile onun kontrolü 100nM miRNA mimic kontrol (pre-miR miRNA prekürsör negatif kontrol) ile transfekte edildi. Transfeksiyonda “Lipofectamine RNAimax (Thermofisher)” kullanıldı ve kitin protokolüne uygun olarak basamaklar takip edildi. Modülasyonlar kantitatif PCR ile doğrulandı.

miRNA mimic, miRNA hedefsiz miRNA (NT miR cont) ve işlem yapılmamış hücrelerden (kontrol) oluşan ikiye tekrarlı 3 grup oluşturuldu (Şekil 3.2.6.).

1. 6-kuyulu kültür kabının her bir kuyusu için hem miRNA-124 mimic hem de NT mimic için Tablo 3.2.8.’deki gibi A ve B karışımları ayrı ayrı hazırlandı.

2. A ve B nazikçe karıştırıldı.

3. A+B karışımı oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

4. Bu arada kültür ortamı hücrelerden uzaklaştırıldı, PBS ile yıkandı.

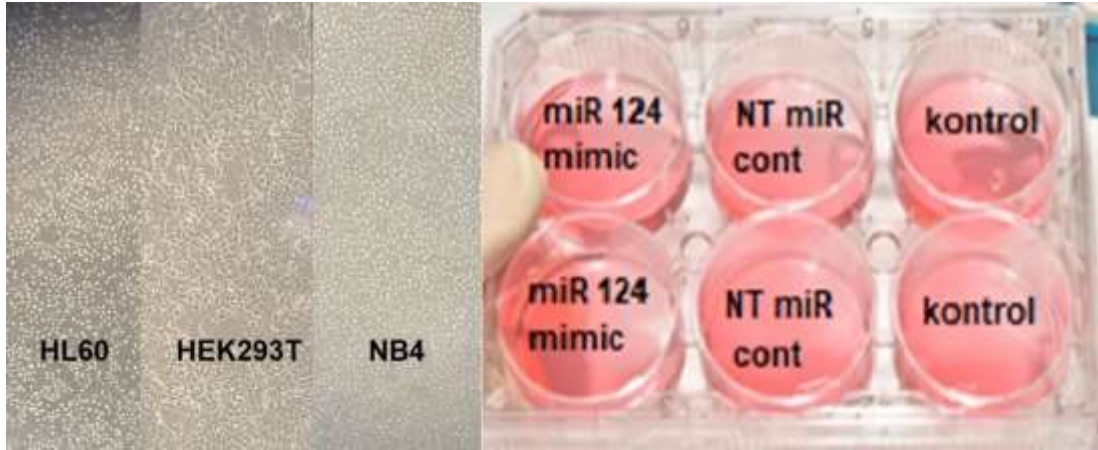
5. 6-kuyucuklu hücre kültür kabı her bir kuyucuğu için 1500 µL medyumda çözünen hücreler eklendi.

6. Ardından her kuyucuğa 500 µL transfeksiyon karışımı (A+B) eklendi.

7. Hücreler 37°C’de 48 saat inkübe edildi.

8. Her bir mimic, hedefsiz miRNA ve işlem yapılmayan kontrol hücreler çift olarak çalışıldı.

Daha sonra transfeksiyon başarısı RT-qPCR ile kontrol edildi.



Şekil 3.2. 6. Hücrelerin mikroskopik görüntüsü ve mimik transfeksiyonu için oluşturulan gruplar

Tablo 3.2 8. miRNA hedefli / hedefsiz mimik ve transfeksiyon ajanı karışımları

miRNA-124 mimik karışımı	miRNA NT mimik karışımı
A: 240 µL medyum + 10 µL miRNA-124 mimik	A: 240 µL medyum + 10 µL miRNA NT(hedefsiz) mimik
B: 230 µL medyum + 5 µL Lipofectamin RNA imax	B: 230 µL medyum + 5 µL Lipofectamin RNA imax

- miRNA baskılanması

miRNA inhibitörleri olgun miRNA'larla hibridize olan kimyasal olarak modifiye edilmiş oligonükleotitlerdir. Bu moleküller, miRNA'ların ve onların hedef genlerinin tamamlayıcı eşleşmesini önlemek için olgun miRNA'larla güçlü bir şekilde rekabet eder ve böylece miRNA'ların fonksiyonunu engeller. Belirli miRNA ifadelerinin yüksek olduğu AML alt grubunu temsil eden hücre soylarında miRNA inhibitörleri ile knockdown sağlandı. AML hücrelerinde RT-qPCR sonucunda yüksek ifadesi tespit edilen miRNA'lar, özel olarak tasarlanmış “hsa-miRNA-126-3p inhibitör, MedChemExpress, Katalog No.: HY-RI00172” miRNA inhibitörleri ile baskılandı. Hedef hücreler 100nM hedef miRNA inhibitör ve kontrol olarak 100nM anti-miR miRNA ile transfekte edildi. Transfeksiyonda “Lipofectamine RNAimax (ThermoFisher)” kullanıldı ve kitin protokolüne uygun olarak basamaklar takip edildi. Modülasyonlar kantitatif PCR ile doğrulandı.

miRNA inhibitör, miRNA hedefsiz miRNA(NT miR cont) ve işlem yapılmamış hücrelerden (kontrol) oluşan ikişer tekrarlı 3 grup oluşturuldu (Şekil 3.2.7.).

1. 6-kuyulu bir plakanın her bir kuyusu için hem miRNA-124 inhibitör hem de NT inhibitör için Tablo 3.2.9.'deki gibi A ve B karışımları ayrı ayrı hazırlandı.

2. A ve B nazikçe karıştırıldı.

3. A+B karışımı oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

4. Bu arada kültür ortamını hücrelerden uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı.

5. 6-kuyucuklu bir plakanın her bir kuyucuğu için 1500 μ L medyum eklendi.

6. Ardından her kuyucuğa 500 μ L transfeksiyon karışımı (A+B) eklendi.

Hücreler 37°C'de 48 saat inkübe edildi.

Her bir mimik/inhibitör, hedefsiz miRNA ve işlem yapılmayan kontrol hücreler çift olarak çalışıldı.

Daha sonra transfeksiyon başarısı RT-qPCR ile kontrol edildi.



Şekil 3.2. 7. Hücrelerin mikroskopik görüntüsü ve miRNA inhibitör transfeksiyonu için oluşturulan gruplar

Tablo 3.2 9. miRNA hedefli / hedefsiz inhibitör ve transfeksiyon ajanı karışımları

miRNA-126 inhibitör karışımı	miRNA NT inhibitör karışımı
A: 240 μ L medyum + 10 μ L miRNA-126 inhibitör	A: 240 μ L medyum + 10 μ L miRNA NT (hedefsiz) inhibitör
B: 230 μ L medyum + 5 μ L Lipofectamin RNAimax	B: 230 μ L medyum + 5 μ L Lipofectamin RNAimax

3.2.16. miRNA modülasyonlarının hücre sağkalımı üzerine etkisi

Sağkalım analizi “Cell Counting Kit 8 (WST-8 / CCK8) (Abcam)” kiti ile yapıldı ve kit protokolüne göre çalışıldı. Test ve kontrol sonuçları 460 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü. Bilinen sayıda canlı hücre içeren kuyucuklar bir kalibrasyon eğrisi oluşturmak üzere hazırlandı. 460 nm’de ölçüm sonuçları bu kalibrasyon eğrisine göre analiz edildi.

1. Mimik, inhibitör, hedefsiz kontroller ve işlem yapılmamış hücrelerden oluşan 6 kuyulu hücre kültür kabındaki hücreler toplandı, santrifüj edilerek 100 µL’de 1×10^4 hücre olacak şekilde medyumla yeniden çözüldü.

2. Hücre süspansiyonu (100 µL/kuyu) 96 kuyucuklu kültür kabına eklendi.

3. miRNA mimik ve hedefsiz kontrolü; miRNA inhibitör ve hedefsiz kontrolü ile hiçbir işlem yapılmamış olan hücrelerden ikili olarak çalışıldı.

4. İnkübatörde 37°C ve %5 CO₂’de inkübe edildi.

5. CCK-8, 37°C’de bir su banyosunda 5 dakika çözdürüldü.

6. Plakanın her kuyucuğuna 10µL CCK-8 çözeltisi eklendi. Optik yoğunluk (OD) okumasını engelleyeceğinden kuyucuklara kabarcık girmemesine özen gösterildi.

5. Kültür kabı inkübatörde 1-4 saat boyunca inkübe edildi.

6. Absorbans 450 nm’de bir mikro plaka okuyucu kullanılarak ölçüldü.

7. Bilinen sayıda canlı hücre içeren kuyucuklardan elde edilen veriler kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

8. Hedef ve kontrolün absorbans değerlerinden blank değerleri çıkarılarak arka plan temizlendi. Daha sonra uygulama yapılan grup absorbans ortalamaları kontrol grup absorbans ortalamalarına bölünerek % canlılık değişimi bulundu.

Canlılık (%) Formülü = Hedef grup/Kontrol grup X 100

3.2.17. İstatistiksel analiz

Veriler IBM SPSS 25 istatistik programı ile analiz edildi. Verilerin karşılaştırmasında, parametrik veriler için independent sample T testi, non parametrik veriler için Mann Whitney U Testi kullanıldı. Veriler arasındaki korelasyonu araştırmak amacıyla, parametrik veriler için Pearson Korelasyon Testi, non parametrik veriler için Spearman’ın Korelasyon Testi kullanıldı. Hastalarda sağkalım analizleri Kaplan-Meier yöntemi ile yapıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Ekzozomal miRNA'ların ekspresyon karşılaştırılması GraphPad Prism 8 programı kullanılarak yapıldı.



4. BULGULAR

4.1. Hastaların ve sağlıklı Kontrollerin genel özellikleri

Çalışmada yer alan 20 hastanın demografik ve klinik özellikleri Tablo 4.1.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. 1. Hastaların demografik ve klinik özellikleri

Özellik	Durum	Sayı (n)	Kadın	Erkek
Cinsiyet	Kadın	7		
	Erkek	13		
Yaş	<60	9	5	4
	>60	11	4	7
Lökosit	<50000	13	3	10
	>50000	4	3	1
	Bilinmeyen	3	1	2
Blast	<%20	3	1	2
	>%20	17	6	11
Alt Sınıf	M2	1	1	1
	M5	2	1	
	MDS Geçişli	7	2	5
	Tanımlanmamış AML	6	1	5
	Kompleks karyotip	2	2	
Sitogenetik	Del(17)	1		1
	Der(17)	1	1	
	Del(5)	1	1	
	Trizomi 8	1	1	
	Trizomi 21	2	2	
	Normal karyotip	8	3	5
	Tanımlanmamış	6	1	5
Nüks	Var	2	1	1
	Yok	18	6	12
Son durum	Sağ	12	2	10
	Ölüm	8	4	4

(del: delesyon, der: derivatif kromozom, inv :inversiyon, MDS: Miyelodisplastik sendrom, AML: Akut miyeloid lösemi, M5: FAB M5, M2: FAB M2)

Hastaların %35'i kadın ve %65'i erkektir. Kadın hastaların sayısı 7, erkek hastaların sayısı 13'tür. Hastalarda 60 yaş üstü bireylerin sayısı 11 (%55), 60 yaş altı bireylerin sayısı dokuzdur (%45). Hastaların %65'inin lökosit sayısı 50.000'den az (n=13), %20'sinin lökosit sayısı 50.000'den yüksektir (n=4),%15'inin (n=3) lökosit sayısı ise bilinmemektedir. Blast oranında eşik değer %20 olarak alındı. Hastaların üçünün blast sayısı eşik değerinin altında, 17'si üstündedir.

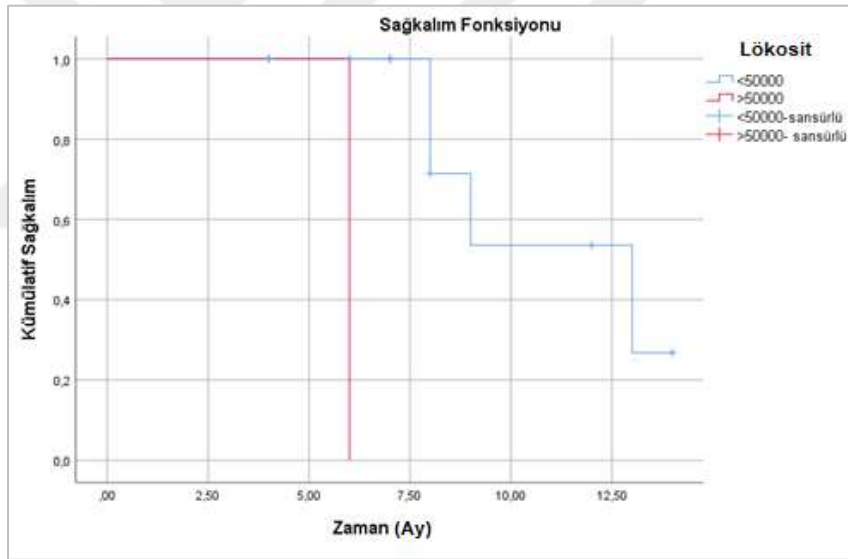
Tabloda güncel 2022 WHO sınıflandırma kriterleri baz alınarak hastalar alt sınıf ve sitogenetik özelliklerine göre gruplandırıldı. FAB sınıfı bilinen hastalardan ikisinin M5, birinin M2, yedisinin MDS ilişkili AML, altısının klinik alt sınıfı

tanımlanmamış AML ve ikisinin de kompleks karyotipe sahip olduğu belirlendi. Sitogenetik incelemeler sonucunda vakaların sekizinin normal karyotipte olduğu tespit edildi. Trizomi 21'li iki vaka ve Trizomi 8'li bir vaka ile Der17, Del17 ve del 5 kromozom anomalisi olan birer vaka bulundu. Vakaların altısı sitogenetik olarak tanımlanamadı. Çalışma devam ederken hastaların ikisinde nüks gerçekleşti. Çalışma sırasında belirlenen zaman aralığında (14 ay) ölen hasta sayısı sekiz olarak tespit edildi.

Hastaların sağkalımları yaş ve cinsiyet parametreleri açısından istatistiksel açıdan incelendi, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p>0,05$).

Hastaların lökosit oranları ile sağkalımları Kaplan Meier yöntemi ile analiz edildi. Lökosit oranı ile sağkalım arasında anlamlı istatistiksel ilişki tespit edildi ($p=0,001$).

Şekil 4.1.1'de hastalarda sağkalım ve lökosit ilişkisi grafiği gösterilmiştir.



Şekil 4.1. 1. Hastalarda sağkalım ve lökosit sayısı arasındaki ilişki

İlk 5 aylık dönemde her iki grupta da sağkalım oranı aynıdır. Ancak 5. aydan sonra lökosit sayısı 50.000'den büyük olan hastalarda sağkalımın hızla düştüğü ve bu bireylerin tamamının öldüğü, WBC sayısı 50.000'den küçük olan hastalarda ölümlerin 7,5 aydan sonra ortaya çıktığı ve 7,5-10 ay arası sağkalan bireylerin 50 ± 3 'e düştüğü görüldü. Lökosit sayısı 50.000'den fazla olan hastalar bu duruma göre daha kötü prognoza sahiptir.

Sağlıklı kontrol grubu, hastaların yaş ve cinsiyet dağılımına yakın bireylerden oluşturuldu. Hastalarda ve sağlıklı kontrollerde yaş ortalamalarının cinsiyete göre dağılımı Tablo 4.1.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. 2. Hastalarda ve sağlıklı kontrollerde yaş ortalamalarının cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet	Hasta Yaş ortalaması	Hasta sayısı	Sağlıklı Kontrol yaş ortalaması	Sağlıklı kontrol sayısı
Kadın	60,3	7	58,35	9
Erkek	63,38	13	60,73	11
Ortalama	61,8		59,5	

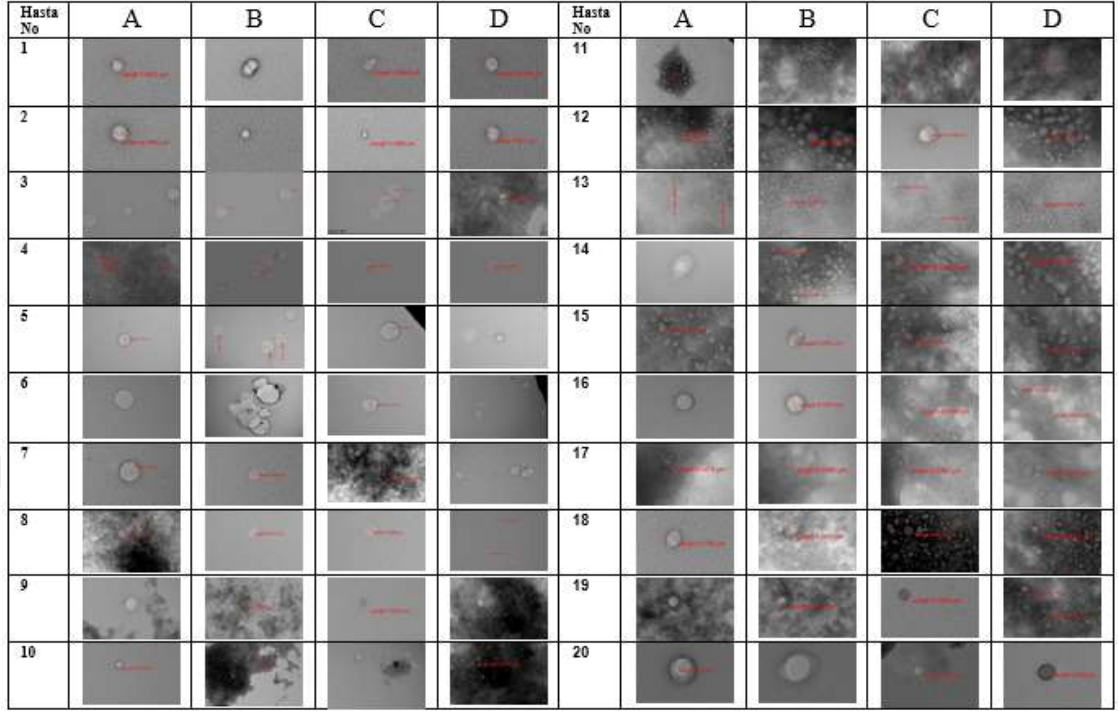
Hastalarda yaş ortalamaları 61,8 olup, hasta kadınların yaş ortalaması 60,2 ve hasta erkeklerin yaş ortalaması 63,3'tür. Sağlıklı kontrol yaş ortalamaları 59,5 kadınların ortalaması 58,3 ve erkeklerin yaş ortalaması 60,7'tir. Tanı anında hastalarda medyan yaş 64 olarak tespit edildi.

4.2. Eksozomların karakterizasyonu

4.2.1. TEM ile eksozomların görüntülenmesi

Eksozom karakterizasyonunun ilk adımı eksozomların transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile görüntülenmesidir. Hastaların tamamının, dört sağlıklı kontrolün ve hücre soylarının eksozomları elektron mikroskobu ile yapı ve boyut bakımından incelendi.

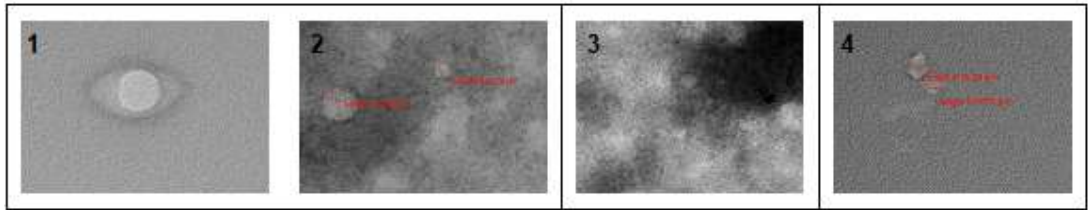
Hastalara ait eksozom görüntüleri sırasıyla (1-20 hasta) Şekil 4.2.1.'de gösterildi.



