



Diffüz Büyük B-hücreli Lenfoma Patogenezinde Tümör-kökenli Ekzozomların Fonksiyonel Önemi

Program Kodu: 1001

Proje No: 114S442

**Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Vildan CANER**

Araştırmacı(lar):

Gökhan Ozan ÇETİN

Sibel KABUKÇU-HACIOĞLU

Emre TEPELİ

Nilay ŞEN TÜRK

Gülseren BAĞCI

Bursiyer:

İkbal Cansu BARIŞ

**MART 2018
DENİZLİ**

Tümör gelişimi ve progresyonu, kanser hücreleri ve bu hücrelerin yer aldığı mikroçevre arasındaki karşılıklı ilişkiye bağlıdır. Bu ilişki sadece uzaysal etkileşimlere değil, aynı zamanda belli çözünebilir moleküller aracılığı ile kanser hücrelerinin buldukları mikroçevre ile etkileşime girme yeteneklerine bağlıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, eksozomların hücreleri mesajcılar olduklarını ve içerdikleri biyolojik belirteçlerle hücreler arası iletişimde aktif rol oynadıklarını göstermektedir. Bu genel bilgiler doğrultusunda, projemizde (a) Diffüz Büyük B-hücreli Lenfoma (DBBHL) hastalarının ve sağlıklı bireylerin plazma örneklerinde bulunan eksozomların karakterizasyonunu ve miRNA ekspresyon profillerini karşılaştırmayı, (b) DBBHL-kökenli eksozomların normal B-hücrelerine bilgiyi transfer eden araçlar olup olmadıklarını belirlemeyi ve (c) DBBHL tedavisinde, endozom maturasyonunda defekte neden olan bir ajan varlığında standard tedavinin etkinliğini değerlendirmeyi hedefledik.

Projemizde sağlıklı bireyler ve DBBHL hastalarının plazma örneklerinden ultrasantrifügasyon yöntemi ile eksozom izolasyonunu yapıldı. İzolasyonu takiben elektron mikroskopi görüntüleme ve western-blot analizleri ile eksozomların karakterizasyonları tamamlandı. İzole edilen eksozomlarda bulunan miRNA içerikleri, array-tabanlı yöntem kullanılarak belirlendi ve karşılaştırıldı. Lenfoma hücresi ile normal B-hücre arasında eksozom aracılığı iletişimin varlığı, *in vitro* koşullarda oluşturulan ko-kültür modeli ile belirlendi ve transfer edilen özgün miRNA'lar yine array-tabanlı yöntemle identifiye edildi. Son olarak, endozom olgunlaşmasını bloke eden ajan varlığında, DBBHL hücrelerinin standard R-CHOP tedavisine yanıtları, MTT yöntemi ile analiz edildi.

Projemiz, DBBHL hastalarının plazma eksozom özelliklerini tanımlayan ve lenfoma-kökenli eksozomların sağlıklı B-hücreleri tarafından internalize edildikleri ve hedef hücrede miRNA profili özelinde yeni bir programlamaya neden olduğunu belirleyen ilk çalışma olması açısından orijinal nitelikler taşımaktadır. Projemizden elde ettiğimiz ön veriler, DBBHL'da sirkülasyondaki tümör-kökenli eksozomların detaylı moleküler içeriklerinin belirlenmesinin yanısıra fonksiyon çalışmalarının tamamlanmasının, hastalığın patogenezinin ve progresyonunun aydınlatılmasına yönelik önemli katkılar sağlayacağını göstermektedir. Bu yeni çalışmaların verileri de en nihayetinde bu hastalıkla mücadelede yeni hedeflerin de tanımlanmasına öncülük edecektir.

Bu proje, TÜBİTAK - SBAG (Projeno: 114S442) tarafından desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
Tablo Listesi	iii
Şekil Listesi	iv
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
1.GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM	9
3. 1 Çalışma Grubu	9
3.2 Eksozom İzolasyonu.....	11
3.3 İzole Edilen Eksozomların Karakterizasyonu	12
3.4 Eksozomların miRNA Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi	15
3.5. Hücreler Arası Eksozom Transferi İçin Ko-kültür Modeli	16
3.6 Mikroarray Analizlerinin Verifikasyonu	18
3.7. Endozom Maturasyonunda Defekte Neden Olan Ajan Varlığında Standard DBBHL Tedavisinin Etkinliği	18
4. BULGULAR	21
4.1 Sağlıklı Gönüllü Bireyler Ve DBBHL Hastalarının Plazma Örneklerinde Varolan Eksozom Konsantrasyonları	21
4.2 Sağlıklı Gönüllü Bireyler Ve DBBHL Hastalarının Plazma Örneklerinden İzole Edilen Eksozomların Karakterizasyonu	22
4.3 Normal B Hücreleri Ve DBBHL Hücre Hatlarından Eksozom İzolasyonu Ve Karakterizasyonu	25
4.4 DBBHL Hastalarının Plazmalarından İzole Edilen Eksozomlardaki miRNA'ların Tanımlanması	26
4.5 Normal B Hücreleri Ve DBBHL-kökenli Eksozomlardaki miRNA'ların İdentifikasyonu.....	29
4.6 DBBHL Hücre Hatlarında Bafilomisin A1 ve R-CHOP Duyarlılıklarının Belirlenmesi	32
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	37
6. KAYNAKLAR	51



TABLO LİSTESİ

	Sayfa no
Tablo 1. DBBHL olgularına ait demografik veriler	10
Tablo 2. DBBHL hastalarının plazma eksozomlarında down-regüle olan 33 adet miRNA	27
Tablo 3. Down-regüle olan miRNA'ların hedef genleri ve potansiyel olarak etkiledikleri KEGG biyolojik yolları	28
Tablo 4. Pfeiffer hücre hattı-kökenli eksozomlarda normal B hücresi-kökenli eksozomlara göre anlamlı farklılık gösteren miRNA'lar	29
Tablo 5. SU-DHL2, SU-DHL4, U2932 ve U2940 hücre hattı-kökenli eksozomlarda normal B hücresi-kökenli eksozomlara göre anlamlı farklılık gösteren miRNA'lar	29
Tablo 6. Pfeiffer hücre hattı ile ko-kültüre edilen B hücresinde miRNA profili.	30
Tablo 7. SU-DHL2 hücre hattı ile ko-kültüre edilen B hücresinde miRNA profili	30
Tablo 8. SU-DHL4 hücre hattı ile ko-kültüre edilen B hücresinde miRNA profili	31
Tablo 9. U2932 hücre hattı ile ko-kültüre edilen B hücresinde miRNA profili..	31
Tablo 10. U2940 hücre hattı ile ko-kültüre edilen B hücresinde miRNA profili... ..	32

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa no
Şekil 1. Ko-kültür modelinin şematik gösterimi ve uygulaması	17
Şekil 2. Sağlıklı gönüllü bireyler ve DBBHL hastalarının plazma örneklerinden izole edilen eksozom konsantrasyonları	21
Şekil 3. DBBHL hastalarının plazma örneklerinden izole edilen eksozom konsantrasyonlarının klinik verilere göre dağılımları	22
Şekil 4. Sağlıklı gönüllü bireyin plazma örneğinden izole edilen eksozomların STEM (A) ve SEM (B) görüntüleri	22
Şekil 5. DBBHL hastasının plazma örneğinden izole edilen eksozomların STEM (A) ve SEM (B) görüntüleri	23
Şekil 6. Sağlıklı gönüllü bireyler ve DBBHL hastalarının plazma örneklerinden izole edilen eksozomlardaki total protein konsantrasyonları ...	23
Şekil 7. Sağlıklı gönüllü bireylerin (A) ve DBBHL hastalarının (B) plazma örneklerinden izole edilen eksozomlardaki total proteinlerin Coomassie blue ile boyalı örnek SDS-PAGE jel görüntüleri	24
Şekil 8. DBBHL hastalarına ait eksozom konsantrasyonları ve eksozom içeriğinde bulunan protein miktarları	24
Şekil 9. DBBHL hastalarına ait eksozom örneklerinde Western Blot analiz görüntüleri	25
Şekil 10. Sağlıklı gönüllü bireyden izole edilen B-hücre (A) ve DBBHL hücresinden (Pfeiffer hücre hattı) (B) izole edilen eksozomların SEM görüntüleri	25
Şekil 11 Mikroarray çalışmasına ait kalite kontrol (QC) rapor örneği	26
Şekil 12. DBBHL hastalarının plazmalarından izole edilen eksozom örneklerinde mikroarray verilerinin heatmap analizleri	27
Şekil 13. DBBHL hastalarının plazmalarından izole edilen eksozom örneklerinde mikroarray verilerinin hiyerarşik küme analizleri ve dendogram	28
Şekil 14. hsa-miR-3960, hsa-miR-6089, hsa-miR-939-5p, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-595'e ait (A) özgün amplifikasyon eğrileri ve (B) erime eğrisi analizleri	33
Şekil 15. Pfeiffer (yeşil), SU-DHL-2 (mavi) hücre hatlarında hsa-miR-6803-5p'ye ait (A) özgün amplifikasyon eğrileri ve (B) erime eğrisi analizleri	33
Şekil 16. DBBHL hücre hatlarının 24 saatlik R-CHOP duyarlılıkları	34
Şekil 17. DBBHL hücre hatlarının 48 saatlik R-CHOP duyarlılıkları	34



Şekil 18. DBBHL hücre hatlarında farklı konsantrasyonlardaki Bafilomisin A1 ve R-CHOP kombinasyonlarının duyarlılıkları 35



ÖZET

Diffüz Büyük B-hücreli Lenfoma (DBBHL) non-Hodgkin lenfomaların en yaygın gözlenen alt tipidir ve agresif lenfomaların yaklaşık %80'inden fazlasını oluşturmaktadır. DBBHL'nın patogenezinin aydınlatılmasına yönelik hazırlanan bu çalışmamızda, DBBHL hastalarının ve sağlıklı bireylerin plazma eksozom özellikleri karşılaştırılmasının yanısıra DBBHL hücre hatları ile normal B-hücreleri arasındaki eksozomal etkileşim değerlendirildi.

Plazma örneklerinden ultrasantrifügasyon yöntemi ile eksozom izolasyonu yapıldı. İzole edilen eksozomlarda bulunan miRNA içerikleri, array-tabanlı yöntem kullanılarak belirlendi ve karşılaştırıldı. Lenfoma hücresi ile normal B-hücre arasında eksozom aracılığı iletişimin varlığı, *in vitro* koşullarda oluşturulan ko-kültür modeli ile belirlendi ve ko-kültüre edilmiş B-hücrelerindeki özgün miRNA'lar yine array-tabanlı yöntemle tanımlanıp tanımlanmadı. Son olarak, eksozom olgunlaşmasını bloke eden ajan varlığında, DBBHL hücrelerinin standard R-CHOP tedavisine yanıtları, MTT yöntemi ile analiz edildi.

Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldıklarında, DBBHL hastalarının plazma eksozom konsantrasyonlarında anlamlı artış gözlemlendi. Ancak, nodal tutulumlu ve ileri evre DBBHL hastalarının plazma eksozom konsantrasyonlarında anlamlı derecede azalma gözlemlendi. DBBHL hastalarının plazma eksozomlarında 33 adet miRNA'nın ekspresyonunda anlamlı azalma saptandı. Sağlıklı B-hücrelerinin DBBHL-kökenli eksozomları internalize ettikleri ve farklı lenfoma-kökenli eksozomların B-hücrelerinde farklı miRNA ekspresyonlarına neden oldukları belirlendi. Düşük doz Bafilomisin A1 uygulamasının lenfoma hücrelerini R-CHOP tedavisine karşı daha duyarlı hale getirdiği belirlendi.

DBBHL hücrelerinin B-hücrelerle eksozomlar aracılığı ile etkileşime geçtiklerini ve tümör mikroçevresini yeniden programlayabileceklerini düşünmekteyiz. DBBHL-kökenli eksozomlarda ekspresyon farklılığı gösteren miRNA'ların hangilerinin lenfoma-spesifik ve hangilerinin de lenfoma ile ilişkili olduğunun belirlenmesi yönelik fonksiyon çalışmalarına gereksinim vardır. Tüm bu çalışmalardan elde edilecek veriler, DBBHL'nın tanısı ve prognozunu değerlendirilmesinde likit biyopsi olarak plazma eksozom örneklerinin klinik uygulamada kullanılabilirliklerinin anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Diffüz Büyük B-hücreli lenfoma, eksozom, miRNA, B-hücresi, Bafilomisin A1, R-CHOP tedavi



ABSTRACT

Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) is the most common subtype of non- Hodgkin lymphoma, accounting for approximately more than 80% of aggressive lymphomas. In this study, the plasma exosomal characteristics of DLBCL patients and healthy subjects were compared as well as the exosomal interaction between DLBCL cell lines and normal B-cells was evaluated for elucidating disease pathogenesis in DLBCL.

Exosome isolation from plasma were performed with ultracentrifugation. The miRNAs extracted from the isolated exosomes were determined and compared using the array-based miRNA profiling. The presence of exosome-mediated communication between lymphoma cell and normal B-cell was determined by *in vitro* co-culture model and then the miRNAs in co-cultured B-cells were also identified by the array based miRNA profiling. Finally, the responses of DLBCL cells to standard R-CHOP treatment were analyzed by MTT test in the presence of the agent that blocks endosomal maturation.

The concentrations of plasma exosomes were significantly higher in patients with DLBCL compared to healthy controls. However, there was a significant decrease in plasma exosomal concentrations in DLBCL patients with nodal involvement and advanced stage. A total of 33 miRNAs in plasma exosomes of DLBCL patients were significantly decreased compared to that in the plasma exosomes of healthy controls. It was determined that DLBCL-derived exosomes were taken up by healthy B-cell and the different DLBCL-derived exosomes could cause specific miRNA expression profiles in healthy B-cells. It was also determined that low-dose bafilomycin A1 could sensitize DLBCL cells to the cytotoxic effects of R-CHOP.

We thought that DLBCL cells could communicate with B-cells via exosomes and the exosome-based communication could allow to reprogram the tumor microenvironment. Functional studies are needed to identify lymphoma-specific miRNAs and lymphoma-associated miRNAs within the differently expressed miRNAs in DLBCL-derived exosomes. The data obtained from these studies will help to understand of how to realize the clinical application of plasma exosome samples as liquid biopsy in DLBCL diagnosis and prognosis evaluation.

Keywords: Diffuse Large B-cell Lymphoma, exosome, miRNA, B-cell, Bafilomycin A1, R-CHOP treatme



1. GİRİŞ

Tümör gelişimi ve progresyonu, kanser hücreleri ve bu hücrelerin yer aldığı mikroçevre arasındaki karşılıklı ilişkiye bağlıdır. Bu ilişki sadece uzaysal etkileşimlere değil, aynı zamanda belli çözünebilir moleküller aracılığı ile kanser hücrelerinin buldukları mikroçevre ile etkileşime girme yeteneklerine bağlıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, eksozomların hücreleri mesajcıları olduklarını ve içerdikleri biyolojik belirteçlerle hücreler arası iletişimde aktif rol oynadıklarını göstermektedir. Böylece zaman içinde eksozomların “hücrel çöp toplayıcıları” imajı “bilgi taşıyan veziküller” olarak değişmiştir. Normal fizyolojik mekanizmaların kendi lehine çevrildiği kanserde, tümöre yakın veya uzak bölgelere eksozomlar aracılığı ile horizontal bilgi transferi gerçekleşir ve bu durum tümörün gelişimini ve metastazını kolaylaştırır. Eksozomal kargolar, köken aldıkları hücreye benzer moleküler profile sahiptirler ve membran içinde paketlenmiş halde olduklarından ekstraselüler enzimlerden korunarak hedef hücreye aktarılırlar. Hedef hücrelerde, hücrel fonksiyonları etkileyebilecek tüm fizyolojik ve patolojik olaylara katılırlar.

Tümör-kökenli eksozomların biyolojisi tam olarak anlaşılammıştır ve bu alanda moleküler ve genetik mekanizmaların aydınlatılmasına çalışılmaktadır. Bu genel bilgiler doğrultusunda, projemizde DBBHL patogenezinin aydınlatılmasına yönelik olarak;

- Sağlıklı bireylerin ve DBBHL hastalarının plazma örneklerinden izole edilen eksozomların özelliklerini belirlemeyi,
- Bu eksozomlarda var olan miRNA ekspresyon profillerini karşılaştırmayı,
- DBBHL-kökenli eksozomların normal B-hücrelerine bilgiyi transfer eden araçları olup olmadıklarını belirlemeyi ve
- DBBHL tedavisinde, endozom maturasyonunda defekte neden olan bir ajan varlığında standard tedavinin etkinliğini değerlendirmeyi amaçladık.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

Diffüz Büyük B-hücreli Lenfoma (DBBHL) agresif lenfomaların en yaygın tipidir ve Hodgkin-dışı lenfomaların yaklaşık %30-40'ını oluşturmaktadır. Ülkemizde DBBHL insidansı ile ilgili detaylı veriler olmamakla birlikte, 2006-2008 yıllarına ait Sağlık Bakanlığı kanser istatistik verilerine göre, Hodgkin-dışı lenfomalar kadınlarda en sık görülen 8.kanser türü iken, erkeklerde 7. sırada yer almaktadır (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2010). DBBHL, olgun B-hücre neoplazmlarından biridir. Nadir görülen lenfoblastik ve mantle-hücre lenfoma alt tipleri dışında, tüm B-hücre Hodgkin-dışı lenfomalarda, *IgV* genlerinde somatik hipermutasyonlar gözlenir ve bu da bize bu lenfomaların germinal merkez (GC) içinde bloklanan veya GC'den geçen B-hücrelerden köken aldıklarını gösterir.

Dünya Sağlık Örgütü lenfoma sınıflandırmasına göre, DBBHL genetik, immünolojik, morfolojik ve klinik özelliklerine göre alt gruplara ayrılmaktadır (Swerdlow vd., 2008). Gen ekspresyon profillerindeki farklılıklara göre sınıflandırıldıklarında, DBBHL olguları germinal merkez B-hücre (GCB)-benzeri, aktive B-hücre (ABC)-benzeri ve primer mediastinal B-hücre lenfoması (PBML) olmak üzere 3 moleküler alt tipi ayrılmaktadırlar (Lenz vd., 2008). DBBHL alt tiplendirmesinde gen ekspresyon profil analizlerini yansıtabilecek şekilde, immunohistokimyasal olarak farklı algoritmalar tanımlanmıştır. Günümüzde en yaygın kullanılan algoritma Hans ve ark. tarafından tanımlanmıştır ve bu algoritmaya göre DBBHL olguları GCB-benzeri ve GCB-benzeri olmayan olmak üzere 2 immunofenotipik alt gruba ayrılmaktadır (Hans vd., 2004). Bu alt tiplendirmeler aynı zamanda klinik sonuçlarla da ilişkilidir ve ABC-benzeri lenfoma olgularının GCB-benzeri olgulara göre daha kötü prognoza sahip oldukları bilinmektedir (Dunleavy vd., 2009). Ancak gen ekspresyon profilleri tanı ve tedaviye yanıtı etkileyecek tüm biyolojik parametreleri karşılamamaktadır ve klinik açıdan bu olgularla ilgili verilecek kararda henüz yer almamaktadır. Bu nedenle hem prediktif hem de tedavi ile ilişkili kararların verilebilmesinde yeni biyolojik belirteçlere gereksinim vardır. Hemen hemen tüm hücresel yollarda global regülatörler olarak görev yaptıkları değerlendirilen mikroRNA (miRNA)'lar, bu açıdan önemli adaylar olarak değerlendirilmektedirler.

miRNA'lar birçok farklı hedef genin ekspresyonlarını post-transkripsiyonal düzeyde baskılayan küçük, kodlama-yapmayan RNA'lardır. Türler arasında oldukça sıkı korunan bu moleküller gelişim, organogenez ve homeostaz gibi önemli biyolojik olaylara katılırlar. Birçok hedef RNA molekülüne bağlanabilmeleri nedeniyle de, miRNA ekspresyonlarındaki değişimler bu miRNA'ların hedef genlerinde deregülasyona neden olabilmektedirler ve özellikle de kanser başta olmak üzere birçok patoloji ile ilişkilendirilmişlerdir (Kwak vd., 2010). Örneğin, sağlıklı

doku ve kanser dokusu karşılaştırıldığında, miRNA ekspresyon profillerinin farklı olduğu bilinmektedir (Garzon vd., 2010). Bu nedenle günümüzde kanserin tanısında, progresyonunda ve tedavisinde miRNA'ların potansiyel kullanımları ile ilgili araştırmalar yoğunluk kazanmıştır. Son yıllarda vücut sıvılarında da stabil miRNA'ların belirlenmesi, sirkülasyondaki bu moleküllerin klinik tanıda yeni biyolojik belirteçler olarak kullanılabilirliğine zemin hazırlamıştır (Weber vd., 2010; Scholer vd., 2010). Sirkülasyondaki bu miRNA'lar ideal olarak değerlendirilen biyolojik belirteçlerin birçok özelliklerini barındırmaktadır. Şöyle ki, biyolojik belirteçler olarak proteinler değerlendirildiğinde, (a) çok farklı tiplerinin olması ve bu nedenle analizlerinde çok daha fazla informatif veri içermeleri, (b) kanda kompleks yapılarda bulunmaları, (c) post-translasyonel modifikasyonları ve dizi varyasyonları gibi nedenler proteinlerin bu amaçlarla kullanımlarını sınırlamaktadır. Oysa, miRNA dizilerinin farklı biyolojik sıvılarda stabil olmasının yanı sıra türler arasında oldukça sıkı korunmuş olmaları ve ekspresyonlarının doku veya biyolojik evreye göre farklılıklar gösterebilmesi önemli avantajlarından. Ekspresyonlarının kolaylıkla analiz edilebilmesi (örn; kantitatif PCR ile) bir başka avantaj olarak değerlendirilebilir (Etheridge vd., 2011). Dolayısıyla duyarlı, özgün ve stabil olmalarının yanısıra invaziv olmayan yöntemlerle de belirlenebilmeleri nedeniyle miRNA'lar, ideal biyolojik belirteçlerin tüm özelliklerini taşımaktadırlar. miRNA'lar hematolojik malignansilerde de hem tanı hem de prognozda önemli biyolojik belirteçler olarak değerlendirilmişlerdir. Örneğin miRNA ekspresyon profillerindeki farklılıkların insan B-hücrelerinin farklılaşma evrelerini yansıttıkları, tümör sınıflandırmasında önemli veriler sağladıkları ve hatta prognozun belirlenmesinde klinik verilere ve gen ekspresyon profillerine eklenebilirlikleri belirlenmiştir. Son yıllarda yapılan bir çalışmada da miRNA ekspresyon profillerinin klinik sonuçları yansıtanın yanısıra standart DBBHL tedavisi alan hastalarda yaşam süresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Malumbres vd., 2009; Alencar vd., 2011). Tüm bu ve benzeri çalışmaların sonuçları arasında tam bir konsensus sağlanmamıştır vesözkonusu hastalığın tanısı ve patogenezi ile ilgili henüz aydınlatılmayan mekanizmaların varlığı vurgulanmaktadır.

Eksozomlar, 50-100 nm çapında ve endositik orijinli membranla çevrili veziküllerdir. Epitel hücreleri, B-hücreleri, retikülositler ve tümör hücreleri gibi birçok farklı hücre tipi tarafından ekstraselüler alana salınırlar. Günümüzde hastalıklarla ilişkili olarak eksozomların kan plazması, idrar, süt, bronkoalveolar lavaj örnekleri, amniyon sıvısı ve malign efüzyonlar gibi vücut sıvılarında buldukları bilinmektedir (Mathivanan vd., 2010). Eksozom oluşumu, hücre yüzeyinde proteinlerin endositozu ile başlar. Bu süreç klatrin-bağımlı (örn; transferrin reseptörü) veya klatrin-bağımsız (örn; glikozilfosfatidilinositol-anchored proteinler) olabilir. Bu endositik veziküller erken endozomlara dönüşürlü. Erken endozomların ligandları hafif asidik pH'da housekeeping reseptörlerinden ayrılarak ya plazma membranına geri dönerler ya da

diğer proteinlerle birlikte geç endozomda yer alırlar. Geç endozomlarda pH asidiktir (5.0-5.5) ve geç endozomlar daha yuvarlak şekillidirler. Geç endozomda proteinler, membranın tomurcuklanması ile oluşan intraluminal veziküllere yerleşirler ve sonuçta multiveziküler cisim (MVB) oluşur. MVB'ler ya protein degradasyonu için lizozomlarla birleşirler ya da plazma membranı ile füzyon yaparlar ve eksozomlar olarak ekstraselüler alanda serbest kalırlar. Bir başka ifade ile ekstraselüler alana salınan intraluminal veziküller eksozomlar olarak adlandırılırlar (van der Goot vd., 2006). Dolayısıyla eksozom oluşumu iki dahili tomurcuklanma mekanizması içerdiğinden, hücre gibi topolojik oryantasyonunu korur (dışarıda membran proteinleri ve içeride sitozol benzeri yapılanma). Eksozomlar büyüklükleri, hemen hemen homojen görüntüleri ve yoğunlukları (sukroz gradientinde 1.10-1.21 g/mL) nedeniyle diğer eksozomal-olmayan veziküllerden ayrılırlar. Örneğin apoptotik cisimcikler, heterojen görünümde olmakla birlikte 100 nm çaptan daha büyük olabilirler ve yoğunlukları da 1.23 g/mL'den daha fazladır (van der Goot vd., 2006). Bazı mekanizmalar öne sürülmekle birlikte eksozomlarda proteinlerin ve lipidlerin paketlenmesinin altında yatan mekanizmalar henüz bilinmemektedir. Farklı hücrelerden salınan eksozomlar lipid ve protein kompozisyonu, büyüklük ve yoğunluk açısından ortak özelliklerin yanısıra farklı özellikleri de barındırırlar. Eksozomların içerdikleri ortak protein aileleri şaperonlar (HSP70 ve HSP90), hücre iskeleti proteinleri (aktin, tübülün gibi), transport ve füzyonda yer alan proteinler (Rab11, Rab2 ve anneksinler gibi), tetraspanin proteinler (CD9, CD63, CD81 ve CD82) ve ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) proteinleri (TSG101 gibi)'dir. Bu proteinlerin yanısıra her bir eksozom köken aldığı hücreye özgün proteinleri de içerir (Keller vd., 2006). Dolayısıyla bu hücreye-ölgün proteinler farklı kaynaklardan eksozomların identifikasyonunda önemli birer belirteçler olarak değerlendirilebilirler. Eksozomların fonksiyonlarının büyük olasılıkla salındıkları hücrenin tipine ve üretilmelerine neden olan koşullara bağlı oldukları düşünülmektedir. İlk keşfedildikleri retikülositlerde, eksozom salınımının lizozomal degradasyona alternatif bir yol olduğu değerlendirilmiştir (retikülositlerin lizozom içermemesi nedeniyle). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda eksozomların hücre-ari mesajcılar oldukları ve hücreler arası iletişimde rol oynadıkları belirlenmiştir (Keller vd., 2006; Mathivanan vd., 2010).