Şekil 4.2. 1. Hastalara ait eksozomların TEM görüntüleri (n=20)

Her bir hasta eksozom çökeltisinden (pelet) eşit alanlar taranarak çok sayıda eksozom görüntüsü alındı ve hasta başına dört (A, B, C, D) eksozom görüntüsü verildi.

Sağlıklı kontrollerin eksozom karakterizasyonuna katkı sağlaması açısından dört sağlıklı kontrolün eksozom görüntülemesi yapıldı. Görüntüler Şekil 4.2.2.'de verilmiştir.

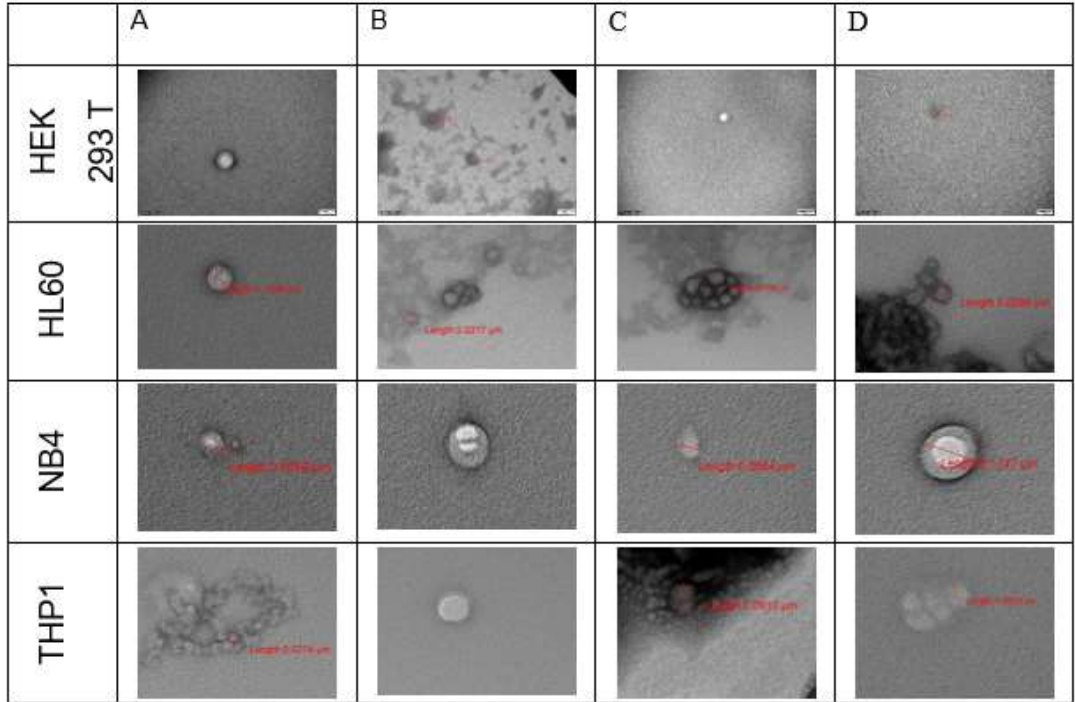


Şekil 4.2. 2. Sağlıklı kontrollere ait eksozomlarının TEM görüntüleri (n=4)

Hasta ve sağlıklı kontrollerin TEM görüntüleri incelenerek, her bir hastanın ve incelenen sağlıklı kontrolün eksozom yüklü gridlerinde eksozomlar boyut ve yapısal olarak tanımlandı. Alınan görüntülere göre, en küçük boyutlu eksozom görüntüsü

hastalarda 0,030 μm , sağlıklı kontrollerde de 0,031 μm 'dir. En büyük eksozom boyutu hastalarda 0,153 iken sağlıklılarda 0,175'tir. Her iki grupta da eksozom görüntüleme sırasında hem ayrı ayrı dağılmış olarak görünen (Örnek Şekil 4.1.1. 1A, 2A ve Şekil 4.2.2. 1) eksozomlara hem de yoğun öbek halindeki eksozomlara (Örnek Şekil 4.2.1. 7C ve Şekil 4.2.2. 3) rastlandı.

THP1, NB4, HL60 ve HEK 293T hücre soylarından salgılanan eksozomların karakterizasyonu için de TEM kullanıldı. Görüntüler Şekil 4.2.3.'te verilmiştir.

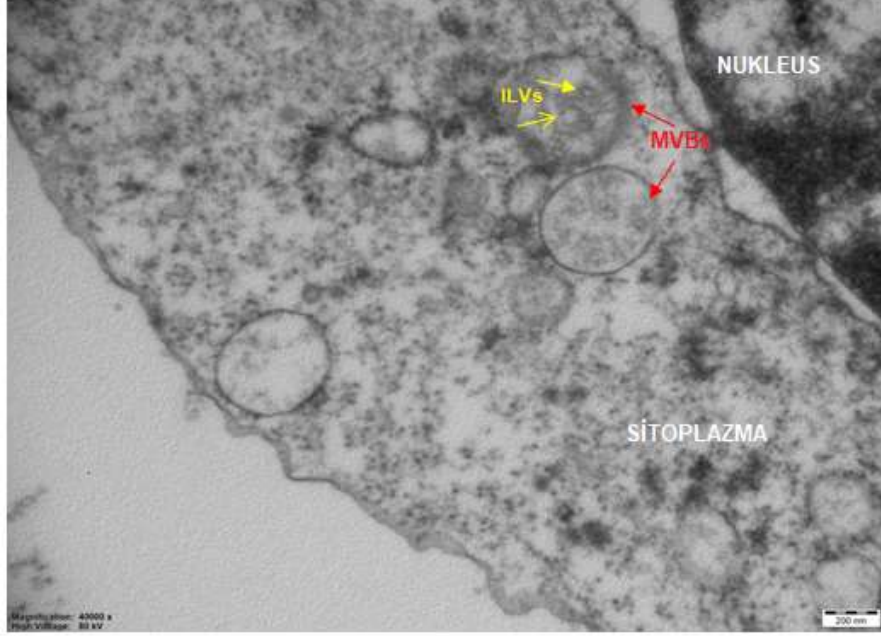


Şekil 4.2. 3. Hücre soylarından izole edilen eksozomların TEM görüntüsü

Hücre soylarından elde edilen eksozom TEM görüntülerinde de hem tek tek dağılmış (Örnek: Şekil 4.2.3. HEK 293T A) hem de öbek halinde (Örnek Şekil 4.2.3. HL60 C ve THP1 A) eksozomlar görüntülendi. Eksozomlar boyut ve yapı olarak incelendiğinde en küçük eksozom boyutunun 0,03 μm ve en büyük eksozom boyutu 0,170 μm olarak görüntülendi. Ama genel duruma bakıldığında hücre soylarından izole edilen eksozomların boyutu hastaların ve sağlıklı kontrollerin eksozom boyutundan küçüktü.

TEM ile görüntülenen eksozomlar erken endozomların multi veziküler cisimciklere (MVB) dönüşmesi ve içine doğru tomurcuklanmasıyla oluşan

intraluminal veziküllerin (ILV) ekzositoz ile salgılanmasının sonucudur. THP1 hücrelerinde eksozomların öncülü olan ILV'leri içeren MVB'lerin TEM görüntüsü Şekil 4.2.4.'te verilmiştir.



Şekil 4.2. 4. THP1 hücre soyunda MVB ve içlerindeki ILV TEM görüntüsü
(MVB: Multiveziküler cisimler, ILV : İntralüminar veziküller)

Görüntülerde kırmızı oklarla MVB'ler, sarı oklarla ise MVB'lerin içindeki ILV'ler gösterilmektedir.

4.2.2. Western blot ile TSG101 proteinin gösterilmesi

Hasta, sağlıklı kontroller ve hücre soylarında eksozomların karakterizasyonu için western blot tekniği kullanıldı.

Protein ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde genel olarak hastalardaki protein konsantrasyonları sağlıklı kontrollerden daha yüksek bulundu. Hasta ve sağlıklı kontrollerin eksozomal protein miktarları Bağımsız Örneklem T testi ile analiz edildi ve istatistiksel olarak da anlamlı bir fark bulundu ($p=0,006$). Hastaların ortalaması 2,05 iken sağlıklı kontrollerin ortalaması 1,28'dir. Hastalarda eksozomal protein konsantrasyonu ortalamaları sağlıklı kontrol ortalamalarından 1,6 kat fazladır.

Hasta ve sağlıklı kontrollerin protein konsantrasyonları ölçüm sonuçları Tablo 4.2.1.'de verildi.

Tablo 4.2. 1. Hasta ve sağlıklı kontrollerin eksozomal proteinlerin konsantrasyonları ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (BCA assay sonuçları)

Hasta No	Protein ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Hasta No	Protein ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Sağlıklı No	Protein ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Sağlıklı No	Protein ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
1	1,42	11	4,00	1	0,42	11	3,00
2	1,34	12	3,20	2	0,76	12	1,60
3	1,04	13	1,14	3	1,20	13	1,72
4	2,01	14	0,10	4	1,01	14	1,11
5	1,10	15	2,13	5	0,68	15	1,10
6	1,25	16	2,40	6	0,74	16	1,10
7	4,00	17	2,30	7	2,66	17	2,03
8	2,10	18	1,40	8	1,63	18	0,70
9	1,08	19	2,51	9	0,53	19	1,37
10	2,70	20	2,32	10	2,40	20	0,80

Hücre soylarının protein ölçüm sonuçları Tablo 4.2.2.'de gösterildi.

Tablo 4.2. 2. Hücre soylarının eksozomal proteinlerin konsantrasyonları ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (BCA assay sonuçları)

Hücre soyları	THP1	NB4	HL60	HEK293 T
Protein konsantrasyonları($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	1,02	0,94	1,41	0,86

AML hücre soylarındaki eksozomal protein konsantrasyonları sağlıklı kontrol hücreler olan HEK 293T ile karşılaştırıldığında her bir AML hücre soyunda protein konsantrasyonunun daha yüksek olduğu görüldü. Kontrole göre kıyaslandığında THP1 hücre soyunun 1,18 kat, NB4 hücre soyunun 1,09 kat, HL60 hücre soyunun ise 1,63 kat daha fazla protein konsantrasyonuna sahip olduğu belirlendi.

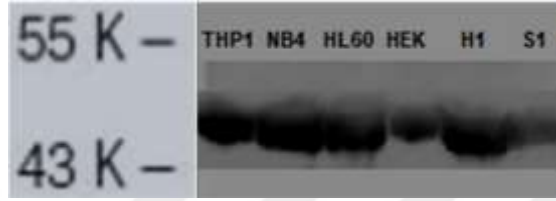
Eksozomların karakterizasyonu için TSG101 proteinleri western blot ile görüntülendi. 20 hastanın ve 20 sağlıklı kontrolün western blot ile eksozomal TSG101 proteini ifadesi Şekil 4.2.5.'te gösterildi.



Şekil 4.2. 5. 20 hastanın ve 20 sağlıklı kontrolün western blot ile tespit edilen eksozomal TSG101 protein bantları

Hasta ve sağlıklı kontrollerin TSG101 proteinlerinin western blot görüntüleri incelendiğinde genel olarak hastalardaki protein ifadesi daha yoğun olarak değerlendirildi. Bu durum Bağımsız Örneklem T testi sonucuyla da uyumludur ($p=0,006$).

THP1, NB4, HL60 ve HEK 293 T hücre soyları proteinleri ve daha önceden TSG101 protein bandı elde edilmiş olan bir hasta (H1) ve bir sağlıklı kontrol (S1) örneği birlikte jelde yürütüldü. Hücre soylarından elde edilen TSG101 protein ifadeleri Şekil 4.2.6.'da gösterildi.

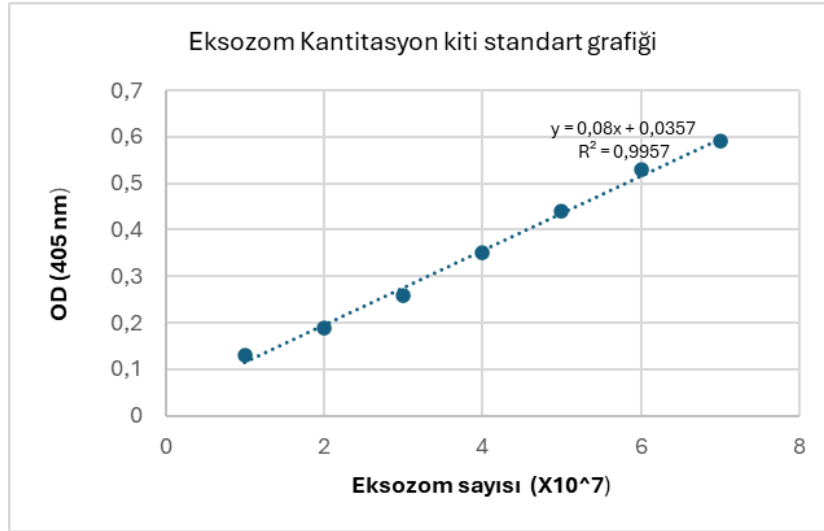


Şekil 4.2. 6. Hücre soylarının western blot ile eksozomal TSG101 protein bantları ve hasta ve sağlıklı kontrol örnekleriyle karşılaştırılması (H1: Hasta, S1: Sağlıklı kontrol)

Hücrelerin TSG101 protein ifadesi hem hücre soylarının kendi içinde hem de bir hasta ve bir sağlıklı kontrol örneğiyle karşılaştırıldı. AML hücre hatlarının TSG101 protein ifadesi kontrol hücre olan HEK 293T'ye göre daha fazla olduğu tespit edildi. AML hasta örneği ile karşılaştırıldıklarında hasta örneğinin protein ifadesinin AML hücre soylarıyla uyumlu olduğu görüldü. Sağlıklı kontrol örneğinin bant yoğunluğu da kontrol hücreyle uyumlu olup AML hasta ve AML hücre soylarından elde edilen bantlara göre protein miktarının az olduğu belirlendi.

4.2.3. Eksozomların Kantitasyonu

Eksozom kantitasyonunun ilk aşamasında standartların absorbans eğrisi oluşturuldu. Standartlar hazırlanarak absorbans değerleri ölçüldü ve Şekil 4.2.7'deki Standart Eğri Grafiği çizildi.



Şekil 4.2. 7. Eksozom standart eğri grafiği

Örneklerin absorbans sonuçları Tablo 4.2.3' te verildi. Absorbans değerleri bu standart eğrinin formülüne göre hesaplanarak mikrolitredeki eksozom sayısı (X) bulundu ($y=0,08X+0,0357$).

Tablo 4.2. 3. Örneklerin absorbans değerleri, μL 'deki ve kullanılan örnek miktarındaki eksozom sayıları

Hasta No	Absorbans	Eksozom/ μL ($\times 10^7$)	50 μL 'deki eksozom ($\times 10^5$)	Hasta No	Absorbans	Eksozom/ μL ($\times 10^7$)	50 μL 'deki eksozom ($\times 10^5$)
1	1,01	12,05	241,07	11	0,81	9,61	192,32
2	0,46	5,36	107,32	12	0,29	3,24	64,82
3	1,28	15,61	312,32	13	0,25	2,67	53,57
4	0,55	6,42	128,57	14	0,33	3,74	74,82
5	1,75	21,42	428,57	15	0,97	11,74	234,82
6	0,74	8,86	177,32	16	1,01	12,24	244,82
7	0,69	8,24	164,82	17	1,27	15,49	309,82
8	0,42	4,80	96,07	18	1,15	13,92	278,57
9	0,37	4,24	84,82	19	0,41	4,74	94,82
10	0,31	3,42	68,57	20	2,22	27,30	546,07

Mikrolitredeki eksozomal protein ile mikrolitredeki eksozom sayısı verileri non parametrik olduğu için Spearman'ın Korelasyon Testi ile analiz edildi. Hasta örneklerindeki eksozomal protein miktarı ile eksozom sayılarının istatistiksel olarak

anlamli derecede uyumlu olduğu (p=0,023) ve protein artışı ile eksozom sayısı artışının anlamli pozitif korelasyon gösterdiği belirlendi.

4.3. RT-qPCR ile eksozomal miRNA ekspresyonlarının gösterilmesi

4.3.1. RT qPCR sonuçlarının değ erlendirilmesi

Hasta ve sağlıklı kontrollerin miRNA ifadeleri analiz edildi ve $2^{-\Delta C_t}$ değ erleri Tablo 4.3.1.'de verildi.

Tablo 4.3. 1. AML hastalarının ve sağlıklı kontrollerin eksozomal miRNA ifadesi ortalamaları

Hasta No	miR21	miR124	miR126	miR335	miR370	Sağlıklı No	miR21	miR 124	miR126	miR335	miR370
1	133,9	277,2	118,5	96,07	100,08	1	16,80	3,05	11,59	1,50	2,53
2	0,01	0,01	451,94	76,11	0,02	2	0,001	0,45	0,32	0,02	0,25
3	2,41	7,52	38,59	5,24	2,01	3	2,41	4,35	2,97	0,95	11,24
4	10,06	33,36	28,64	0,80	4,64	4	0,75	0,33	2,27	0,44	0,17
5	0,76	11,16	592,22	4,72	0,81	5	0,08	4,35	0,69	0,78	4,59
6	0,001	0,26	63,56	279	0,03	6	10,06	2,17	1,05	0,68	1,16
7	0,49	19,56	13,62	0,20	2,01	7	0,003	2,93	28,00	0,42	1,80
8	0,08	0,01	2,77	0,61	0,03	8	42,22	0,99	0,15	0,83	0,52
9	0,19	0,11	592	0,01	1,92	9	205	1,30	46,53	0,32	2,57
10	4,82	0,01	1,73	0,28	0,15	10	0,76	2,28	0,36	0,67	2,73
11	204,4	35,02	73,01	0,07	8,40	11	0,01	3,29	0,38	0,68	2,55
12	0,01	0,02	20,68	0,01	0,02	12	0,49	0,42	1,95	1,50	0,25
13	0,75	0,54	0,51	0,01	0,50	13	0,19	3,53	0,78	0,02	11,24
14	0,05	0,06	1,16	0,64	0,02	14	4,82	0,16	0,90	0,38	0,17
15	0,01	0,01	16,80	0,03	0,01	15	0,01	4,29	2,52	0,44	4,66
16	0,06	0,06	0,21	0,01	0,04	16	0,05	2,13	0,17	0,78	1,16
17	2,73	0,13	0,30	0,07	0,23	17	592,2	1,67	12,02	0,68	1,13
18	204,3	0,00	0,38	0,92	1.438,1	18	0,01	2,00	3,48	0,42	0,86
19	0,002	0,05	73,52	0,02	0,30	19	0,06	0,84	6,43	0,83	0,64
20	0,03	0,07	0,03	0,10	0,01	20	2,73	0,70	0,73	0,32	1,57

Hasta ve sağlıklı kontrollerin miRNA ifade düzeyleri Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Sonuçlar Tablo 4.3.2'de verildi.

Tablo 4.3. 2. Hasta ve sağlıklı kontrollerde miRNA ifade düzeylerinin Mann Whitney U Testi ile karşılaştırmaları

Mann Whitney U	miRNA21	miRNA-124	miRNA-126	miRNA-335	miRNA-370
P değeri	0,69	0,042	0,029	0,25	0,037
Z değeri	-0,50	-2,03	2,178	-1,13	-2,08

(miRNA ifade düzeyleri $2^{-\Delta Ct}$ değeri olarak hesaplanmıştır.)

Hastalar ve sağlıklı kontroller arasında miRNA-124, miRNA-126 ve miRNA-370 ifadesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,042$, $p=0,029$ ve $p=0,037$). miRNA-124 ve miRNA-370'in sağlıklılardaki ortalamalar hastalardan daha yüksek bulundu (sırasıyla $Z=-2,03$ ve $Z=-2,08$). miRNA-126'nın ise hastalarda daha yüksek oranda ifade edildiği belirlendi ($Z=2,178$).

Hastaların $2^{-\Delta Ct}$ değerleri ile eksozom sayısı ve eksozomal proteinler arasındaki korelasyon Spearman korelasyon testi ile analiz edildi. Ancak istatistiksel olarak anlamlılık bulunamadı ($p>0,05$).

Eksozomal miRNA'ların hasta ve sağlıklılarda kendi içlerindeki uyumluluk durumları Tablo 4.3.3'te gösterildi.

Tablo 4.3. 3. Hasta ve Sağlıklı kontrollerde miRNA ifade düzeylerinin korelasyon analizi

Spearman Korelasyon Analizi		miRNA-21	miRNA-124	miRNA-126	miRNA-335	miRNA-370
Hastalar	miRNA-21	.				
	miRNA-124	0,015	.			
	miRNA-126	0,712	0,023	.		
	miRNA-335	0,114	0,166	0,231	.	
	miRNA-370	0,001	0,001	0,264	0,086	.
Sağlıklı Kontroller	miRNA-21	.				
	miRNA-124	0,350	.			
	miRNA-126	0,478	0,801	.		
	miRNA-335	0,385	0,386	0,840	.	
	miRNA-370	0,748	0,001	0,777	0,914	.

Hastalarda miRNA-21 ile miRNA-124 arasında ($p=0,015$), miRNA-124 ile miRNA-126 arasında ($p=0,023$), miRNA-21 ile miRNA-370 arasında ($p=0,001$) ve miRNA-124 ile miRNA-370 arasında ($p=0,001$) istatistiksel olarak anlamlı pozitif

korelasyon tespit edildi. Sağlıklı kontrollerde ise miRNA-124 ile miRNA-370 arasında anlamlı pozitif korelasyon belirlendi ($p=0,001$).

Hastalarda miRNA ifadelerinin karşılaştırılması hasta yaş gruplarına göre de gerçekleştirildi. Hasta eksozomal miRNA'larının hasta yaş grubuna göre Mann Whitney U Testine göre karşılaştırılması Tablo 4.3.4'te verildi.

Tablo 4.3. 4. Hasta miRNA ifade düzeylerinin yaş gruplarına göre karşılaştırılması

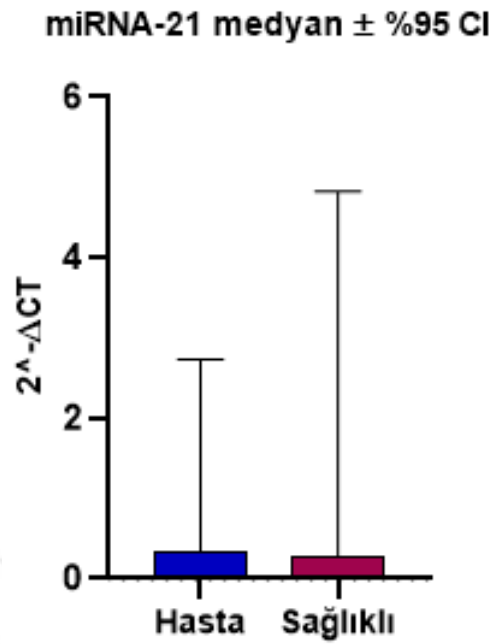
Mann Whitney U	miRNA21	miRNA-124	miRNA-126	miRNA-335	miRNA-370
P değeri	0,011	0,396	0,354	0,487	0,316
Z değeri	-2,546	-0,849	-0,926	-0,694	-1,003

Hastalar birinci grup 60 yaş altı ve ikinci grup 60 yaş üstü olmak üzere iki gruba ayrıldı. Verilere göre miRNA-21 ifadesinin, yaş gruplarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği belirlendi ($p=0,011$). 60 yaş üstü grupta 60 yaş altı gruba göre ortalama miRNA-21 ifadesinin daha yüksek olduğu tespit edildi ($Z=-2,546$).

Hastaların ikisinde ilk tanıdan sonra nüks görüldü. Nüks görülme görülme durumlarına göre eksozomal miRNA ifadeleri açısından değerlendirildi. miRNA ifadelerinin nüks ile ilişkisi Mann Whitney U Testi ile analiz edildi. Eksozomal miRNA ifadesi ile nüks arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ($p>0,05$).

Çalışmada yer alan hasta grubu ($n=20$) ve sağlıklı kontrol grubunda ($n=20$) miRNA'ların göreceli ekspresyon seviyeleri ($2^{-\Delta Ct}$) arasındaki değişimler Graphpad Prism 8.0.2 programı ile görselleştirildi. Sonuçların doğrulanması amacıyla medyan değerlerine göre %95 güven aralığında analiz edildi. Analiz sonuçları tablolar halinde sunuldu.

Hasta ve sağlıklı kontrollerin miRNA-21 ifadelerinin $2^{-\Delta Ct}$ karşılaştırmaları Şekil 4.3.1'de verilmiştir.



Şekil 4.3. 1. Hasta ve Sağlıklı kontrollerde miRNA-21'in $2^{-\Delta C_t}$ değerlerinin karşılaştırılması

Grafiğe göre her iki grup da oldukça heterojen bir dağılım göstermektedir.

Hasta ve sağlıklı kontroller medyan, alt ve üst değerlerine göre %95 güven aralığında analiz edildi. Gruplara ait medyan değerleri ile alt ve üst güvenirlilik katsayısı (CI) sınırları Tablo 4.3.5'te verildi.

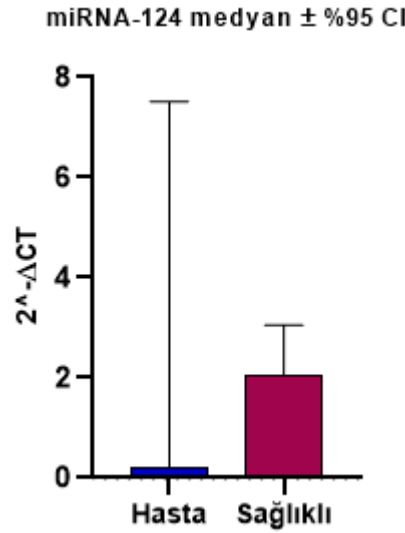
Tablo 4.3. 5. Grupların miRNA-21 medyan ve güven aralıkları karşılaştırmaları

Grup	Medyan	%95 Alt CI	%95 Üst CI
Hasta	0.343	0.028	2.572
Sağlıklı	0.283	0.033	3.778

Hastalarda medyan değer 0,34; sağlıklılarda 0,28 olarak belirlendi. Her iki grupta da medyan değerlerin yakın olması bu iki grupta istatistiksel bir anlamlılık olmadığını düşündürdü. Bu sonuç, hasta ve sağlıklı kontrol grubun eksozomal miRNA $2^{-\Delta C_t}$ 'lerinin karşılaştırıldığı Tablo 4.3.2'deki Mann Whitney U testi ile de desteklendi ($p=0,69$). Ayrıca hem hasta hem de sağlıklı kontrollerde güven aralıklarının çok geniş

olduğu belirlendi. Bu durum iki grubun da heterojen olduğunu ve geniş bir varyasyona sahip olduğunu göstermektedir.

Hasta ve sağlıklı kontrollerin eksozomal miRNA-124 ifadeleri $2^{-\Delta Ct}$ değerlerine göre karşılaştırıldı ve sonuçlar Şekil 4.3.2’de gösterildi.



Şekil 4.3. 2. Hasta ve Sağlıklı kontrollerde miRNA-124’in $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması

Hastalarda sağlıklı kontrollere göre heterojen miRNA-124 ifadesi gözlemlendi. Hastalarda medyan değeri oldukça düşüktür.

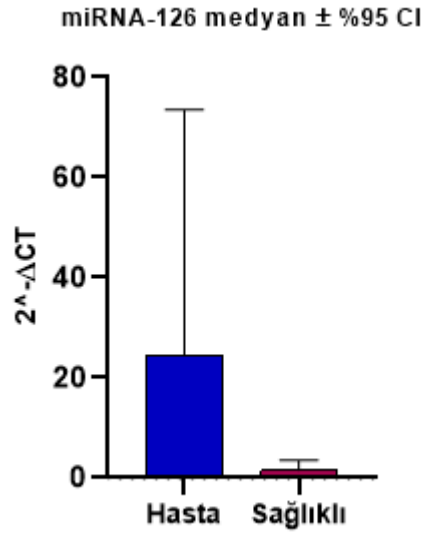
Gruplar medyana göre %95 güven aralığında analiz edildi ve sonuçlar Tablo 4.3.6’da verildi.

Tablo 4.3. 6. Grupların miRNA-124 medyan ve güven aralıkları karşılaştırmaları

Grup	Medyan	%95 Alt CI	%95 Üst CI
Hasta	0.221	0.017	4.493
Sağlıklı	2.064	0.911	2.990

Hastalarda medyan 0,22 iken sağlıklılarda 2,06 olarak tespit edildi. Alt ve üst değerler arasındaki farkın hastalarda daha geniş bir aralıkta olduğu görüldü. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu Mann Whitney U Testi sonuçları ile desteklendi (Tablo 4.3.2)(p=0,042).

Hasta ve sağlıklı kontroller arasında eksozomal miRNA-126 ifadesinin $2^{-\Delta Ct}$ yöntemi ile karşılaştırılması sonuçları Şekil 4.3.3'te verildi.



Şekil 4.3. 3. Hasta ve Sağlıklı kontrollerde miRNA-126'nin $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması

Grafikle görüldüğü gibi hastaların medyan değerleri sağlıklı kontrollere göre çok yüksektir. Ayrıca alt ve üst değerler arasındaki fark hastalarda yüksek ancak sağlıklı kontrollerde çok düşüktür. Bu durum sağlıklı kişilerde miRNA-126 ifadesi açısından daha homojen bir dağılım olduğunu gösterir.

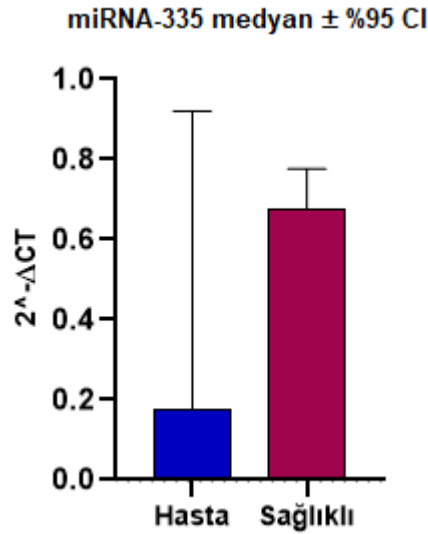
Grupların medyan ve uç değerleri Tablo 4.3.7'de verilmiştir.

Tablo 4.3. 7. Grupların miRNA-126 medyan ve güven aralıkları karşılaştırmaları

Grup	Medyan	%95 Alt CI	%95 Üst CI
Hasta	24.65	1.15	73.26
Sağlıklı	1.49	0.69	3.22

Hastalarda medyan değer 24,65 sağlıklı kişilerde 1,49 olarak belirlendi. Medyan değerler arasındaki büyük fark ve hastaların sağlıklı kişilere göre çok heterojen bir dağılım göstermesi istatistiksel olarak anlamlı bir farkı düşündürmektedir. Bu bulgu Mann Whitney U testi ile desteklendi (Tablo 4.3.2) ($p=0,029$).

Eksozomal miRNA-335 ifadesi hastalarda ve sağlıklı kontrollerde karşılaştırıldı ve sonuçlar Şekil 4.3.4'te gösterildi.



Şekil 4.3. 4. Hasta ve Sağlıklı kontrollerde miRNA-335'in $2^{-\Delta C_t}$ değerlerinin karşılaştırılması

Grafikte, hastalardaki medyan değer in sağlıklı lardan düşük oldu ğ u ancak daha geniş bir heterojenite gösterdiği, buna karş ın hastalarda daha homojen bir dağı lım oldu ğ u göz lendi.

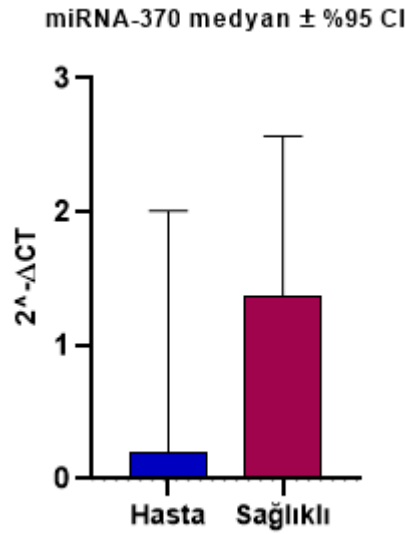
Grupların medyan ve alt üst sınır değ erleri Tablo 4.3.8'de verildi.

Tablo 4.3. 8. Grupların miRNA-335 medyan ve güven aralıkları karşı laşt ırmaları

Grup	Medyan	%95 Alt CI	%95 Üst CI
Hasta	0,1754	0,005	0,9202
Sağ lıklı	0,6783	0,42	0,7765

Gruplar karşı laşt ırıld ığında sağlıklı kontrollerin medyan değ eri 0,67 iken hastalarınki 0,17'dir. Sağ lıklılarda üst ve alt güven aralıkları hastalara göre daha yakındır. Bu durum hastaların miRNA-335 bakım ından geniş bir varyasyona sahip oldu ğ unu gösterir. Ancak Mann Whitney U testine göre istatistiksel olarak anlamlılık bulunamadı (Tablo 4.3.2.) ($p=0,25$).

Son olarak hasta ve sağlıklı kontrollerin eksozomal miRNA-370 ifadeleri karşılaştırıldı ve Şekil 4.3.5'te verildi.



Şekil 4.3. 5. Hasta ve Sağlıklı kontrollerde miRNA-370'in $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması

Grafik incelendiğinde hastalarda medyan değer in sağlıklı kontrollerden düşük olduğu, üst ve alt sınır aralıklarının daha geniş olduğu yani daha heterojen dağılım gösterdikleri tespit edildi.

Grupların medyan ve güven aralıkları Tablo 4.3.9'da gösterildi.

Tablo 4.3. 9. Grupların miRNA-370 medyan ve güven aralıkları karşılaştırmaları

Grup	Medyan	%95 Alt CI	%95 Üst CI
Hasta	0,193	0,021	2,007
Sağlıklı	1,367	0,637	2,567

Gruplar incelendiğinde sağlıklıların medyan değeri 1,367, hastaların ise 0,193 olarak bulundu. Güven üst sınırları birbirine yakın olsa da hastalarda alt ve üst sınır arasındaki fark daha geniştir. Bu durum hastaların daha heterojen miRNA-370 ifade dağılımını gösterir. Gruplar arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığını kontrol etmek için Tablo 4.3.2' deki Mann Whitney U Testi sonuçlarına bakıldığında $p=0,03$ olduğu, sonuç olarak istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu belirlendi.

4.3.2. Hücresel ve Eksozomal miRNA'ların Karşılaştırılması

Karşılaştırma için ilk 10 hastanın hücresel ve eksozomal miRNA $2^{-\Delta Ct}$ değerleri kullanıldı. Hastalarda eksozomal miRNA profilleri ile hücresel miRNA profilleri arasındaki ilişki Spearman korelasyon testi ile araştırıldı ve $p<0,05$ anlamlı kabul edildi. Sonuçlar Tablo 4.3.10'da verildi.

Tablo 4.3. 10. Hasta hücrelerinin ve eksozomlarının miRNA ifade düzeylerinin Spearman Korelasyon Testi Sonuçları

		miRNA-21	miRNA-124	miRNA-126	miRNA-335	miRNA-370		
HÜCRELER	miRNA21	.	0,004	0,003	0,008	0,001	miRNA21	EKSOZOMLAR
	miRNA124	0,004	.	0,000	0,023	0,0001	miRNA124	
	miRNA126	0,003	0,0001	.	0,022	0,0001	miRNA126	
	miRNA335	0,008	0,023	0,022	.	0,001	miRNA335	
	miRNA370	0,001	0,0001	0,0001	0,001	.	miRNA370	

Hücresel miRNA'ların kendi içinde, eksozomal miRNA'ların da kendi içinde anlamlı düzeyde uyumlu oldukları belirlendi ($p<0,05$). Ancak hücresel miRNA'lar ile eksozomal miRNA'lar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edilmedi.

Hastaların hücresel ve eksozomal miRNA ifadeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı Mann Whitney U Testi ile analiz edildi. Sonuçlar Tablo 4.3.11'de gösterildi.

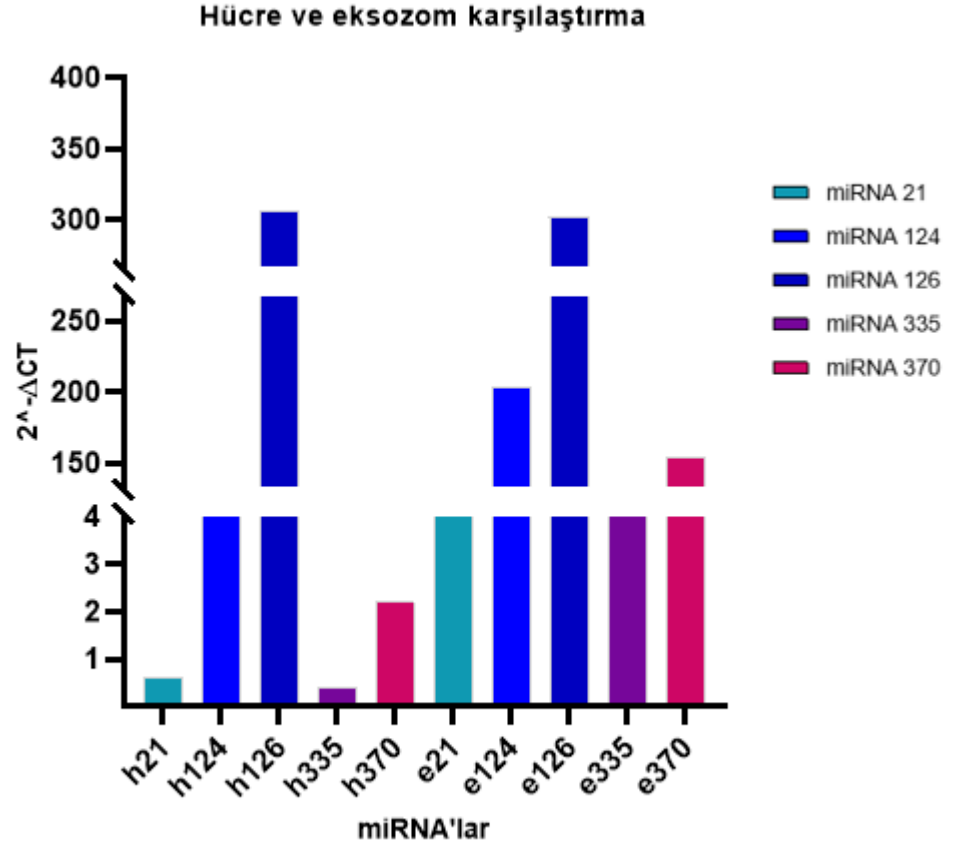
Tablo 4.3. 11. Hasta hücresel ve eksozomal miRNA'larının Mann Whitney U Testi ile karşılaştırma sonuçları

	miRNA-21	miRNA-124	miRNA-126	miRNA-335	miRNA-370
P değeri	0,003	0,496	0,496	0,023	0,007
Z değeri	-2,948	-0,681	-0,680	-2,268	-2,721

Hücresel ve eksozomal miRNA'lar arasında miRNA-21, miRNA-335 ve miRNA-370 için istatistiksel olarak anlamlı ilişki tespit edildi (sırasıyla $p=0,003$, $p=0,023$ ve $p=0,007$). Gruplar arasındaki istatistiksel farkın yönü ve büyüklüğünü

belirtmek için Z değeri kullanıldı. Z değerinin negatif olması eksozomal miRNA'nın medyan değerlerinin daha yüksek olduğunu gösterir. MiRNA -21, miRNA-335 ve miRNA-370 eksozomal ifadesi hücresel ifadelerinden büyüktür (sırasıyla $Z=-2,94$, $Z=-2,26$ ve $Z=-2,72$).

Hastaların hücre ve eksozom kökenli miRNA'larının $2^{-\Delta Ct}$ değerleri Şekil 4.3.6.'daki grafik ile görselleştirildi.