Eksozomların hücre-ari mesajcılar olmaları ve hücreler arası iletişimde rol oynamaları, son yıllarda tümör-kökenli eksozomların yaygın bir şekilde araştırılmaya başlanmasına öncülük etmiştir. Tümör-kökenli eksozomların biyokimyasal analizlerinde özellikle tetraspaninlerden, MHC sınıf I moleküllerinden ve ısı şok proteinlerinden oldukça zengin oldukları belirlenmiştir (Lötvall vd., 2014). Tümör-kökenli eksozomlarla ilgili çalışmaların bir bölümü eksozomların yapısal özelliklerinin karakterizasyonuna odaklanırken, diğer çalışmalar eksozomların hücreler

arası iletişimdeki rolüne odaklanmıştır. Ekstraselüler alana salınımları, eksozomların aynı zamanda kan ve idrar gibi vücut sıvılarında da araştırılabileceği olanağını sunmuştur. Over kanserleri ile ilgili yapılan bir çalışmada, sirkülasyonda bulunan tümör-kökenli eksozomlarının miRNA ekspresyon profillerinin, biyopsi örneklerindeki miRNA profilleri için aday tanı belirteçleri olarak kullanılabileceklerini ve aynı zamanda asemptomatik bireylerin taramalarında potansiyel kullanımlarının oldukları gösterilmiştir (Taylor vd., 2008). Benzer çalışma akciğer kanserleri ile de yapılmış ve hastalarda plazma-eksozom düzeylerinin arttığı (akciğer adenokarsinomlu hastalarda 2.85 mg/mL eksozom iken sağlıklı gönüllü bireylerde 0.77 mg/mL) gözlenmiştir (Rabinowits vd. 2009). Hessvik ve ark. (Hessvik vd., 2012), prostat kanser hücrelerinden salınan eksozomların miRNA ve snRNA'ları içerdiklerini ve bu hücrelerden salınan miRNA profilini parent hücre profiline benzediğini göstermişlerdir. Bu çalışmada ayrıca eksozomlar içinde belli bir miRNA grubunun seçilerek yer aldığını ve bazı miRNA'ların çok daha düşük miktarda bulduklarını göstermişlerdir. Hematolojik malignansilerle ilgili ilk çalışmalar serum örneklerindeki miRNA ekspresyon profillerinin belirlenmesine odaklanılarak yapılmıştır. Sağlıklı kontrol bireyler ve DBBHL hastalarının serumlarında tümörle-ilişki miR-155, miR-210 ve miR-21'in ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında, kanserli bireylerde bu moleküllerin ekspresyon düzeylerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Lawrie vd., 2008). Bu sonuçlar sirkülasyondaki miRNA'ların bu hastalığın izlenmesinde biyolojik belirteçler olarak kullanılabileceklerini göstermektedir. Burada önemli bir nokta, sekretuar miRNA'ların RNaz-araçlı degradasyondan bir şekilde korunduklarıdır, çünkü RNA'yı degrade eden RNaz enzim konsantrasyonu hem sağlıklı hem de kanserli bireylerde oldukça yüksektir ve bu enzim oldukça stabildir. Bu noktada sirkülasyondaki RNA'larla ilgili önemli bir gelişme, eksozomlarda RNA ve miRNA'ların varlığının ortaya koyulmasıdır. Bu bulgu, eksozomlar içindeki sekretuar miRNA'ların fonksiyonu ve transferi ile ilgili yeni çalışmalara öncelik etmiştir. Roccaro ve ark. (Roccaro vd., 2013) normal ve multiple myelom (MM) kemik iliği mezenkimal stromal hücrelerinin eksozomal miRNA içeriklerinin birbirinden farklı olduklarını ve normal kemik iliği mezenkimal stromal hücreden salınan eksozomların MM hücrelerine transfer edildiklerini göstermişlerdir. Bu çalışmada ayrıca, MM kemik iliği mezenkimal stromal hücre-kökenli eksozomların orijin aldıkları hücrelerin eksozomları ile karşılaştırıldıklarında, daha yüksek düzeyde onkogenik proteinleri, sitokinleri ve adezyon moleküllerini içerdikleri belirlenmiştir. Bu veriler eksozomlar aracılığı ile fonksiyonel miRNA transferinin intraselüler iletişimde ve immun regülasyonda olası bir mekanizması olabileceğini desteklemektedir. Peinado ve ark., melanoma-kökenli eksozomların, kemik iliği-kökenli hücreleri pro-vaskülojenik ve pro-metastatik fenotip oluşumu yönünde eğittiklerini ve dolayısıyla metastatik niş oluşumunu uyardıklarını göstermişlerdir (Peinado vd., 2012). Bu çalışmalar, eksozomların non-invaziv bir yöntemle hastalıkların tanısında önemli biyolojik

belirteçler olarak değerlendirilebileceklerini ve aynı zamanda hücre-hücre veya organ-organ iletişimini sağlayarak hastalıkların patogenezinde yer alabileceklerini düşündürmektedir. Aynı zamanda, bir tümör mikroçevresinde hücreler arası iletişimde eksozomal miRNA transferinin önemine odaklanacak ve planlanacak yeni çalışmalar, birçok hastalıkla ilgili yanıtlanmayı bekleyen sorularla ilgili yeni mekanizmaların ortaya koyulmasına öncülük edecektir. Bir tümör mikroçevresi fazla sayıda kanser hücrelerini, kanser hücrelerinin köken aldığı hücreleri, epitel hücrelerini, fibroblastları, endotelial hücreleri ve bu alana infiltre olmuş lenfositleri içeren oldukça kompleks bir doku özelliği göstermektedir. Eksozomların bu tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerin durumunu değiştirme yeteneğine sahip miRNA içerdikleri (en azından miRNA'lar aracılığı ile hedef hücrede epigenetik modifikasyonlara neden olarak) yukarıdaki tanımlanan çalışmalarla da gösterilmiştir. Bu tür çalışmalarda önemli bir nokta da, eksozomlarda bulunan miRNA'ların geniş profillerde analizlerinin yapılması gerekliliğidir. Herbir kanser türüne özgün eksozomal miRNA içeriklerinin farklı olması, bu kanser türlerinin etyolojisi ve/veya patogenezinin farklı olmasının da bir yansıması olabilir. Yeni nesil dizi teknolojilerinin gelişmesine bağlı olarak, hücrelerin dışında bulunan bu nükleik asitleri geniş skalada direkt tanımlayabilmemiz artık mümkündür. Bu noktada projemizde DBBHL-kökenli eksozomlarda bulunan miRNA'ların selektif olarak yer alıp almadıklarını belirlemeyi ve böylelikle hastalığın patogenezinin aydınlatılmasına katkıda bulunmayı amaçladık.

Hem solid tümörlerde hem de diğer hematolojik malignansilerde olduğu gibi, DBBHL'de de son yıllarda sirkulasyondaki tümör hücrelerinin belirlenmesi, önemli kanser araştırmalarından birini oluşturmaktadır. Araştırmaların bir grubunu bu hücrelerin tanı amaçlı kullanımları ve bu hücrelerin belirlenmesinde uygulanacak duyarlı ve özgün yöntemlerin geliştirilmesi oluştururken, diğer grup araştırmalar bu hücrelerin biyolojik önemlerinin belirlenmesine odaklanmıştır. DBBHL hastalarında, sirkülasyonda neden lenfoma hücrelerinin bulunduğu ve hangi moleküler mekanizmaların kan dolaşımına bu hücrelerin salınmasına yol açtığı henüz bilinmemekle birlikte, uzun bir süredir sirkülasyonda lenfoma hücrelerinin bulunduğu bilinmektedir. Günümüze kadar sirkülasyondaki lenfoma hücrelerinin önemine odaklanan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan ilkinde, kan dolaşımında lenfoma hücrelerinin gözleendiği DBBHL hastalarının daha kötü prognoza sahip oldukları ve bu olguların %44'ünün kemoterapiye dirençli olduğu belirlenmiştir (Muringampurath-John vd., 2012). Yakın zamanda yapılan bir diğer araştırmada da DBBHL'li olgularda B-lenfopeni insidansının yüksek olduğu ve bu sonucun neoplastik hücreler nedeniyle normal B-hücrelerinin baskılanmasını yansıtacağı öne sürülmüştür (De Tute vd., 2013). Bu sınırlı sayıdaki veriler, sirkülasyondaki lenfoma hücreleri ile normal B-hücreleri arasında bir iletişimin olduğunu ve normal B-hücrelerinin henüz bilinmeyen bir mekanizma ile bu iletişimden etkilendiklerini göstermektedir.

Projemizde yer alan ko-kültür deneyleri bu amaçla planlandı ve lenfoma hücreleri ile normal B-hücreleri arasındaki iletişimin moleküler mekanizmalarından birinin aydınlatılması hedeflendi. Aynı zamanda eksozomal kökenli miRNA ekspresyon profilleri karşılaştırılarak, ko-kültür deneylerinde ve DBBHL'li olgularda ekspresyonlarında değişim gözlenen ortak miRNA'ların belirlenmesi hedeflendi.

Hasta ve tümörün özelliklerine bağlı olmakla birlikte, DBBHL büyük ölçüde tedavi edilebilir bir hastalıktır. Günümüzde kimerik anti-CD20 monoklonal antikoru olan rituksimab (R)'in siklofosamid, doksorubicin, vinkristin ve prednizon (CHOP)'dan oluşan standart tedaviye eklenmesi (R-CHOP) ile daha iyi klinik sonuçlar elde edilmiştir. Kemoterapi ve monoklonal antikor tedavi kombinasyonu (R-CHOP), hastaların büyük bir çoğunluğunu tedavi edebilmekle birlikte bazı hastalarda refraktör veya relaps hastalık gelişebilmekte ve R-CHOP-tabanlı tedaviden yanıt alınamamaktadır. Bu nedenle, standart DBBHL tedavisine yanıt vermeyen hastalarda, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu noktada önemli bir strateji, standart DBBHL tedavisinin bu tedavi ile hücre ölümüne duyarlı hale gelen hücrelerin tedavi etkinliğini arttıracak yeni ajanlarla birlikte kullanımı olabilir. Ageberg ve ark., prenilasyonun (bir post-translasyonel protein modifikasyonu) bir formu olan geranilgeranilasyonu inhibe edici ajan varlığında, hücrelerin CHOP ile sitotoksik tedaviye daha duyarlı olduklarını belirlemişlerdir (Ageberg vd., 2011). Projemizde, eksozomal miRNA'ların buldukları çevre içinde kanser hücrelerinin yararına hücrel fenotipi kontrol ettikleri hipotezimizden yola çıkarak, endozom olgunlaşmasının bloke edildiği ajan varlığında, standart DBBHL tedavisinin etkinliğini değerlendirmesi amaçlandı ve ajan olarak Bafilomisin A1 kullanıldı. Bafilomisin A1, hücrelerde vakuolar tip H⁺-ATPaz (V-ATPaz)'ın özgün inhibitörüdür ve lizozom, endozom gibi bu enzimi içeren organellerin asidifikasyonunu önler. Endositik transport üzerinde Bafilomisin A1'in etkinliğinin hücre tipine göre değiştiği, bazı hücrelerde erken endozomdan geç endozoma geçişi bloke ederken (Clague vd., 1994), bazı hücrelerde de geç endozomdan lizozoma geçişi bloke ettiği öne sürülmüştür (van Deurs vd., 1996). Bafilomisin A1'in aynı zamanda otofagolizozom oluşumunu önlediği ve bu fonksiyonunu lizozomlarda bulunan proton pompasını bloke ederek gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Kawaguchi vd., 2011). Farklı kanser hücreleri ile yapılan bu çalışmaların sonuçları, Bafilomisin A1 ve standart DBBHL tedavi kombinasyonunun, DBBHL tedavisinde daha başarılı olabileceğini düşündürmektedir.

Endositik orijinli küçük veziküller (50-100 nm) olan eksozomlar, antijen sunumu gibi fizyolojik koşullar ve tümör gibi patolojik koşullarda birçok hücre tipi tarafından ekstraselüler alana salınırlar. Son yıllardaki araştırmalar, sağlıklı bireylerle karşılaştırıldıklarında kanserli bireylerin



vücut sıvılarında ekzozomların hem sayısal olarak arttıklarını hem de içerdikleri belli biyolojik belirteçleri aşırı ifade ettikleri belirlenmiştir. Bu ön veriler, tümör-kökenli ekzozomların tanıda biyolojik belirteç olarak kullanılabilirliklerine ve aynı zamanda hücreler arası iletişimdeki rolünün belirlenmesine yönelik yeni çalışmaların yapılmasına öncülük etmektedir.

Bu bulgulardan yola çıkarak projemizin hipotezleri:

1. Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, DBBHL hastalarında ekzozomal miRNA ekspresyon profillerinin farklılıklar gösterebileceği,
2. Kanser hücrelerinden (DBBHL hücrelerinden) salınan ekzozomların özgün bir miRNA profili içerebilecekleri, bu profile benzer belli grup miRNA'ları normal B-hücrelerine aktarabilecekleri ve dolayısıyla ekzozomların hücreler arasında bilgiyi transfer eden araçlar olabilecekleri ve
3. Endozom maturasyonunda defekte neden olan bir ajan varlığında standart DBBHL tedavisinin daha etkin olabileceğidir.

Bu hipotezlerimiz doğrultusunda projemizin hedefleri:

1. Sağlıklı bireylerle DBBHL hastalarının periferik kan örneklerinden ekzozomların izolasyonu,
2. İzole edilen ekzozomların karakterizasyonu,
3. Sağlıklı bireylerden ve DBBHL hastalarından izole edilen ekzozomların içerdikleri özgün miRNA ekspresyon profillerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması,
4. DBBHL-kökenli ekzozomların normal B-hücrelerine ekzozom aracılığı ile miRNA'ları transfer ettiklerinin belirlenmesi ve
5. Endozom maturasyonunda defekte neden olan bir ajan varlığında, standart DBBHL tedavisinin etkinliğinin değerlendirilmesidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1 Çalışma Grubu

Projemizde değerlendirilmesi gereken minimum örnek sayısı ile ilgili olarak, <http://bioinformatics.mdanderson.org/MicroarraySampleSize/> sitesi (Dr. Anne Bowcock - Imperial College, Faculty of Medicine, Chair in Cancer Genomics, London, UK- ile kişisel görüşme sonucunda önerisi doğrultusunda) kullanıldı ve gruplar (DBBHL olguları ve sağlıklı bireyler) arasında istatistiksel anlam 0.001, güç %90 ve standart sapma (SD) değeri 0.7 olarak alındı. Buna göre projemiz kapsamında değerlendirilmesi gereken minimum örnek sayısı 15 olarak hesaplandı.

Projemizde Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Polikliniğine başvuran ve ilk kez DBBHL tanısı alan 20 hasta değerlendirildi (Çalışmaya 21 olgu dahil edilmişti, ancak 2 adet olguda mikroarray analizinin tekrarlarında çok tutarsız sonuçlar elde edildiğinden ve bu 2 olgunun tedavisi başladığından, geriye yönelik örnek tekrarı yapılmadı ve çalışma dışı bırakıldı. Proje süresinde aşağıda belirtilen çalışmaya dahil edilme kriterlerine uygun sadece 1 olgu daha dahil edilebildi ve bu nedenle çalışmada toplam 20 DBBHL hastası değerlendirildi). Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- a) Klinik değerlendirmeyi takiben patolojik incelemeler sonucunda hastalığın tanısını almak,
- b) 18-75 yaş arasında olmak,
- c) Enfeksiyöz ajanlar (HIV, EBV) açısından negatif olmak (Virusların ekzozomlar içinde viral ve hücrel komponentleri sekrete ederek tümör mikroçevresini yönlendirebilecekleri gözönüne alınarak)
- d) *De novo* DBBHL tanısı almak (Kronik lenfositik lösemi veya mantel hücreli lösemi gibi indolent lenfoma öyküsü bulunmamak) ve
- e) Daha önce sitotoksik bir ilaç tedavisi almamış olmak.

DBBHL olgularına ait demografik veriler Tablo 1'de yer almaktadır. Çalışmadan elde edilecek verilerin hastalığın immunofenotip alt grupları arasında farklılıklar gösterip göstermediklerinin karşılaştırılması amacı ile çalışmaya dahil edilen DBBHL olgularının immunofenotip alt grupları, Hans ve ark.'nın tanımladığı algoritma kullanılarak belirlendi (Hans vd., 2004). Özetle, rutin olarak uygulanan bu prosedürde, formaline fikse parafine gömülü (FFPE) arşiv doku örneklerinden 5-µm kalınlığında kesitler alınarak, 60°C'de en az 2 saat dehidre edildi. Deparafinizasyon ve antijen retrieval işlemleri otomatize sistemde (Ventana Medical Systems)

gerçekleştirildi. İmmunohistokimyasal analizlerde primer antikorlar olarak Bcl-6, IRF4/MUM1 ve CD10 kullanıldı. Her analiz aşamasında reaktif lenf nodülleri ve normal timik doku örnekleri pozitif kontrol olarak kullanılırken, primer antikorun eklenmediği ve aynı immunohistokimyasal protokolün uygulandığı preparatlar negatif kontrol olarak değerlendirildi. Işık mikroskopunda 40x büyütmede immunopozitif hücreleri içeren en az 10 alan analiz edildi ve immunopozitif hücrelerin sayısı, sayılan toplam hücre sayısına bölündü. Neoplastik hücrelerin en az %25'inde immunopozitiflik görüldüğünde, ekspresyon pozitif olarak değerlendirildi. Hans algoritmasına göre hastalar Germinal Merkez (GC) ve Germinal Merkez-dışı (Non-GC) olmak üzere iki immunofenotipik alt gruba ayrıldı.

Tablo 1. DBBHL olgularına ait demografik veriler

Demografik veri	Sayı (n)	Yüzde (%)
Yaş		
<60	8	40
≥60	12	60
Cinsiyet		
Kadın	11	55
Erkek	9	45
Klinik Evre		
I-II	4	20
III-IV	16	80
Tutulum		
Nodal	12	60
Ekstranodal	8	40
İmmunofenotip		
GC	7	35
Non-GC	13	65
Sağkalım*		
>12 ay	14	70
≤ 12 ay	6	30

*: Tüm DBBHL hastalarında R-CHOP tedavisi uygulanmıştır.

DBBHL olgu grubuna dahil edilen 20 olgunun yaş ortalaması $62,5 \pm 15,12$ olarak hesaplandı. DBBHL olguları ile sağlıklı bireyler arasında projede hedeflenen analizler açısından yaş farkının ortadan kaldırılması amacıyla yaş ortalamaları $55,6 \pm 14,0$ olan ve 21 bireyden oluşan kontrol grubu oluşturuldu (iki grup arasında yaş ortalaması açısından istatistiksel karşılaştırmada $p=0.108$ olarak belirlendi). Kontrol grubunu oluşturan bireylerde çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- a) Herhangi bir malignite öyküsü bulunmamak,
- b) 18-75 yaş arasında olmak,
- c) Herhangi bir kronik hastalık öyküsü (diyabetes mellitus, kronik karaciğer hastalığı gibi) ve otoimmün hastalık öyküsü bulunmamak,
- d) Organ fonksiyonları açısından stabil olmak,
- e) Daha önce sitotoksik bir ilaç tedavisi almamış olmak.

Projemiz için Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurul'undan 27.08.2013 tarihinde onay alınmıştır. Proje sürecinde, çalışmaya dahil edilen sağlıklı bireyler ve DBBHL hastaları çalışma ile ilgili bilgilendirildi ve yazılı onay belgeleri alındı.

3.2 Eksozom İzolasyonu

3.2.1 Plazma Örneklerinden Eksozom İzolasyonu

Çalışma grubunu oluşturan DBBHL hastaları ve sağlıklı gönüllü bireylerden aç karnına EDTA'lı tüplere (Vacutainer K2EDTA'lı tüp, BD) 20 ml kan örnekleri alındı. Tüm olgu ve sağlıklı bireylerde sağ kol antekübital venden kan örnekleri alındı. Kan örneği alınırken ≥ 21 gangle-iğne kullanıldı ve damara girildikten hemen sonra kola uygulanan turnike uzaklaştırıldı (stres oluşumundan kaçınmak, trombositlerden eksozom salınımını uyarmamak amacı ile). İğne içerisindeki ilk 2 ml'lik kan örneği ekarte edildikten sonra, EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. Kan örneği alma sırasında dikkat edilecek noktalar konusunda Hematoloji Bilim Dalı Kan Alma Servisi'nde çalışan hemşireler bilgilendirildi (Lacroix vd., 2013, Witwer vd., 2013, McDonald vd., 2013).

Kan örnekleri alındıktan sonra en kısa sürede Tıbbi Genetik Laboratuvarı'na ulaştırıldı ve plazma örneklerinden eksozom izolasyonu, 2 basamakta gerçekleştirildi (Lacroix vd., 2013, McDonald vd., 2013): İlk basamakta, platelet-free plazma örneğinin eldesi hedeflendi ve bu amaçla 2 kez ardışık olarak 2.500 x g'de 15 dk santrifüj işlemleri gerçekleştirildi. İzole edilen plazma örneklerindeki hemogloblin konsantrasyonunun yüksek olmasının, eksozom eldesinden sonraki analizlerde problemlere yol açabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, tüm plazma örneklerindeki hemogloblin konsantrasyonu ticari kit yardımı, üretici firmanın belirttiği protokol uygulanarak ile belirlendi (Hemogloblin Assay Kit, Sigma). İkinci basamakta, 12.000 x g'de 45 dk santrifüj sonrasında örnekler, 0.2 μ m por çaplı filtreden geçirildi ve 110.000 x g'de 2 saat ve 1 saat olmak üzere ardışık 2 farklı ultrasantrifüj işlemi uygulandı (Optima Max-XP, Beckman Coulter). Santrifüj sonrasında, elde edilen pelet PBS ile dilüe edildi ve 50 μ l örnek direkt olarak



morfolojik analiz için PAÜ Elektron Mikroskobu Birimi'ne iletildi. Geride kalan örnekler, sonraki analizlerde kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

3.2.1.1 Plazma Örneklerindeki Eksozom Miktarlarının Belirlenmesi

Plazma örneklerindeki eksozom miktarının belirlenmesi amacı ile tüm eksozomlarda var olduğu bilinen esterez enzim aktivitesine dayalı protokol uygulandı ve bu amaçla ticari kit (Exocet, SBI) kullanıldı. Uygulanan protokol aşağıda özetlendi:

- Kitle birlikte sağlanan standart örneği kullanılarak 20×10^7 - 1280×10^7 aralığında 7 farklı standart örneği hazırlandı.
- Eksozom örneklerine (20 μ l) eksozom lizis tamponu (80 μ l) eklendi, 37°C'de 5 dk inkübe edildikten sonra 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant örneklerine (50 μ l) ve standart örneklerine kitle birlikte sağlanan reaksiyon karışımı eklendi ve 15 dk inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası örneklerin 450 nm dalga boyunda OD değerleri kaydedildi (BioTek, ELx808) ve standard grafiği kullanılarak, plazma örneklerinde varolan eksozom miktarları belirlendi.

3.3 İzole Edilen Eksozomların Karakterizasyonu

3.3.1 Elektron Mikroskopisi İle Morfolojik Karakterizasyon

Eksozomların morfolojik karakterizasyonlarını belirlemek için 2 farklı yöntem uygulandı:

a. Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu (STEM-Scanning Transmission Electron Microscope) Yöntemi:

- PBS içindeki eksozom pelletinden 5 μ l alınarak formvar kaplı nikel gridlere absorbe edildi (20 dk).
- PBS (pH 7,4) ile yıkanan gridler, %2'lik paraformaldehit ile 10 dakika fikse edildikten ve PBS ile yıkandıktan sonra, %1'lik glutaraldehit ile 5 dakika fikse edildi.
- PBS ile yıkanan gridler (7x2 dk), %2'lik Uranil Asetat (sulu) ile 15 dakika kontrastlandıktan sonra 3-5 kez tri-distile su ile yıkandı.
- Kurutulan gridler, Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu dedektörü (STEM) içeren Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu'nda (FESEM-Carl Zeiss, Supra 40 VP) incelendi ve mikrografları alındı.

b. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM-Scanning Electron Microscope) Yöntemi:

- PBS içindeki eksozom pelleti Poly-L lizin kaplı yuvarlak lamellere damlatıldıktan ve oda sıcaklığında 40 dakika bekletildikten sonra, %2,5'lük glutaraldehit ve %4'lük paraformaldehit (PBS'de) ile 5 dakika fikse edildi.

- Distile su ile yıkanan lameller, gece boyunca kurumaya bırakıldıktan sonra stamlara yerleştirildi ve Au-Pd ile kaplandı.

- Lameller Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu'nda (FESEM-Carl Zeiss, Supra 40 VP) incelenerek mikrografları alındı.

3.3.2 Eksozomal Protein İçeriğinin Belirlenmesi

İzole edilen eksozom örneklerinden lizatlar hazırlandı. Bu amaçla, aşağıda belirtildiği şekilde lizis çalışma tamponu hazırlandı ve protokol uygulandı:

- 1x lizis tamponuna (Cell Signalling Tech.), 1 µl proteaz inhibitör kokteyli (100x) (Cell Signalling Tech.) ve 1 µl EDTA (0.5 M) eklenerek toplamda 100 µl çalışma lizis tamponu elde edildi.