Şekil 4.3. 6. Hastalarda hücresel ve eksozomal miRNA'ların $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması (h: hücresel miRNA, e: eksozomal miRNA)

4.3.3. Hastalarda eksozomal miRNA'lar ile sağkalım arasındaki ilişki

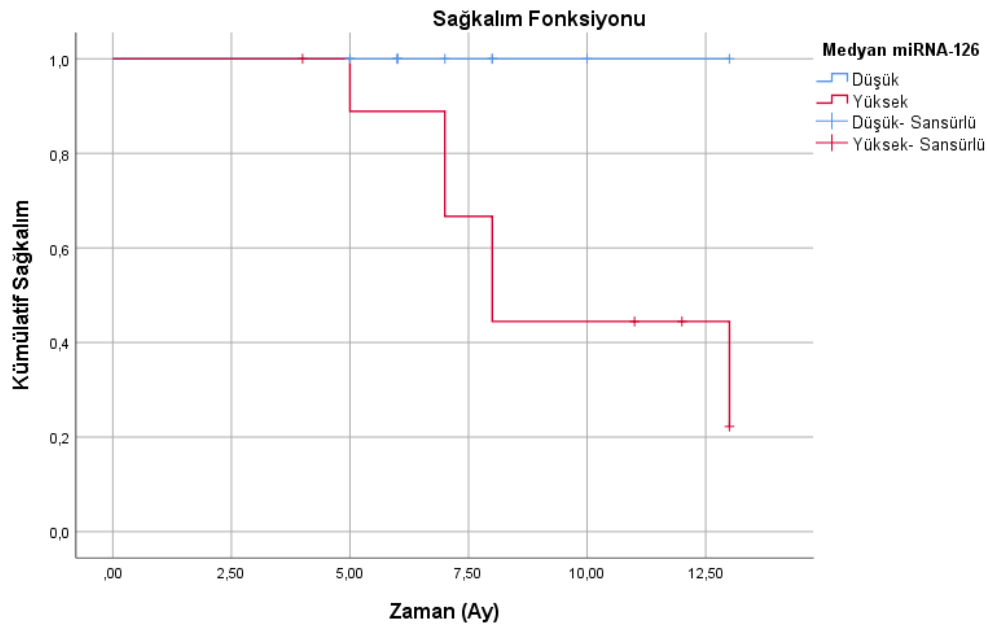
Hasta eksozomal miRNA'ları ve genel sağkalım arasındaki ilişkiler SPSS istatistik programında Kaplan-Meier yöntemi ile analiz edildi. Hastalar eksozomal miRNA medyan değerlerine göre gruplandırıldı ve $p<0,05$ anlamlı kabul edildi (Tablo 4.3.12).

Tablo 4.3. 12. Kaplan Meier analizi Log-rank testi p değerleri

	miRNA-21	miRNA-124	miRNA-126	miRNA-335	miRNA-370
P değeri	0,30	0,54	0,035	0,016	0,38

Eksozomal miRNA 126 ve miRNA 335'in genel sağkalım ile istatistiksel olarak ilişkili olduğu tespit edildi (sırasıyla $p=0,035$ ve $p=0,016$).

Eksozomal miRNA-126 ekspresyonunun genel sağkalım üzerine etkisi Kaplan Meier yöntemi ile analiz edildi (Şekil 4.3.7). miRNA-126 medyan değeri 24,65 bulundu. Medyan değer üzerindeki ifade değerleri yüksek; medyan değer altındaki ifade düzeyleri ise düşük ifade düzeyi olarak sınıflandırıldı. Çalışmada sağkalımla takip süresince beklenen durumun (ölüm) gerçekleşmediği sansürlenene bireyler çizgi üzerine + işareti ile gösterildi.

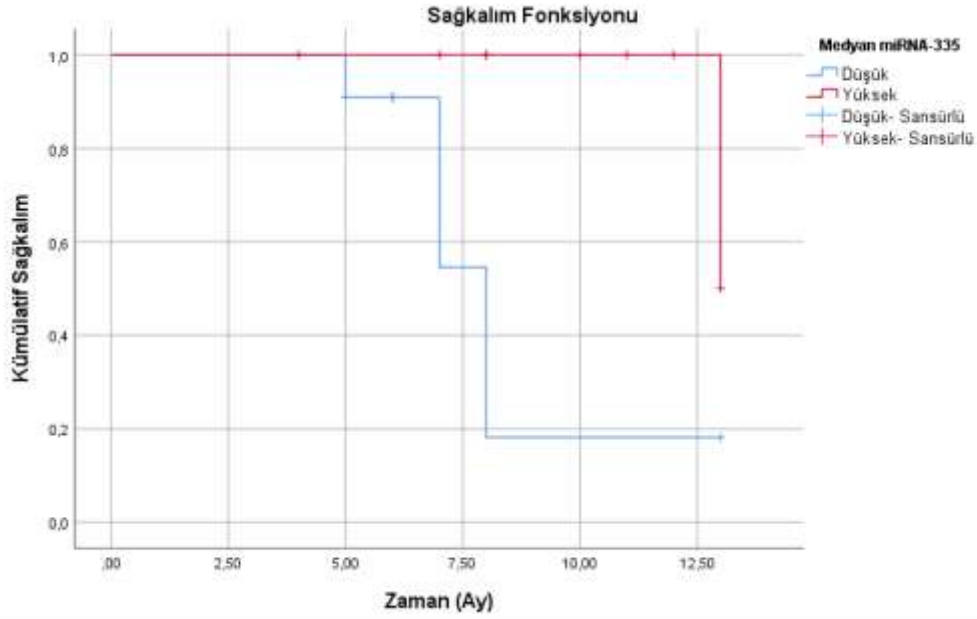


(Takip süresince ölüm gerçekleşmediği sansürlenene bireyler çizgi üzerine + işareti ile gösterildi)

Şekil 4.3. 7. Eksozomal miRNA126 ile sağkalım arasındaki ilişki

Eksozomal miRNA-126 ile sağkalım arasında anlamlı istatistiksel bir ilişki bulundu ($p= 0,035$). Kaplan Meier analizine göre takip süresi olan 14 ay boyunca miRNA-126 ifadesinin düşük olduğu grupta % 100 iken, miRNA-126 ifadesinin medyan değerden yüksek olduğu grupta 22 ± 1 'dir.

Eksozomal miRNA-335 ifadesi Kaplan- Meier yöntemi ile analiz edildi ve sonuçlar Şekil 4.3.8’de gösterildi. miRNA-335’in medyan değeri 0,17 bulundu.



(Takip süresince ölüm gerçekleşmediği sansürlenene bireyler çizgi üzerine + işareti ile gösterildi)

Şekil 4.3. 8. Eksozomal miRNA 335 ile sağkalım arasındaki ilişki

Takip süresi boyunca miRNA-335 ifadesinin düşük olduğu grup için sağkalım $\% 18 \pm 1$ 'dir. miRNA-335 ifadesinin yüksek olduğu grupta ise sağkalım $\% 50 \pm 2$ 'dir.

4.4. Hücre soylarında miRNA ekspresyonları ve modülasyon deneyleri

4.4.1. Hücre soylarının RT-qPCR Sonuçlarının Analizi

Çalışmada HL60, NB4, THP1 AML hücre soyları ile kontrol hücre soyu olarak HEK 293T kullanıldı. Her bir hücre soyundan izole edilen eksozomlardan RT-qPCR ile hedef miRNA'ların ifadeleri analiz edildi. Referans gen olarak U6 kullanıldı ve ifadeler U6'ya göre normalize edildi (ΔCt). AML hücresel ve eksozomal miRNA ifadelerinin kontrol hücre HEK 293T'ye göre değişimi $\Delta\Delta Ct$ yöntemi ile hesaplandı. Sonuçların miRNA ifadesi düzeyleri $2^{-\Delta Ct}$ ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplandı.

Hücre soylarının ve eksozomların $2^{-\Delta Ct}$ değerleri Tablo 4.4.1'de verildi.

Tablo 4.4. 1. Hücre soylarında ve eksozomlarda miRNA ifadeleri ($2^{-\Delta Ct}$)

Hücreler	miRNA-21	miRNA-124	miRNA-126	miRNA-335	miRNA-370
NB4	2,289448	4,432129	59,50752	2,211461	67,88402
HL60	621,6678	0,192109	1132,268	56,29754	7,621104
THP1	0,151774	0,187505	0,476319	0,198196	0,798298
HEK293T	0,328736	45,25483	2,675855	1,796265	45,25483
Eksozomlar	miRNA-21	miRNA-124	miRNA-126	miRNA-335	miRNA-370
NB4	0,071298	0,285191	4,027822	0,071298	0,285191
HL60	0,192109	0,149685	8,815241	0,149685	0,149685
THP1	0,014378	0,057512	1,172835	0,014378	0,115023
HEK293T	0,15	0,11	72,00374	0,12	0,114229

Hücresel ve eksozomal miRNA'ların $2^{-\Delta Ct}$ değerleri Mann Witney U testi ile analiz edildi. Sonuçlar Tablo 4.4.2'de verildi.

Tablo 4.4. 2. Tüm hücrelerde hücresel ve eksozomal miRNA düzeylerinin Mann Whitney U Testi ile karşılaştırılması

HL60, NB4, THP1 ve HEK 293T hücrelerinin Mann Whitney U Testi					
	miRNA-21	miRNA-124	miRNA-126	miRNA-335	miRNA-370
P değeri	0,043	0,083	0,564	0,021	0,022

(miRNA düzeyleri $2^{-\Delta Ct}$ ile hesaplanmıştır.)

Birinci grup hücreler ikinci grup eksozomlar olarak belirlendi. Bu sonuçlar hastalardaki hücresel miRNA ve eksozomal miRNA sonuçlarının karşılaştırıldığı Tablo 4.3.6'daki verilerle uyumludur. Ancak bu veriler sağlıklı hücreyi de kapsamaktadır. Bu nedenle hastalarla hücrelerin karşılaştırılmasında kontrol hücre olan HEK 293T hücre hattı miRNA $2^{-\Delta Ct}$ değerlerini dışlayarak analiz tekrarlandı. Sonuçlar Tablo 4.4.3'te verildi.

Tablo 4.4. 3. NB4, HL60 ve THP1 hücre soylarında hücresel ve eksozomal miRNA düzeylerinin Mann Whitney U Testi ile karşılaştırılması

HL60, NB4 ve THP1 hücrelerinin Mann Whitney U Testi					
	miRNA-21	miRNA-124	miRNA-126	miRNA-335	miRNA-370
P değeri	0,127	0,275	0,513	0,050	0,050

(miRNA düzeyleri $2^{-\Delta Ct}$ ile hesaplanmıştır.)

miRNA-335 ve miRNA-370'te hücresel ve eksozomal ifade açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur (sırasıyla $p=0,05$ ve $p=0,05$). Bu sonuçlar hastalardan elde edilen Tablo 4.3. 6'daki sonuçlarla miRNA-335 ve miRNA-370 açısından uyumludur.

Hücre soylarının hücresel ve eksozomal miRNA'larının kontrol hücresi HEK 293T'ye göre kat değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplandı. Sonuçla Tablo 4.4.4'te verildi.

Tablo 4.4. 4. Hücre soylarında hücresel ve eksozomal miRNA'ların $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

Hücreler	miRNA-21	miRNA-124	miRNA-126	miRNA-335	miRNA-370
NB4	6,96	0,09	22,54	1,23	1,50
HL60	1891,08	0,004	429,04	31,34	0,16
THP1	0,46	0,004	0,18	0,11	0,017
Eksozomlar	miRNA-21	miRNA-124	miRNA-126	miRNA-335	miRNA-370
NB4	8,63	2,49	8,63	0,62	2,49
HL60	1,68	1,31	18,89	1,31	1,31
THP1	0,12	0,50	2,51	0,12	1,006

Sonuçlar değerlendirildiğinde, NB4 hücrelerinde miRNA-124'ün azaldığı (0,09 kat), bunun dışındaki hücresel miRNA'ların kontrol hücreye göre ifadesinin arttığı belirlendi. Ancak NB4 hücre soylarının eksozomal miRNA ifadelerinde kontrole göre miRNA-124'ün arttığı (2,5 kat), miRNA-335'in azaldığı (0,62 kat) tespit edildi.

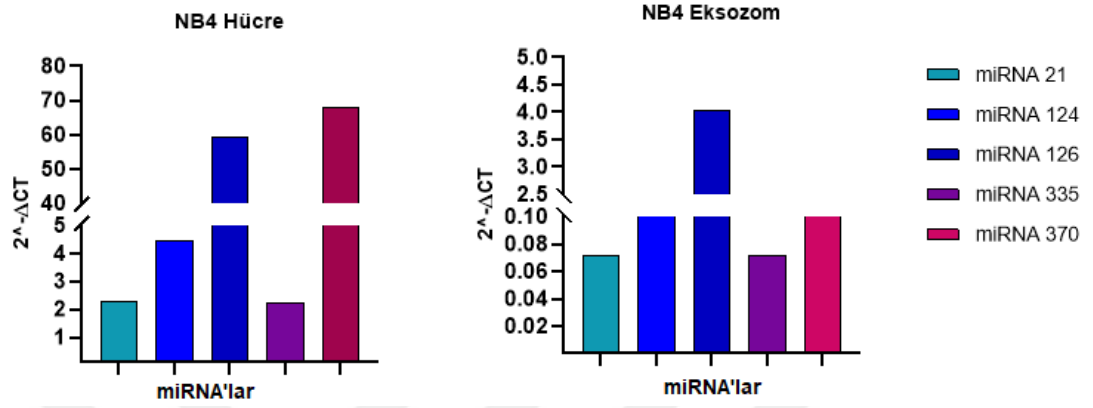
HL60 hücrelerinde hücresel miRNA-21, miRNA-126 ve miRNA-335 ifadesinin kontrole göre artış gösterdiği belirlendi. miRNA-124 ve miRNA-370 ifadesi kontrole göre daha düşük olarak tespit edildi. HL60 eksozomlarında ise bütün miRNA'lar kontrole göre artmış bulundu. En belirgin artış miRNA-126'da görüldü (18,89 kat).

THP1 hücre soylarının hücresel miRNA ifadeleri tüm incelenen miRNA'lar için kontrole göre düşük bulundu. THP1 kökenli eksozomlarda ise sadece miRNA-126'nın artış gösterdiği tespit edildi (2,5 kat).

Ayrıca tüm hücrelerde hücresel ve eksozomal miRNA'lar Spearman korelasyon testi ile analiz edildi. Ancak istatistiksel olarak anlamlılık bulunamadı ($p>0,05$).

Hücresel ve eksozomal miRNA $2^{-\Delta Ct}$ sonuçları karşılaştırmalı olarak Graphpad Prism programında görselleştirildi.

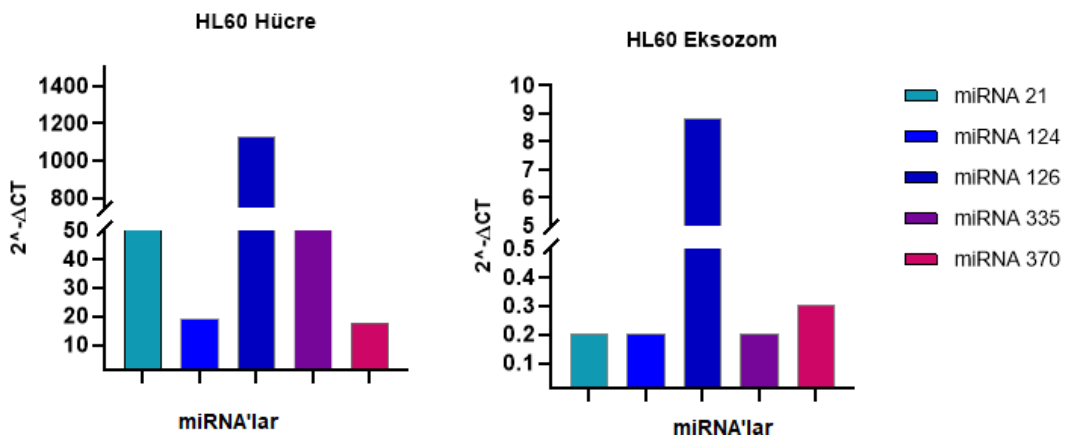
NB4 hücrelerinin hücresel ve eksozomal $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırması Şekil 4.4.1’de gösterildi.



Şekil 4.4. 1. NB4 hücre soyunda hücresel ve eksozomal miRNA'ların $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması

NB4 hücre soyunun hücresel ve eksozomal miRNA'ları incelendiğinde miRNA-126'nın her iki grupta da ifadesinin diğer miRNA'lara göre yüksek olduğu görüldü. miRNA-335 ifadesi ise eksozomlarda hücreye göre oldukça düşük bulundu.

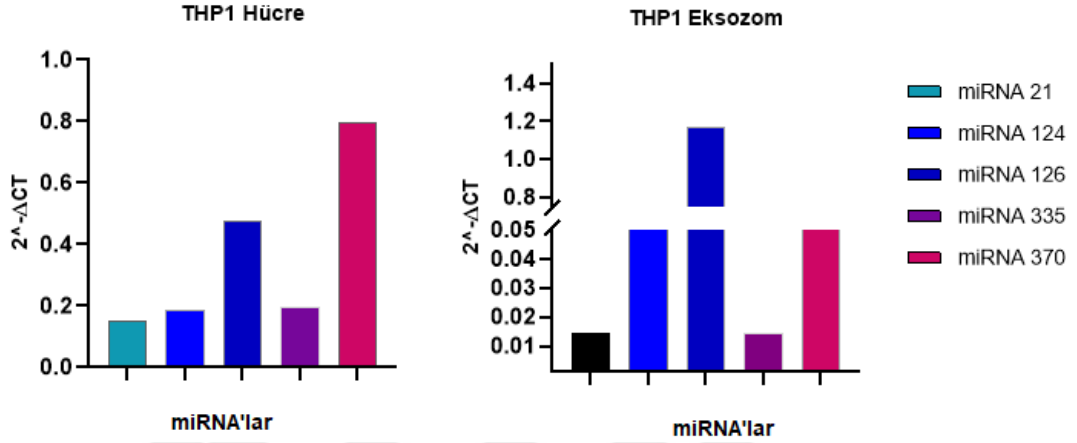
HL60 hücrelerinin hücresel ve eksozomal $2^{-\Delta Ct}$ karşılaştırması sonucu Şekil 4.4.2. oluşturuldu



Şekil 4.4. 2. HL60 hücre soyunda hücresel ve eksozomal miRNA'ların $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması

HL60 hücre soyunda da miRNA-126'nın diğer miRNA'lara göre hem hücresel hem de eksozomal olarak yüksek olduğu göze çarparken miRNA-21'in hücresel ifadesinin yüksek ancak eksozomal ifadesinin düşük olduğu görüldü.

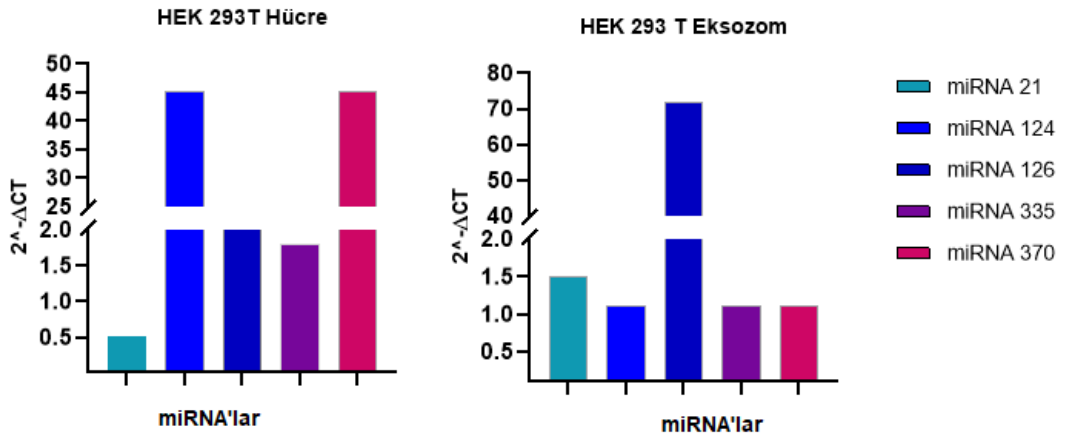
THP1 hücre soyunun hücresel ve eksozomal miRNA'larının $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması Şekil 4.4.3'te gösterildi.



Şekil 4.4. 3. THP1 hücre soyunda hücresel ve eksozomal miRNA'ların $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması

THP1 hücrelerinde tüm hücresel miRNA-126 dışındaki tüm miRNA'ların eksozomlarda daha az ifade edildiği belirlendi. Ancak miRNA-126 ifadesinin arttığı görüldü.

Son olarak HEK 293T hücrelerinin hücresel ve eksozomal miRNA'larının $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması Şekil 4.4.4'te verildi.



Şekil 4.4. 4. HEK 293 T hücre soyunda hücresel ve eksozomal miRNA'ların $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin karşılaştırılması

Sağlıklı kontrol hücre olan HEK 293 T’de hücresel miRNA-124 ve miRNA-370 ifadesi eksozomal miRNA ifadelerine göre yüksek ancak miRNA-126 ifadesi düşük olarak tespit edildi. Bu durum AML hücre soylarından farklılık göstermektedir.

4.4.2. Hücre modülasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Hastalarda sağkalımla ilişkili olduğu tespit edilen miRNA-126 ve bir tümör baskılayıcı olan miRNA-124, hücre soylarında mimik ve inhibitörler kullanılarak modüle edildi. NB4, HL60 ve HEK 293 T hücreleri 48 saatlik miRNA-124 mimik ve miRNA-126 inhibitör uygulamasına maruz bırakıldı. miRNA-124 ifadesinin mimik uygulaması ile artırılması ve miRNA-126 ifadesinin ise inhibitör uygulamasıyla geçici olarak susturulması hedeflendi.

Aşırı ifade ve geçici susturmanın başarılı olup olmadığı RT-qPCR ile analiz edildi. miRNA ifadeleri U6 referans gene göre normalize edildi. Grupların $2^{-\Delta Ct}$ değerleri Tablo 4.4.5’te gösterildi.

Tablo 4.4. 5. MiRNA-124 mimik ve miRNA-126 inhibitör uygulanan hücrelerin $2^{-\Delta Ct}$ değerleri

Hücreler	miRNA-124 kontrol (NTC)	miRNA-124 mimik	miRNA-124 NT kontrol	miRNA-126 kontrol (NTC)	miRNA-126 inhibitör	miRNA-126 NT
NB4	3,71922	1226,218	9,34413	4,432129	2,143547	4,257481
HL60	5,205367	234,753	2,027919	1132,268	50,73818	1013,408
HEK	19,97329	68,5935	17,464264	27,85762	10,12605	14,82541

(NTC: Kontrol, NT: Hedefsiz miRNA/siRNA uygulanmış kontrol)

NB4 ve HL60 hücre soylarında miRNA-124 mimik uygulanan gruba kontrol (NTC) ve hedefsiz kontrol (NT) gruba göre miRNA ifadesinin arttığı belirlendi. İfade değişimleri kat değişimi olarak verildi. Kat değişimi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemine göre hesaplandı. $\Delta\Delta Ct$ ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri Tablo 4.4.6’da gösterildi.

Tablo 4.4. 6. Mimik ve inhibitör uygulanan grupların $\Delta\Delta Ct$ ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

Hücreler	$\Delta\Delta Ct$		$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
	miRNA-124 mimik	miRNA-126 inhibitör	miRNA-124 mimik	miRNA-126 inhibitör
NB4	-8,365	1,048	329,6977	0,483638
HL60	-5,495	4,48	45,09826	0,044811
HEK	-1,78	1,46	3,434262	0,363493

Grupların $2^{-\Delta\Delta C_t}$ sonuçları değerlendirildiğinde miRNA-124 mimik uygulaması sonucu miRNA-124 ifadesinde NB4 hücrelerinde 329 kat artış, HL60 hücrelerinde 45 kat artış ve HEK 293T hücrelerinde ise 3,5 katlık bir artış belirlendi. Mimik uygulaması ile tüm hücrelerde miRNA-124 ifadesinin arttığı tespit edildi.

miRNA-126 inhibitör uygulaması sonucunda ise miRNA-126 ifadesi NB4 hücrelerinde 0,48 kat, HL60 hücreleri 0,04 ve HEK 293 T hücreleri ise 0,36 kat azaldığı belirlendi. İnhibitör uygulaması sonucu tüm hücre soylarında baskılanma oranı % 50'den fazla olduğu ve baskılanmanın başarılı olduğu değerlendirildi.

4.4.3. Modüle edilmiş hücrelerde sağkalım analizi sonuçlarının değerlendirilmesi

NB4, HL60 ve HEK 293T hücrelerin sağkalım analizi CCK8 (WST-8) yöntemi ile gerçekleştirildi. Mimik ve inhibitör uygulaması yapılan gruplar hiçbir uygulama yapılmamış kontrol gruba göre normalize edildi. Çalışma üçlü tekrarlar halinde gerçekleşti ve absorbans değerlerinin ortalamaları alındı. Sonuçlar Tablo 4.4.7'de verildi.

Tablo 4.4. 7. CCK8 Sağkalım analizi absorbans değerleri ortalamaları

Hücreler	NTC	124 mim	124 NT	NTC	126 inh	126 NT
NB4	0,65	0,275	0,88	0,65	0,35	0,6
HL60	0,79	0,325	0,86	0,79	0,345	0,65
HEK	0,4	1,2	0,6	0,4	0,7	0,45

Tablo 4.4.8'de 48 saat mimik ve inhibitör uygulaması sonrasında hücre gruplarındaki canlılık değişimi verildi. Her bir değer formüle göre 100 ile çarpıldı.

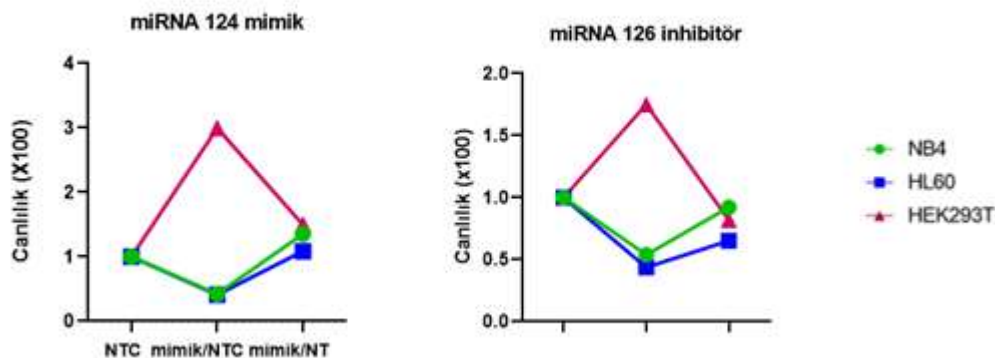
Tablo 4.4. 8. Hücre gruplarındaki canlılık değişimleri

Hücreler	NTC	124 mim/NTC	124 mim/NT	NTC	126 inh/NTC	NT/NTC
NB4	1	0,42	1,35	1	0,53	0,92
HL60	1	0,41	1,08	1	0,43	0,65
HEK	1	3	1,5	1	1,75	0,82

(NTC: Kontrol, NT: Hedefsiz miRNA/siRNA uygulanmış kontrol)

miRNA-124 mimik uygulaması sonucunda NB4 hücre soyunda % 42 ve HL60 hücre soyunda ise %41 canlılık belirlendi. HEK 293T hücrelerinde % 300'lük bir artış hesaplandı. Kontrol %100(1) kabul edildi.

miRNA-126 inhibitör uygulanan grupta ise canlılık NB4 te %54'e HL60'ta ise %44'e düştü. HEK 293T'de %175'lik bir artış gözlemlendi. Hücre canlılıklarının karşılaştırılması Şekil 4.4.5'te verildi.



Şekil 4.4. 5.Hücre canlılıklarının karşılaştırılması

Şekil 4.4.2' de görüldüğü gibi NB4 canlılığında hem mimik hem inhibitör uygulamasında azalma, ancak HL60 canlılığında mimik uygulamasında artma inhibitör uygulamasında azalma belirlendi. HEK 293T hücrelerinde ise mimik ve inhibitör uygulamalarının ikisinin de canlılık artışına neden olduğu gözlemlendi.

4.4.4. RT-qPCR sonuçları ile CCK8 canlılık analizi sonuçlarının karşılaştırılması

RT-qPCR sonuçlarıyla CCK8 canlılık analizi sonuçları karşılaştırıldı ve sonuçlar Tablo 4.4.9'da gösterildi.

Tablo 4.4. 9. RT-qPCR sonuçları ile absorbans canlılık analizi sonuçlarının karşılaştırılması

Hücreler	$\Delta\Delta C_t$		$2^{-\Delta\Delta C_t}$		Canlılık (x100)	
	miRNA-124 mimik	miRNA-126 inhibitör	miRNA-124 mimik	miRNA-126 inhibitör	miRNA-124 mimik	miRNA-126 inhibitör
NB4	-8,36	1,04	329,69	0,48	0,42	0,54
HL60	-5,49	4,48	45,09	0,04	0,41	0,44
HEK	-1,78	1,46	3,43	0,36	3	1,75

Tablo 4.4.9'deki verilere dayanarak mimik uygulanan gruplarda miRNA-124 ifadesinin NB4'te 329 kat, HL60'ta 45 kat arttığı, HEK 293T'de ise bu artışın 3,43 kat olduğu belirlendi. Ancak NB4 ve HL60 hücre soylarında canlılık düşerken (sırasıyla 0,42 ve 0,41) HEK 293T'de canlılığın 3 kat arttığı tespit edildi. İnhibitör uygulanan

gruplarda ise miRNA-126 ifadesinin NB4'te 0,48 kat, HL60'ta 0,044 kat azaldığı, HEK 293T'de ise 0,36 katlık bir azalma olduğu belirlendi. Ancak baskılanma oranı düşüktür. Buna karşın NB4 ve HL60 hücrelerinde canlılıkta azalma görüldü (sırasıyla 0,54 ve 0,44). HEK 293T hücrelerinde ise 1,75 kat artış tespit edildi. Veriler hücrelerde gerçekleştirilen miRNA modülasyonlarıyla hücre canlılığı arasında ilişki olduğunu gösterdi.



5. TARTIŞMA

Akut miyeloid lösemiler (AML), hızla ilerleyen, kemik iliğindeki miyeloid hücre sayısında artış, olgunlaşmalarında durma ile karakterize edilen, klonal bir hematopoietik kök hücre bozukluğu olup genetik, biyolojik ve klinik olarak heterojendir. AML'ler, hızlı başlangıçlı, ilerleyici ve sıklıkla tedaviye dirençli bir profil sergilerler (O'Reilly vd., 2021; Arber vd., 2016).

AML için mevcut tedavi protokolleri, tedavi sınıflandırmasına katkıda bulunan prognostik faktörlere dayanmaktadır. Ancak, yeni teşhis, prognoz, tedavi seçimi ve yanıt-tahmin belirteçlerine ihtiyaç vardır. AML hücrelerinden salınan eksozomların analizi de bu aday belirteçlerdendir (Li vd., 2023).

Farklı hücre türleri, birbirleriyle eksozomlar aracılığıyla iletişim kurabilirler. Eksozomlar tarafından taşınan sinyal moleküllerinin hücre zarındaki yüzey reseptörlerine bağlanmasıyla spesifik sinyal yolları aktifleşir (Dezhakam vd., 2023). Kanser hücreleri genellikle normal hücrelerden daha fazla eksozom üretirler. Kanser hücresi kaynaklı eksozomlar hem yerel hem de uzak mikroçevreleri değiştirebilirler. Eksozom yapısı heterojendir (Thery vd., 2009). Eksozom ile ilişkili miRNA'lar ve diğer moleküler yükler, kan dolaşımı aracılığıyla alıcı hücrelere ulaştırılabilirler (Li L vd., 2023). Eksozomların, kemik iliği nişindeki lösemik kök hücreler, lösemik blastlar ve stromal hücreler arasındaki moleküler iletişime aracılık ettiği ve lösemik kök hücre korunmasını ve AML ilerlemesini desteklediği bildirilmiştir (Li L vd., 2023). Eksozomlar önemli miRNA'ları veya onkogenik mRNA'ların lösemik hücrelere ilerleme özelliklerini değiştirmek için hematopoietik kök hücrelere taşınmasına aracılık ederler. Bu özellikleri eksozomların lösemi gelişimini desteklemesini sağlayan en önemli mekanizmalardan biridir. Böylece, kemik iliği mikroçevresinin özelliklerini AML lehine değiştirebilir. Eksozomların lösemi gelişimindeki destekleyici rolüne ek olarak, eksozomlar kemoterapi sırasında lösemi hücrelerini koruyabilirler (Amin vd., 2022).

Bu literatür bilgilerinden yola çıkarak AML hastalarının, sağlıklı kontrollerin ve hücre soylarının eksozomlarından izole edilen miRNA-21, miRNA-124, miRNA-126, miRNA-335 ve miRNA-370 ifadeleri incelendi. Bu tez çalışmasında öncelikli amaç bu eksozomal miRNA ifadelerinin hasta klinik durumlarıyla ve hücre canlılıklarıyla ilişkisini analiz etmektir.

Bunun için öncelikle izole edilen eksozomlar nitelik ve nicelik bakımından karakterize edilmesi gerekmektedir. Çalışmamızda eksozomların karakterizasyonunu sağlamak için üç yöntem kullanıldı. Bunlar eksozomların TEM ile görüntülenmesi (boyut-yapı analizi ile doğrulama), western blot ile TSG101 bantlarının görüntülenmesi (protein analizi ile doğrulama) ve mikrolitredeki eksozom sayısının belirlenmesi (kantitasyon ile doğrulama) yöntemleridir.

İlk olarak eksozomların TEM ile yapı ve boyut bakımından incelenmesi gerçekleştirildi. Her bir hastanın eksozomları TEM ile eşit alan taranarak görüntülendi. Tüm hastalardan izole edilen eksozomlar TEM görüntüleme ile boyut ve yapı bakımından değerlendirildi. Görüntülemeye X60000 büyütme kullanıldı. Ayrıca eksozom karakterizasyonuna katkı sağlaması açısından dört sağlıklı kontrolden izole edilen eksozomlar da TEM ile görüntülendi. Eksozomların yapısal görüntüsü ve boyut analizleri literatürle uyumludur (Thery ve diğ. 2009; Muller ve diğ 2014). Sağlıklı kontrollerden sadece dört tanesinin eksozomlarının görüntülenebilmesi çalışmanın bu aşamasının kısıtlılıklarındandır. Mali nedenlerden dolayı alınabilecek grid sayısı sadece mevcut analizler için yeterli olmuştur.

Eksozom karakterizasyonunun ikinci basamağı TSG101 protein tespiti için western blot analizidir. TSG101 eksozom sentezi sırasında görevli ve eksozom karakterizasyonunda temel proteinlerden biridir (Yang ve diğ 2024).

Hastalarda, sağlıklı kontrollerde ve hücre soylarında TSG101 protein bantları western blot yöntemi ile analiz edildi. Hasta ve sağlıklı kontrollerin eksozomal protein ölçümleri yapılarak $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ cinsinden hesaplandı. Hasta ve sağlıklı kontrollerin TSG101 proteinlerinin western blot görüntüleri incelendiğinde genel olarak hastalardaki protein ifadesi daha fazla olarak değerlendirildi. Bu durum Bağımsız Örneklem T testi sonucuyla da doğrulandı ($p=0,006$). Hastaların ortalaması 2,05 iken sağlıklı kontrollerin ortalaması 1,28'dir. Hastalarda eksozomal protein konsantrasyonu ortalamaları sağlıklı kontrol ortalamalarından 1,6 kat fazladır.

AML hücre soylarındaki eksozomal protein konsantrasyonları sağlıklı kontrol hücreleri olan HEK 293T ile karşılaştırıldığında her bir AML hücre soyunda protein konsantrasyonu daha yüksek olduğu görüldü. THP1, NB4, HL60 ve HEK 293 T hücre soyları proteinleri ile daha önceden TSG101 protein bandı elde edilmiş olan bir hasta (H1) ve bir sağlıklı kontrol (S1) örneğinin jelde birlikte yürütüldü ve TSG101 ifadeleri

görüldü (Şekil 4.2.5). Görüntülerle AML hücre soylarında ve H1'de protein yoğunluğunun HEK 293T'den ve S1'den daha yüksek olduğu doğrulandı. Kanser hücrelerinde eksozom miktarının sağlıklı hücrelerden fazla olması beklenen bir durumdur. Sonuçlarımız bu bağlamda literatürle uyumludur (Hong ve diğ. 2016).

Her ne kadar eksozom karakterizasyonunda yaygın olarak TEM ve western blot gibi yöntemler kullanılsa da örneklerdeki eksozom sayılarının belirlenmesi de güncel uygulamalardandır. Eksozom karakterizasyonunda üçüncü adım olarak eksozom kantitasyonu gerçekleştirildi. Eksozom kantitasyon kiti kullanılarak mikrolitredeki eksozom sayısı belirlendi. Daha sonra mikrolitredeki eksozom sayılarıyla mikrolitredeki protein miktarları arasında uyumluluk Spearman'ın Korelasyon Testi ile analiz edildi. Hasta örneklerindeki eksozomal protein miktarı ile eksozom sayılarının istatistiksel olarak anlamlı derecede uyumlu olduğu ($p=0,023$) ve protein artışı ile eksozom sayısı artışının anlamlı pozitif korelasyon gösterdiği tespit edildi. Hastalardaki eksozom sayıları literatürdeki verilerle uyumlu bulundu (Rodríguez-Zorrilla ve diğ. 2023). Ayrıca hasta protein ve eksozom sayılarının karşılaştırılması ile de eksozom doğrulaması çift yönlü olarak gerçekleştirildi.