- 100 µl çalışma lizis tamponuna 100 µl eksozom örneği eklendi ve homojenize edildi. Örnekler 15 dk buzda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tekrar vortekslenerek eksozom lizatları hazırlandı. Bu lizatlar eksozomların protein miktarlarının belirlenmesinde, total proteinlerin görüntülenmesinde ve Western Blot analizlerinde kullanıldı.

Eksozomların protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla ticari bir kit (DC Protein Assay, BioRad) ve ticari protein standardı (Protein Standard II, BSA, BioRad) kullanıldı. Uygulanan protokol aşağıda özetlendi:

- Protein standartları kullanılarak 0,008-1,29-mg/ml konsantrasyonlarda olmak üzere 5 farklı standart hazırlandı.
- Üretici firmanın belirttiği şekilde çalışma solusyonu hazırlandı. Herbir standardın ve eksozom lizat örneklerinin üzerine çalışma solusyonu eklenerek homojenize edildi.
- Bu homojenatın üzerine kitle birlikte sağlanan bir diğer solüsyon (Reagent B) eklendi ve 15 dk inkübasyondan sonra 750 nm'de (BioTek, ELx808) okuma yapıldı.
- İzole edilen eksozomlardaki total protein miktarları, standart eğrisi baz alınarak hesaplandı.

Eksozomların total protein içeriklerinin görüntülenmesi amacıyla, yukarıda belirtilen protokolle elde edilen lizat örnekleri Coomassie blue ile boyandı. Bu amaçla uygulanan protokol aşağıda özetlendi:

- 30 µl lizat örneğine 10 µl Western Blot yükleme boyası (4x) eklendi ve 95°C'de 5 dk inkübe edildi. Sonrasında protein örnekleri 90 V'da SDS-PAGE'de yürütüldü (BioRad).

- Jel örnekleri Coomassie blue (Sigma) , metanol (Merck) ve glacial asetik asit (Merck) içeren boyama solüsyonuna aktarıldı ve 4 saat inkübe edildi.

- İnkübasyon sonrası, jel örnekleri metanol ve glacial asetik asit içeren destaining solüsyonunda overnight inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası jel görüntüleri alındı.

3.3.3 Ekzozomlarda CD63, CD81 (TAPA1) Ve TSG101 Yüzey Belirteçlerinin Belirlenmesi

Ekzozom yüzey belirteçlerinin varlığı için yapılacak Western Blot analizleri için ayrılan ekzozom lizat örneklerine de 10 µl Western Blot Yükleme Boyası eklendi ve 95°C'de 5 dk inkübe edildi. Takiben anti-CD63 (Abcam), anti-TAPA1 (Abcam), anti-TSG101 (Abcam), anti-β aktin (Abcam) (henüz tüm ekzozomlarda western blot çalışmalarında kullanılacak yükleme kontrolü için seçilmesi gereken hedefler tanımlanmamıştır. Biz de çalışmamızda bu antikoru yükleme kontrolü olarak değil de, bu antikoru içerip içermediklerini belirlemek amacı ile kullandık) primer antikorları ve goat anti-rabbit IgG sekonder antikor (Abcam) kullanılarak Western Blot analizleri tamamlandı. Bu amaçla uygulanan protokol aşağıda özetlendi:

- %10'luk SDS-PAGE jeli hazırlandı. Jelin kuyularına 20 µl olacak şekilde ekzozom örnekleri ve protein moleküler ağırlık standardı (Prestained Protein Ladder, Santa Cruz Biotech.) yüklendi.

- SDS-PAGE jeller, 1 x SDS running tamponunda yaklaşık 1 saat yürütüldü (BioRad).

- Elektroforez işlemi takiben, jel ve blot membranı (PVDF membran, Immobilon-P, Sigma) içerecek şekilde yeni bir jel kaseti hazırlandı ve 1x transfer tamponunda 100 V'da 90 dk bekletilerek jelde bulunan proteinlerin membrana transferi gerçekleştirildi.

- Membranlar, yağsız süt tozu içeren TBST solüsyonunda yaklaşık 1 saat bekletilerek, bloklandı.

- Üretici firmanın belirttiği şekilde her bir hedef yüzey belirteci için primer antikorlar hazırlandı ve membranlar 4°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

- İnkübasyon sonrası membranlar TBST'de 10 dk (x4) rotatorda yıkandı.

- Yıkama sonrası membranlara sekonder antikor solüsyonu (1:10.000) eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

- İnkübasyon sonrası membranlar TBST'de 10 dk (x4) rotatorda yıkandı.

- Membranlar, sekonder antikorun taşıdığı HRP'nin kromojenik substratını (DAB) içeren boyama solüsyonunda* görüntülendi.

*: Boyama solüsyonunun hazırlanması: 200 mM Sodyum Asetat (pH 5.0) (Sigma) içine 0.0334 g DAB (Sigma) eklendi. Üzerine %0.3'lük CoCl (Merck) ve %3'lük H₂O₂ (Merck) eklendi ve sonrasında bantlar görüntülendi.

3.4 Eksozomların miRNA Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi

3.4.1 Eksozomlardan Total RNA İzolasyonu

DBBHL olguları ve sağlıklı bireylerin plazma örneklerinden elde edilen eksozomların miRNA içeriklerinin belirlenmesi amacıyla, öncelikle eksozom örneklerinden total RNA izolasyonu yapıldı. Bu amaçla uygulanan protokol kısaca aşağıda özetlendi:

- 300 µL eksozom örneği üzerine 100 µl lizis tamponu (Qiagen) ve 1 mL Trizol (Roche) eklendi.
- Örnek üzerine kloroform (Sigma) eklenerek faz ayrımının oluşması sağlandı ve en üstte yer alan aköz fazdan 750-800 µl alınarak steril bir tüpe aktarıldı.
- RNA presipitasyonu için izopropil alkol (AppliChem) eklendi ve sonrasında RNA %70'lik etanol (Sigma) ile yıkandı.
- Alkolün uzaklaştırılmasını takiben RNA, RNaz-free suda (Ambion) çözdürüldü.
- Elde edilen RNA'nın miktarı spektrofotometrik olarak (NanoDrop, Thermo) ölçüldü.

3.4.2 Mikroarray Analizi

Eksozomal miRNA'ların mikroarray analizi için ticari kit (SurePrint G3 Human miRNA r21 Array Kit, G4870C, Agilent) kullanıldı. Spike-In solüsyonunun hazırlanması (internal kontrol), örneklerin defosforilize edilmesi, örneklerin denatürasyonu, örneklerin ligasyonu, örneklerin kurutulması, örneklerin bloklanması, örneklerin hibridize edilmesi, hibridizasyon sonrası yıkama ve analiz basamaklarından oluşan protokol aşağıda özetlendi:

- Analiz edilecek tüm örnekler, total RNA miktarları 50 ng/ml olacak şekilde ayarlandı. Kitle birlikte sağlanan ve üretici firmanın önerdiği şekilde hazırlanan etiketleme öncesi dilüsyon solüsyonu ve fosfataz tamponu kullanılarak RNA örneklerinin defosforilizasyonu gerçekleştirildi.

- Örneklerin %100 DMSO yardımı ile denatürasyonu gerçekleştirildi.

- Örnekler T4 RNA ligaz, T4 RNA ligaz tamponu ve Cyanin3-pCp yardımı ile etiketleme işlemi için 16°C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı.

- Örneklerin kurutulmasını takiben hibridizasyon aşamasına geçildi. Nükleaz-free suda çözdürülen örneklere hibridizasyon dilüsyon solüsyonu, bloklama ajanı ve Hi-RPM tamponu eklendi.

- Örnekler 8'li mikroarray lamındaki yükleme alanlarına üretici firmanın tanımladığı şekilde aktarıldı ve lamalar hibridizasyon fırınında 65°C'de 20 saat hibridizasyona bırakıldı.

- İnkübasyonu takiben yıkama tamponları ile yıkama basamakları gerçekleştirildi.

- Son olarak mikroarray sisteminin tarayıcısında üretici firmanın önerdiği ayarlar yapılarak tarama yapıldı ve elde edilen görüntüler kaydedildi.

- Ham verilerin sistem tarafından analize uygun formata transfer edilmesini takiben veriler, Gene Spring GX yazılım (versiyon 14.9, Digital Biology) programı kullanılarak analiz edildi. Özetle, kontrol problemlerine ait veriler dışlandı ve "Entity List Inspector" da sadece miRNA problemlerinin yer aldığı bir liste oluşturuldu. Veriler "detected" forma alındı ve katlı değişim 2 kat ve daha fazla değişim gösteren miRNA'lar için kullanıldı. Her örnek 3 kez tekrarlandı ve ortalama değerleri alınarak multiple korelasyon analizleri tamamlandı.

3.5. Hücreler Arası Eksozom Transferi İçin Ko-kültür Modeli

3.5.1 Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinden B-hücre İzolasyonu Ve Kültürü

B-hücrelerinde yaşla birlikte eksozom internalizasyon kapasitesinin artması nedeniyle, 62 yaşında sağlıklı bireyden EDTA'lı tüpe 5 ml periferik kan örneği alındı (Eitan vd., 2017). Kan örneği 1:1 oranında PBS ile sulandırıldı ve eşit hacimde Ficoll (Lonza) içeren tüpe aktarıldı. Sonrasında 2500 rpm'de 20 dk +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası Ficoll ile plazma arasında mononükleer hücrelerin lokalize olduğu buffy coat katmanı dikkatlice başka bir tüpe aktarıldı. Aktarılan hacmin 3 katı miktarında PBS eklendi ve 2 kez yıkandı. Daha sonra elde edilen süspansiyonda hücre sayımı yapıldı ve ticari kit yardımı (B cell isolation kit, Milteny) ile B-hücre izolasyonu aşamasına geçildi. Özetle, 1×10^7 hücre konsantrasyonu başına biyotinle işaretli antikor ve sonrasında anti-biyotin boncukları eklendi ve magnetik alanda seperasyon işlemi tamamlandı. İzole edilen B-hücrelerin varlığı CD19 ve CD3 yüzey belirteçleri kullanılarak Flowsitometri (Beckman Coulter) analizi ile teyit edildi.

Flow sitometri analiz sonucuna göre, saf halde izole edilen B-hücre süspansiyonunun kültür aşamasına geçildi. Kültür aşamasından önce, fetal dana serumu (FBS) kaynaklı eksozom kontaminasyonunu önlemek amacı ile, FBS'de bulunan eksozomlar ultrasantrifüjle uzaklaştırıldı ve bu hali ile kültür koşullarına eklendi (Shelke vd., 2014). Özetle hücreler, %10 (v/v) eksozomları uzaklaştırılmış FBS ve %1 penisilin (100 ünite/ml) /streptomisin (100 µg/ml) supplementli RPMI 1640 besiyerinde 37°C'de %5 CO₂'li nemli ortamda kültüre edildi. Kültüre edilen B-hücrelerinin saflığı da flow sitometri analizi ile CD19 ve CD3 hedef alınarak teyit edildi.

3.5.2 DBBHL Hücre Hatları Ve Kültür Koşulları

Ko-kültür deneylerinde Pfeiffer (CRL-2631, ATCC) ve SU-DHL-4 (CRL-2957, ATCC) olmak üzere 2 adet Germinal Merkez B Hücreli (GCB), SU-DHL-2 (CRL-2956, ATCC) ve U2932 (ACC 633, DSMZ) olmak üzere 2 adet Aktive B Hücreli (ABC) ve son olarak da 1 adet Primer Mediastinal B-Hücreli Lenfoma (U2940, ACC 634, DSMZ) olmak üzere, 3 temel DBBHL alt tipine ait hücre hatları kullanıldı. Ko-kültür deneylerinde kullanılmadan önce, tüm hücre

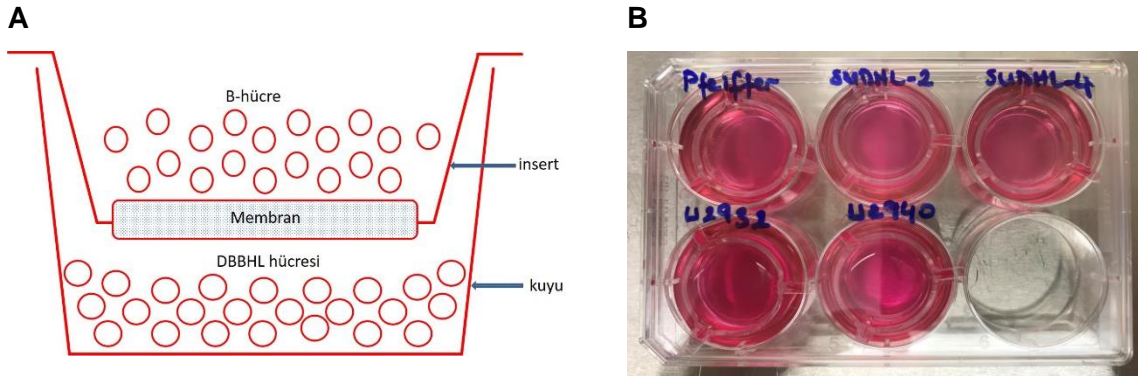
hatlarına ait hücreler 3.5.1 bölümünde belirtildiği hali ile kültür ortamı ve koşullarında kültüre edildiler.

3.5.3 Normal B-hücre ve DBBHL Hücre Hatlarından Eksozom İzolasyonu

Bu basamak ko-kültür sonrası DBBHL hücrelerinden B hücelere transfer olan miRNA'ların tanımlanması amacı ile yapıldı. Çalışmamızın klinik örnekler (DBBHL hastaları ve sağlıklı gönüllü bireyler) bölümünde uygulanan eksozom izolasyonu aşamaları, tüm DBBHL hücre hatlarının yanısıra B-hücre kültüründe de uygulandı ve tamamlandı.

3.5.4 Ko-kültür Modelinin Oluşturulması

Sirkülasyondaki DBBHL hücrelerinin normal B-hücelerine eksozomlarını aktardıklarını ve bu eksozomların özgün miRNA'ları içerdikleri hipotezimizi desteklemek amacı ile ko-kültür modeli oluşturuldu. Bu model için uygulanan deney dizaynı ve uygulaması Şekil 1'de yer almaktadır. Bu modelde 6-kuyulu hücre kültürü kapları (Greiner Bio-One) kullanıldı ve her kuyuya DBBHL hücrelerinden 1×10^6 /ml konsantrasyonda eklendi. Daha sonra 0.4- μ m por çaplı membran içeren insert (Greiner Bio-One) yerleştirildi ve insert üzerine aynı kültür ortamında yer alan 1×10^6 /ml konsantrasyonda sağlıklı B-hüceleri eklendi.



Şekil 1. Ko-kültür modelinin şematik gösterimi ve uygulaması. (A) Farklı kompartmanlarda (insert ve kuyu) ko-kültüre edilen DBBHL hücre ve sağlıklı B-hücre popülasyonları, insertte bulunan membran nedeniyle birbirlerinden ayrılırlar. (B) Tüm hücre hatlarının yer aldığı ko-kültür uygulaması.

Ko-kültür modelinin oluşturulmasından sonra, hücreler daha önce tanımlanan koşullarda inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonrası insert üzerindeki hücrelerden daha önce tanımlandığı şekilde eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen eksozomlardan total RNA izolasyonu sonrası mikroarray analizi yapıldı. Kanser hücresi-

kökenli eksozomların normal B-hücrelerine transferinin bir göstergesi olarak, izole edilen eksozomların miRNA içerikleri normal B-hücre hattına ait miRNA profilleri ile karşılaştırıldı.

3.6 Mikroarray Analizlerinin Verifikasyonu

Mikroarray analizlerinin verifikasyonu real-time PCR ile gerçekleştirildi (LightCycler 2.0, Roche Diagn.) Real-time PCR ile konfirmasyon için ekspresyon düzeyinde anlamlı değişiklik gösteren hsa-miR-3960, hsa-miR-6089, hsa-miR-939-5p, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-595'in (tümü down regüle) yanısıra hücre hatları miRNA mikroarray analizinde ekspresyon artışı en yüksek olan miR-6803-5p seçildi. Real-time PCR analizinde, MiRCURY miRNA assay platformunda yer alan hedef miRNA'lara özgün primer setleri (Qiagen) kullanıldı.

Eksozomlardan izole edilen total RNA örneklerinden cDNA sentezi, ticari kit (miRCURY LNA Universal RT MicroRNA PCR, Universal cDNA synthesis kit II, Exiqon) yardımı ile gerçekleştirildi. Özetle, kitle birlikte sağlanan 5x reaksiyon tamponu, enzim karışımı, sentetik RNA spike, nükleaz içermeyen su ve kalıp RNA (5 ng/ μ l)'yı içeren 10 μ l'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışım 42°C'de 60 dk inkübe edildikten sonra, reverse transkriptazın ısı ile inaktivasyonunu sağlamak amacı ile 95°C'de 5 dk inkübe edildi.

Real-time PCR protokolüne başlamadan önce, bir önceki basamakta elde edilen cDNA örneği nükleaz içermeyen su ile 1:80 oranında dilüe edildi ve protokolde bu dilüe cDNA örneği kalıp olarak kullanıldı. Real-time PCR karışımı, SYBR®Green master karışımı (miRCURY LNA Universal RT MicroRNA PCR, Exilent SYBR®Green master mix, Exiqon) kullanılarak hazırlandı. Özetle, 5 μ l PCR Master karışımı, 1 μ l PCR primer seti ve 4 μ l dilüe cDNA örneğini içeren reaksiyon karışımı hazırlandı. Real-time PCR amplifikasyon protokolü: 95°C'de 10 dk (1 döngü), 95°C'de 10 sn ve 60°C'de 1 dk (40 döngü) olarak uygulandı. Amplifikasyon sonrası, ürünlerin identifikasyonu amacı ile 95°C'de 0 sn, 55°C'de 1dk ve 90°C'de 0 sn (ramp. rate: 0.1°C) olacak şekilde erime eğrisi analiz yapıldı.

3.7. Endozom Maturasyonunda Defekte Neden Olan Ajan Varlığında Standard DBBHL Tedavisinin Etkinliği

3.7.1 Sitotoksik Ajanlar Ve Hazırlık Aşamaları

Endozom maturasyonunda defekte neden olan ajan olarak Bafilomisin A1 (Cayman Chemical) kullanıldı ve stok konsantrasyonu 1600 nM olacak şekilde DMSO'da çözdürüldü. Hazırlık aşaması, gerekli biyogüvenlik ve sterilizasyon önlemleri alınarak tamamlandı.

DBBHL'nin standard tedavisinde kullanılan R-CHOP kombinasyonunun öncelikle CHOP bölümü hazırlandı. Bu amaçla siklofosamid monohidrat (C) (Sigma), doksorubisin hidroklorid (H) (Sigma), vinkristin sülfat (O) (Sigma), ve prednisolon (P) (Sigma) DMSO'da çözdürüldü. Her bir ajanın klinik dozu (siklofosamid, 750 mg/m²; doksorubisin, 50 mg/m²; vinkristin, 1.4 mg/m²; prednisolon, 100 mg/m²) yansıtacak şekilde ara çalışma konsantrasyonları hazırlandı ve final CHOP konsantrasyonu 10 mg/ml olarak kullandı. Standard tedaviyi oluşturan R-CHOP kompozisyonu için lokal eczaneden temin edilen Rituximab (Mabthera, 100 mg/10 ml, Roche) kullanıldı ve 10 mg/ml CHOP'a 10µg/ml konsantrasyonda eklendi (Zhao vd., 2015). Hazırlık aşaması, gerekli biyogüvenlik ve sterilizasyon önlemleri alınarak tamamlandı.

3.7.2 Bafilomisin A1 Doz Aralığı Çalışması

Bafilomisin A1'in 1-10 nM aralığında olan "düşük doz" ve 100-1000 nM aralığında olan "yüksek doz" olmak üzere 2 farklı doz aralığı bulunmaktadır (Yuan vd., 2015, Redmann vd., 2017). Bu doz aralıkları baz alınarak, Pfeiffer, SU-DHL-2, SU-DHL-4, U2932 ve U2940 olmak üzere 5 farklı DBBHL hücre hattı 2-500 nM Bafilomisin A1 ile 24 ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücre canlılıkları ticari kit (XTT, Cell proliferation Kit II, Roche) yardımı ile üretici firmanın belirttiği şekilde belirlendi. Özetle, XTT karışımının eklenmesinden sonra hücreler 37°C'de %5 CO₂'li nemli ortamda 4 saat inkübe edildi. Sonuçlar 650 nm referans dalga boyunda 450 nm dalga boyundaki optik dansiteleri baz alınarak hesaplandı (BioTek, ELx808). Tüm DBBHL hücre hatlarında her bir koşul için hedeflenen analizler 3 kez tekrar edildi ve elde edilen verilerin ortalamaları kullanıldı.

3.7.3 DBBHL Hücre Hatlarında R-CHOP Duyarlılığının Belirlenmesi

Çalışmada değerlendirilen Pfeiffer, SU-DHL-2, SU-DHL-4, U2932 ve U2940 hücre hatlarının R-CHOP tedavisine duyarlılıklarını belirlemek amacı ile, hücreler %10, %100 ve %200 R-CHOP ile 24 ve 48 saat inkübe edildi (Ageberg vd., 2011, Zhao vd., 2015). İnkübasyon sonrası hücre canlılıkları ticari kit (XTT, Cell proliferation Kit II, Roche) yardımı ile üretici firmanın belirttiği şekilde belirlendi ve R-CHOP ilave edilmemiş kontrol hücrelerine göre normalize edildi. Özetle, XTT karışımının eklenmesinden sonra hücreler 37°C'de %5 CO₂'li nemli ortamda 4 saat inkübe edildi. Sonuçlar 650 nm referans dalga boyunda 450 nm dalga boyundaki optik dansiteleri baz alınarak hesaplandı (BioTek, ELx808). Tüm DBBHL hücre hatlarında her bir koşul için hedeflenen analizler 3 kez tekrar edildi ve elde edilen verilerin ortalamaları kullanıldı.

3.7.4 DBBHL Hücre Hatlarında R-CHOP Ve BAF Kombine Tedavinin Etkinliği

Bafilomisin A1'in R-CHOP tedavisine karşı hücreleri duyarlı hale getirip getirmediğini belirlemek amacı ile, çalışmada değerlendirilen Pfeiffer, SU-DHL-2, SU-DHL-4, U2932 ve U2940 hücre hatlarına daha önce tanımlanan baz aralıkları dikkate alınarak 10, 50, 100 ve 500 nM olmak üzere 4 farklı dozda Bafilomisin A1 eklenmiş %100 R-CHOP kombine tedavisi uygulandı. Hücreler bu farklı doz kombinasyonlarını içeren ajanlarla 24 ve 48 inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücre canlılıkları ticari kit (XTT, Cell proliferation Kit II, Roche) yardımı ile üretici firmanın belirttiği şekilde belirlendi. XTT karışımının eklenmesinden sonra hücreler 37°C'de %5 CO₂'li nemli ortamda 4 saat inkübe edildi. Sonuçlar 650 nm referans dalga boyunda 450 nm dalga boyundaki optik dansiteleri baz alınarak hesaplandı (BioTek, ELx808). Tüm DBBHL hücre hatlarında her bir koşul için hedeflenen analizler 3 kez tekrar edildi ve elde edilen verilerin ortalamaları kullanıldı.

3.8 İstatistiksel Analiz

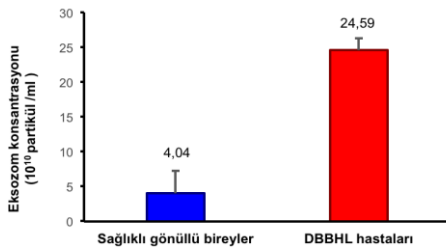
İstatistiksel analizler, SPSS (version11; SPSS Inc., Chicago, IL,USA) yazılımı kullanılarak oluşturuldu. DBBHL hastalarında farklılıkları değerlendirmek ve Bafilomisin A1'in etkinliğini değerlendirmek amacı ile student t-testi (eksozom sayısı ve demografik özellikler) ve Pearson korelasyon testi (eksozom sayı ve protein konsantrasyonu) kullanıldı. miRNA array istatistiksel analizleri Gene Spring GX (versiyon 14.9, Digital Biology) programı kullanılarak yapıldı ve multiple korelasyon analizleri tamamlandı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Sağlıklı Gönüllü Bireyler Ve DBBHL Hastalarının Plazma Örneklerinde Varolan Eksozom Konsantrasyonları

Çalışmada değerlendirilen 21 sağlıklı gönüllü bireye ve 20 DBBHL hastasına ait plazma örneklerinden başarılı bir biçimde eksozom izolasyonu gerçekleştirildi. Sağlıklı gönüllü bireyler ve DBBHL hastalarının plazma örneklerinin içerdikleri hemoglobin konsantrasyonları sırası ile $190,3 \pm 125,2$ mg/100 ml ve $204,5 \pm 47,9$ mg/100 ml olarak belirlendi. Bu değerler, eksozom izolasyonu sonrasında ileri analiz aşamalarını etkilemeyecek düzeyde olduğu belirlendi (Witwer vd., 2013).