Eksozomların nitelik ve nicelik olarak doğrulaması yapıldıktan sonra hastaların ve sağlıklı kontrollerin eksozomal miRNA-21, miRNA-124, miRNA-126, miRNA-335 ve miRNA-370 ifadeleri analiz edildi. Çalışmalar bu ifade verileri üzerinden devam ettirildi. Bu miRNA'lar daha önce sınırlı sayıda çalışmada AML'de incelenen miRNA'lardır. Örneğin miRNA-21 daha önce birçok kanserde ve AML'de araştırılmış onkogenik miRNA'dır (Vandewallw ve diğ 2021; Fletcher ve diğ 2022). Bütün AML FAB alt sınıflarında tedavi seçiminde kullanılabileceği bildirilmiştir (Moussa ve diğ. 2020; Wang ve diğ 2018). miR-124, hücre büyümesini baskılama, farklılaşmayı uyarma ve apoptozu teşvik etmedeki rolü nedeniyle bir tümör baskılayıcı olarak nitelenmiştir. AML'de eksozomal miRNA-124'ün ifade değişiminin farklı prognoza sahip AML alt gruplarında tespit edilmesi bu molekülün olası biyobelirteç rolünün belirlenmesi önemlidir (Chen vd., 2014). Tanı sırasında yüksek miRNA-126 ifadesinin AML de lösemik kök hücre devamına katkı sağladığı ve kemoterapi direnci ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Naldini vd., 2023). Ancak eksozomal miRNA-126'nın farklı AML alt gruplarındaki ifade düzeyleri karşılaştırmalı olarak incelenmemiştir. miRNA-335 ifadesinin AML'de arttığı bildirilmiştir. Ancak kanserdeki net

mekanizması bilinmemektedir (Zhang vd., 2022). miRNA-370 pediatrik AML’de daha önce prognostik değeri gösterilmiştir. Ancak erişkin AML’de farklı translokasyonlara sahip AML hastalarında eksozomal miRNA olarak ifade profili araştırılması gereken bir moleküldür (Ali vd., 2022). AML’de bu hedef miRNA’larla ilgili çalışmalar bulunmasına rağmen eksozomal ifade değişimlerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda bu miRNA’lar hastalarda, sağlıklı kontrollerde ve hücre soylarında gen ifadesi açısından incelendi. Hasta ve sağlıklı kontrollerin $2^{-\Delta Ct}$ değerleri Mann Whitney U testi ile analiz edildiğinde miRNA-124, miRNA-126 ve miRNA-370’in gruplar arasında ifadelerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,042$, $p=0,029$ ve $p=0,037$). miRNA-124 ve miRNA-370’in sağlıklılardaki ortalamaları hastalardan daha yüksek bulundu (sırasıyla $Z=-2,03$ ve $Z=-2,08$). miRNA-126’nın ise hastalarda daha yüksek oranda ifade edildiği belirlendi ($Z=2,178$). Bu miRNA’ların eksozomal ifadelerinin hasta ve sağlıklı kontrollerde farklı olması miRNA’ların fonksiyonlarıyla ilişkili olabilir. miRNA-124 tümör baskılayıcı bir miRNA’dır ve hücrelerde sağlıklıların ortalamalarının hastalardan yüksek olması beklenen bir durumdur. Sonuçlarımız bu bakımdan literatürle uyumludur. Ancak eksozomal olarak da ifade farkının aynı doğrultuda olması AML’de olası biyobelirteç rolünü düşündürmektedir. Tanı sırasında tespit edilen yüksek miRNA-126 ifadesinin, lösemik hücre devamlılığını sağlayarak ve tedavi direncini arttırarak lösemiye desteklediği bilinmektedir (Naldini vd., 2023). Bu bakımdan tanı sırasında kanı alınmış hastalarda eksozomal miRNA-126 ifadesinin yüksek olması literatürle uyumlu bir bulgudur. Hastaların eksozomlarında miRNA-126 ifadesinin sağlıklılardan yüksek olması miRNA-126’nın AML’deki ilerletici rolüyle ilişkili olabilir. Ayrıca bu molekülün eksozomal ifadesinin yüksek bulunması hücreler arası iletişime katkı sağlayarak öncül hücrelerin lösemik hücrelere dönüşümünü teşvik edebilir (Garzon ve diğ. 2006). Farklı lösemik hücrelerde kemoterapi direncinin gelişimine katkı sağlayarak minimal rezidüal hastalık gelişimini destekleyebilir (Naldini vd., 2023). Daha geniş AML alt sınıflarını içeren bir grupta yapılacak çalışmalar miRNA-126’nın AML alt sınıflarındaki etkisini ortaya koyabilir. Böylece farklı alt gruplarda eksozomal miRNA ifadesi tespitine dayanarak hızlı tedavi seçimi kararları alınabilir. Eksozomal miRNA-370 ifadesi sağlıklı kontrollerde

hastalardan yüksek bulundu. miRNA-370 hücre çoğalmasını, apoptozu, göçü ve invazyonu teşvik ederek veya baskılayarak farklı kanser türlerinde onkogenik veya tümör destekleyici rollere sahiptir. (Ye ve diğ.2023). Eksozomal miRNA-370 ifadesinin sağlıklı kontrollerde hastalardan yüksek olması bu miRNA'nın iki yönlü özelliğinden kaynaklanabilir. miRNA-370 pediatrik AML'de önemli derecede azaldığı ve bu nedenle tümör baskılayıcı rolü olduğu bildirilmiştir (Ali vd., 2022). Sonuçlarımız yetişkin AML'de de miRNA-370'in tümör baskılayıcı rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Hastalarda ve sağlıklı kontrollerde eksozomal miRNA ifadelerinin korelasyonu Spearman'ın Korelasyon Testi ile analiz edildi. Sağlıklılarda sadece miRNA-124 ve miRNA-370 arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon ($p=0,001$) gözlemlendi. Bu sonuç bu iki miRNA'nın tümör baskılayıcı özelliğinden dolayı sağlıklı kontrollerde daha fazla ifade edilmeleriyle ilgili olabilir. Ancak hastaların eksozomal miRNA'larındaki korelasyonların bir kısmı tümör baskılayıcı ve onkogenik özelliği olan miRNA'lar arasındadır. Hastalarda miRNA-21 ve miRNA-124 arasında ($p=0,015$), miRNA-21 ile miRNA-370 arasında ($p=0,001$), miRNA-124 ile miRNA-126 arasında ($p=0,023$) ve miRNA-124 ile miRNA-370 arasında ($p=0,001$) istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon tespit edildi. Bu sonuçlar miRNA ifadeleri ve eksozomal kargonun paketlenmesiyle ilgili değişimler açısından ilgi çekicidir. Çalışmalarda kanser hücresi kaynaklı eksozomların ana hücrede bulunan spesifik proteinler, lipidler ve nükleik asitleri taşıdığı bildirilmiştir. Bu durum, eksozom biyogenezinin rastgele bir süreç olmadığını göstermektedir. Ayrıca kanser hücre eksozomlarının ana tümör hücrelerinde metabolik ve proteomik profillerdeki herhangi bir değişikliği yansıtabileceği bilinmektedir. (Villarroya-Beltri vd., 2014; Dezhakam vd., 2023). Eksozom sentezi sırasında hastalarda belirli bir anda ve belirli bir hasta alt tipinde miRNA profili değişiyor olabilir ya da belirli moleküller birlikte paketleniyor olabilir. Bu durum muhtemelen eksozom biyogenezinden kaynaklanan bir durumdur (Dezhakam vd., 2023) Bazı miRNA'ların hasta alt gruplarında farklı evrelerde farklı ifadeleri de söz konusu olabilir. Örneğin Chen ve arkadaşları, azalmış miR-124-1 ifadesinin genellikle AML hastalarında, en sık t(15;17) olanlarda bulunduğunu ve daha uzun nüksüz ve genel sağ kalım ile ilişkili olduğunu

bildirmişlerdir. Bu durum miR-124-1 azalmasının bazı AML tiplerinde sağ kalımı tahmininde kullanılabileceğini göstermektedir (Chen ve diğ. 2013).

Megakaryositik lösemi hücre hatlarında miRNA-126 ifadesi artarken, farklılaşmış megakaryositlerde ve CD34+ progenitör hücrelerde in vitro ifadesi azalır ve bu da megakaryositik lösemide olası rolünü düşündürür (Garzon ve diğ. 2006). Ayrıca Liao ve arkadaşlarının çalışması AML'nin spesifik alt tiplerinde miRNA-124 ile miRNA-126'nın ifadelerinin azalmasının iyi prognozla, ifadelerinin artmasının ise kötü prognozla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Liao ve diğ 2017). miRNA-124 ile miRNA-126'nın pozitif korelasyonu bu bakımdan literatürle uyumlu olup hasta alt tiplerinin daha ayrıntılı incelenmesini gerektirmektedir.

Bu açıdan değerlendirildiğinde bulgularımız önem arz etmektedir. Çünkü AML hastalarındaki eksozomal miRNA'ların birbirine göre durumu doğrudan hastalık alt tipleriyle ilişkili olabilir. Eksozomal miRNA analizleri kullanılarak, karyotip analizi gibi süre gerektiren analizlerden çok daha hızlı bir biçimde hastanın klinik alt sınıfı tespit edilebilir. Bu nedenle, eksozomlar, farklı tümör tiplerine sahip hastalarda spesifik biyobelirteçler olarak prognostik, tanısal ve terapötik unsurlar olarak değerlendirilebilirler.

Burada asıl şaşırtıcı olan bir onkomiR olduğu bilinen miRNA-21'in hem miRNA-124 hem de miRNA-370 ile korelasyon göstermesidir. Bu miRNA'ların artışı prognostik öneme sahip olabilir. Çünkü miRNA-21'in artışının AML'de tedavi direnciyle ilişkili olduğu, miRNA-124'ün artışının spesifik AML alt tiplerinde kötü prognozla ilişkili olduğu ve miRNA-370'in aşırı ifadesinin lösemik hücre proliferasyonunu teşvik ettiği bilinmektedir (Fletcher ve diğ 2022; Chen ve diğ. 2013; Ali vd., 2022). miRNA-21, miRNA-124 ve miRNA-370 de birlikte artış görülmesi kötü prognozu ve ilaç direncini öngörebilir.

Hastaların eksozomal miRNA'ları 60 yaş altı ve 60 yaş üstü bireylerde Mann Whitney U testi ile analiz edildiğinde 60 yaş üstünde miRNA-21 ifadesinin anlamlı derecede artmış olduğu tespit edildi ($p=0,011$). Bu durum AML'nin karakteristik durumuyla ilgili olabilir. İleri yaş bireylerin, olumsuz bir sitogenetik risk profili ile ortaya çıkma olasılığı daha yüksektir, kemoterapiye cevap verme olasılıkları daha azdır ve tedaviye bağlı toksisitelere daha duyarlıdırlar (Abaza ve diğ. 2024). miRNA-21 söz konusu durumlara katkı sağlayan bir onkomiRNA'dır (Fletcher ve diğ 2022) .

Hasta ve sağlıklı kontrollerin miRNA'ları medyan, alt ve üst sınırları açısından %95 güven aralığına göre değerlendirildi. miRNA-21'in medyan değeri sağlıklı kontrollerden yüksektir ancak birbirine yakın değerdedir (Şekil4.3.1.) (Tablo 4.3.5.). Hastalarda medyan 0,34 iken sağlıklı kontrollerde 0,28'dir. Medyan değerlerin birbirine yakın olması dolayısıyla istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,69$). Hem hasta hem de sağlıklı kontrollerde güven aralıklarının çok geniş olduğu belirlendi. Bu durum iki grubun da heterojen olduğunu ve geniş bir varyasyona sahip olduğunu göstermektedir. AML hastalarında miRNA-21 ifadesinin geniş bir varyasyona sahip olması AML hastalarının heterojenitesiyle ilgili beklenen bir durum olabilir. Ancak sağlıklı kontrollerde ifade heterojenitenin çokluğu eksozomlarda miRNA-21'in paketlenmesiyle ilgili özel bir durumu olabilir. Ancak literatürde bununla ilgili bir bilgiye rastlanmamıştır. miRNA-124 ifadesi açısından hastalar ve sağlıklı kontroller değerlendirildiğinde sağlıklı kontrollerde medyan değerin hastalara göre çok yüksek olduğu ve daha heterojen bir dağılım gösterdiği belirlendi. Hastaların medyan değeri 0,22 ve sağlıklı kontrollerin medyan değeri 2,06'dır. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu Mann Whitney U Testi sonuçları ile desteklendi ($p=0,042$). Sağlıklı kontrollerde miRNA-124 ifadesinin yüksek olması bu miRNA'nın tümör baskılayıcı özelliğinden dolayı beklenen bir durumdur. Ancak hastalarda çok yüksek miRNA-124 ifade eden bireylerin bulunması ayrıca değerlendirilmesi gereken bir durumdur. Bu, AML hastalarının çok geniş bir varyasyona sahip olmasından kaynaklanabilir ve daha önce ifade edildiği gibi bu durum bazı AML alt tiplerinde kötü prognozla ilişkili olabilir (Chen ve diğ. 2013). miRNA-126 medyan değeri hastalarda 24,65 iken sağlıklı kontrollerde 1,49'olarak bulundu. Bu bulgu istatistiksel olarak da desteklendi ($p=0,029$). Bu durum miRNA-126'nın AML'deki etkisiyle ilgili beklenen ve literatürle uyumlu bir durumdur (Naldini vd., 2023). Ayrıca hastalarda geniş aralıkta bir ifade dağılımı görülürken sağlıklı kontroller de oldukça heterojendi. Hastalarda miRNA-126 ifadesinin yüksek olması ve geniş bir varyasyon göstermesi AML patogenezinde bu miRNA'nın hastalığı destekleyici etkisiyle ilişkilidir. miRNA-335 ifadeleri hasta ve sağlıklı kontrollerde medyan değerleri ve aralıkları açısından karşılaştırıldığında sağlıklı kontrollerde hastalara göre daha yüksek olduğu tespit edildi. Hastalarda medyan 0,17 iken sağlıklılarda 0,67'dir. Hastalar sağlıklı kontrollerden daha heterojen bir miRNA-

335 ifadesi dağılımı göstermektedir. Ancak her ne kadar medyan değerleri farklı olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,25$). Bu durum örnek sayısıyla ya da sağlıklı kontrollerdeki varyasyon genişliğiyle ilgili olabilir. Lösemi ile ilgili bir çalışmada, relaps görülen hastaların kontrole göre, ilaca dirençli hastaların ilaca duyarlı hastalara göre daha düşük miRNA-335 seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir (Barrios-Palacios ve diğ. 2023). Buna göre miRNA-335 ifadesinin düşüklüğü AML alt sınıflarında farklılık gösterebilir ve kötü prognozla ilişkili olabilir. Son olarak miRNA-370 medyan ifadesi hasta ve sağlıklılara göre değerlendirildiğinde hastalarda medyan değer 1,36 sağlıklı kontrollerde ise 0,19 olduğu bulundu. Değerler arasında istatistiksel olarak da anlamlı fark tespit edildi ($p=0,03$). Hastalar sağlıklı kontrollerden daha heterojen dağılım gösterdi. miRNA-370 pediatrik AML’de önemli derecede azaldığı ve bu nedenle tümör baskılayıcı rolü olduğu bildirilmiştir. Ancak miRNA-370’in aşırı ifadesinin lösemik hücre proliferasyonunu teşvik ettiği bilinmektedir (Ali vd., 2022). Sonuçlarımız bunu destekler niteliktedir. Medyana göre aşırı miRNA-370 ifade eden hastalarda bu durum kötü prognozla ilişkili olabilir.

Çalışmamızda ayrıca eksozomal miRNA ifadelerinin hücrel miRNA ifadelerini ne kadar yansıtabileceğini analiz etmek amacıyla ilk 10 hastanın hücrel ve eksozomal miRNA ifade düzeyleri karşılaştırıldı. Veriler non parametrik olduğu için ilk olarak Spearman’ın korelasyon testi ile hücrel ve eksozomal miRNA’lar arasında uyumluluk olup olmadığı analiz edildi. Hücrel ve eksozomal miRNA’lar arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadı ($p>0,05$). Ancak hem hücrelerde hem de eksozomlarda hedef miRNA’ların tamamının kendi içinde korelasyon gösterdiği belirlendi ($p<0,05$). Bu durum AML hücrelerinde hedef tüm miRNA’ların ifadelerinin düzensizleştiğinin kanıtı olabilir. Ancak eksozom biyogenezi sırasında bu miRNA’lar ifade edildikleri düzeyde paketlenememiş olabilir (Dezhakam vd., 2023). Öte yandan eksozomlardaki miRNA ifadelerinin kendi içinde korelasyon göstermesi ancak hücrelerle uyumlu olmaması eksozom sayılarının çok fazla olması ve çok heterojen bir yapıda olmalarıyla ilişkili olabilir. Ayrıca örneklem sayısının azlığı ve AML hastalarının çeşitliliği sonuçların güvenilirliğini etkileyebilir.

Hastalarda hücrel ve eksozomal miRNA-21, miRNA-335 ve miRNA-370 arasındaki ifade düzeyleri arasında anlamlı farklılık bulundu (sırasıyla, $p=0,003$, $p=0,023$ ve $p=0,007$). Bu miRNA’ların hücrelerde ve eksozomlarda farklı ifade

seviyelerine sahip olması literatürde daha önce incelenmemiş bir durumdur. Daha fazla sayıda AML hasta hücresi ve eksozomu ile daha geniş çalışmalara ihtiyaç vardır. miRNA-124 ve miRNA-126'nın hasta ve kontroller arasında ifade farklılıkları veya korelasyon durumu daha geniş hasta kohortlarıyla netleşebilir. Çünkü kanserli hastaların plazmasında biriken eksozomlar, tümör hücre kaynaklıdır (Boyiadzis ve diğ,2016). Bu nedenle eksozomların AML hücre miRNA profilini ne kadar yansıttığı teşhis, tedavi seçimi ve prognoz tahmini açısından önemlidir.

Hastalarda eksozomal miRNA'ların sağkalım ile ilişkisi Kaplan Meier yöntemi ile analiz edildi. miRNA-126 ve miRNA-335 sağkalım ile ilişkili bulundu. Kaplan Meier analizine göre takip süresi olan 14 ay boyunca miRNA-126 ifadesinin düşük olduğu grupta % 100 iken, miRNA-126 ifadesinin medyan değerden yüksek olduğu grupta 22 ± 1 'dir. miRNA-126'nın yüksek ifadesi kötü prognoz ve düşük sağkalımla ilişkilidir. Bulgularımız bu bakımdan literatürle uyumludur (Liao ve diğ 2017). On dört aylık takip süresi boyunca miRNA-335 ifadesinin düşük olduğu grup için sağkalım 18 ± 1 'dir. miRNA-335 ifadesinin yüksek olduğu grupta ise sağkalım 50 ± 2 'dir. Bu durum miRNA-335 düşük ifadesinin AML'de kötü prognoz ve düşük sağkalımla ilişkili olabileceğini gösterdi. Literatürde de relaps görülen hastaların görülmeyenlere göre, ilaca dirençli hastaların ilaca duyarlı hastalara göre daha düşük miRNA-335-3p seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir (Barrios-Palacios ve diğ. 2023). Bu açıdan sonuçlarımız daha önceki bilimsel çalışmalarla uyumlu olup eksozomal miRNA-335'in potansiyel bir prognoz belirteci olabileceğini düşündürmektedir.

Hastalarla ilgili eksozomal miRNA analizlerinin sonuçlarından faydalanılarak hücre soylarında miRNA modülasyonlarının hücre canlılığıyla ilişkisinin incelenmesi amaçlandı. Öncelikle NB4, HL60 ve THP1 AML hücre soyları ile kontrol hücresi olarak HEK 293T'nin hücresel ve eksozomal miRNA ifade analizleri yapıldı. Hücresel ve eksozomal miRNA'ların ifade düzeyleri Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı ve miRNA-21, miRNA-335 ve miRNA-370 ifadesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (sırasıyla, $p=0,043$, $p=0,021$ ve $p=0,022$). Bu sonuçlar hastalarda eksozomal ve hücresel miRNA ifadelerinin analizinin sonuçlarını gösteren Tablo 4.3.11. ile de uyumludur. Ancak hücre soylarında bu analizi yaparken sağlıklı hücre olan HEK 293T'nin dışlanması gerekmektedir. HEK 293T dışlandığında

hücresel ve eksozomal miRNA'lar açısından miRNA-335 ve miRNA-370'te anlamlı farklılığın devam ettiği tespit edildi (sırasıyla, $p=0,05$, $p=0,05$). Hücrelerdeki miRNA-335 ve miRNA-370 ifadeleri ortalamaları eksozomal miRNA ifade ortalamalarından fazladır. Bu sonuçlar hastalardaki hücresel ve eksozomal miRNA verileriyle uyumluluk göstermemektedir. Hastalarda eksozomal miRNA-335 ve miRNA-370 hücresel miRNA'lardan anlamlı derecede yüksek iken hücre soylarında bu durum tam tersi olarak belirlendi. Bu durum hasta kanlarından izole edilen eksozomların bolluğu ve üretildikleri hücrelerin çeşitliliğinden kaynaklanıyor olabilir. Hasta ve hücre soylarından izole edilen eksozomları miktar bakımından eşitlemek daha güvenilir sonuçlar alınmasına olanak tanıyacaktır.

AML hücre soylarında ve eksozomlarda hedef miRNA ifadelerinin kontrol hücre olan HEK 293T ile karşılaştırılması $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile kat değişimi olarak verildi. Kontrole göre NB4 hücrelerinde miRNA-124'ün 0,09 kat azaldığı, diğer hücresel miRNA'ların kontrol hücreye göre ifadesinin arttığı belirlendi. Ancak NB4 hücre soylarının eksozomal miRNA ifadelerinde kontrole göre miRNA-124'ün 2,5 kat arttığı ve miRNA-335'in ise 0,62 kat azaldığı tespit edildi. HL60 hücrelerinde hücresel miRNA-21, miRNA-126 ve miRNA-335 ifadesinin kontrole göre arttığı, miRNA-124 ve miRNA-370 ifadesinin ise kontrole göre daha düşük seviyede olduğu tespit edildi. Hücrelerde ortalama miRNA-21 ve miRNA-126 ifadesinin kontrole göre çok yüksek düzeyde olduğu belirlendi. HL60 eksozomlarında ise bütün miRNA'ların ifadeleri kontrole göre artmış düzeyde bulundu. En belirgin artış 18,89 kat ile miRNA-126'da görüldü. THP1 hücre soylarının hücresel miRNA ifadeleri tüm incelenen miRNA'lar için kontrole göre düşük seviyede bulundu. THP1 kökenli eksozomlarda ise sadece miRNA-126'nın 2,5 katlık bir artış gösterdiği tespit edildi. Ayrıca tüm hücrelerde hücresel ve eksozomal miRNA'lar Spearman korelasyon testi ile analiz edildi. Ancak istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı ($p>0,05$).

Hastalarda sağkalımla ilişkili olduğu tespit edilen miRNA-126 ve bir tümör baskılayıcı olan miRNA-124, hücre soylarında mimik ve inhibitörler kullanılarak modüle edildi. NB4, HL60 ve HEK 293 T hücreleri 48 saat süresince miRNA-124 mimik ve miRNA-126 inhibitör uygulamasına maruz bırakıldı. miRNA-124 ifadesinin mimik uygulaması ile artırılması ve miRNA-126 ifadesinin ise inhibitör uygulamasıyla geçici olarak susturulması hedeflendi. NB4 ve HL60 eksozomal

miRNA ifadesi açısından hastalarla daha uyumlu olduğu için çalışmaya bu hücrelerle devam edildi. Ancak THP1 hücresi ileri çalışmalarda değerlendirilecektir.

Geçici aşırı ifade ve susturmanın başarılı olup olmadığı RT-qPCR ile analiz edildi. miRNA ifadeleri U6 referans gene göre normalize edildi. Daha sonra mimik ve inhibitör uygulanan gruplardaki miRNA ifadesi ile hiçbir uygulama yapılmamış kontrol hücrelerindeki miRNA arasındaki kat değişimini belirlemek için grupların $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri hesaplandı. miRNA-124 mimik uygulanan NB4 hücrelerinde miRNA-124 ifadesinin 329 katlık bir artış gösterdiği tespit edildi. Literatürde bu şekilde mimik uygulaması ile birkaç yüz kat arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Jin ve diğ 2015). HL60 hücrelerinde ise mimik transfeksiyonu sonrasında miRNA -124 ifadesi kontrole göre 45 kat artmıştır. HEK 293 T’de ise artış 3,4 kattır. Mimik uygulaması ile tüm hücrelerde miRNA-124 ifadesinin arttığı tespit edildi. Mimik transfeksiyonunun başarılı olduğu gösterildi. miRNA-126 inhibitör uygulaması sonucunda ise miRNA-126 ifadesinin NB4 hücrelerinde 0,48 kat, HL60 hücreleri 0,04 ve HEK 293 T hücreleri ise 0,36 kat azaldığı tespit edildi. İnhibitör uygulaması sonucu tüm hücre soylarında baskılanma oranı % 50’den fazla olduğu ve miRNA-126 inhibitörü ile baskılanmanın başarılı olduğu değerlendirildi. NB4, HL60 ve HEK 293T hücrelerin sağkalım analizi CCK8 (WST-8) yöntemi ile gerçekleştirildi. Mimik ve inhibitör uygulaması yapılan gruplar hiçbir uygulama yapılmamış kontrol gruba göre normalize edildi. 48 saatlik uygulama sonucunda hücre canlılık sonuçlarına göre, miRNA-124 mimik uygulaması sonucunda NB4 hücre soyunda %42 ve HL60 hücre soyunda ise %41 canlılık belirlendi. HEK 293T hücrelerinde %300’lük bir artış belirlendi. Sonuçlar miRNA-124’ün uygulamasının AML’de tedavi amacıyla kullanılabileceği görüşümüzle uyumluluk göstermektedir. Çünkü AML hücre soylarında bir tümör baskılayıcı olan miRNA-124’ün aşırı ifadesi hücrelerde canlılığın azalmasına neden oldu ancak kontrol hücrede canlılık arttı. Bu da tümör mikroçevresine miRNA-124 uygulamasının seçilimli olarak AML hücrelerini öldürebileceğini gösterebilir. Ancak bununla ilgili çok sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır. Çalışmalarda miRNA-124 çeşitli kanserlerde tümör baskılayıcı bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak bazı çalışmalar, miRNA-124’ün otofaji ve çoklu ilaç direnci gibi onkogenik süreçlerde de ikili bir rolü olduğunu göstermiştir. miR124 kanserli ve kanserli olmayan hücrelerde apoptozu da düzenler (Moghadası ve diğ. 2020; Schouten ve diğ. 2015). miRNA-124,

yeni tedavi stratejileri tasarlamak amacıyla iyi bir hedef olarak düşünülebilir. miRNA-124 AML ve sağlıklı hücreleri apoptoz açısından farklı yönlendiriyor olabilir. Ama dirençli ve duyarlı hücre tiplerini belirlemek ve AML alt sınıflarındaki etkinliğini araştırmak gerekmektedir. miRNA-126 inhibitör uygulanan grupta ise canlılık NB4 te %54'e HL60'ta ise %44'e düştü. HEK 293T'de %175'lik bir artış gözlemlendi. Bu durum da bir onkogenik miRNA olarak miRNA-126 baskılanmasından beklediğimiz bir sonuçtu. Bu, miRNA-126'nın da AML hücrelerini seçilimli olarak öldürebileceğini göstermektedir. Ancak AML alt gruplarını temsil eden daha fazla çeşit AML hücre soyu kullanılarak çok sayıda yeni çalışma yapılması hangi AML alt tiplerinde etkili olabileceğiyle ilgili daha güvenilir sonuçlar verebilir. Çalışmalarda miRNA-126'nın hem artmış hem de azalmış ifadeleri, farklı kanser evreleri ve bunların tedavi yanıtları için referans görevi görebileceği bildirilmiştir. Örneğin megakaryositik lösemi hücre hatlarında miRNA-126 ifadesi artarken, farklılaşmış megakaryositlerde ve CD34+ progenitör hücrelerde *in vitro* ifadesi azalır (Garzon ve diğ. 2006). Ayrıca miR-126'nın hem aşırı ifadesinin hem de susturulmasının lökomogenezi teşvik ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Li ve diğ. 2015). Bu bağlamda miRNA-126'nın farklı AML alt tiplerinde susturularak sonuçların değerlendirilmesi önem kazanmaktadır.

Mimik ve inhibitör uygulaması sonucu RT-qPCR sonuçlarıyla CCK8 canlılık analizi sonuçları karşılaştırıldı. Mimik uygulanan gruplarda miRNA-124 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin NB4'te 329 kat, HL60'ta 45 kat arttığı, HEK 293T'de ise bu artışın 3,43 kat olduğu belirlendi. NB4 ve HL60 hücre soylarında canlılık düşerken (sırasıyla 0,42 ve 0,41) HEK 293T'de canlılığın 3 kat arttığı tespit edildi. İnhibitör uygulanan gruplarda ise miRNA-126 ifadesinin NB4'te 0,48 kat, HL60'ta 0,044 kat azaldığı, HEK 293T'de ise 0,36 katlık bir azalma olduğu belirlendi. Buna karşın NB4 ve HL60 hücrelerinde canlılıkta azalma görüldü (sırasıyla 0,5 ve 0,4). HEK 293T hücrelerinde ise 1,75 kat artış tespit edildi. Veriler hücrelerde gerçekleştirilen miRNA modülasyonlarıyla hücre canlılığı arasında ilişki olduğunu ve bu ilişkinin AML hücre soylarında canlılığı azaltıcı yönde, kontrol hücre soyunda ise canlılığı arttırıcı yönde olduğu gösterildi. Sonuçlar bu bağlamda beklendiği gibidir. miRNA-124 ve miRNA-126'nın AML'de hem tanı anında sınıflandırmada hem de tedavide etkili olabileceğine dair görüşümüzle paraleldir. Bununla birlikte daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak çalışmamızda, eksozomal miRNA'ların hastalarda sağlıklı kontrollere göre farklı ifade profilleri sergilediği gösterildi. Literatürde daha önce de AML ile prognostik ilişkisi araştırılmış olan miRNA'ların eksozomal olarak da AML hastalarında farklılık gösterdiği ve tanı, tedavi seçim ve prognoz için biyobelirteç olarak kullanılabilirliği düşüncesi desteklendi. Çalışmamız miRNA hedefli tedavilerin araştırılması için ön çalışma niteliğindedir. Yeni ve daha ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akut miyeloid lösemi (AML), kemik iliğindeki olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin kontrolsüz büyümesinden kaynaklanan agresif ve yüksek bir ölüm oranına sahip bir kanserdir. Çok heterojen bir malignite olan AML’de klasik parametreler doğru ve hızlı tedavi seçimi için yeterli olmayabilir. Bu nedenle yeni tanı, tedavi seçimi ve prognoz belirteçlerine ihtiyaç vardır. Bu tez çalışmasında AML hastalarının plazmalarındaki eksozomların taşıdıkları miRNA’ların biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyeli araştırıldı. Hasta ve sağlıklı kontrollerde eksozomal miRNA’ların hastalarda farklı ifade profili sergilediği gösterildi. Bu hedef miRNA’ların bazılarının sağkalım ile ilişkili olduğu gösterildi. Özellikle literatürde daha önce de AML ile prognostik ilişkisi araştırılmış olan, ancak eksozomlardaki durumu bilinmeyen miRNA’ların, eksozomal olarak da AML hastalarında farklılık gösterdiği ve bu durumun prognostik önemi olabileceği düşüncesi desteklendi. Ayrıca bazı miRNA’ların AML kökenli eksozomlardaki artış ve azalışında korelasyon görülmesi spesifik AML alt sınıflarıyla ilişkili olabilir ve AML alt sınıflarının erken tespiti için önemli adaylar olarak rol oynayabilir. Eksozomal miRNA’lar, AML tanısından itibaren saatler içinde AML alt grupların belirlenmesini sağlayabilir ve daha hızlı tedavi seçimi için önemli tanısal araçlar olarak değerlendirilebilir. Hastalarda prognostik önemi olduğunu düşündüğümüz miRNA’ların hücre soylarında modülasyonu sonucu AML hücrelerinde canlılığın azalması, kontrol hücrede ise canlılığın artması bu miRNA’ların AML tedavisinde hücre seçilimli tedavi geliştirilmesi için kullanılabileceğini düşündürmektedir. Eksozomlar, nano araçlar olarak belirli miRNA’ları tümör mikroçevresine taşıyabilir ve bu miRNA’lar kanser hücrelerini seçilimli bir biçimde hedefleyebilir. Ancak sonuçları değerlendirebilmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Daha geniş kohortlarla çalışmanın ilerletilmesi bulguların desteklenmesi bakımından önemlidir.

Eksozomal miRNA’ların ilgili oldukları yolak haritaları çıkarılarak yeni tedavi hedefleri belirlenebilir.

AML alt gruplarını temsil eden daha geniş bir hücre hattı paneliyle hedef miRNA'ların hücre canlılığı üzerindeki etkisi araştırılabilir ve yeni tedavi seçenekleri belirlenebilir.

Belirli miRNA'lar bakımından zenginleştirilmiş olan eksozomların bu hücre alt gruplarındaki canlılık üzerindeki etkisi incelenebilir.

Çalışmamız literatürle uyumlu ve alana katkı sağlayacak niteliktedir. Ancak bulguların yeni çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- ALİ, M. M., MOHAMED, R. H., SAYED, A. A., AHMED, S., YASSİN, D. A., EL-SAYED, W. M. 2022. miR-370 is better than miR-375 as a non-invasive diagnostic biomarker for pediatric acute myeloid leukemia patients. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 34: 403–411.
- AMİN, A. H., SHARİFİ, L. M. A., KAKHHAROV, A. J., OPULENCIA, M. J. C., ALSAİKHAN, F., BOKOV, D. O., MAJDİ, H. S., JAWAD, M. A., HAMMİD, A. T., SHALABY, M. N., MUSTAFA, Y. F., SİAHMANSOURİ, H. 2022. Role of Acute Myeloid Leukemia AML-Derived exosomes in tumor progression and survival. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 150:113009.
- ARBER DA, ORAZİ A, HASSERJIAN RP. 2022. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*, 140: 1200-1228.
- B. ZHANG, L. NGUYEN, L. Lİ, D. ZHAO, B. KUMAR, H. WU, A. LİN, F. PELLICANO, L. HOPCROFT, Y.L. SU,. Bone marrow niche trafficking of miR-126 controls the self-renewal of leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia *Nat. Med.*, 2018, 24: 450-462.
- BARRİOS-PALACİOS, D., ORGANİSTA-NAVA, J., BALANDRÁN, J. C., ALARCÓN-ROMERO, L. D. C., ZUBİLLAGA-GUERRERO, M. I., ILLADES-AGUIAR, B., RİVAS-ALARCÓN, A. A., DÍAZ-LUCAS, J. J., GÓMEZ-GÓMEZ, Y., LEYVA-VÁZQUEZ, M. A. 2023. The Role of miRNAs in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Relapse and the Associated Molecular Mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 251, 119.
- BOYİADZİS, M., & WHİTESİDE, T. L. 2016. Plasma-derived exosomes in acute myeloid leukemia for detection of minimal residual disease: are we ready?. *Expert review of molecular diagnostics*, 166: 623–629.
- BRAY, F., LAVERSANNE, M., SUNG, H., FERLAY, J., SİEGEL, R. L., SOERJOMATARAM, I., & JEMAL, A. 2024. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 743:229–263.
- BUGA CORBU, V., GLÜCK, A., & ARİON, C. 2014. Actual biological diagnosis of acute myeloblastic leukemia in children. *Journal of medicine and life*, 72, 291–295.
- CHEN, X. X., LIN, J., QIAN, J., QIAN, W., YANG, J., MA, J. C., DENG, Z. Q., XIE, D., AN, C., TANG, C. Y., QIAN, Z. 2014. Dysregulation of miR-124-1 predicts

- favorable prognosis in acute myeloid leukemia. *CLINICAL BIOCHEMISTRY*, 47: 63–66.
- CHENG, Y., SHEN, P. 2020. miR-335 acts as a tumor suppressor and enhances ionizing radiation-induced tumor regression by targeting ROCK1. *FRONT ONCOL*, 10: 278.
- CHENG, D., JIAN, J., XING, C., LIU, Y., LIU, C., CUI, Z., LI, S., WANG, R., LI, X., MA, X. 2023. Circulating cardiac MicroRNAs safeguard against dilated cardiomyopathy. *CLIN. TRANSL. MED.*, 13, e1258.
- CHENNAMADHAVUNI, A., IYENGAR, V., MUKKAMALLA, S. K. R., SHIMANOVSKY, A. 2023. Leukemia. [Updated 2023 Jan 17]. In *STATPEARLS [INTERNET]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- COELHO, M. O., QUINTAS, S. T., SARMENTO, B., DE WEVER, O., CASTRO, F. 2025. Engineered dendritic cells-derived extracellular vesicles for cancer immunotherapy. *JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE*, 381: 113620.
- DE VISSER, K. E., JOYCE, J. A. 2023. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *CANCER CELL*, 41: 374–403.
- DEZHAKAM, E., KHALILZADEH, B., MAHDIPOUR, M., ISILDAK, I., YOUSEFI, H., AHMADI, M., NASERI, A., RAHBARGHAZI, R. 2023. Electrochemical biosensors in exosome analysis; a short journey to the present and future trends in early-stage evaluation of cancers. *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, 222: 114980.
- DOHNER, H., WEI, A. H., APPELBAUM, F. R., CRADDOCK, C., DINARDO, C. D., DOMBRET, H., EBERT, B. L., FENAUX, P., GODLEY, L. A., & HASSERJIAN, R. P. 2022. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *BLOOD*, 140: 1345–1377.
- EDGAR, J. R. 2016. What are exosomes, exactly? *BMC BIOL*, 14:46.
- EGUCHI, T., SHETA, M., FUJII, M., CALDERWOOD, S. K. 2022. Cancer extracellular vesicles, tumoroid models, and tumor microenvironment. *SEMINARS IN CANCER BIOLOGY*, 86Pt 1:112–126.
- FENG, D., ZHAO, W. L., YE, Y. Y., BAI, X. C., LIU, R. Q., CHANG, L. F., ZHOU, Q., SUI, S. F. 2010. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *TRAFFIC COPENHAGEN*, 11: 675–687.
- FERRARA, F., SCHIFFER, C. A. 2013. Acute myeloid leukaemia in adults. *LANCET LONDON*, 381: 484–495.

- FLETCHER, D., BROWN, E., JAVADALA, J., UYSAL-ONGANER, P., GUINN, B. A. 2022. microRNA expression in acute myeloid leukaemia: New targets for therapy?. *EJHAEM*, 3:596–608.
- FU, S., WANG, Y., XIAA, X., ZHENG, J. C. 2020. Exosome engineering: Current progress in cargo loading and targeted delivery. *NANOIMPACT*, 20, Article 100261.
- GARZON, R., PICHIORRI, F., PALUMBO, T., IULIANO, R., CIMMINO, A., AQEILAN, R., VOLINIA, S., BHATT, D., ALDER, H., MARCUCCI, G., CALIN, G. A., LIU, C. G., BLOOMFIELD, C. D., ANDREEFF, M., CROCE, C. M. 2006. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 103: 5078–5083.
- GININI, L., BILLAN, S., FRIDMAN, E., & GIL, Z. 2022. Insight into Extracellular Vesicle-Cell Communication: From Cell Recognition to Intracellular Fate. *CELLS*, 11(9), 1375.
- GOLDMAN, S. L., HASSAN, C., KHUNTE, M., SOLDATENKO, A., JONG, Y., AFSHINNEKOO, E., MASON, C. E. 2019. Epigenetic modifications in acute myeloid leukemia: Prognosis, treatment, and heterogeneity. *FRONTIERS IN GENETICS*, 10: 133.
- GUO, B., GU, J., ZHUANG, T. 2025. MicroRNA-126: From biology to therapeutics. *BIOMED PHARMACOTHER*, 185:117953.
- GURUNG, S., PEROCHEAU, D., TOURAMANIDOU, L., & BARUTEAU, J. 2021. The exosome journey: From biogenesis to uptake and intracellular signalling. *CELL COMMUNICATION AND SIGNALING: CCS*, 19: 47.
- HANAHAN, D. 2022. Hallmarks of cancer: New dimensions. *CANCER DISCOVERY*, 12:31–46.
- HANAHAN, D., & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *CELL*, 100: 57–70.
- HENNE, W. M., BUCHKOVICH, N. J.EMR, S. D. 2011. The ESCRT pathway. *DEVELOPMENTAL CELL*, 21: 77–91.
- HONG, C, S., Funk, S., Muller, L., Boyiadzis, M., & Whiteside, T. L. (2016). Isolation of biologically active and morphologically intact exosomes from plasma of patients with cancer. *JOURNAL OF EXTRACELLULAR VESICLES*, 5, 29289.
- [<https://med.stanford.edu/majetilab.html>]
- [<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>]

- JAGANNATHAN-BOGDAN, M., & ZON, L. I. 2013. Hematopoiesis. *DEVELOPMENT*, 140: 2463–2467.
- JEPPESEN, D. K., FENIX, A. M., FRANKLIN, J. L., HIGGINBOTHAM, J. N., ZHANG, Q., ZIMMERMAN, L. J., LIEBLER, D. C., PING, J., LIU, Q., EVANS, R., FISSELL, W. H., PATTON, J. G., ROME, L. H., BURNETTE, D. T., & COFFEY, R. J. 2019. Reassessment of exosome composition. *CELL*, 177: 428–445.e18.
- JIN, H. Y., GONZALEZ-MARTIN, A., MILETIC, A. V., LAI, M., KNIGHT, S., SABOURI-GHOMI, M., HEAD, S. R., MACAULEY, M. S., RICKERT, R. C., & XIAO, C. 2015. Transfection of microRNA mimics should be used with caution. *FRONTIERS IN GENETICS*, 6: 340.
- JONAS, S., & IZAURRALDE, E. 2015. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *NATURE REVIEWS GENETICS*, 16: 421–433.
- YAKIMCHUK, K. J. M. M., KANTARJIAN, H., KADIA, T., DINARDO, C., DAVER, N., BORTHAKUR, G., JABBOUR, E., GARCIA-MANERO, G., KONOPLEVA, M., & RAVANDI, F. 2021. Acute myeloid leukemia: Current progress and future directions. *BLOOD CANCER JOURNAL*, 11: 41.
- KHOURY, J. D., SOLARY, E., ABLA, O., AKKARI, Y., ALAGGIO, R., APPERLEY, J. F., BEJAR, R., BERTI, E., BUSQUE, L., CHAN, J. K. C., ... HOCHHAUS, A. 2022. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. *LEUKEMIA*, 36: 1703–1719.
- KHWAJA, A., BJORKHOLM, M., GALE, R. E., LEVINE, R. L., JORDAN, C. T., EHNINGER, G., BLOOMFIELD, C. D., ESTEY, E., BURNETT, A., ... LINCH, D. C. 2016. Acute myeloid leukaemia. *NATURE REVIEWS DISEASE PRIMERS*, 2: 16010.
- KIM, H., LEE, Y. Y., & KIM, V. N. 2025. The biogenesis and regulation of animal microRNAs. *NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY*, 26: 276–296.
- KISHTAGARI, A., LEVINE, R. L., & VINY, A. D. 2020. Driver mutations in acute myeloid leukemia. *CURRENT OPINION IN HEMATOLOGY*, 27: 49–57.
- KONOSHENKO, M. Y., LEKCHNOV, E. A., VLASSOV, A. V., & LAKTIONOV, P. P. 2018. Isolation of extracellular vesicles: General methodologies and latest trends. *BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL*, 2018: 8545347.
- KOWAL, J., TKACH, M., & THÉRY, C. 2014. Biogenesis and secretion of exosomes. *CURRENT OPINION IN CELL BIOLOGY*, 29: 116–125.