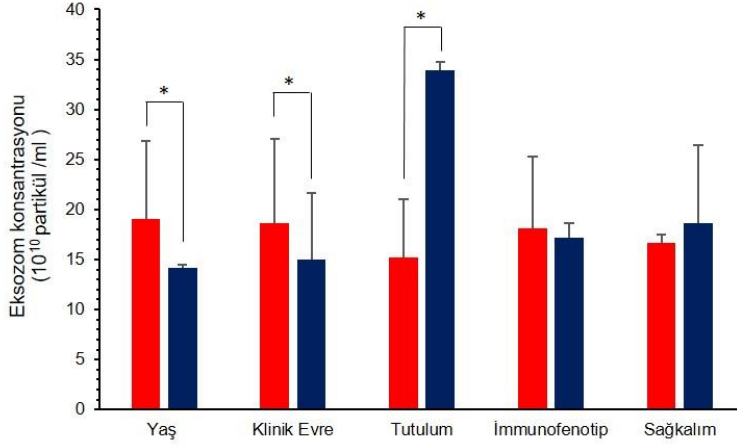
Sağlıklı gönüllü bireylerin plazma eksozom konsantrasyonu ortalama $4,04 \times 10^{10} \pm 3,25$ /ml (aralık $1,09-8,74 \times 10^{10}$ /ml) olarak belirlendi. DBBHL olgularının plazma örneklerinden izole edilen eksozom konsantrasyonu ise ortalama $24,59 \times 10^{10} \pm 1,7$ /ml (aralık $13,18-86,28 \times 10^{10}$ /ml) olarak belirlenirdi (Şekil 2). Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, DBBHL olgularında eksozom konsantrasyonunun yaklaşık 6 kat daha fazla olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p=0.0001$).



Şekil 2. Sağlıklı gönüllü bireyler ve DBBHL hastalarının plazma örneklerinden izole edilen eksozom konsantrasyonları.

DBBHL hastalarının plazma kökenli eksozom konsantrasyonları, hastalara ait demografik özelliklerle karşılaştırıldı (Şekil 3). Ortalama tanı yaşı 60 yaş olarak değerlendirildiğinde, 60 yaşın altındaki DBBHL hastalarının plazma örneklerinde eksozom sayısında anlamlı bir artış gözlemlendi ($p=0.04$). Aynı zamanda ektranodal tutulumlu (mide, akciğer, beyin vb) lenfoma hastalarının plazma örneklerinde eksozom konsantrasyonunun anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p=0.02$). Klinik evre açısından olgular ileri evre (evre IV) ve erken evre (evre I-II-III) olmak üzere iki ayrı grupta değerlendirildiğinde, evre IV olgularda eksozom konsantrasyonunun anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p=0.04$). Eksozom konsantrasyonları

hastaların lökosit hücre konsantrasyonları ile de karşılaştırıldı ve bazofil dışında ($p=0.031$, $R=0.351$) diğer hücre sayıları ile bir korelasyon saptanmadı.

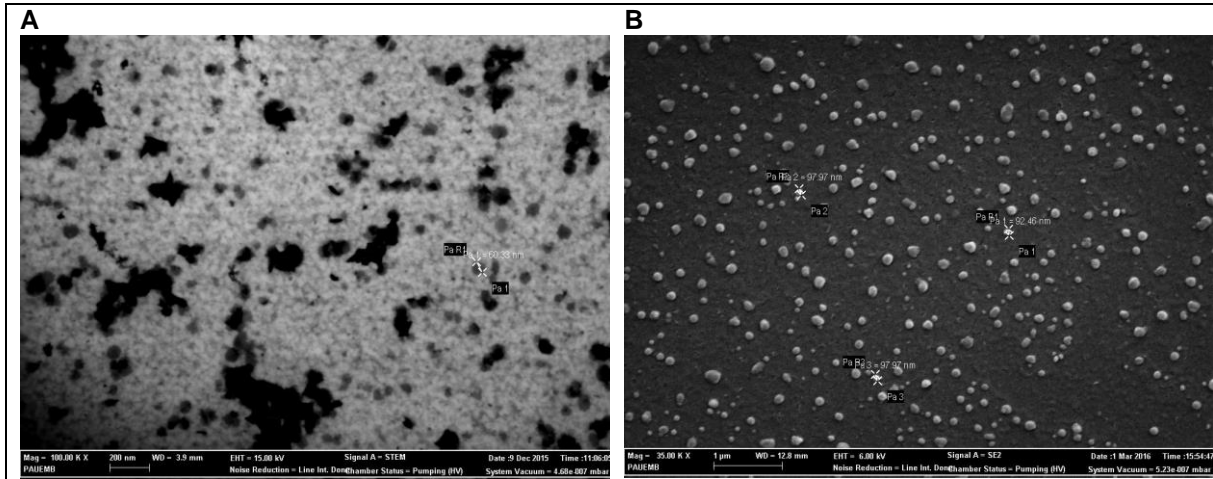


Şekil 3. DBBHL hastalarının plazma örneklerinden izole edilen eksozom konsantrasyonlarının klinik verilere göre dağılımları (*: $p < 0.05$).

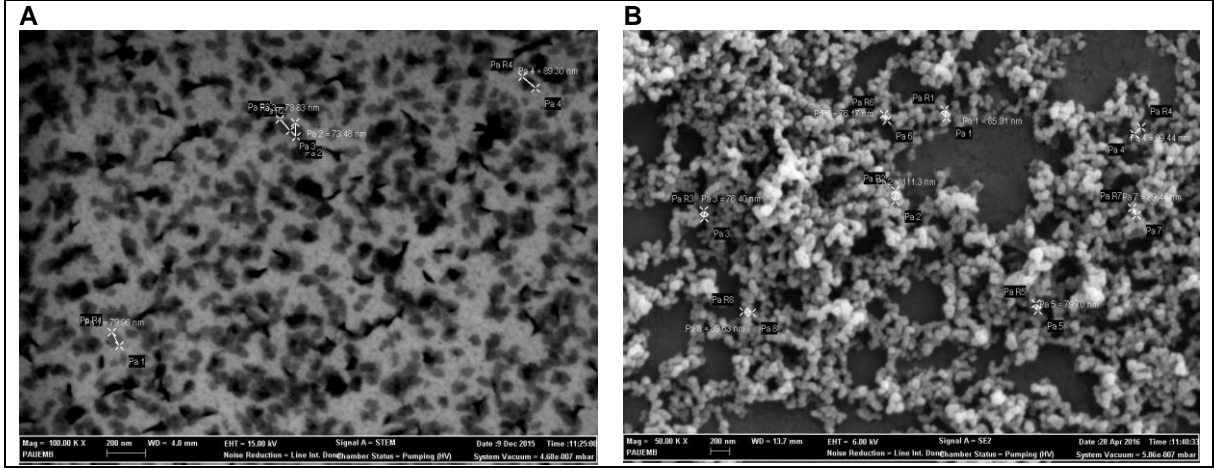
4.2 Sağlıklı Gönüllü Bireyler Ve DBBHL Hastalarının Plazma Örneklerinden İzole Edilen Eksozomların Karakterizasyonu

4.2.1 Eksozomların Morfolojik Karakterizasyonu

Elektron mikroskopi analizlerinde, sağlıklı gönüllü bireyler ve DBBHL hastaların plazmalarından izole edilen eksozomların, beklendiği gibi 40-120 nm çapında oldukları belirlendi. Şekil 4 ve 5'te sırası ile sağlıklı gönüllü bireyden ve DBBHL hastasından izole edilen eksozomlara ait örnek elektron mikroskopi görüntüleri yer almaktadır.



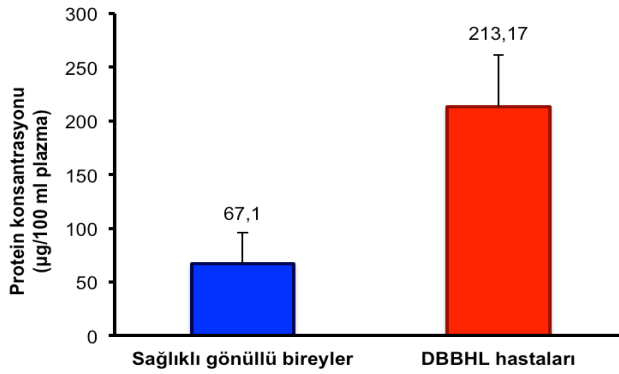
Şekil 4. Sağlıklı gönüllü bireye ait plazma örneğinden izole edilen eksozomların (A) STEM ve (B) SEM görüntüleri.



Şekil 5. DBBHL hastasına ait plazma örneğinden izole edilen eksozomların (A) STEM ve (B) SEM görüntüleri.

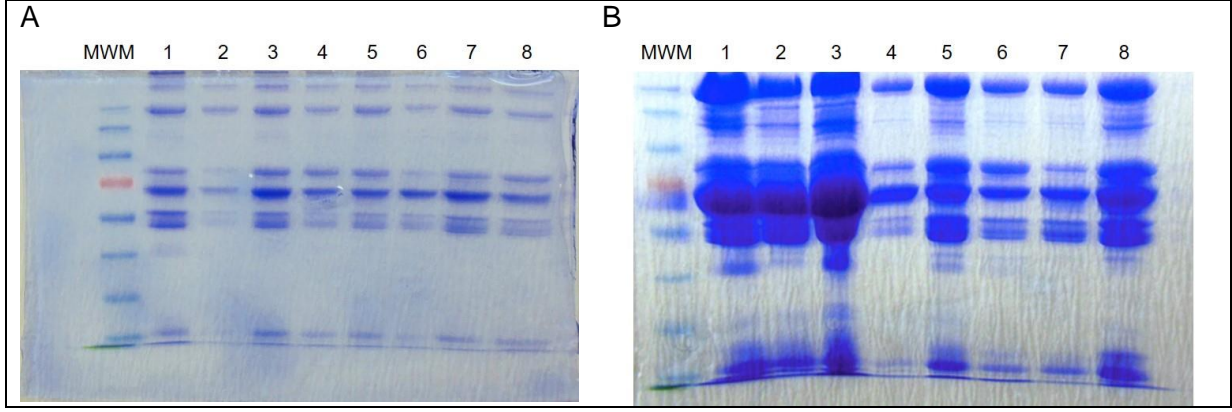
4.2.2 Eksozomların Total Protein Konsantrasyonları

Kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireylerin plazma örneklerinden izole edilen eksozomlardaki total protein ortalama konsantrasyonu $67,10 \pm 29,8$ $\mu\text{g}/100$ ml plazma (aralık 54,4-105,46 $\mu\text{g}/100$ ml) olarak belirlendi. DBBHL grubunda ise ortalama total protein konsantrasyonu $213,17 \pm 48,2$ $\mu\text{g}/100$ ml plazma (aralık 121,6-575,3 $\mu\text{g}/100$ ml) olarak saptandı (Şekil 6).



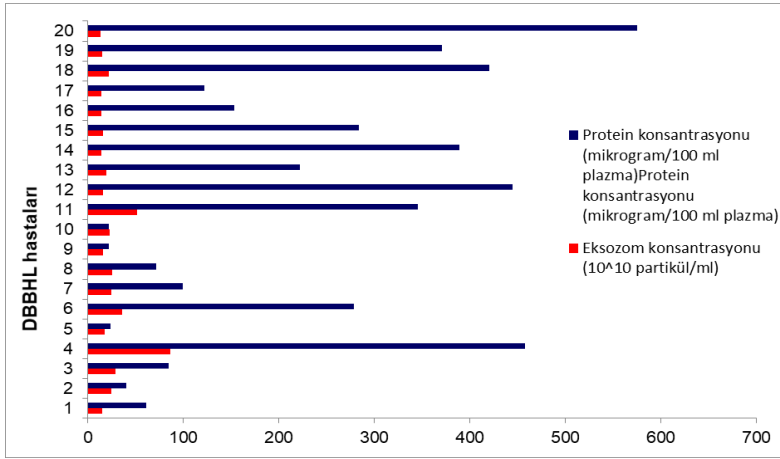
Şekil 6. Sağlıklı gönüllü bireyler ve DBBHL hastalarının plazma örneklerinden izole edilen eksozomlardaki total protein konsantrasyonları.

Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, DBBHL hastalarının eksozomal protein miktarının 3,2 kat daha fazla olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p=0.001$). Sağlıklı gönüllü bireyler ve DBBHL hastalarına ait eksozomal proteinlerin SDS-PAGE sonrası elde edilen jel görüntülerinde de bu bulguyu destekleyici nitelikte olarak, DBBHL eksozom örneklerinin kontrol grubuna göre daha fazla protein içerdiği gözlemlendi (Şekil 7).



Şekil 7. (A) Sağlıklı gönüllü bireylerin ve (B) DBBHL hastalarının plazma örneklerinden izole edilen eksozomlardaki total proteinlerin Coomassie blue ile boyalı örnek SDS-PAGE jel görüntüleri (MWM: Moleküler Weight Marker, 10-250 kDa, ThermoSci., 26619).

Eksozom konsantrasyonu ve eksozomların içerdiği protein konsantrasyonu arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadı ($p=0.409$, $R=-0.316$). Şekil 8'de 20 DBBHL hastasına ait eksozom konsantrasyonları ve eksozom içeriğinde bulunan protein miktarları yer almaktadır.

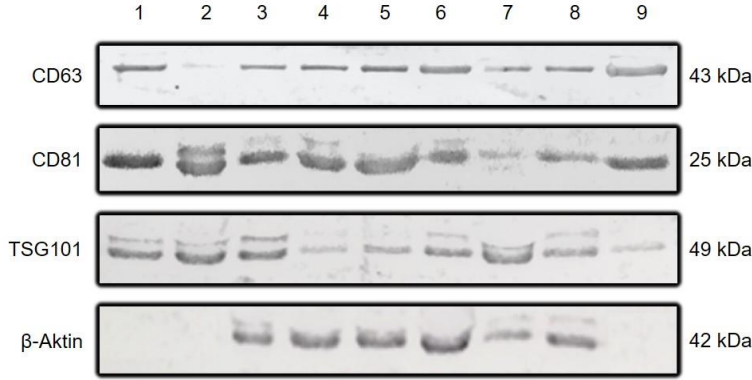


Şekil 8. DBBHL hastalarına ait eksozom konsantrasyonları ve eksozom içeriğinde bulunan protein miktarları

4.2.3 Eksozomların Yüzey Belirteçleri

Sağlıklı gönüllü bireylerin plazma örneklerinden izole edilen tüm eksozom örneklerinin CD63, CD81 ve TSG101 yüzey belirteçleri ile β -aktin proteinini içerdikleri belirlendi. DBBHL hastalarının plazma örneklerinden izole edilen tüm eksozom örneklerinin de CD63, CD81 ve TSG101 yüzey belirteçlerini taşıdıkları ancak, 3 hastaya (1, 2 ve 9 no'lu hastalar) ait eksozomların β -aktin proteinini içermedikleri belirlendi. Şekil 9'da DBBHL hastalarına ait

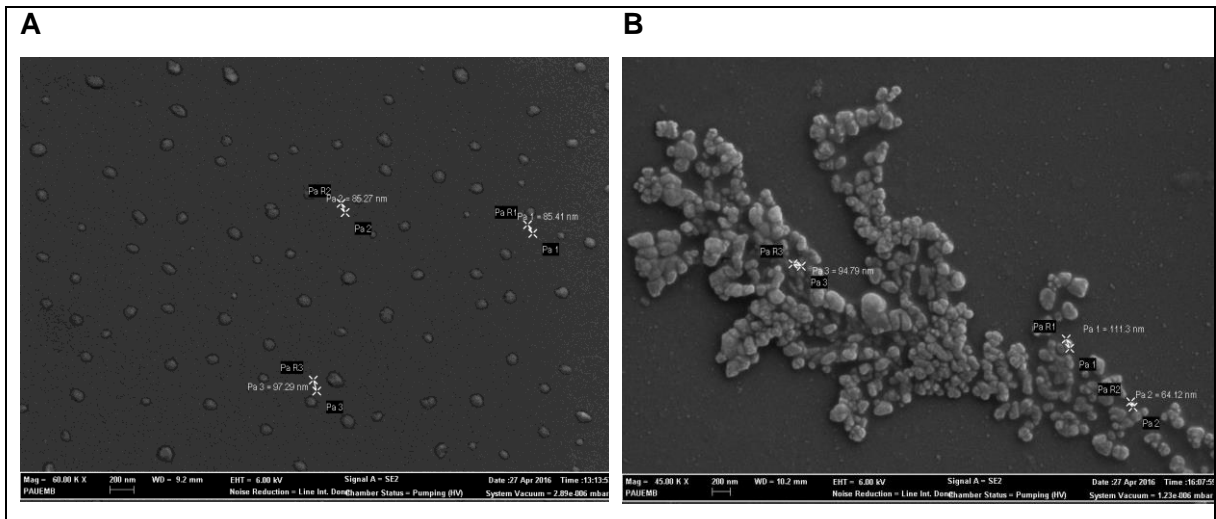
eksozomlarda hedef yüzey belirteçleri ve β -aktin proteinlerine özgün, Western Blot örnek görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 9. DBBHL hastalarına ait eksozom örneklerinde Western Blot analiz görüntüleri. L1-9: 1-9 nolu hastalara ait plazma örneklerinden izole edilen eksozomlarda sırası ile CD63, CD81, TSG101 ve β -aktin antikorlarına karşı elde edilen protein fragmanları yer almaktadır.

4.3 Normal B Hücreleri Ve DBBHL Hücre Hatlarından Eksozom İzolasyonu Ve Karakterizasyonu

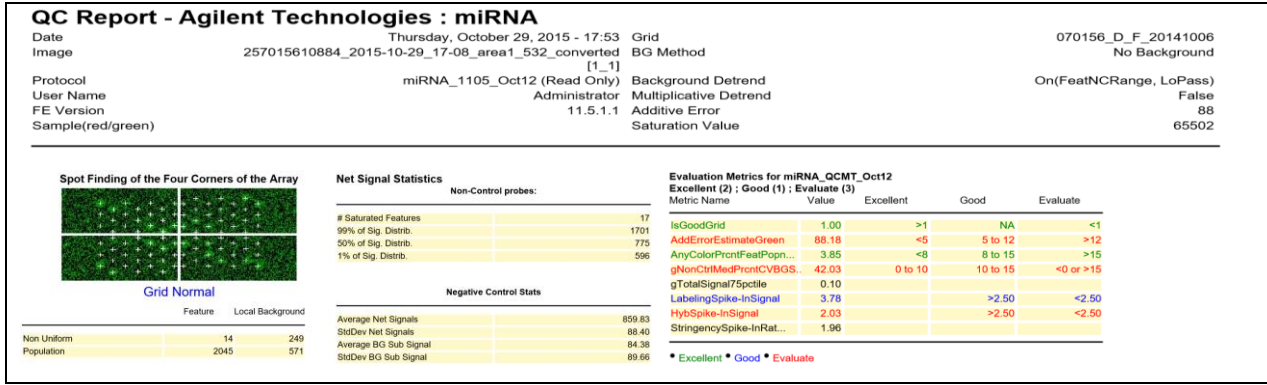
Normal B hücresi ve DBBHL hücre hatlarından izole edilen eksozomlara ait örnek EM görüntüleri Şekil 10'da yer almaktadır. İzole edilen eksozomların beklendiği gibi, 60-140 nm büyüklükte oldukları belirlendi. Normal B hücresinden izole edilen eksozomlarla birlikte Pfeiffer, SU-DHL-2, SU-DHL-4, U2932 ve U2940 hücre hatlarından izole edilen eksozomların, özgün yüzey belirteçlerini taşıdıkları saptandı.



Şekil 10. Sağlıklı gönüllü bireyden izole edilen (A) B-hücre ve (B) DBBHL hücresinden (Pfeiffer hücre hattı) izole edilen eksozomların SEM görüntüleri.

4.4 DBBHL Hastalarının Plazmalarından İzole Edilen Eksozomlardaki miRNA'ların Tanımlanması

Çalışmaya dahil edilen 20 DBBHL hastası ve 21 sağlıklı gönüllü bireylerin plazma örneklerinin eksozomal fraksiyonlarından başarılı bir biçimde total RNA izolasyonu gerçekleştirildi ve mikroarray analizleri tamamlandı. Çalışılan tüm örneklerde kalite kontrol raporu değerlendirildikten sonra biyoinformatik analize geçildi. Şekil 11'de bir mikroarray çalışmasına ait kalite kontrol (QC) rapor örneği yer almaktadır.



Şekil 11. Mikroarray çalışmasına ait kalite kontrol (QC) rapor örneği.

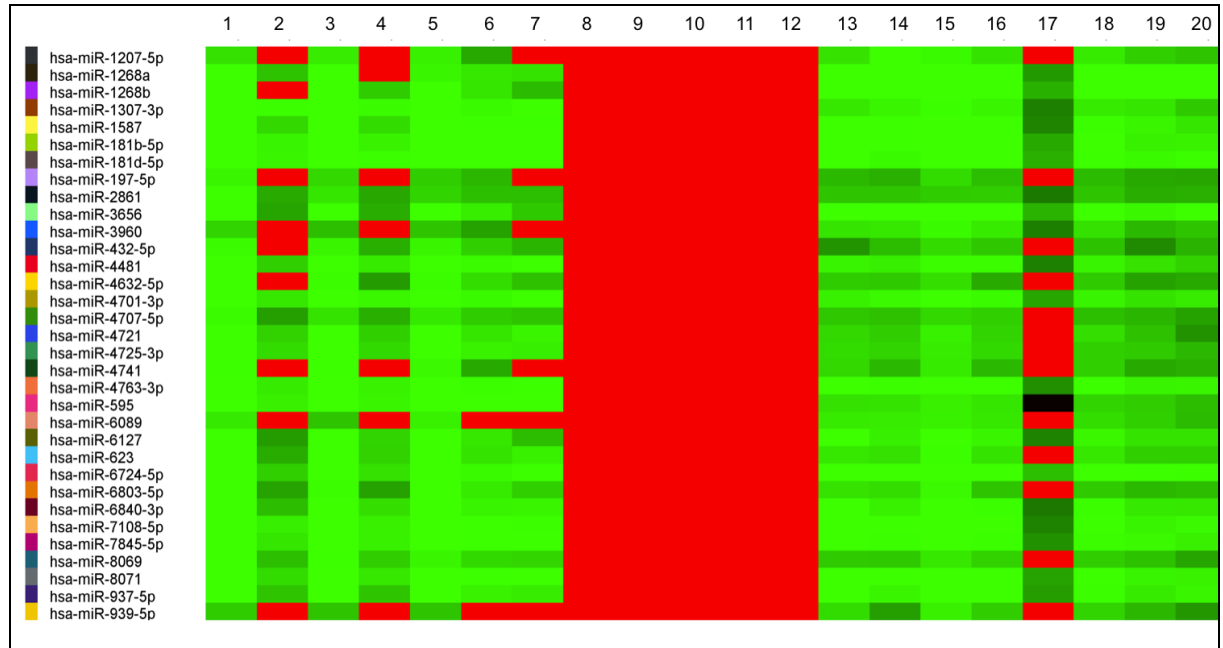
Bonferroni multiple korelasyon analizine göre sağlıklı gönüllü bireylerle karşılaştırıldığında, DBBHL hastalarında 33 adet miRNA'nın ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma gözlemlendi (Tablo 2) ve ekspresyon düzeylerine göre heatmap analizleri yapıldı (Şekil 12).

Multiple korelasyon analizlerinden Benjamini korelasyon analizi uygulandığında ise, hsa-miR-3960, hsa-miR-6089 ve hsa-miR-939-5p olmak üzere 3 adet miRNA'nın DBBHL hastalarının plazmalarından izole edilen eksozomlarda anlamlı olarak down-regüle oldukları analiz edildi (sırası ile $p=0.00067$, $p=0.00377$ ve $p=0.00411$). Mikroarray verilerinin hiyerarşik küme analizleri Şekil 13'de yer almaktadır.

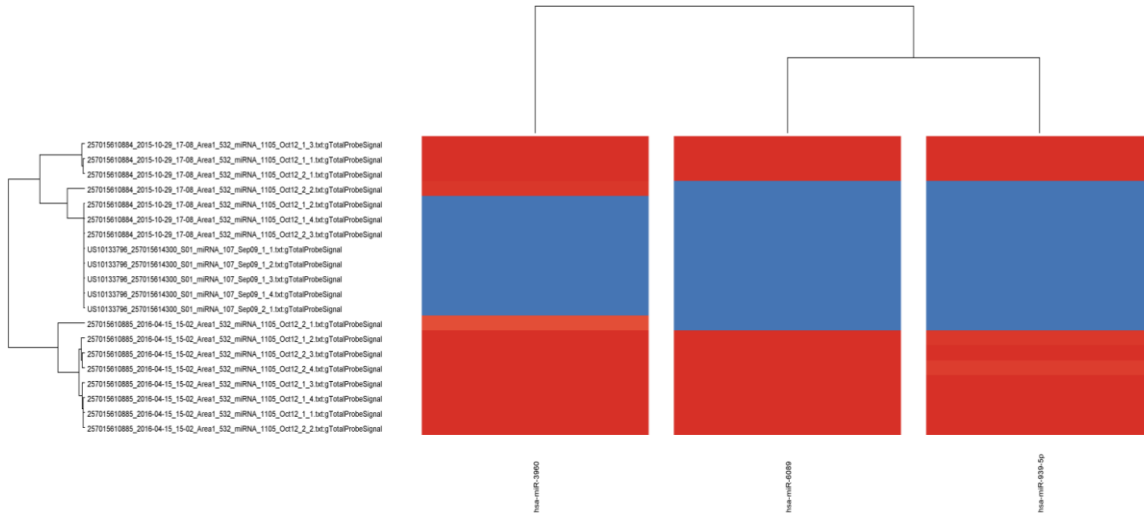
Ekspresyonunda değişim gözlenen bu 3 miRNA'nın hedef genleri ve hedef yolak analizleri Agilent GeneSpring GX platformu kullanılarak belirlendi. Bu platformda PITA, PicTar, TarBase, TargetScan ve microRNA.org veritabanları kullanılarak hedef genler saptandı ve "The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes" (KEGG) Pathway veri tabanından ilgili yollar belirlendi. Söz konusu veri tabanlarında hsa-miR-6089 bulunamadığından, Tablo 3'te sadece hsa-miR-3960 ve hsa-miR-939-5p'e ait hedef genler ve yollar yer almaktadır.