- KOZOMARA, A., BIRGAOANU, M., & GRIFFITHS-JONES, S. 2019. miRBase: From microRNA sequences to function. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, 47: D155–D162.
- KUMAR, C. C. 2011. Genetic abnormalities and challenges in the treatment of acute myeloid leukemia. *GENES & CANCER*, 2: 95–107.
- KUMARSWAMY, R., VOLKMANN, I., & THUM, T. 2011. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA BIOLOGY*, 8: 706–713.
- LANE, S. W., SCADDEN, D. T., & GILLILAND, D. G. 2009. The leukemic stem cell niche: Current concepts and therapeutic opportunities. *BLOOD*, 114: 1150–1157.
- LEE, Y. S., & DUTTA, A. 2009. MicroRNAs in cancer. *ANNUAL REVIEW OF PATHOLOGY*, 4: 199–227.
- LEHMANN, U., HASEMEIER, B., & CHRISTGEN, M. 2008. Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *JOURNAL OF PATHOLOGY*, 214: 17–24.
- LI, C., GE, Q., LIU, J., ZHANG, Q., WANG, C., CUI, K., CHEN, Z. 2017. Effects of miR-1236-3p and miR-370-5p on activation of p21 in various tumors and its inhibition on the growth of lung cancer cells. *TUMOUR BIOL*, 39: 1010428317710824.
- LI, Z., CHEN, P., SU, R. 2015. Overexpression and knockout of miR-126 both promote leukemogenesis. *BLOOD*, 126: 2005–2015.
- LI, L., MUSSACK, V., GÖRGENS, A., PEPELDJIYSKA, E., HARTZ, A. S., ASLAN, H., RACKL, E., RANK, A., SCHMOHL, J., EL ANDALOUSSI, S., PFAFFL, M. W., SCHMETZER, H. 2023. The potential role of serum extracellular vesicle derived small RNAs in AML research as non-invasive biomarker. *NANOSCALE ADVANCES*, 5: 1691–1705.
- LI, Q., WANG, M., LIU, L. 2023. The role of exosomes in the stemness maintenance and progression of acute myeloid leukemia. *BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY*, 212: 115539.
- LIU, Y., HUANG, X., TIMANI, K. A., BROXMEYER, H. E., HE, J. J. 2015. MicroRNA-124 targets Tip110 expression and regulates hematopoiesis. *STEM CELLS DEV*, 24: 2009–2017.
- LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-Delta Delta CT Method. *METHODS SAN DIEGO*, 25: 402–408.

- LUO, H. T., ZHENG, Y. Y., TANG, J. 2021. Dissecting the multi-omics atlas of the exosomes released by human lung adenocarcinoma stem-like cells. *NPJ GENOMIC MEDICINE*, 6: 48.
- MATER. METHODS. 2015. 5: 1450–1453.
- MATHIVANAN, S., FAHNER, C. J., REID, G. E., SIMPSON, R. J. 2012. ExoCarta 2012: Database of exosomal proteins, RNA and lipids. *NUCLEIC ACIDS RES*, 40: D1241–D1244.
- MCKELVEY, K. J., POWELL, K. L., ASHTON, A. W., MORRIS, J. M., MCCracken, S. A. 2015. Exosomes: Mechanisms of uptake. *JOURNAL OF CIRCULATING BIOMARKERS*, 4: 7.
- MENDES, M., MONTEIRO, A. C., NETO, E., BARRIAS, C. C., SOBRINHO-SIMÕES, M. A., DUARTE, D., CAIRES, H. R. 2024. Transforming the niche: The emerging role of extracellular vesicles in acute myeloid leukaemia progression. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, 25: 4430.
- MEUNIER, J., LEMOINE, F., SOUMILLON, M., LIECHTI, A., WEIER, M., GUSCHANSKI, K., HU, H., KHAITOVICH, P., KAESSMANN, H. 2013. Birth and expression evolution of mammalian microRNA genes. *GENOME RESEARCH*, 23: 34–45.
- MOGHADASI, M., ALIVAND, M., FARDI, M., MOGHADAM, K. S., SOLALI, S. 2020. Emerging molecular functions of microRNA-124: Cancer pathology and therapeutic implications. *PATHOL RES PRACT*, 216: 152827.
- MOUSSA AGHA, D., ROUAS, R., NAJAR, M., BOUHTIT, F., FAYYAD-KAZAN, H., LAGNEAUX, L. 2020. Impact of bone marrow miR-21 expression on acute myeloid leukemia T lymphocyte fragility and dysfunction. *CELLS*, 9: 2053.
- NALDINI, M. M., CASIRATI, G., BARCELLA, M. 2023. Longitudinal single-cell profiling of chemotherapy response in acute myeloid leukemia. *NAT COMMUN*, 14: 1285.
- O'BRIEN, J., HAYDER, H., ZAYED, Y., PENG, C. 2018. Overview of MicroRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *FRONTIERS IN ENDOCRINOLOGY*, 9: 402.
- OGAWA, S. 2019. Genetics of MDS. *BLOOD*, 133: 1049–1059.
- O'REILLY, E., ZEINABAD, H. A., SZEGEZDI, E. 2021. Hematopoietic versus leukemic stem cell quiescence: Challenges and therapeutic opportunities. *BLOOD REV*, 50: 100850.

- PASCAL, J. M. 2018. The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage. *DNA REPAIR AMST*, 71: 177–182.
- PENDLETON, M., LINDSEY, R. H., FELIX, C. A., GRIMWADE, D., OSHEROFF, N. 2014. Topoisomerase II and leukemia. *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES*, 1310: 98–110.
- RANA, S., MALINOWSKA, K., ZOLLER, M. 2013. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *NEOPLASIA*, 15: 281–295.
- RAPOSO, G., STOORVOGEL, W. 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *JOURNAL OF CELL BIOLOGY*, 200: 373–383.
- SCOTT, G. K., MATTIE, M. D., BERGER, C. E., BENZ, S. C., BENZ, C. C. 2006. Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *CANCER RES*, 66: 1277–1281.
- SEITER, K., HARRIS, J. E. 2011. Acute myeloid leukemia staging. *RETRIEVED 26 AUGUST 2011*.
- SHAH, M. Y., CALIN, G. A. 2014. MicroRNAs as therapeutic targets in human cancers. *WILEY INTERDISCIPLIN REV RNA*, 5: 537–548.
- SHALLIS, R. M., WANG, R., DAVIDOFF, A., MA, X., ZEIDAN, A. M. 2019. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *BLOOD REV*, 36: 70–87.
- SHANG, R., LEE, S., SENAVIRATHNE, G., LAI, E. C. 2023. microRNAs in action: Biogenesis, function and regulation. *NATURE REVIEWS GENETICS*, 24: 816–833.
- SHETA, M., TAHA, E. A., LU, Y., EGUCHI, T. 2023. Extracellular vesicles: New classification and tumor immunosuppression. *BIOLOGY*, 12: 110.
- TAGAWA, H., SETO, M. 2005. A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *LEUKEMIA*, 19: 2013–2016.
- TANAKA, T. N., BEJAR, R. 2019. MDS overlap disorders and diagnostic boundaries. *BLOOD*, 133: 1086–1095.
- TEBBI, C. K. 2021. Etiology of acute leukemia: A review. *CANCERS*, 13: 2256.
- THERY, C., OSTROWSKI, M., SEGURA, E. 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *NAT REV IMMUNOL*, 9: 581–593.
- VANDEWALLE, V., ESSAGHIR, A., BOLLAERT, E. 2021. miR-15a-5p and miR-21-5p contribute to chemoresistance in cytogenetically normal acute myeloid leukaemia by targeting PDCD4, ARL2 and BTG2. *J CELL MOL MED*, 25: 575–585.

- VIENBERG, S., GEIGER, J., MADSEN, S., DALGAARD, L. T. 2017. MicroRNAs in metabolism. *ACTA PHYSIOLOGICA OXFORD*, 219: 346–361.
- VILLARROYA-BELTRI, C., BAIXAULI, F., GUTIERREZ-VAZQUEZ, C., SANCHEZ-MADRID, F., MITTELBRUNN, M. 2014. Sorting it out: Regulation of exosome loading. *SEMIN CANCER BIOL*, 28: 3–13.
- WANG, J., LI, F., MA, Z., YU, M., GUO, Q., HUANG, J. 2018. High expression of TET1 predicts poor survival in cytogenetically normal acute myeloid leukemia from two cohorts. *EBIOMEDICINE*, 28: 90–96.
- WANG, J., WANG, P., ZHANG, T., GAO, Z., WANG, J., FENG, M. 2019. Molecular mechanisms for stemness maintenance of acute myeloid leukemia stem cells. *BLOOD SCI*, 1: 77–83.
- WANG, J., WU, F., LIU, C., DAI, W., TENG, Y., SU, W., KONG, W., GAO, F., CAI, L., HOU, A., & JIANG, C. 2019. Exosomes Released from Rabies Virus-Infected Cells May be Involved in the Infection Process. *VIROLOGICA SINICA*, 34(1), 59–65.
- WEI, J., WANG, F., KONG, L. Y., XU, S., DOUCETTE, T., FERGUSON, S. D., YANG, Y., MCENERY, K., JETHWA, K., GJYSHI, O., QIAO, W., LEVINE, N. B., LANG, F. F., RAO, G., FULLER, G. N., CALIN, G. A., HEIMBERGER, A. B. 2013. miR-124 inhibits STAT3 signaling to enhance T cell-mediated immune clearance of glioma. *CANCER RESEARCH*, 73: 3913–3926.
- WELSH, J. A., GOBERDHAN, D. C. I., O'DRISCOLL, L., BUZAS, E. I., BLENKIRON, C., BUSSOLATI, B., CAI, H., DI VIZIO, D., DRIEDONKS, T. A. P., ERDBRÜGGER, U., FALCON-PEREZ, J. M., FU, Q. L., HILL, A. F., LENASSI, M., LIM, S. K., MAHONEY, M. G., MOHANTY, S., MÖLLER, A., NIEUWLAND, R., OCHIYA, T., ... WITWER, K. W. 2024. Minimal information for studies of extracellular vesicles MISEV2023: From basic to advanced approaches. *J EXTRACELLULAR VESICLES*, 13: e12404.
- WIGHTMAN, B., HA, I., RUVKUN, G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *CELL*, 75: 855–862.
- YANG, Y., WANG, X. L., YUE, Y. X., CHEN, G., XIA, H. F. 2025. TSG101 overexpression enhances metastasis in oral squamous cell carcinoma through cell cycle regulation. *CELLULAR SIGNALLING*, 125: 111519.
- YE, L., WANG, F., WU, H., YANG, H., YANG, Y., MA, Y., XUE, A., ZHU, J., CHEN, M., WANG, J., ZHANG, Q. A. 2021. Functions and targets of miR-335 in cancer. *ONCOTARGETS AND THERAPY*, 14: 3335–3349.

- YE, L., WANG, J., YI, K., WANG, F., WANG, J., WU, H., YANG, H., YANG, Z., ZHANG, Q. 2023. Recent findings on miR-370 expression, regulation and functions in cancer. *ONCOLOGY REPORTS*, 49: 79.
- YOU, Y., SHAN, Y., CHEN, J., YUE, H., YOU, B., SHI, S., LI, X., CAO, X. 2015. Matrix metalloproteinase 13-containing exosomes promote nasopharyngeal carcinoma metastasis. *CANCER SCIENCE*, 106: 1669–1677.
- YOUSEFNIA, S., NEGAHDARY, M. 2024. Diagnostic application of aptamers against leukemia, multiple myeloma and lymphoma: A review. *JOURNAL OF DRUG DELIVERY SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 2024.
- ZHANG, L., WANG, X., WU, J., XIAO, R., LIU, J. 2021. MiR-335-3p inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest and apoptosis in acute myeloid leukemia by targeting EIF3E. *BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY*, 85: 1953–1961.
- ZHANG, L., YU, D. 2019. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA REV CANCER*, 1871: 455–468.



EKLER

EK 1- Etik Kurul Onayı



TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
GİRÜŞİMSSEL ÖLMİYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU



BAYVURU BİLGİLERİ	Araştırmanın Açık Adı	Akut Miyeloid Lösemide Eksozon Kökenli MikroRNA'ların Araştırılması		
	Koordinatör / Sorumlu Araştırmacı	Doç. Dr. Bahadır Bataz / TNKÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji		
	Etik Kurul Toplantı Tarihi	23.06.2023		
	Araştırma Protokol Numarası	2023.321.06.07		
	Araştırmanın Türü	Prospektif ☒	Retrospektif ☐	Diğer: ☐
	Araştırmanın Destekleyicisi	TÜBİTAK ☐	TNKÜ BAP ☒	Araştırmacı ☐ Diğer: ☐
	Araştırmanın Bölgesi	117667 A		
	Araştırmanın Merkezi	Tek Merkezli ☒	Çok Merkezli ☐	
KARAR BİLGİLERİ	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereği, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik bilimsel sakınca bulunmadığına, toplantıya katılan etik kurul üye san ayısının oy birliği ile karar verilmiştir.			

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İş ve Biyolojik Ürünlerin Etik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuz
----------------------------	---

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Araştırma ile İlgili	Katılım *	İmza
Prof. Dr. Ali Rıza KIZILIB	Biyofizik	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. M. Melin DONMA	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Savaş GÜZEL	Tıbbi Biyokimya	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Yakup ALBAYRAK	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Sibel ÖZKAN GÖRDAL	Genel Cerrahi	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Ayşin NALBANTOĞLU	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Sonat Pinar KARA	İç Hastalıkları	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Birel TOPÇU	Biyostatistik	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Mahir JAFAROVA DEMİRKAPU	Tıbbi Farmakoloji	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	Katılmadı
Doç. Dr. Berna ERDAL	Tıbbi Mikrobiyoloji	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Mahir Ümit ÇETİN	Ortopedi ve Travmatoloji	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Aliye ÇELİKKOL	Tıbbi Biyokimya	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Zeynep KURTULUŞ TOSUN	İç Hastalıkları Hemşireliği	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr. Öğr. Üyesi Nale Eren SAKA	Adli Tıp	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr. Öğr. Üyesi Ayhan ŞAHİN	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr. Öğr. Üyesi Hilal GÜLGEZEN AYDIN	Prostetik Diş Tedavisi	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

*: Toplantıda bulunma

Etik Kurul Başkanı

Unvanı/Adı/Soyadı:

İmza:

EK 2- ÖZGEÇMİŞ**Doğum Yeri:** İSTANBUL**Bildiği Yabancı Diller:** İngilizce**Uzmanlık Alanı:** Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi, Tıbbi Genetik**EĞİTİMLER**

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi	19..-20..
Y. Lisans	Tıbbi Genetik	İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	20..-20..
Doktora	Tümör Biyolojisi ve İmmünoloji	Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	20..- 20..

KATILDIĞI KONGRELER VE BİLİMSEL TOPLANTILAR

20.. Türkiye	17. Uluslararası Tıp ve Sağlık Bilimleri Kongresi	Ankara
20.. Türkiye	8. Uluslararası Tıp ve Sağlık Bilimleri Kongresi	Ankara
20..	Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi	İstanbul

KATILDIĞI KURSLAR VE ALDIĞI SERTİFİKALAR:

20..	Temel SPSS Kursu İŞTAR Akademi (İzmir)	Online,
20..	Biyoinformatik Kursu İstanbul Üniversitesi	İstanbul
20..	Konfokal Mikroskobu Kullanma Teknikleri Kursu	İstanbul

GÖREV ALDIĞI VE YÜRÜTTÜĞÜ PROJELER:

Görev Unvanı	Proje Bilgileri	Yıl
YÜRÜTÜCÜ	TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) Proje No: 124S471 , Proje Kodu: 1002 - Hızlı Destek Hızlı Destek – B, “Akut Miyeloid Lösemi Hücrelerinde Eksozomal miRNA 126 ve miRNA 124 İfade Düzeylerinin Hücre Sağkalımı Üzerine Etkisinin Araştırılması”	Başlangıç: EYLÜL 20.. Bitiş: Devam ediyor
YÜRÜTÜCÜ	TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) Proje No: 223S280 , Proje Kodu: 1002 - Hızlı Destek Hızlı Destek – A, “Akut Miyeloid Lösemide Eksozom Kökenli Mikrorna'ların Araştırılması”	Başlangıç: EYLÜL 20.. Bitiş: EYLÜL 20..
YÜRÜTÜCÜ	TÜSEB (Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı), Program Kodu: 2022-A3-DR\TUS-03, Proje No: 28726 “Meme Kanserlerinde WWOX ve PD-L1 İlişkisinin Araştırılması “	Başlangıç: EYLÜL 20.. Bitiş: KASIM 20..
ARAŞTIRMACI	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi , Proje No: 26523: “AKUT MİYELOİD LÖSEMİDE SPINK2 GEN EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI”	Başlangıç: 20.. Bitiş: 20..

ESERLER

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

A1. Gezer S, Emrence Z, Elverdi T, et al. **Upregulation of SPINK2 in acute myeloid leukemia.** Adv Lab Med. 2023;4(1):92-104. Published 2023 Feb 20. doi:10.1515/almed-2022-0047

A2. Avcı, Burcu Altındağ; Doğan, Mustafa; Batar, Bahadır; Yildirim, İlker; Serdal, Elif; Gezer, Sümbül; Onar, Çağatay L.; Akpınar, Seval; Turgut, Burhan. **Patients with severe coronavirus disease 2019 have high frequency of factor 5 Leiden and prothrombin gene mutations.** Blood Coagulation & Fibrinolysis 34(1):p 14-19, January 2023. | DOI: 10.1097/MBC.0000000000001167

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:

B1. A comparison of Exosome Isolation by Using Ultracentrifugation and Precipitation- Based Exosome Isolation Kit from Acute Myeloid Leukemia Cell Lines and an AML Case ,17. UTSAK, 2024

B2. SPINK2 Gene Expression in Acute Myeloid Leukemia, 8. UTSAK, 2021

DENEYİM

**20.. - 20..
Tekirdağ, Türkiye**

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarı,

**20..
Kocaeli, Türkiye**

Tübitak Marmara Araştırma Enstitüsü

- CAR T Hücre Tedavi Sistemi, TÜBİTAK MAM,
Moleküler Onkoloji Laboratuvarında misafir araştırmacı

**20..-20
İstanbul, Türkiye**

Genetik 2 Laboratuvarı

- İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Detae ,
Genetik 2 Laboratuvarı