Tablo 2. DBBHL hastalarının plazma eksozomlarında down-regüle olan 33 adet miRNA

miRNA	Aktif Dizi	MiRBase erişim numarası	Katlı Değişim (≥ 2)	Değişim
hsa-miR-1207-5p	CCCCTCCCAGCCT	MIMAT0005871	57,02	Downregüle
hsa-miR-1268a	CCCCACCACCAC	MIMAT0005922	53,14	Downregüle
hsa-miR-1268b	CACCCCCACCACC	MIMAT0018925	58,80	Downregüle
hsa-miR-1307-3p	CACGACCGACGCC	MIMAT0005951	10,70	Downregüle
hsa-miR-1587	CCCAACCCAGCCC	MIMAT0019077	16,95	Downregüle
hsa-miR-181b-5p	ACCCACCGACAGCA	MIMAT0000257	16,15	Downregüle
hsa-miR-181d-5p	ACCCACCGACAACAATG	MIMAT0002821	16,10	Downregüle
hsa-miR-197-5p	CCTCCCCTGCC	MIMAT0022691	25,77	Downregüle
hsa-miR-2861	CCGCCACC	MIMAT0013802	11,08	Downregüle
hsa-miR-3656	CCACCCCCGCAC	MIMAT0018076	31,36	Downregüle
hsa-miR-3960	CCCCCGCCTCCG	MIMAT0019337	98,68	Downregüle
hsa-miR-432-5p	CCACCCAATGACCTACTC	MIMAT0002814	7,51	Downregüle
hsa-miR-4481	AACCACCAGCCAC	MIMAT0019015	12,47	Downregüle
hsa-miR-4632-5p	TCCGCCACACCCA	MIMAT0022977	8,34	Downregüle
hsa-miR-4701-3p	ACACCACACCCATCAC	MIMAT0019799	14,47	Downregüle
hsa-miR-4707-5p	CCAGAACCCGCC	MIMAT0019807	5,69	Downregüle
hsa-miR-4721	CCACCGTCACCTGG	MIMAT0019835	4,62	Downregüle
hsa-miR-4725-3p	CCCGACACTGACGC	MIMAT0019844	4,90	Downregüle
hsa-miR-4741	AGCCGACCCCTCC	MIMAT0019871	27,30	Downregüle
hsa-miR-4763-3p	CCCGCCAGCAC	MIMAT0019913	17,14	Downregüle
hsa-miR-595	AGACACACCACGGCACA	MIMAT0003263	7,88	Downregüle
hsa-miR-6089	CCGCCCCGCC	MIMAT0023714	76,72	Downregüle
hsa-miR-6127	CCTCCACCCACTC	MIMAT0024610	19,64	Downregüle
hsa-miR-623	ACCCAACAGCCCCTGC	MIMAT0003292	6,84	Downregüle
hsa-miR-6724-5p	CCCCACGCCCG	MIMAT0025856	25,24	Downregüle
hsa-miR-6803-5p	ACGCCAGCCCC	MIMAT0027506	6,36	Downregüle
hsa-miR-6840-3p	CACCCCGCACAAAG	MIMAT0027583	16,11	Downregüle
hsa-miR-7108-5p	CCACCCGCCTGC	MIMAT0028113	17,08	Downregüle
hsa-miR-7845-5p	CCACGACCCCTCC	MIMAT0030420	16,46	Downregüle
hsa-miR-8069	ACGCCGACCCGCC	MIMAT0030996	5,24	Downregüle
hsa-miR-8071	CCACCCACTCCAGT	MIMAT0030998	18,51	Downregüle
hsa-miR-937-5p	CCAGCCCCACCC	MIMAT0022938	22,02	Downregüle
hsa-miR-939-5p	CACCCCCAGAGCC	MIMAT0004982	56,55	Downregüle



Şekil 12. DBBHL hastalarının plazmalarından izole edilen eksozom örneklerinde mikroarray verilerinin heatmap analizleri.



Şekil 13. DBBHL hastalarının plazmalarından izole edilen ekzom örneklerinde mikroarray verilerinin hiyerarşik küme analizleri ve dendrogram.

Tablo 3. Down-regüle olan miRNA'ların hedef genleri ve potansiyel olarak etkiledikleri KEGG biyolojik yolları

KEGG yolak adı	miRNA	Hedef gen/ler
Metabolik yolak	hsa-miR-3960/ hsa-miR-939	CERS1, GPAT4, PHOSPHO1, NDUFS7, AC02,
	hsa-miR-3960	MIF, GPLS
	hsa-miR-939	CEL, AK8, TYMP, ALOX12B, HPD, CKMT1A, GPAA1,
	hsa-miR-3960/ hsa-miR-939	COL6A2, SIPA1L3, MAPK8IP3, GNAI2, PPP2R3B, GRIN1, APOA1, PI3R2, PLIN1, FXD1, PRKCG, MAP2K7, CACNG7, HCN2, SRF, SSTR5, WNT6,
Kanserde sinyal iletim yolları (Rab1, PI3K, Ras, cAMP, PPAR, MAPK, mTOR, Wnt sinyal iletim yolları)	hsa-miR-939	GRP119, CACNA1F
Kanserde sinyal iletim yolları (cAMP, cGMP ve MAPK sinyal iletim yolları)	hsa-miR-939	MLLT1
Kanserde transkripsiyonal misregülasyon	hsa-miR-3960/ hsa-miR-939	AP2A2, DNM2, GRK6, CYTH2
Endositoz yolağı	hsa-miR-939	MRPL21, RPL24, RPLP2, RPS11
Ribozom yolağı	hsa-miR-3960/ hsa-miR-939	HUWE1, UBE2O
Ubikitin aracılı proteaz	hsa-miR-3960/ hsa-miR-939	SLC7A8
Protein sindirimi ve absorpsiyonu	hsa-miR-3960/ hsa-miR-939	SLC9A3
	hsa-miR-3960	CTRB1
	hsa-miR-939	TBC1D17
Mitofaji	hsa-miR-939	FIS1
Ferroptozis	hsa-miR-3960/ hsa-miR-939	MAP1LC3B
Nekroptozis	hsa-miR-3960	HIST3H2A

4.5 Normal B hücresi Ve DBBHL-kökenli Eksozomlardaki miRNA'ların İdentifikasyonu

Normal B hücre-kökenli ve Pfeiffer hücre hattı-kökenli eksozomların miRNA profilleri karşılaştırıldığında, Pfeiffer hücre hattı-kökenli eksozomlarda 11 adet miRNA'nın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde aşırı ekspresyona olduğu belirlendi (tüm miRNA'lar için $p < 0.001$) (Tablo 4).

Tablo 4. Pfeiffer hücre hattı-kökenli eksozomlarda normal B hücresi-kökenli eksozomlara göre anlamlı farklılık gösteren miRNA'lar

miRNA	Aktif Dizi	MiRBase erişim numarası	Katlı Değişim (≥ 2)	Değişim
hsa-miR-1268a	CCCCCACCACCAC	MIMAT0005922	21,78	Upregüle
hsa-miR-1268b	CACCCCACCACC	MIMAT0018925	21,40	Upregüle
hsa-miR-1587	CCCAACCCAGCCC	MIMAT0019077	35,17	Upregüle
hsa-miR-3656	CCACCCCGCAC	MIMAT0018076	30,99	Upregüle
hsa-miR-4701-3p	ACACCACACCCATCAC	MIMAT0019799	101,12	Upregüle
hsa-miR-595	AGACACACCACGGCACA	MIMAT0003263	5,39	Upregüle
hsa-miR-6089	CCGCCCGCCC	MIMAT0023714	8,64	Upregüle
hsa-miR-6127	CCTCCACCCACTC	MIMAT0024610	22,55	Upregüle
hsa-miR-6803-5p	ACGCCAGCCCC	MIMAT0027506	120,35	Upregüle
hsa-miR-8069	ACGCCGACCGCC	MIMAT0030996	689,26	Upregüle
hsa-miR-8071	CCACCCACTCCAGT	MIMAT0030998	131,28	Upregüle

Normal B hücre-kökenli ve SU-DHL2 hücre hattı-kökenli eksozomların miRNA profilleri karşılaştırıldığında, SU-DHL2 hücre hattı-kökenli eksozomlarda 3 adet miRNA'nın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde down-regüle olduğu belirlendi (tüm miRNA'lar için $p < 0.001$) (Tablo 5). Geride kalan hücre hatları olan SU-DHL4, U2932 ve U2940 hücre hatlarından da, ilginç bir biçimde, aynı miRNA'ların aynı oranda down regüle oldukları gözlemlendi.

Tablo 5. SU-DHL2, SU-DHL4, U2932 ve U2940 hücre hattı-kökenli eksozomlarda normal B hücresi-kökenli eksozomlara göre anlamlı farklılık gösteren miRNA'lar

miRNA	Aktif Dizi	MiRBase erişim numarası	Katlı Değişim (≥ 2)	Değişim
hsa-miR-3960	CCCCCGCCTCCG	MIMAT0019337	52,89	Downregüle
hsa-miR-595	AGACACACCACGGCACA	MIMAT0003263	15,09	Downregüle
hsa-miR-6089	CCGCCCGCCC	MIMAT0023714	40,33	Downregüle

Normal B-hücreleri ile DBBHL hücre hatlarının ko-kültür deneylerinden sonra, kanser hücrelerinin karşılaştıkları B-hücrelerine farklı miRNA'ları aktardıkları belirlendi. Pfeiffer hücre hattı ile ko-kültüre edilen B-hücresinde 27 adet miRNA'nın ekspresyonunda değişim gözlemlendi. Bu miRNA'ların 7 tanesinde up-regülasyon, 20 tanesinde ise down-regülasyon saptandı (Tablo 6). SU-DHL2 hücre hattı ile ko-kültüre edilen B-hücresinde 28 adet miRNA'nın ekspresyonunda değişim gözlemlendi. Bu miRNA'ların 6 tanesinde up-regülasyon, 22 tanesinde ise down-regülasyon saptandı (Tablo 7). SU-DHL4 hücre hattı ile ko-kültüre edilen B-hücresinde 27 adet miRNA'nın ekspresyonunda değişim gözlemlendi. Bu miRNA'ların 6 tanesinde

up-regülasyon, 22 tanesinde ise down-regülasyon saptandı (Tablo 8). U2932 hücre hattı ile ko-kültüre edilen B-hücresinde 30 adet miRNA'nın ekspresyonunda değişim gözlemlendi. Bu miRNA'ların 7 tanesinde up-regülasyon, 23 tanesinde ise down-regülasyon saptandı (Tablo 9). Son olarak, U2940 hücre hattı ile ko-kültüre edilen B-hücresinde 6 adet miRNA'nın ekspresyonunda değişim gözlemlendi ve tamamının up-regüle olduğu saptandı (Tablo 10).

Tablo 6. Pfeiffer hücre hattı ile ko-kültüre edilen B hücrelerinde miRNA profili

miRNA	Aktif Dizi	MiRBase erişim numarası	Katlı Değişim	Değişim
hsa-miR-1587	CCAACCCAGCCC	MIMAT0019077	2,47	Upregüle
hsa-miR-3656	CCACCCCGCAC	MIMAT0018076	2,04	Upregüle
hsa-miR-4701-3p	ACACCACCCATCAC	MIMAT0019799	4,21	Upregüle
hsa-miR-6127	CCTCCCACCCACTC	MIMAT0024610	2,00	Upregüle
hsa-miR-6803-5p	ACGCCAGCC	MIMAT0027506	7,46	Upregüle
hsa-miR-8069	ACGCCGACCGCC	MIMAT0030996	64,95	Upregüle
hsa-miR-8071	CCACCCACTCCAGT	MIMAT0030998	5,21	Upregüle
hsa-miR-1207-5p	CCCCTCCCAGCCT	MIMAT0005871	2,49	Downregüle
hsa-miR-1307-3p	CACGACCGACGCC	MIMAT0005951	42,46	Downregüle
hsa-miR-181b-5p	ACCCACCGACAGCA	MIMAT0000257	42,46	Downregüle
hsa-miR-181d-5p	ACCCACCGACAACAATG	MIMAT0002821	42,46	Downregüle
hsa-miR-3960	CCCCCGCCTCCG	MIMAT0019337	9,65	Downregüle
hsa-miR-432-5p	CCACCCAATGACCTACTC	MIMAT0002814	42,46	Downregüle
hsa-miR-4632-5p	TCCGCCACACCCA	MIMAT0022977	42,46	Downregüle
hsa-miR-4707-5p	CCAGAACCCGCC	MIMAT0019807	42,46	Downregüle
hsa-miR-4721	CCACCGTCACCTGG	MIMAT0019835	42,46	Downregüle
hsa-miR-4725-3p	CCCGACACTGACGC	MIMAT0019844	42,46	Downregüle
hsa-miR-4741	AGCCGACCCCTCC	MIMAT0019871	42,46	Downregüle
hsa-miR-4763-3p	CCCGCCAGCAC	MIMAT0019913	42,46	Downregüle
hsa-miR-595	AGACACACCACGGCACA	MIMAT0003263	4,92	Downregüle
hsa-miR-6089	CCGCCCGGCC	MIMAT0023714	2,29	Downregüle
hsa-miR-623	ACCCAACAGCCCCTGC	MIMAT0003292	42,46	Downregüle
hsa-miR-6724-5p	CCCCACGCCCG	MIMAT0025856	42,46	Downregüle
hsa-miR-6840-3p	CACCCCGCACAAAG	MIMAT0027583	42,46	Downregüle
hsa-miR-7108-5p	CCACCCGCCTGC	MIMAT0028113	42,46	Downregüle
hsa-miR-7845-5p	CCACGACCCCTCC	MIMAT0030420	42,46	Downregüle
hsa-miR-939-5p	CACCCCGAGGCC	MIMAT0004982	42,46	Downregüle

Tablo 7. SU-DHL2 hücre hattı ile ko-kültüre edilen B hücrelerinde miRNA profili

miRNA	Aktif Dizi	MiRBase erişim numarası	Katlı Değişim	Değişim
hsa-miR-1207-5p	CCCCTCCCAGCCT	MIMAT0005871	19,38	Downregüle
hsa-miR-1307-3p	CACGACCGACGCC	MIMAT0005951	19,38	Downregüle
hsa-miR-1587	CCAACCCAGCCC	MIMAT0019077	3,11	Upregüle
hsa-miR-181b-5p	ACCCACCGACAGCA	MIMAT0000257	19,38	Downregüle
hsa-miR-181d-5p	ACCCACCGACAACAATG	MIMAT0002821	19,38	Downregüle
hsa-miR-197-5p	CCTCCCAGTCC	MIMAT0022691	19,38	Downregüle
hsa-miR-3656	CCACCCCGCAC	MIMAT0018076	4,56	Upregüle
hsa-miR-3960	CCCCCGCCTCCG	MIMAT0019337	5,39	Downregüle
hsa-miR-432-5p	CCACCCAATGACCTACTC	MIMAT0002814	19,38	Downregüle
hsa-miR-4481	AACCACCGCCAC	MIMAT0019015	19,38	Downregüle
hsa-miR-4632-5p	TCCGCCACACCCA	MIMAT0022977	19,38	Downregüle
hsa-miR-4701-3p	ACACCACCCATCAC	MIMAT0019799	3,96	Upregüle
hsa-miR-4707-5p	CCAGAACCCGCC	MIMAT0019807	19,38	Downregüle
hsa-miR-4721	CCACCGTCACCTGG	MIMAT0019835	19,38	Downregüle
hsa-miR-4725-3p	CCCGACACTGACGC	MIMAT0019844	19,38	Downregüle
hsa-miR-4741	AGCCGACCCCTCC	MIMAT0019871	19,38	Downregüle
hsa-miR-4763-3p	CCCGCCAGCAC	MIMAT0019913	19,38	Downregüle
hsa-miR-595	AGACACACCACGGCACA	MIMAT0003263	4,61	Downregüle

hsa-miR-623	ACCCAACAGCCCCTGC	MIMAT0003292	19,38	Downregüle
hsa-miR-6724-5p	CCCCACGCCCG	MIMAT0025856	19,38	Downregüle
hsa-miR-6803-5p	ACGCCAGCCCC	MIMAT0027506	7,49	Upregüle
hsa-miR-6840-3p	CACCCCGCACAAAG	MIMAT0027583	19,38	Downregüle
hsa-miR-7108-5p	CCACCCGCCTGC	MIMAT0028113	19,38	Downregüle
hsa-miR-7845-5p	CCACGACCCTCCC	MIMAT0030420	19,38	Downregüle
hsa-miR-8069	ACGCCGACCGCC	MIMAT0030996	27,72	Upregüle
hsa-miR-8071	CCACCCACTCCAGT	MIMAT0030998	5,10	Upregüle
hsa-miR-937-5p	CCAGCCCCACCC	MIMAT0022938	19,38	Downregüle
hsa-miR-939-5p	CACCCCCAGAGCC	MIMAT0004982	19,38	Downregüle

Tablo 8. SU-DHL4 hücre hattı ile ko-kültüre edilen B hücresinde miRNA profili

miRNA	Aktif Dizi	MiRBase erişim numarası	Katlı Değişim	Değişim
hsa-miR-1207-5p	CCCCTCCCAGCCT	MIMAT0005871	26,02	Downregüle
hsa-miR-1307-3p	CACGACCGAGGCC	MIMAT0005951	26,02	Downregüle
hsa-miR-1587	CCCAACCCAGCCC	MIMAT0019077	2,28	Upregüle
hsa-miR-181b-5p	ACCCACCGACAGCA	MIMAT0000257	26,02	Downregüle
hsa-miR-181d-5p	ACCCACCGACAACAATG	MIMAT0002821	26,02	Downregüle
hsa-miR-197-5p	CCTCCCACTGCC	MIMAT0022691	26,02	Downregüle
hsa-miR-3656	CCACCCCGCAC	MIMAT0018076	4,20	Upregüle
hsa-miR-3960	CCCCCGCCTCCG	MIMAT0019337	6,10	Downregüle
hsa-miR-432-5p	CCACCCAATGACCTACTC	MIMAT0002814	26,02	Downregüle
hsa-miR-4481	AACCACCAGCCCAC	MIMAT0019015	26,02	Downregüle
hsa-miR-4632-5p	TCCGCCACACCCA	MIMAT0022977	26,02	Downregüle
hsa-miR-4701-3p	ACACCACACCCATCAC	MIMAT0019799	3,23	Upregüle
hsa-miR-4707-5p	CCAGAACCCGCC	MIMAT0019807	26,02	Downregüle
hsa-miR-4721	CCACCGTCACCTGG	MIMAT0019835	26,02	Downregüle
hsa-miR-4725-3p	CCCGACACTGACGC	MIMAT0019844	26,02	Downregüle
hsa-miR-4741	AGCCGACCCCTCC	MIMAT0019871	26,02	Downregüle
hsa-miR-4763-3p	CCCGCCAGCAC	MIMAT0019913	26,02	Downregüle
hsa-miR-595	AGACACACCACGGCACA	MIMAT0003263	5,74	Downregüle
hsa-miR-623	ACCCAACAGCCCCTGC	MIMAT0003292	26,02	Downregüle
hsa-miR-6724-5p	CCCCACGCCCG	MIMAT0025856	26,02	Downregüle
hsa-miR-6803-5p	ACGCCAGCCCC	MIMAT0027506	7,10	Upregüle
hsa-miR-6840-3p	CACCCCGCACAAAG	MIMAT0027583	26,02	Downregüle
hsa-miR-7108-5p	CCACCCGCCTGC	MIMAT0028113	26,02	Downregüle
hsa-miR-7845-5p	CCACGACCCTCCC	MIMAT0030420	26,02	Downregüle
hsa-miR-8069	ACGCCGACCGCC	MIMAT0030996	24,52	Upregüle
hsa-miR-8071	CCACCCACTCCAGT	MIMAT0030998	3,73	Upregüle
hsa-miR-937-5p	CCAGCCCCACCC	MIMAT0022938	26,02	Downregüle
hsa-miR-939-5p	CACCCCCAGAGCC	MIMAT0004982	26,02	Downregüle

Tablo 9. U2932 hücre hattı ile ko-kültüre edilen B hücresinde miRNA profili

miRNA	Aktif Dizi	MiRBase erişim numarası	Katlı Değişim	Değişim
hsa-miR-1587	CCCAACCCAGCCC	MIMAT0019077	3,16	Upregüle
hsa-miR-3656	CCACCCCGCAC	MIMAT0018076	4,65	Upregüle
hsa-miR-4701-3p	ACACCACACCCATCAC	MIMAT0019799	7,46	Upregüle
hsa-miR-6127	CCTCCCACCCACTC	MIMAT0024610	3,88	Upregüle
hsa-miR-6803-5p	ACGCCAGCCCC	MIMAT0027506	9,30	Upregüle
hsa-miR-8069	ACGCCGACCGCC	MIMAT0030996	42,75	Upregüle
hsa-miR-8071	CCACCCACTCCAGT	MIMAT0030998	11,73	Upregüle
hsa-miR-1207-5p	CCCCTCCCAGCCT	MIMAT0005871	14,03	Downregüle
hsa-miR-1307-3p	CACGACCGAGGCC	MIMAT0005951	14,03	Downregüle
hsa-miR-181b-5p	ACCCACCGACAGCA	MIMAT0000257	14,03	Downregüle
hsa-miR-181d-5p	ACCCACCGACAACAATG	MIMAT0002821	14,03	Downregüle
hsa-miR-197-5p	CCTCCCACTGCC	MIMAT0022691	14,03	Downregüle
hsa-miR-2861	CCGCCACCGC	MIMAT0013802	14,03	Downregüle
hsa-miR-3960	CCCCCGCCTCCG	MIMAT0019337	5,13	Downregüle
hsa-miR-432-5p	CCACCCAATGACCTACTC	MIMAT0002814	14,03	Downregüle
hsa-miR-4481	AACCACCAGCCCAC	MIMAT0019015	14,03	Downregüle

hsa-miR-4632-5p	TCCGCCACACCCA	MIMAT0022977	14,03	Downregüle
hsa-miR-4707-5p	CCAGAACCCGCC	MIMAT0019807	14,03	Downregüle
hsa-miR-4721	CCACCGTCACCTGG	MIMAT0019835	14,03	Downregüle
hsa-miR-4725-3p	CCCGACACTGACGC	MIMAT0019844	14,03	Downregüle
hsa-miR-4741	AGCCGACCCCTCC	MIMAT0019871	14,03	Downregüle
hsa-miR-4763-3p	CCCGCCCAGCAC	MIMAT0019913	14,03	Downregüle
hsa-miR-595	AGACACACCACGGCACA	MIMAT0003263	2,73	Downregüle
hsa-miR-623	ACCCAACAGCCCCTGC	MIMAT0003292	14,03	Downregüle
hsa-miR-6724-5p	CCCCACGCCCG	MIMAT0025856	14,03	Downregüle
hsa-miR-6840-3p	CACCCCGCACAAAG	MIMAT0027583	14,03	Downregüle
hsa-miR-7108-5p	CCACCCGCCTGC	MIMAT0028113	14,03	Downregüle
hsa-miR-7845-5p	CCACGACCCTCCC	MIMAT0030420	14,03	Downregüle
hsa-miR-937-5p	CCAGCCCACCC	MIMAT0022938	14,03	Downregüle
hsa-miR-939-5p	CACCCCGAGGCC	MIMAT0004982	14,03	Downregüle

Tablo 10. U2940 hücre hattı ile ko-kültüre edilen B hücrelerinde miRNA profili

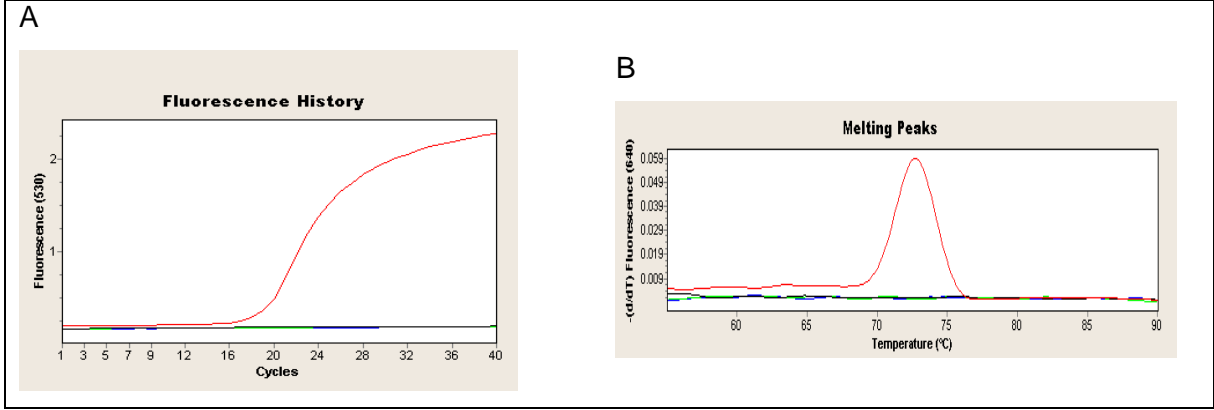
miRNA	Aktif Dizi	MiRBase erişim numarası	Katlı Değişim	Değişim
hsa-miR-4701-3p	ACACCACACCCATCAC	MIMAT0019799	43,15	Upregüle
hsa-miR-595	AGACACACCACGGCACA	MIMAT0003263	2,29	Upregüle
hsa-miR-6089	CCGCCCGGCC	MIMAT0023714	6,40	Upregüle
hsa-miR-6803-5p	ACGCCAGCCCC	MIMAT0027506	27,20	Upregüle
hsa-miR-8069	ACGCCGACCGCC	MIMAT0030996	316,43	Upregüle
hsa-miR-8071	CCACCCACTCCAGT	MIMAT0030998	74,47	Upregüle

Bu sonuçların ortak özelliği, kanser hücrelerinin eksozomlar aracılığı ile sağlıklı B hücrelerine miRNA özelinde özgün bilgi aktarımı yapmalarıdır. Bir başka ifade ile, DBBHL hücre hatlarına ait yukarıdaki tablolarda yer alan ko-kültür sonuçları, tümör-kökenli eksozomların tümör mikroçevresini özgün olarak yeniden programladığını göstermektedir. Örneğin GCB alt tipine sahip Pfeiffer ve SU-DHL-4 hücre hatlarının ko-kültür sonrası eksozomlar aracılığı ile B-hücrelere aktardıkları miRNA profilleri farklılık göstermektedir. Pfeiffer hücrelerinin eksozomlar aracılığı ile B-hücrelerine hsa-miR-197-5p, hsa-miR-4481 ve hsa-miR-937-5p'yi aktarmadıkları, ancak hsa-miR-6127'yi aktardıkları belirlendi. Bir başka ilginç veri de, normal B-hücreleri ile karşılaştırıldığında aynı miRNA ekspresyon farklılıklarını gösteren hücre hatlarının (Pfeiffer dışındaki tüm hücre hatları) ko-kültür sonrasında B-hücrelerinde gözlenen miRNA ekspresyon farklılıklarıdır.

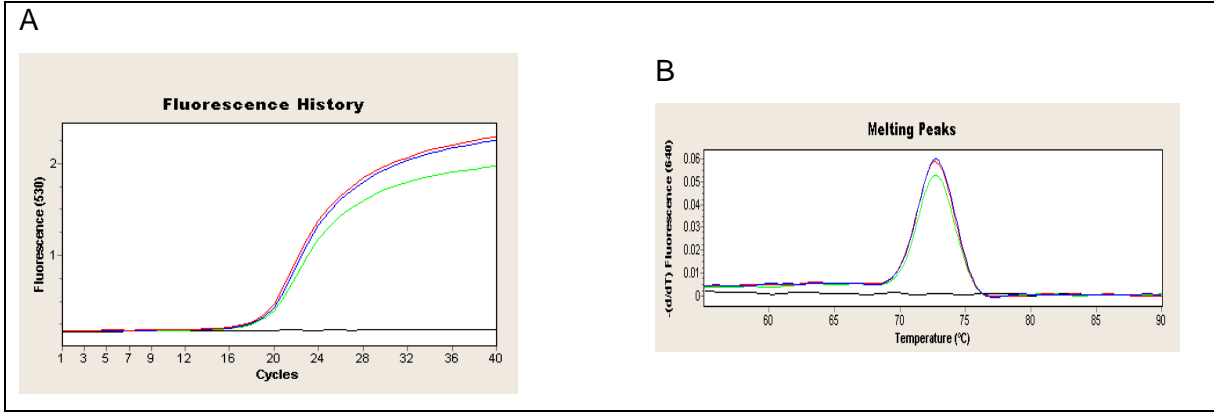
Verifikasyon amacıyla uygulanan real-time PCR analizine ait örnek görüntüler Şekil 14 ve 15'te yer almaktadır. Beklendiği gibi, hedef miRNA'ların ekspresyon durumlarının mikroarray analizi sonucunda elde edilen verilerle uyumlu olduğu gözlemlendi.

4.6 DBBHL Hücre Hatlarında Bafilomisin A1 ve R-CHOP Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Çalışmamıza dahil edilen tüm DBBHL hücre hatları için, Bafilomisin A1 doz aralığı çalışmasında kullanılan tüm dozlarda 24 ve 48 saat inkübasyon sonrası hücre canlılıklarında



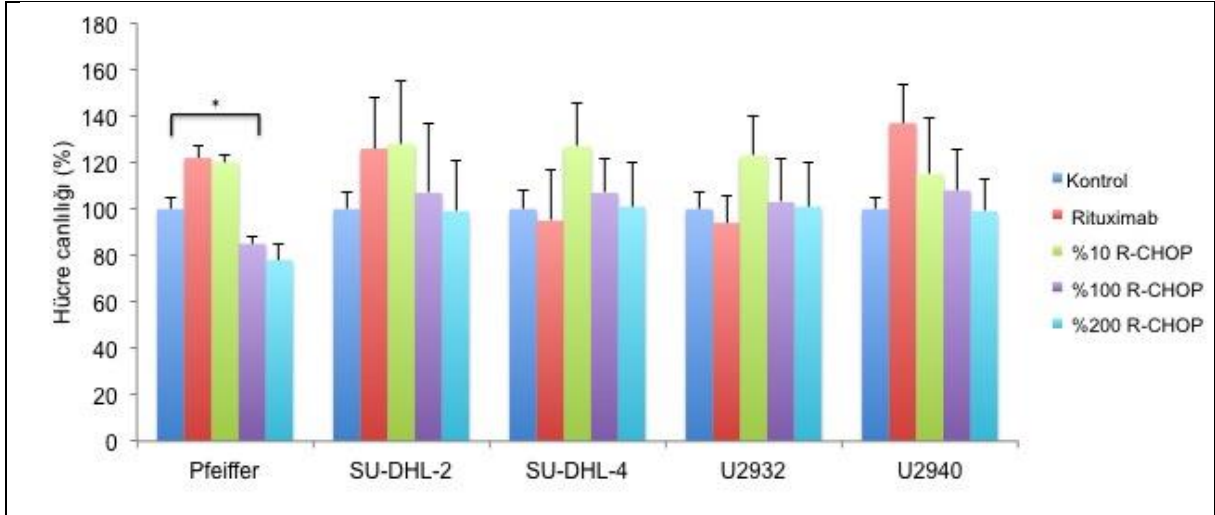
Şekil 14. hsa-miR-3960, hsa-miR-6089, hsa-miR-939-5p, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-595'e ait (A) özgün amplifikasyon eğrileri ve (B) erime eğrisi analizleri (UniSP6 spike-in kontrol primer setine ait veriler kırmızı, negatif kontrole ait veriler siyah ile gösterildi).



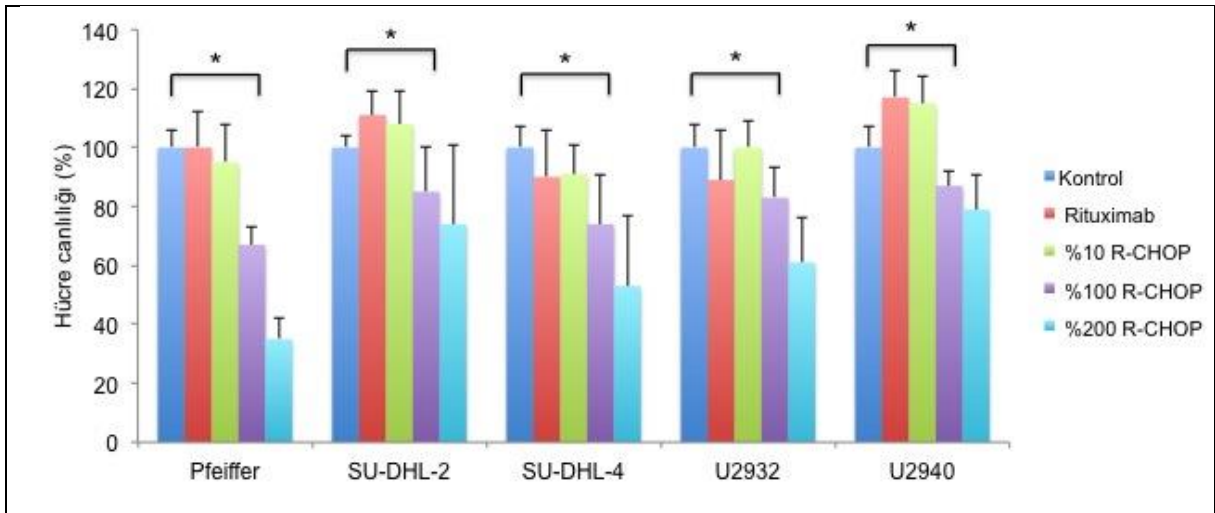
Şekil 15. Pfeiffer (yeşil), SU-DHL-2 (mavi) hücre hatlarında hsa-miR-6803-5p'ye ait (A) özgün amplifikasyon eğrileri ve (B) erime eğrisi analizleri (UniSP6 spike-in kontrol primer setine ait veriler kırmızı, negatif kontrole ait veriler siyah ile gösterildi).

herhangi bir değişim gözlenmedi. Doz-yanıt eğrileri oluşturmak amacıyla, tüm hücre hatlarına tek başına rituximab (klinik kullanım dozu olan 10 µg / ml) ve artan konsantrasyonlarda (%10, %100-klinik doz ve %200-herbir ajan için klinik doz karşılıklarının iki katı ajan içeren) R-CHOP eklendi, 24 ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. Şekil 15 ve Şekil 16'da sırası ile 24 ve 48 saatlik inkübasyon verileri yer almaktadır. SU-DHL4 ve U2932 hücre hatlarının beklendiği gibi, rituximab'a duyarlı oldukları gözlemlendi. İlk 24 saatlik inkübasyon sonrasında sadece Pfeiffer hücre hattında klinik kullanım dozunu yansıtan %100 R-CHOP tedavisinin anlamlı düzeyde etkili olduğu gözlemlendi (Şekil 16). Oysa tüm hücre hatlarının 48 saatlik inkübasyon sonrasında %100 R-CHOP tedavisinden anlamlı düzeyde etkilendikleri gözlemlendi (Şekil 17). Bu nedenle proje hedeflerimizden biri olan Bafilomisin A1 + R-CHOP kombine tedavinin etkinliği, tüm hücre hatlarının R-CHOP tedavisine duyarlı oldukları zaman dilimi olan 48 saatlik inkübasyon sonrası değerlendirildi (24 saatlik inkübasyon verileri de

değerlendirildi, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmediğinden, veriler burada sunulmadı).

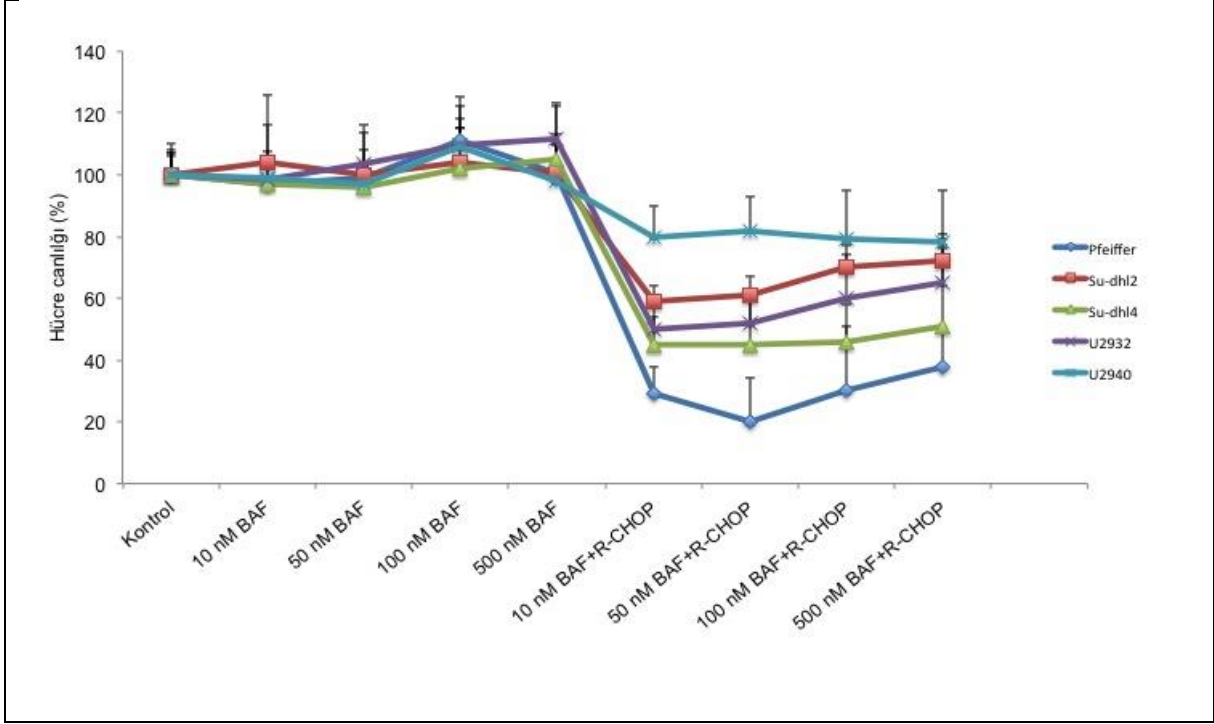


Şekil 16. DBBHL hücre hatlarının 24 saatlik R-CHOP duyarlılıkları. DBBHL hücre hatları 3 farklı konsantrasyonda R-CHOP ile inkübe edildi. Hücre canlılıkları XTT yöntemi ile belirlendi ve tedavi almamış kontrol hücrelerine göre veriler normalize edildi. Tüm veriler, 3'lü tekrarların ortalamaları \pm SEM olarak sunuldu (*: $p < 0.05$).



Şekil 17. DBBHL hücre hatlarının 24 saatlik R-CHOP duyarlılıkları. DBBHL hücre hatları 3 farklı konsantrasyonda R-CHOP ile inkübe edildi. Hücre canlılıkları XTT yöntemi ile belirlendi ve tedavi almamış kontrol hücrelerine göre veriler normalize edildi. Tüm veriler, 3'lü tekrarların ortalamaları \pm SEM olarak sunuldu (*: $p < 0.05$).

Tek başına Bafilomisin A1'in uygulandığı tüm konsantrasyonlarda, tüm hücre hatları için hücre canlılıkları açısından olumsuz bir değişim gözlenmezken, Bafilomisin A1 ve R-CHOP kombine tedavi uygulamalarında farklı sonuçlar elde edildi (Şekil 18).



Şekil 18. DBBHL hücre hatlarında farklı konsantrasyonlardaki Bafilomisin A1 ve R-CHOP kombinasyonlarının duyarlılıkları. Hücre canlılıkları XTT yöntemi ile belirlendi ve tedavi almamış kontrol hücrelerine göre veriler normalize edildi. Tüm veriler, 3'lü tekrarların ortalamaları \pm SEM olarak sunuldu.

Pfeiffer hücre hattında yüksek doz Bafilomisin A1 ile karşılaştırıldığında herhangi bir etki gözlenmezken, düşük doz Bafilomisin A1 uygulamasında hücre canlılığında yaklaşık %5 lik bir azalma gözlemlendi. Ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$). SU-DHL2 hücre hattında düşük doz Bafilomisin A1 ilavesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenirken (10 nM konsantrasyonda hücre canlılığında %15 ve 50 nM konsantrasyonda hücre canlılığında %13 azalma) ($p > 0.05$), yüksek doz Bafilomisin A1 uygulamalarının hücre canlılığında anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlendi. SU-DHL4 hücre hattı için, 500 nM Bafilomisin A1 ile karşılaşma hücre canlılığında herhangi bir etki oluşturmazken, Bafilomisin A1'in diğer dozlarının aynı etkiyi göstererek hücre canlılığında yaklaşık %12'lik bir azalmaya neden olduğu saptandı ($p > 0.05$). U2932 hücre hattında düşük doz Bafilomisin A1 ile hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenirken (10 nM konsantrasyonda hücre canlılığında %13 ve 50 nM konsantrasyonda hücre canlılığında %11 azalma) ($p < 0.05$), yüksek doz Bafilomisin A1 uygulamasının hücre canlılığında anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlendi. U2940 hücreleri için çalışılan tüm dozlarda Bafilomisin A1'in hücre canlılığı üzerinde bir etkisinin olmadığı gözlemlendi ($p > 0.05$). Genel olarak değerlendirecek olursak, ABC-tipi DBBHL hücre hatları olan SU-DHL2 ve U2932 hücre hatlarında (aynı zamanda t(14;18) negatif hücre hatları) düşük doz Bafilomisin A1 ilavesinin, R-CHOP tedavisi için hücreleri daha duyarlı



duruma getirdikleri gözlemlendi. Bu hücrelerin yanısıra Pfeiffer ve ilginç biçimde GCB-tip DBBHL hücre hattı olan SU-DHL4'te de düşük doz BAF uygulamasının hücreleri R-CHOP tedavisine duyarlı hale getirdikleri gözlemlendi. U2940, DBBHL'nın timik orijinli B-hücrelerinden köken alan alt tipi olan bir primer mediastinal B-hücreli lenfoma hücre hattıdır ve bu hücrelerin çalışmamızda değerlendirilen tüm Bafilomisin A1 doz ilavelerinde R-CHOP tedavisine duyarlılığında bir değişim saptanmadı.



5. TARTIŞMA /SONUÇ

Tüm vücut sıvılarımız, hücrelerden köken alan ve membranla çevrili vezikülleri içerirler ve bu EV (ekstraselüler vezikül)'ler buldukları ortama içerikleri doğrultusunda mesaj iletirler. EV'lerin biyolojik fonksiyonlarının anlaşılmasında en önemli basamak, EV izolasyonunda uygulanan yöntemlerle ilgili metodolojik ilerlemedir. Bu noktada kritik basamaklar, ISEV (Uluslararası Ekstraselüler Veziküller Derneği)'in farklı çalışma grupları tarafından hazırlanan ve bu alandaki araştırmacılara yol gösterecek şekilde “minimum sağlanması gereken koşullar” alt başlığı altında yayınlanan kılavuzlarda yer almaktadır (Witwer vd., 2013; Lötvall vd., 2014, Mateescu vd., 2017; Witwer vd., 2017). Örnek olarak plazma örneklerinde var olan EV'lerin platelet, lökosit, eritrosit, endotelial hücre-kökenli oldukları kadar, dokulardan salınan EV'leri de içerdikleri bilinmektedir. Henüz hücre-kökenli EV'leri tanımlayacak belirteçler tanımlanmadığından, bu kadar heterojen kaynaklı EV'lerle ilgili çalışmalarda öncelikle izolasyon aşamasında ortak protokollerin kullanımı, elde edilen verilerin daha sağlıklı tartışılabilmesine olanak sağlayacaktır. Bu durum, 2016 yılında ISEV kongresinde, ilgili komite üyelerinin oturum başkanlıklarını yaptığı özel bir oturumda da detaylıca tartışılmıştır (Proje ekibi “An-ultracentrifugation-based protocol for exosome isolation in diffuse large B-cell lymphoma“ başlıklı poster sunum ile kongreye katılmıştır).

Taze plazma örneklerinin morfolojik olarak intakt eksozomların en iyi kaynağı olarak tanımlanması (Muller vd., 2014), serumda plazmadan daha fazla miktarda olmalarına karşın, trombosit kaynaklı veziküllerin serumda bulunan EV'lerin %50'sinden fazlasını oluşturması ve dolayısıyla sirkülasyondaki EV'lerin fizyolojik ortamının plazma olması (Witwer vd., 2013) nedeniyle DBBHL hastaları ve sağlıklı gönüllü bireylerin plazma örneklerinden eksozom izolasyonu gerçekleştirildi. Plazma örneklerinin eldesinde kullanılacak antikoagulanın seçimi son derece önemlidir. Heparin eksozom izolasyonu sonrası PCR çalışmalarında primerlerle yarışimsal rekabete girmekte, yanlış negatif sonuçlara neden olabilmekte ve dolayısıyla nükleik asit eldesi sırasında heparini uzaklaştırmak için ayrıca ek bir yıkama protokolüne gereksinim duyularak zaman ve maliyeti arttırmaktadır. EDTA da PCR reagentleri ile etkileşime girebilir, ancak etkileri heparinden çok daha azdır ve reaksiyon sonuçlarını etkilememektedir (Witwer vd., 2013). Bu nedenle de çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı bireylerin kan örnekleri EDTA'lı tüplere alındı.

Hücrelerin farklı tipte EV'leri serbest bırakabildikleri bilinmektedir. Bazı EV'ler doğrudan plazma membranından serbest kalırlar ve sıklıkla mikropartiküller, mikroveziküller veya ektozomlar olarak adlandırılırlar. Bu veziküllerin büyüklükleri nanometre-mikrometre arasında değişmektedir. Multiveziküler endozomal kompartmanlar (MVB) içinde oluşan internal

veziküller, plazma membranı ile birleştğinde ekstraselüler alanda serbest kalırlar. Bu EV'ler eksozomlar olarak adlandırılırlar ve çapları 150 nm'nin altındadır (Raposo vd., 2013; Kowal vd., 2014). Bu nedenle yüksek hızda santrifüjün veya 220 nm gözenekli filtrelerden geçirme uygulamalarının eksozomların izolasyon protokolünde yer alması önerilmektedir (Gould vd., 2013; Kowal vd., 2016). Özetle, projemizin en önemli ve başlangıç basamağında ilgili kılavuzlarda ve literatürlerde yer alan örnek seçimi, örnek alımı, eksozom izolasyonu ve karakterizasyonunda belirtilen noktalara uyuldu ve modifiye bir protokol oluşturuldu. Bu protokol uygulanarak, tüm örneklerden başarılı bir biçimde eksozom izolasyonları ve karakterizasyonları yapıldı. Bilgilerimiz dahilinde, uygulanan bu protokol, DBBHL hastalarının plazma örneklerden eksozom izolasyonu ile ilgili tanımlanan ilk protokoldür.

Hücrel etkileşimlerin ana yöneticisi olan ve normal fizyolojik mekanizmaları lehine çeviren kanserde, eksozomlar özel bir öneme sahiptirler. Eksozom aracılığı ile tümöre yakın veya uzak bölgelere horizontal bilginin transfer edilmesi, tümörün gelişimi ve metastazını kolaylaştırmaktadır. Her bir eksozom köken aldığı hücrenin bir imprint'i gibidir ve nükleik asitler, proteinler, enzimler, lipidler, sitokinler gibi temel hücrel komponentleri içerirler. Eksozom biyogenezi kanserde artar ve dikkat çekici bir biçimde tümör hücreleri normal proliferen olan hücrelerden çok daha fazla sayıda eksozom üretirler ve salarlar. Kronik Lenfositik Lösemi (Yeh vd., 2015), Hodgkin lenfoma (Monique vd., 2016) gibi hematolojik neoplazmlı hastaların yanısıra meme kanseri (Galindo-Hernandez vd., 2013), over kanseri (Szajnik vd., 2013) gibi solid tümöre sahip hastaların plazma ve diğer vücut sıvılarında eksozom düzeylerinde anlamlı artış gözlenmektedir. Bu çalışmalarla uyumlu olarak, projemizde DBBHL hastalarının plazma örneklerinde eksozom konsantrasyonunun sağlıklı kontrollere göre arttığını belirledik ve bilgilerimiz dahilinde, literatürde DBBHL hastalarının plazma eksozom düzeylerini rapor eden bir çalışma bulunmadığından, projeden elde ettiğimiz bu veri, bu kapsamda orijinal nitelik taşımaktadır. Tümör hücre kökenli eksozom salınımindaki artıştan sorumlu tutulan mekanizmaların başında, tümör mikroçevresinde baskın olan ve hipoksinin eşlik ettiği stres yer almaktadır. Bunun dışında, kanserde sıklıkla uyarılan p53 proteinin eksozom salınıminin regülasyonunda rol oynayabileceği düşünülmektedir (Whiteside vd., 2016). Her ne kadar kanserin tipine ve agresifliğine bağlı olarak farklı mekanizmaların var olduğu öne sürülse de, tümör hücrelerinde eksozom salınıminin regüle eden mekanizmalar günümüze dek tam olarak açığa çıkarılamamıştır. Çalışmamızda DBBHL hastalarının plazma eksozom konsantrasyonları, hastaların demografik verilerine göre karşılaştırıldığında, nodal tutulumlu ve ileri evre hastalarda eksozom sayısının azaldığı belirlendi. Bilgilerimiz dahilinde, literatürde plazma eksozom konsantrasyonunun hastalığın klinik verileri ile karşılaştırıldığında tek bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, akciğer kanseri hastalarının plazma eksozom

konsantrasyonlarının nodal tutulum ve ileri evre ile ters ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bir başka ifade ile, çalışmamızdan elde verilerle uyumlu olarak, mediastinal lenf nodu tutulumu olan ve ileri evre akciğer kanseri hastalarında plazma eksozom konsantrasyonunun azaldığı belirlenmiştir (Fotinos-Ioannis D vd., 2016). İleri evre olgularda, eksozomların plazmadan çekilme nedeni bilinmemektedir ve bu nedeni bulmaya yönelik yapılacak fonksiyon çalışmalarına gereksinim vardır. Elde edilecek veriler, hiç kuşkusuz kanserin başlamasının yanısıra özellikle progresyonu ile ilgili önemli mekanizmaların aydınlatılmasına yardımcı olacaktır.

Çalışmamızda sağlıklı bireylerin plazma örneklerinden izole edilen eksozomlardaki total proteinlerin konsantrasyonunun literatürde daha önce belirlenen konsantrasyonla uyumlu olduğu gözlemlendi (Caby vd., 2005). DBBHL olgularında ise eksozomal protein miktarının sağlıklı kontrollere göre 2,3 kat daha fazla olduğu belirlendi. Bilgilerimiz dahilinde, literatürde DBBHL'da daha önce bildirilen herhangi bir veri bulunmadığından, karşılaştırma yapılamadı. Ancak, literatürde çeşitli hematolojik malignansilerde bildirilmiş veriler bulunmaktadır. Örneğin, AML'li olguların serum örneklerinden izole edilen mikroveziküllerin total protein konsantrasyonunun, sağlıklı bireylere göre yaklaşık 60 kat daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Szczepanski vd., 2011). Benzer şekilde bir solid tümör örneği olan Küçük hücre dışı akciğer kanserli hastaların plazma örneklerinden izole edilen eksozomların protein konsantrasyonlarının, sağlıklı bireylerden izole edilen eksozomlara oranla 3,9 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir (He vd., 2014). Çalışmamızda eksozom konsantrasyonu ile total protein konsantrasyonunun korele olmadığı belirlenmişti. Eksozomların içerdikleri proteinlerin identifikasyonları proje hedefimiz değildi, ancak bu sonuçlar bize eksozomların özgün bir biçimde belli proteinleri içerdiklerini ve bu özgün proteinler nedeniyle de hastalığın patogeneziye katılabileceklerini düşündürmektedir. Total protein konsantrasyonunda artışın yanısıra, sıvı biyopsi materyali olarak eksozomların protein içeriklerinin identifikasyonunun önemli avantajları da bulunmaktadır. Kanda bulunan proteinlerle karşılaştırıldıklarında daha konsantre olmaları ve daha stabil olmaları (eksternal proteazlardan korunmaları nedeniyle), tümör kökenli eksozomal proteinler, kanserin erken tanısının yanısıra progresyonunun ve tedavi yanıtının değerlendirilmesinde önemli aday belirteçler olarak değerlendirilebilirler.

Eksozom biyogenezi, hücre plazma membranının içeriye doğru invajinasyonu sonrası endozom oluşumu ile başlar ve eksozomlar endositik yolağın komponentlerini içerirler. Aynı zamanda eksozom membranı endozom-spesifik tetraspaninler (örn: CD9, CD63, CD81, CD82), aksesuar ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) yolak proteinleri (örn: ALIX, TSG101) ve diğer moleküllerle dekore edilmiştir (Kowal vd., 2014) . Henüz EV alt tiplerini birbirinden ayırt edecek özgün belirteçler bulunmamaktadır. ISEV, ekstraselüler

veziküller arasında yer alan eksozomların tanımlanması için üç farklı proteinin varlığının gösterilmesini önermektedir (en az bir adet tetraspanin ve en az bir adet endozom membranına bağlanan protein, bu proteinler arasında yer almaktadır). Çalışmamızda izole edilen tüm eksozom örneklerinin CD63 (tetraspanin), CD81 (tetraspanin) ve TSG101 (enzozom membranına bağlanan protein) proteinlerini taşıdıkları, ancak hücre iskeleti proteini olan β -aktin açısından heterojen oldukları saptandı. β -aktin negatif eksozomların varlığı, eksozom izolasyonunda selüler debris kontaminasyonunun olmadığı bir göstegesini olarak izolasyon protokolünün başarısını da yansıtmaktadır (Le vd., 2017). Literatürde, kolon kanseri ve triple-negatif meme kanseri gibi tümör kökenli hücrelerden salınan eksozomların da β -aktin taşıma durumlarına göre heterojen oldukları rapor edilmiştir (Le vd., 2017; McCready vd., 2010). Hücre tipine göre salınan eksozomların belirteçleri hakkında bilgi içeren ExoCarta veritabanında da belli hücrelerden salınan eksozomların β -aktin içerdikleri yer almaktadır (http://exocarta.org/gene_summary?gene_id=11461). Tüm bu sonuçlar bize, DBBHL örneğinde olduğu gibi eksozomların hücre tipine ve vücut sıvısı tipine bağlı olarak farklı makromolekülleri taşıdıklarını ve bu farklılığa bağlı olarak heterojenite gösterdiklerini kanıtlamaktadır.

Moleküler profilleri benzerlik gösterse de, eksozomların veziküller ve membran içerikleri tam anlamıyla köken aldığı hücrenin tıpa tıp aynısı değildir. Tümör-kökenli eksozomlar da kısmen köken aldıkları hücreye ait moleküler izleri taşırlar ve bu moleküler iz, farklı tümör hücreleri tarafından üretilen eksozomları birbirinden ayırmanın yanısıra tümör-kökenli eksozomları malign-olmayan hücrelerden salınan eksozomlardan da ayırt eder (Whiteside, 2016). Bu verileri destekler nitelikte, çalışmamızda DBBHL hastalarına ait klinik örneklerden ve DBBHL hücre hatlarından izole edilen eksozomların sağlıklı B-hücrelerinden salınan eksozomlardan farklı miRNA profillerini içerdikleri gösterilmiştir. Dolaşımda varolan eksozomlar; (a) malign hücrelerden salınan, (b) tümör-kökenli eksozomlar tarafından uyarılan komşu non-malign hücrelerden salınan, (c) kanserle ilişkili mediatörler tarafından uyarılan sağlıklı hücrelerden salınan ve (d) kanserle ilişkili immün hücrelerden salınan eksozomları içermektedir. Bu hücrelerin herbirinden salınan eksozomlara özgün belirteçlerin henüz bilinmiyor olması nedeniyle hedef eksozomların özgün olarak tanımlanamaması, dolaşımda var olan tümör-kökenli eksozomlarla ilgili araştırmalarda karşılaşılan temel zorluktur. Ancak, konu ile ilgili detaylı verilerin birikimi ve teknolojik ilerlemelere paralel olarak, yakın gelecekte tümör-kökenli eksozomların buldukları ortamdaki saf olarak izole edilmeleri beklenebilir.

Tümör kökenli eksozomlar tümörden aldıkları bilgiyi diğer malign hücrelere veya normal hücrelere transfer ederler. Eksozomların yüzeylerinde atasal hücre-kökenli sinyal iletim

molekülleri bulunmaktadır ve intraveziküler içeriklerinde biyolojik olarak aktif olan ve hedef hücrelerde fonksiyonel yanıtları uyarabilecek yetenekte olan DNA, mRNA, miRNA, enzimler ve çözünebilir faktörler bulunmaktadır. Hedef hücre tarafından alınma şekli ve mekanizmaları tam olarak anlaşılammakla birlikte, aşağıda belirtilen bir veya birden fazla mekanizmayı kullanarak hedef hücre ile etkileşime geçerler: a) yüzey molekülleri aracılığı ile direkt sinyal iletimi (hücre içi sinyal iletim yolları aktive olur), b) hedef hücre membranı ile füzyon (hücre lümenine proteinlerin ve genlerin transferine neden olur), c) opsonize olan eksozomların hedef hücreler tarafından fagositozu ve internalizasyonu, ve d) reseptör-aracılı endositoz (Mulcahy vd., 2014). Tümör kökenli eksozomların endotelial hücreler, epitel hücreleri, fibroblastlar, kemik iliği myeloid prekürsörleri, mezenkimal kök hücreler ve diğer tümör hücreleri tarafından alındığını rapor eden çalışmalar bulunmaktadır (Whiteside, 2016). Ancak, eksozomların periferik kan hücre popülasyonları tarafından kabul edildiklerine dair sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bununla birlikte lenfoma özelinde sadece 2 çalışma yer almaktadır. Bu çalışmalardan biri 2015 yılında tamamlanmıştır. Sağlıklı gönüllü bireylerden ve lenfoma hastalarından izole edilen B-hücrelerinin Mantle hücreli lenfoma-kökenli eksozomları etkin biçimde internalize ettikleri belirlenmiştir. Oysa, sağlıklı bireylerden ve lenfoma hastalarından izole edilen T ve NK hücrelerinin eksozomları internalize etmedikleri/çok zor internalize ettikleri gözlenmiştir (Hazan-Halevy vd., 2015). Diğer çalışma 2017 yılında tamamlanmış ve DBBHL hücre hatlarından izole edilen eksozomların sağlıklı B-hücreleri tarafından internalizasyonlarının hem çok hızlı olduğu hem de yüksek miktarda eksozom içerdiği belirlenmiştir. NK, monosit ve T-hücrelerinde ise eksozomların hücre içerisine alınmasının son derece düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir (Bennit vd., 2017). Lenfoma ile ilgili ilk verilerin elde edildiği bu iki çalışmanın yanısıra, çalışmamızdan elde edilen verilerle de DBBHL-kökenli eksozomların sağlıklı B- hücreleri tarafından etkin bir biçimde internalize edildikleri gösterildi (ko-kültüre edilmiş B-hücresi ile sağlıklı B-hücresinin miRNA profillerinde farklılık gözlenmesi nedeniyle, internalizasyonun etkin olduğu değerlendirilmiştir). Periferik kan lökositleri tarafından etkin internalizasyonda, eksozom orijinin önemli bir parametre olup olmadığına dair daha detaylı çalışmalara gereksinim vardır. Bu gerekçelerle, proje ekibi olarak eksozomların yapılarını/içerdikleri yüzey reseptör profillerini, orijin aldıkları hücre tipini ve farklı membran profiline sahip hedef hücreleri birlikte değerlendirebileceğimiz yeni bir çalışmanın hazırlıklarına başlamış bulunmaktayız. Ön verileri elde ettiğimiz bu çalışma ve ön verilerden yola çıkarak planladığımız bu yeni çalışmalardan elde edeceğimiz veriler, DBBHL'nin patogeneğinde tümör-kökenli eksozomların rolünün daha detaylı tanımlanmasına ve yeni tedavi seçeneklerinin ortaya çıkmasına yardımcı olacaktır.

Stabil ekstraselüler küçük RNA moleküllerinin keşfi, gen ekspresyonunun regülasyonu ile ilgili daha detaylı tartışmalar yapmamızı olanaklı kılmıştır ve bu moleküllerin başta hücre-hücre

iletişimi olmak üzere birçok kompleks mekanizmada rol oynayabilecekleri anlaşılmıştır. Bu perspektifte, miRNA'lar, son 10 yıldır insanlarda en sıklıkla araştırılan küçük kodlamayan RNA'lar olarak yerini almıştır. Başta kanser olmak üzere birçok farklı hastalıkta selüler ve ekstraselüler miRNA'ların ekspresyonlarında değişikliği rapor eden çalışmalar bulunmaktadır (Cech vd., 2014; Bracken vd., 2016). B-hücre gelişimi ve fonksiyonunda miRNA'ların rolüne dair kanıtlar 2007 yılında başlamış ve ilk olarak, miR-150'nin c-Myb transkripsiyon faktörünün *in vivo* ekspresyonunu kontrol ettiği rapor edilmiştir (Xiao vd., 2007). DBBHL hastalardan elde edilen primer B-hücrelerinde; miR-155'in ABC-alt tipi, miR-28-3p ve miR-28-5p'nin aşırı ekspresyonunun GCB-alt tipi, miR-193b ve miR365'in aşırı ekspresyonu ile miR-629, miR-423-5p ve miR-15a'nın down-regülasyonunun PMBL-alt tipi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Iqbal vd., 2015). DBBHL'de hastalığın progresyonunu veya tedavi yanıtının izlenmesinde, hastaların plazma veya serum örneklerinde kantitatif PCR ile hedef miRNA moleküllerinin ekspresyon düzeylerini belirlemeyi hedefleyen birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar birbirinden farklı olmakla birlikte, DBBHL hastalarının serum örneklerinde miR-15a, miR-21, miR-155 ve miR-210 olmak üzere bazı miRNA'ların ekspresyonlarının arttığı rapor edilmiştir (Lawrie vd., 2008; Fang vd., 2012; Jones vd., 2013). Bilgilerimiz dahilinde, literatürde, DBBHL hastalarında eksozomal miRNA'ları tanımlayan tek bir çalışma bulunmaktadır. 2017 yılında Khare ve ark., 14 DBBHL hastasının plazmalarından izole ettikleri eksozom örneklerinde yeni nesil dizi analizi ile miRNA profillerini belirlemeyi hedeflemişlerdir. Plazma ve eksozom örnekleri arasında, miRNA kategorilerinin dağılımları açısından bir farklılığın gözlenmediği, DBBHL hastalarında miR-124 ve miR532-5p'nin en fazla up-regüle olan miRNA'lar; miR-425 ve miR-145'in en fazla down-regüle olan miRNA'lar oldukları rapor edilmiştir (Khare vd., 2017). Bu sonuçlar, çalışmamızdan elde edilen verilerle uyumlu değildir. Sirkülasyondaki miRNA verileri ile ilgili uyumsuzluklar ve farklılıklar; örneklerin saklanması, örneklerin işlenmesi gibi pre-analitik farklılıkların yanısıra verilerin normalizasyonu ve analizi gibi post-analitik farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Örneğin serum koagülasyonu nedeniyle örnekler arasındaki farklılıkları minimize etmek için plazma örneklerinin seçilmesini öneren çalışmaların yanısıra (Wang vd., 2012), serum örneklerinin çok daha stabil ve fazla miktarda küçük RNA moleküllerini içerdiklerini vurgulayan çalışmalar da bulunmaktadır (van Schooneveld vd., 2012). Plazma örneklerinin kullanıldığı çalışmalarda, toplam $2,5 \times 10^4$ konsantrasyondaki eksozom miktarı mikroarray analizleri için yeterlidir (Jørgensen vd., 2013). Dolayısıyla, çalışmamızda mikroarray verilerinin doğruluğu için yetersiz örnek olasılığı ekarte edilmiştir. Ayrıca sirkülasyondaki miRNA'ları normalize etmek için kullanılan endojen kontrollerin henüz standardize edilmemiş olması, mikroarray ve yeni nesil dizi analizi yöntemi ile elde edilen miRNA profillerinde uyumsuz sonuçlara neden olmaktadır (Matsuzaki vd., 2017). Yukarıda tartışıldığı üzere, serum veya plazma örneği kullanılarak sirkülasyondaki

miRNA'ların varlığını belirleyen çalışmaların sonuçları farklılıklar göstermektedir. Son dönemlerde güncel yaklaşım, izole edilen eksozom örneklerindeki eksozomal miRNA'ların analizleridir. Sirkülasyondaki miRNA'ların doğaları gereği proteinlerle kompleks halde bulunmaları (Vickers vd., 2011) göz önüne alındığında, biyomarker analizlerinde eksozomal-miRNA'ların odaklanması gereken örnekler olduğu açıktır. Dolayısıyla eksozomal miRNA profili, patolojilerin saptanmasında diğer örneklerle göre büyük üstünlüğe sahiptir.

İnsanlarda klinik örneklerin, izolasyon metodlarının, analiz platformlarının ve veri analizlerinin çeşitliliği, farklı vücut sıvılarında veya dokularda bulunan ekstraselüler RNA moleküllerinin varlığını ve tiplerini anlamamıza yardımcı olacaktır. Ancak, sağlıklı insanların vücut sıvısı örneklerinin ekstraselüler içeriğini tanımlayan çok az çalışma bulunmaktadır (Margue vd., 2015; Yuan vd., 2016; Freedman vd., 2016; Ben-Dov vd., 2016; Fehlmann vd., 2016). Sağlıklı bireylerden elde edilen plazma örnekleri kullanılarak sirkülasyonda varolan miRNA'ları tanımlamayı hedefleyen çalışmaların değerlendirildiği bir derlemede, hsa-miR-3960 ve hsa-miR-6089'un plazma örneklerinde en fazla aşırı eksprese edilen 20 miRNA arasında yer aldıkları görülmektedir (Hruštincová vd., 2015). Aralık 2017'de yayınlanan bir çalışmada 125 sağlıklı bireyin plazma eksozomlarından, dışkı örneklerinden, idrar örneklerinden ve servikal sürüntü örneklerinden ekstrakte edilen RNA örnekleri dizi analizi ile incelenmiştir. Hsa-miR-3960'ın da içinde bulunduğu toplam 11 miRNA'nın analiz edilen tüm örneklerde tanımlanan miRNA'lar oldukları bildirilmiştir (Ferrero vd., 2017). Çalışmamızda hsa-miR-3960'un hem DBBHL hastalarının plazma eksozomlarında hem de Pfeiffer hücre hattı dışındaki tüm hücre hatlarında down regüle olduğu belirlendi. Hsa-miR-3960, 9.kromozomda lokalize siklin-bağımlı kinaz 9 geninin ekzonunda yer almaktadır ve uzunluğu 20 nt olup, içeriğindeki GC oranı %96'dır. 2014 yılında MirTarget programı kullanılarak yapılan bir çalışmada, miR3960'ın 375 hedef mRNA üzerinde 1100 bağlanma bölgesinin bulunduğu hesaplanmıştır. Bu bağlanma bölgelerinin 565'inin 5'UTR bölgesinde, 515'inin kodlayan dizi (CDS)'lerde ve 20 tanesinin de 3'UTR bölgelerinde olduğunu bildirilen bu çalışma ile, miR-3960'ın bağlanma bölgelerinin yaklaşık yarısının mRNA'ların protein-kodlayan bölgelerinde lokalize olduğu gösterilmiştir (Ivashchenko vd., 2014). miR3960'ın önemli hedef genlerinden biri de seramid sentaz 1 (*CERS1*) genidir. 2015 yılında yapılan bir çalışmada, lusiferaz aktivite testi ile miR3960'ın *CERS1*'in 3'UTR'sine bağlandığı konfirme edilmiştir (Huang vd., 2015). Seramid sentaz enzimi, spesifik yağ asidi zincir uzunluğunun yanısıra seramidin *de novo* oluşumunu düzenleyen bir enzimdir ve özellikle C18-seramidin oluşumunu destekler. *CERS1*'in yönlendirmesi ile C18-seramid oluşumu, prelinik ve klinik çalışmalarda bir tümör baskılayıcı olarak tanımlanmaktadır (Saddoughi vd., 2011). C18-seramid ayrıca mitokondriyal membranlar üzerinde MAP1LC3B (Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta) ile

doğrudan etkileşime geçer ve MAP1LC3B içeren fagoforlar aracılığı ile mitokondrinin seçici hedeflemesi yoluyla otofajiye neden olur (Sentelle vd., 2012). 2017 yılında kolorektal kanserli hastaların serum eksozom örneklerinde de sağlıklı bireylerle karşılaştırıldıklarında miR3960 ekspresyonunun down regüle olduğu gösterilmiştir (Yan vd., 2017). Kolon kanser hücre hatları ve meme kanseri hücre hatları ile yapılan bir çalışmada da, içlerinde miR-3960'ın da yer aldığı toplam 8 miRNA'nın ekspresyonunun down regüle olduğu bildirilmiştir (Reza vd., 2017). Tüm bu sonuçlar bize, DBBHL örneğinde olduğu gibi, hsa-miR-3960'ın sağlıklı ilgili bir problemin varlığını göstermesinin yanısıra tümör baskılayıcı genleri hedefleyen bir miRNA olduğunu göstermektedir. DBBHL'da hsa-miR-3960'ın hedef genleri ile birlikte yeni fonksiyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Böylelikle, bu miRNA'nın down-regülasyonunun lenfomageneze nasıl katkıda bulunduğu ile ilgili bilgi birikimimiz artacaktır.

Yukarıda tartışıldığı gibi, hsa-miR-6089 da sağlıklı bireylerin plazma örneklerinde en fazla eksprese edilen 20 miRNA arasında yer almaktadır (Hruštincová vd.,2015). Sözkonusu miRNA ile ilgili bilgilerin çok kısıtlı olması nedeniyle, günümüzde yaygın kullanımda olan veri tabanlarında bu miRNA'ya özgün hedef genler ve yolak analizleri yapılamamaktadır. Hsa-miR-6089, Xp22.3'de lokalizedir ve 24 nt uzunluğundadır. İki adet kadavra örneğinde doku-spesifik miRNA'ların belirlenmesini hedefleyen bir çalışmada, miR-6089'un doku-spesifik bir miRNA olmadığı gösterilmiştir (Ludwig vd., 2016). Illumina HiSeq 2000 dizi analiz sistemi kullanılarak 4 hepatoselüler karsinom hastası, 12 siroz hastası ve 9 sağlıklı bireyin plazma örneklerinde yapılan miRNA profillemesi çalışmasında miR-6089'un hepaselüler karsinomlu hastalarda sirozlu ve sağlıklı bireylere oranla sırası ile 3 kat ve 2 kat ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir (Moshiri vd.,2018). Multiple myelom (MM) hastaları ile anlamı belirsiz monoklonal gamopati (MGUS) hastalarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, MM hastalarında miR-6089, miR-6087, MiR-4430, miR-4530 ve miR-4281'in anlamlı derecede down-regüle olduğu ve bu miRNA'ların farklılaşma ve metastatik progresyon için gen ekspresyonunun post-transkripsiyonal regülasyonunda yer aldıkları bildirilmiştir (Desantes vd., 2015). Çalışmamızda DBBHL olgularının plazma eksozom örneklerinde hsa-miR-6089 ekspresyonunun down-regüle olduğu belirlenmişti. Dolayısıyla solid tümörler ve hematolojik malignansilerle yapılan bu çalışmalardan elde edilen birbirine zıt sonuçlar, hsa-miR-6089'un hematolojik malignansilere özgün bir değişim gösterdiğini düşündürmektedir. DBBHL'nin da dahil olduğu B-hücreli NHL'larda hsa-miR-6089'un fonksiyonel önemine odaklanan detaylı çalışmalara gereksinim vardır.

Çalışmamızda DBBHL hastalarının plazma örneklerinden izole edilen eksozomlarda hsa-miR-939'un down-regüle olduğu belirlenmişti. Normal doku karşılıkları ile karşılaştırıldığında,

kolorektal kanser doku örneklerinde de hsa-miR-939'un down-regüle olduğu gösterilmiştir (Wang vd., 2015). Yeni tanı alan gastrik kanserli 112 hastanın doku örneklerinde hsa-miR-939'un ekspresyonunun analiz edildiği bir çalışmada, lokal relaps veya uzak metastaz gözlenen olgularda hsa-miR-939 ekspresyonunun tümör relapsı olmayan ve metastaz gözlenmeyen olgulara göre anlamlı düzeyde down-regüle olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada, gastrik kanser hücre hatları kullanılarak hsa-miR-939'un kanser hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. MTT ve koloni oluşturma testleri ile hsa-miR-939 yokluğunda kanser hücrelerinin proliferasyon ve *in vitro* tümör oluşturma yeteneklerinin uyarıldığı gözlenmiştir. Ayrıca, hsa-miR-939'un kanser hücrelerini apoptoza yönlendirdiği de belirlenmiştir. Çalışmanın bu ilk bulguları hsa-miR-939 inhibisyonunun hücrel göçü ve invazyonu uyardığıdır. Önemli bir bulgu da hsa-miR-939 aşırı ekspresyonunun, birçok kanserin patogenezinde önemli rol oynayan RAF-MEK-ERK yolağını inhibe ettiğinin belirlenmesidir (Zhang vd., 2017). 2017 yılında yapılan bir meta analiz çalışmasında, nüks göstermeyen prostatik kanserli hastalarla karşılaştırıldığında, nüks prostat kanserinde hsa-miR-939'un en sık down-regüle olan miRNA'lar arasında yer aldığı rapor edilmiştir (Pashaei vd., 2017). Bu benzer bulguların aksine, platelet hücrelerinin 5.000 x g'de santrifüj edilmesi ile elde edilen platelet-kökenli mikropartiküllerin miR-939 içerdiği ve bu mikropartiküllerin over kanser hücre hatları tarafından absorbe edildiği gösterilmiştir. Çalışmada, 24 saat sonra E-kaderin mRNA düzeyinde azalma ve vimentin, fibronektin, ZEB2 ve slug mRNA düzeyinde artış gözlenmiştir. Dolayısıyla miR-939'un platelet ve kanser hücreleri arasında etkileşime aracılık ettiği ve epitelyal-mezenkimal dönüşüm aracılığı ile metastazı uyardığı gösterilmiştir (Tang vd., 2017). Triple-negatif meme kanserli hastalarda hsa-miR-939 ekspresyonunun arttığı ve negatif prognostik faktör olarak değerlendirilebileceği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, hücre hatlarında hsa-miR-939 aşırı ekspresyonunun hücre proliferasyonu ve göç yeteneği ile ilişkili olmadığı, ancak hsa-miR-939'un tümör-kökenli eksozomlar aracılığı ile endotel hücrelere transfer edildiği ve sonuçta endotel hücrelerinde vasküler endotelyal- kaderin (VE-kaderin) ekspresyonunu değiştirerek endotel hücrelerin bariyer fonksiyonunun bozulduğu belirlenmiştir (Di Modica vd., 2017). İnsan kanserlerinde hsa-miR-939'un fonksiyonu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmaların sonuçları birbiri ile uyumlu değildir. Literatürde varolan bu çelişkili bulgular, has-miR-939'un tümör-gelişimi veya tümör baskılanması olmak üzere dual fonksiyonu olabileceğini düşündürmektedir. miRNA'ların hedeflerinde birçok farklı gen bulunmaktadır ve hedefledikleri genlere göre de farklı fonksiyonları yerine getirerek, farklı sonuçlarla karşımıza çıkabilmektedirler. Has-miR-939 örneğinde olduğu gibi, tek bir miRNA etkilediği gen/genler ve yolak/yolaklara bağlı olarak farklı kanser türlerinde hem tümör gelişimini uyarabilir hem de tümör baskılayıcı karakterde olabilir (Agarwal vd., 2015). Çalışmamızdan elde ettiğimiz ön bulgular, DBBHL'da hsa-miR-939'un tümör baskılayıcı

özellikte olduğudur, ancak lenfomagenezdeki rolünü açıklayacak detaylı moleküler mekanizmaların ortaya çıkarılacağı fonksiyon çalışmalarına gereksinim vardır.

Tümör gelişimi ve progresyonunda tümörün yer aldığı mikroçevre ve bu mikroçevreyi oluşturan hücreler arasındaki etkileşim son derece önemlidir. Eksozomlar, fonksiyonel olarak aktif formdaki proteinleri, lipidleri ve nükleik asitleri alıcı hücrelere transfer ederler ve bu hücrelerde gen ekspresyonunu regüle ederek, alıcı hücrenin davranışını değiştirirler (Whiteside vd., 2016). En temel yaklaşımla, eksozomlara miRNA'ların yüklenmesi, kanser hücrelerinin tümör baskılayıcı miRNA'lardan uzaklaşmasına ve sonuçta onkogenik potansiyellerinin artışı ile birlikte komşu hücrelerde gen ekspresyonunu değiştirerek tümörün progresyonuna katkı sağlayacaktır. Eksozomların spesifik olarak hangi alıcı hücreleri hedefledikleri net olarak bilinmemektedir. Ancak bugüne kadar yapılan çalışmalar, çeşitli hücrelerden köken alan eksozomların farklı hücreler tarafından pasif veya aktif olarak internalize edildiklerini göstermektedir. Mantle hücreli lenfoma hücre hatları ile yapılan ko-kültür çalışmasında, kanser hücrelerinden salınan eksozomların, aynı kanser hücreleri tarafından hızlı bir biçimde internalize edildikleri, ancak T-hücreli lösemi hücrelerinde bu internalizasyonunun son derece düşük olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda, lenfoma hücre-kökenli eksozomların sağlıklı bireylerin kan örneklerinden izole edilen B-hücreleri tarafından etkin biçimde internalize edilirlerken, T-lenfositleri ve NK hücreleri tarafından zar-zor internalize edildikleri belirlenmiştir (Hazan-Halevy vd., 2015). Plazma örneklerinden izole edilen eksozomların B-hücreleri tarafından internalizasyonları yaş gruplarına göre değerlendirildiğinde, yaşla birlikte internalizasyonun arttığı, hatta lipopolisakkarit ile uyarılmış B-hücrelerinin eksozomları daha hızlı internalize ettikleri gözlenmiştir. Bu çalışmada ilginç bir bulgu da, bir bireyin eksozom protein profilinin yaklaşık 5 yıl gibi sabit kaldığıdır (Eitan vd., 2017). Melanoma hücreleri ile yapılan bir çalışmada, eksozomlar sükröz gradientine göre "düşük" ve "yüksek" yoğunluk fraksiyonunda olmak üzere iki farklı alt popülasyonda sınıflandırılmışlardır. Bu iki alt popülasyonunun detaylı analizinde, eksozom marker proteinleri olan CD9, CD63, CD81, ALIX ve TSG101'in "düşük" yoğunluk fraksiyonda daha fazla miktarda olduğunun belirlenmesinin yanısıra farklı protein ve RNA içeriklerine sahip oldukları da gösterilmiştir. Bu farklılıkların bir yansıması olacak şekilde, her iki alt grubun alıcı endotel hücrelerdeki biyolojik etkinlikleri de farklı olmuştur (Willms vd., 2016). Yakın bir zamanda, B-hücre kökenli eksozomların non-template-directed 3'-uridylylated miRNA'lardan zengin oldukları, oysa B-hücrelerinin daha çok 3'-adenylylated miRNA'lardan zengin oldukları gösterilmiştir (Koppers-Lalic VD., 2014). miRNA'ları eşleştirmek için non-templated üridin kalıntılarının eklenmesi, miRNA döngüsünü hızlandırır (Baccarini vd., 2011). Dolayısıyla, bir miRNA'nın olduğu yerde kalması veya salgılanması, stabilitesini/yarı ömrünü etkileyebilecektir. Hem hücrelerde hem de

eksozomlarda saptanan miRNA'ların 3'-uç modifikasyonlarının fonksiyonel önemi bilinmemekle birlikte, "etiketli" bu miRNA'ların farklı eksportu, hücrelerin de farklı, spesifik miRNA'ları eksport etmelerine olanak sağlayabilecektir. Bu değerlendirmelerin/yorumların biyolojik olarak da gerçekleştiğine yönelik önemli çalışmalara gereksinim vardır.

Çalışmamızda, DBBHL hücreleri ve bu hücrelerden köken alan eksozomların farklı miRNA profillerine sahip oldukları gözlemlendi. *KRAS* patojenik varyant durumunun hem hücrelerde hem de bu hücrelerden salınan eksozomların miRNA profilini etkiledikleri rapor edilmiştir (Cha vd., 2015). *KRAS* ve *p53* patojenik varyantlarına sahip akciğer kanser hücre hattı ile yapılan bir çalışmada da 165 miRNA'nın kanser hücrelerinde bulunmadığı ve sadece eksozomlarda var olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca wild-type *p53* ve miR-125b'nin potansiyel sinerjik etki göstererek *in vivo* ve *in vitro* M1 makrofaj sayısını arttırdıkları gözlenmiştir (Trivedi vd., 2016). Çalışmamızda farklı DBBHL hücre hatları ile ko-kültüre edilen B-hücrelerinin eksozomlarında da farklı miRNA profillerinin varlığı saptandı. Bu DBBHL hücre hatlarının en azından t(14;18) translokasyonu ve *p53* patojenik varyantın varlığı açısından farklılıklar gösterdiği bilinmektedir. *p53*'ün patojenik varyantına sahip olan hücre hatlarının (U2940 dışındaki tüm hücre hatları) ko-kültür sonrası sağlıklı B-hücrelerine yaklaşık 30 farklı miRNA'yı farklı regülasyonlarda (farklı katlı değişimlerle) aktardıkları gözlenirken, wild-type *p53*'e sahip U2940 hücre hattının ko-kültür sonrası sağlıklı B-hücrelerine hsa-miR-4701-3p, hsa-miR-595, hsa-miR-6089, hsa-miR-6803-5p, hsa-miR-8069 ve hsa-miR-8071 olmak üzere sadece 5 farklı miRNA'yı (up-regüle) aktardıkları belirlenmiştir. *P53*, hücrel stresine karşı yanıt oluşturan bir transkripsiyon faktörüdür ve mikroçevre stresinin varlığı durumunda eksozom mekanizmasında ve salınımında önemli bir rol oynar. Örneğin, *TSAP6* (tumor suppressor activated pathway-6)'nın *p53*-bağımlı regülasyonunun eksozom salınımını ve içeriğini düzenlediği gösterilmiştir (Lespagnol vd., 2008). 2018 yılında, Hepatoselüler kanser hücre hatları ile yapılan bir çalışmada, patojenik varyanta sahip *p53*'ün, patojenik varyant *p53*-bağımlı hücrel strese kaynaklanan eksozom salınımını kolaylaştırarak mikroçevre koşullarını etkilediği gösterilmiştir. RNA'ya bağlanan bir protein olan hnRNPa2b1 proteininin *p53* patojenik varyantı ile ilişkili olduğu ve bunun da kanser hücresi-kökenli eksozomların miR-1246 açısından zengin olmasına neden olduğu bildirilmiştir (Cooks vd., 2018). mRNA'ların eksozomlar içine nasıl transfer edildiği ve spesifik tanıma motifleri ile ilgili şifrelemeye ait bilgilerimiz oldukça sınırlıdır. Konu ile ilgili çalışmalar devam etmektedir ve RNA'ya bağlanan proteinlerin RNA moleküllerin spesifik paketlenmesinde önemli rol oynayabilecekleri düşünülmektedir. Bir başka ifade ile, hücrelerde düşük düzeyde bulunan bazı miRNA'ların eksozomlara aktararak burada muhafaza edildikleri görülmektedir. Özetle, tümör-kökenli eksozomlar tümör mikroçevresini özgün olarak yeniden programlar ve bu programlamada sahip oldukları genetik değişiklikler

önemli rol oynayabilir. Proje ekibimiz, DBBHL'nin heterojen doğası nedeniyle, sahip oldukları genetik değişimlerin ekzozom salınımının yanı sıra hedef hücrelere farklı molekülleri aktarabileceklerini düşünmektedir ve DBBHL'da tümör-kökenli ekzozomların tümör hücrelerinin sahip oldukları mutasyonlarla ilişkisini araştıran yeni çalışmaların başlatılmasını planlamaktadır.

Çalışmamızda beklendiği gibi tüm DBBHL hücre hatlarının miRNA profilleri farklılık gösterdi. Ayrıca, normal B-hücreleri ile ko-kültüre edilmiş B-hücrelerinin farklı miRNA profillerine sahip oldukları belirlendi. İlginç bir bulgu da, DBBHL'nin aynı moleküler alt-tipine sahip olan hücrelerin normal B-hücrelerine farklı miRNA'ları aktarmaları ve bu hedef B-hücrelerinde farklı ekspresyon düzeylerine sahip miRNA profillerinin oluşmasına neden olmalarıdır. Tüm bu bulgular, aynı moleküler alt tipe olmalarına karşın, lenfoma hücrelerinin farklı miRNA'ları ekzozomlara yüklediklerini ve/veya aktardıklarını göstermektedir. Dolayısıyla, şu anda güncel DBBHL moleküler alt tip sınıflandırmasının, lenfoma-kökenli ekzozomların sınıflandırılması açısından yetersiz olduğu açıktır. Bu kapsamda yapılacak geniş-çaplı çalışmalardan elde edilecek veriler, yakın zamanda DBBHL moleküler alt tip sınıflandırmasının yeniden düzenlenerek güncellenmesinin önünü açacaktır. Proje ekibimiz, yukarıda detayları ile tartışıldığı üzere, tümör hücresinin sahip olduğu patojenik varyantların yanısıra uzun kodlamayan RNA'lar (lnc-RNA) başta olmak üzere tümör-kökenli ekzozomların içerdikleri nükleik asitlerin hedef hücrelerde miRNA ekspresyon profilindeki farklılıkların nedeni olabileceğini düşünmektedir.

DBBHL, Batı ülkelerinde %31'lik oran ile erişkinlerde en sık görülen lenfoid malignitedir. Agresif karakterdedir. Kimerik monoklonal anti-CD20 antikoru rituksimabın konvansiyonel CHOP kemoterapisine eklenmesi, progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalımı önemli ölçüde iyileştirmiştir. Ancak, DBBHL hastalarının yaklaşık %40'ı bu tedaviye rağmen relaps nedeniyle hayatlarını kaybetmektedir. Dolayısıyla, R-CHOP temeline yeni biyolojik ajanların eklenerek, tedavi başarısının artırılmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bafilomisin A1, *Streptomyces* türlerinden izole edilen bir antibiyotiktir ve vakuolar H⁺ATPaz (V-ATPaz)'ın inhibitörüdür. Kanserde tipik olarak V-ATPaz aktif durumdadır ve V-ATPaz inhibitörleri anti-kanser ajanları olarak değerlendirilmektedirler. Bafilomisin'in antikanser etkinliğinin, V-ATPaz inhibisyonunun neden olduğu intraselüler asidozdan kaynaklandığı düşünülmektedir (Duffy vd., 2015). Ekzozom biyogenezi, endozomal sistemde bulunan multiveziküler cisim içinde gerçekleşir. Bafilomisin A1'in multiveziküler cisim ve lizozom arasındaki trafiği inhibe ettiği de gösterilmiştir (Van Deurs vd., 1996). Aynı zamanda, EV'lerin alıcı hücrelere interlizasyonu enerji gerektiren bir olaydır ve aktif-V-ATPaz'ın varlığına dayalıdır. Prostat kanser hücre hatları ile yapılan bir çalışmada, düşük doz (10 nM) Bafilomisin A1 kullanılarak V-ATPaz bloke

edildiğinde, eksozomların alıcı hücreler tarafından internalize edilmesini (asidik koşullara gereksinim vardır) önleyen bir pH ortamı oluşturduğu gösterilmiştir (Ronquist vd., 2016). B-hücreli ALL, AML, CML olmak üzere farklı lösemi hücrelerinde Bafilomisin A1'in etkinliğinin incelendiği bir çalışmada, hücre döngüsünün S ve G2/M fazında pediatrik B-ALL hücrelerinin sayısında azalma gözlenmiş ve hücre hatlarına özel olarak bazı siklin-bağımlı kinaz inhibitörlerinin protein düzeyi artarken, bazı siklin ailesi üyelerinin protein düzeyinin azaldığı saptanmıştır. Bafilomisin A1'in B-ALL hücre hatlarında intraselüler veziküllerin pH'sı üzerine etkisi araştırıldığında, düşük doz Bafilomisin A1 uygulamasının otofajiyi inhibe ettiği saptanmıştır. Bafilomisin A1 uygulaması, aynı zamanda Beclin1-Bcl2 kompleksinde artışa neden olmuş ve kaspaz-bağımsız yolakla apoptozu uyardığı gösterilmiştir (Yuan vd., 2015). Düşük doz Bafilomisin A1 varlığında Beclin 1-Bcl-2 kompleksinin artışı, otofaji mekanizmasında Beclin-1'in azalmasına ve anti-apoptotik mekanizmada da Bcl-2'nin azalmasına neden olabilir ve bu kompleks sitoprotektif olan otofajiyi bozarak ve apoptotik kaskadı başlatarak sinerjik dual etki gösterebilir. Yüksek-doz Bafilomisin A1 uygulamasının sadece V-ATPaz'ı ve otofajinin geç fazını etkilediği bilinmektedir (Klionsky vd.,2008). Hepatoblastomada, Bafilomisin A1 uygulamasından sonra, kanser hücrelerinde V-ATPaz'la ilişkili *ATP6V0D2*, *ATP6V1B1* ve *ATP6V0A1* genlerinin ekspresyonunun azaldığı ve apoptozun uyarıldığı gösterilmiştir (Morimura vd., 2008). Hepatoselüler karsinom ve over kanserinde, Bafilomisin A1'in hücre proliferasyonunu ve invazyon yeteneğini baskıladığı, ancak apoptozu uyardığı rapor edilmiştir. Tedavi uygulamasından 48 saat sonrasında, her iki kanser hücresinde ortak olarak miR-923, miR-1246, miR-149, miR-638 ve miR-210'un anlamlı düzeyde up-regüle oldukları, miR-99a, miR-181a-2 ve miR-339-5p'nin anlamlı düzeyde down-regüle oldukları belirlenmiştir (Xiaodong vd., 2015). Literatürde yer alan verilerle uyumlu olarak, çalışmamızda tüm DBBHL hücre hatlarında düşük doz Bafilomisin A1 uygulamasının hücre ölümünü anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiştir. DBBHL standard R-CHOP tedavi rejimine Bafilomisin A1 eklenmesi; en azından tümör hücrelerinin kendi aralarında haberleşmelerine aracılık eden eksozomların internalizasyonunu azaltma, otofajiyi inhibe etme ve apoptozu uyarma olmak üzere 3 farklı mekanizma ile standard R-CHOP tedavisinin etkinliğini arttırdığı düşünülmektedir. Hücre ölümü üzerine Bafilomisin A1'in etkinliğini açıklayan mekanizmaları tanımlamak ve *in vitro* modellerde bu kombine tedavinin benzer etkinliği gösterip göstermediğini belirlemek, proje ekibimiz tarafından planlanan diğer çalışmalar arasında yer almaktadır.

Sonuç olarak, DBBHL'da tümör-kökenli eksozomların fonksiyonel önemini belirlemeyi hedefleyen çalışmamızda;

- Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldıklarında, DBBHL hastalarının plazma eksozom konsantrasyonlarında anlamlı artış gözlemlendi. Ayrıca, izole edilen eksozomların da heterojenite gösterdikleri belirlendi.

- Nodal tutulumlu ve ileri evre DBBHL hastalarının plazma eksozom konsantrasyonlarının anlamlı derecede azalma gözlemlendi. Eksozomların plazmadan geri çekilme nedeni/nedenlerinin belirlenmesi, DBBHL patogenezinin aydınlatılmasına önemli katkılar sağlayacaktır.

- DBBHL hastalarının plazma eksozomlarında 33 adet miRNA'nın ekspresyonunda anlamlı azalma saptandı ve bu miRNA'ların KEGG yolağı veri tabanında lenfomagenezle ilişkili olabilecek genleri hedefledikleri belirlendi. Bu miRNA'ların hangilerinin lenfoma-spesifik ve hangilerinin de lenfoma ile ilişkili olduğunun belirlenmesi, öncelikli hedeflerimiz arasındadır.

- Sağlıklı B-hücrelerinin DBBHL-kökenli eksozomları etkin biçimde internalize ettikleri ve farklı lenfoma-kökenli eksozomların B-hücrelerinde farklı miRNA ekspresyonlarına neden oldukları belirlendi. Lenfoma hücrelerinin sahip olduğu genetik ve epigenetik yapının yanısıra, lenfoma-kökenli eksozomun içerdiği diğer nükleik asitlerin varlığının bu hücrelerden salınan eksozomların içeriğini belirlenmesinde son derece kritik öneme sahip olduğunu düşünmekteyiz. Sonuçta, her bir lenfoma hücrelerinin eksozomlar aracılığıyla tümör mikroçevresini yeniden programlayabileceğini öngörmekteyiz.

- Düşük doz Bafilomisin A1 uygulamasının lenfoma hücrelerini R-CHOP tedavisine karşı daha duyarlı hale getirdiği belirlendi. Düşük doz Bafilomisin A1 uygulamasının Beclin 1-Bcl2 kompleksinin oluşumunu artırarak ve/veya hücrede oluşturduğu ortam pH'sı nedeniyle eksozom internalizasyonunu bloke ederek hücrelerin proliferasyonunu engelleyebileceği ve/veya ölüme neden olabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Agarwal, V. Bell, G. W. Nam, J. W. and Bartel, D. P. 2015. "Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs", *eLife*, 4, 10.

Ageberg, M. Rydström, K. Lindén, O. Linderöth, J. Jerkeman, M. Drott, K. 2011. "Inhibition of geranylgeranylation mediates sensitivity to CHOP-induced cell death of DLBCL cell lines", *Experimental Cell Research*, 317(8), 1179-91.

Ageberg, M. Rydström, K. Lindén, O. Linderöth, J. Jerkeman, M. Drott, K. 2011. "Inhibition of geranylgeranylation mediates sensitivity to CHOP-induced cell death of DLBCL cell lines", *Experimental Cell Research*, 317(8), 1179-91, (2011).

Alencar, A. J. Malumbres, R. Kozloski, G. A. Advani, R. Talreja, N. Chinichian, S. Briones, J. Natkunam, Y. Sehn, L. H. Gascoyne, R. D. Tibshirani, R. Lossos, I. S. 2011. "MicroRNAs are independent predictors of outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP", *Clinical Cancer Research*, 17(12), 4125–41.

Alexander, M. Hu, R. Runtsch, M. C. Kagele, D. A. Mosbrugger, T. L. Tolmachova, T. Seabra, M. C. Round, J. L. Ward, D. M. O'Connell, R. M. 2015. "Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin", *Nature Communications*, 18(6), 7321.

Baccarini, A. Chauhan, H. Gardner, T. J. Jayaprakash, A. D. Sachidanandam, R. Brown, B. D. 2011. "Kinetic analysis reveals the fate of a microRNA following target regulation in mammalian cells", *Current Biology*, 21, 369–376.

Ben-Dov, I. Z. Whalen, V. M. Goilav, B. Max, K. E. Tuschl, T. 2016. "Cell and Microvesicle Urine microRNA Deep Sequencing Profiles from Healthy Individuals: Observations with Potential Impact on Biomarker Studies", *PLoS One*, 11, e0147249.

Bennit, H. R. F. Amber, G. Oppegard, L. J. Chi, D. P. Khan, S. Wall, N. R. 2017. "Uptake of lymphoma-derived exosomes by peripheral blood leukocytes", *Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy*, 79-23.

Bracken, C. P. Scott, H. S. Goodall, G. J. 2016. "A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer", *Nature Review Genetics*, 17, 719–32.

Caby, M. P. Lankar, D. Vincendeau-Scherrer, C. Raposo, G. Bonnerot, C. 2005. "Exosomal like vesicles are present in human blood plasma", *International Immunology*, 17(7), 879-87.

Cech, T. R. Steitz J. A. 2014. “The noncoding RNA revolution- trashing old rules to forge new ones”, *Cell*, 157, 77–94.

Cha, D. J. Franklin, J. L. Dou, Y. Liu, Q. Higginbotham, J. N. Demory Beckler, M. Weaver, A. M. Vickers, K. Prasad, N. Levy, S. Zhang, B. Coffey, R. J. Patton, J. G. 2015. “KRAS-dependent sorting of miRNA to exosomes”, *eLife*. 1(4), e07197.

Clague, M. J. Urbé, S. Aniento, F. Gruenberg, J. 1994. “Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation”, *Journal of Biological Chemistry*, 269(1), 21-4.

Cooks, T. Pateras, I.S. Jenkins, L. M. Patel, K. M. Robles, Al. Morris, J. Forshew, T. Appella, E. Gorgoulis, V. G. Harris, C. C. 2018. “Mutant p53 cancers reprogram macrophages to tumor supporting macrophages via exosomal miR-1246”, *Nature Communicate*, 22,9(1), 771

De Tute, R. M. Barrans, S. Rawstron, A. C. Johnson, P. W. M. Davies, A. J. Jack, A. 2013. “Patients With DLBCL Commonly Have B-Cell Lymphopenia and Circulating Clonal B-Cell Populations With a Phenotype Concordant With The Underlying Tumour”, *Blood*, 122(21), 3013.

Desantes, V. Ilaria, C. Luca, B. Lucia, D. M. Sergio, M. Ivana, C. Maurizio, D. Angelo, V. Maria, A. F. 2015. “MicroRNA profile in bone marrow fibroblasts from patients with multiple myeloma”, *EHA Learning Center*, 12, 100347.

Di Modica, M. Regondi, V. Sandri, M. Iorio, M. V. Zanetti, A. Tagliabue, E. Casalini, P. Triulzi, T. 2017. “Breast cancer-secreted miR-939 downregulates VE-cadherin and destroys the barrier function of endothelial monolayers”, *Cancer Letters*, 1(384), 94-100.

Duffy, A. Le, J. Sausville, E. Emadi, A. 2015. “Autophagy modulation: a target for cancer treatment development”, *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 75(3), 439-447.

Dunleavy, K. Pittaluga, S. Czuczman, M. S. Dave, S. S. Wright, G. Grant, N. Shovlin, M. Jaffe, E. S. Janik, J. E. Staudt, L. M. Wilson, W. H. 2009. “Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma” *Blood*, 113(24), 6069–6076.

Eitan, E. Green, J. Bodogai, M. Mode, N. A. Bæk, R. Jørgensen, M. M. Freeman, D. W. Witwer, K. W. Zonderman, A. B. Biragyn, A. Mattson, M. P. Noren Hooten, N. Evans, M. K. 2017. “Age-

Related Changes in Plasma Extracellular Vesicle Characteristics and Internalization by Leukocytes”, *Scientific Reports*, 7(1), 1342.

Eitan, E. Green, J. Bodogai, M. Mode, N. A. Bæk, R. Jørgensen, M. M. Freeman, D. W. Witwer, K. W. Zonderman, A. B. Biragyn, A. Mattson, M. P. Noren Hooten, N. Evans, M. K. 2017. “Age-Related Changes in Plasma Extracellular Vesicle Characteristics and Internalization by Leukocytes”, *Scientific Reports*, 7(1), 1342.

Eitan, E. Green, J. Bodogai, M. Mode, N.A. Bæk, R. Jørgensen, M. M. Freeman, D. W. Witwer, K. W. Zonderman, A. B. Biragyn, A. Mattson, M. P. Noren Hooten, N. Evans, M. K. 2017. “Age-Related Changes in Plasma Extracellular Vesicle Characteristics and Internalization by Leukocytes”, *Scientific Report*, 2,7(1), 1342.

Etheridge, A. Lee, I. Hood, L. Galas, D. Wang, K. 2011. “Extracellular microRNA: A new source of biomarkers”, *Mutation Research*, 717(1-2), 85–90.

Fang, C. Zhu, D. -X. Dong, H. -J. Zhou, Z. -J. Wang, Y. -H. Liu, L. Fan, L. Miao, K.-R. Liu, P. Xu, W. et al. 2012, “Serum microRNAs are promising novel biomarkers for diffuse large B cell lymphoma”, *Annals of Hematology*, 91, 553–559.

Fehlmann, T. Ludwig, N. Backes, C. Meese, E. Keller, A. 2016. “Distribution of microRNA biomarker candidates in solid tissues and body fluids”, *RNA Biology*, 13, 1084–88.

Ferrero, G. Cordero, F. Tarallo, S. Arigoni, M. Riccardo, F. Gallo, G. Ronco, G. Allasia, M. Kulkarni, N. Matullo, G. Vineis, P. Calogero, R. A. Pardini, B. Naccarati, A. 2017. “Small non-coding RNA profiling in human biofluids and surrogate tissues from healthy individuals: description of the diverse and most represented species”, *Oncotarget*, 14,9(3), 3097-3111.

Fotinos-Ioannis, D. D. Anastasia, K. Andrew, Y. Kristen, R. Stephen, B. Alicia, H. Malcolm, B. 2016. “Correlation of exosome concentrations in the plasma of lung cancer patients with disease stage”, *Journal of Clinical Oncology*, 34.

Freedman, J. E. Gerstein, M. Mick, E. Rozowsky, J. Levy, D. Kitchen, R. Das, S. Shah, R. Danielson, K. Beaulieu, L. Navarro, F. C. Wang, Y. Galeev, T. R. et al. 2016. “Diverse human extracellular RNAs are widely detected in human plasma”, *Nature Communicate*, 7, 11106.

Galindo-Hernandez, O. Villegas-Comonfort, S. Candanedo, F. et al. 2013. "Elevated concentration of microvesicles isolated from peripheral blood in breast cancer patients", *Archives of Medical Research*, 44(3), 208–214,

Garzon, R. Marcucci, G. Croce, C. M. 2010. "Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges", *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(10), 775-89.

Gould, S. J. Raposo, G. 2013. "As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles", *Journal of Extracellular Vesicles*, 15, 2.

Hans, C. P. Weisenburger D. D. Greiner, T. C. Gascoyne, R. D. Delabie, J. Ott, G. Muller-Hermelink, H. K. Campo, E. Braziel, R. M. Jaffe, E. S. Pan, Z. Farinha, P. Smith L. M. Falini, B. Banham, A. H. Rosenwald, A. Staudt, L. M. Connors, J. M. Armitage, J. O. Chan, W. C. 2004. "Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray", *Blood*, 103(1), 275-82.

Hans, C. P. Weisenburger, D. D. Greiner, T. C. Gascoyne, R. D. Delabie, J. Ott, G. Muller-Hermelink, H. K. Campo, E. Braziel, R. M. Jaffe, E. S. Pan, Z. Farinha, P. Smith, L. M. Falini, B. Banham, A. H. Rosenwald, A. Staudt, L. M. Connors, J. M. Armitage, J. O. Chan, W. C. 2004. "Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray", *Blood*, 103(1), 275-82

Hans, C. P. Weisenburger, D. D. Greiner, T. C. Gascoyne, R. D. Delabie, J. Ott, G. Muller-Hermelink, H. K. Campo, E. Braziel, R. M. Jaffe, E. S. Pan, Z. Farinha, P. Smith, L. M. Falini B. Banham A. H. Rosenwald, A. Staudt, L. M. Connors, J. M. Armitage, J. O. Chan, W. C. 2004. "Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray", *Blood*, 103(1), 275-82.

Hazan-Halevy, I. Rosenblum, D. Weinstein, S. Bairey, O. Raanani, P. Peer, D. 2015. "Cell-specific uptake of mantle cell lymphoma-derived exosomes by malignant and non-malignant B-lymphocytes", *Cancer Letters*, 364(1), 59–69.

Hazan-Halevy, I. Rosenblum, D. Weinstein, S. Bairey, O. Raanani, P. Peer, D. 2015. "Cell-specific uptake of mantle cell lymphoma-derived exosomes by malignant and non-malignant B-lymphocytes", *Cancer Letters*, 1,364(1), 59-69.

He, M. Crow, J. Roth, M. Zeng, Y. Godwin, A. K. 2014. "Integrated immunoisolation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology", *Lab on a Chip*, 7,14(19), 3773-80.

Hessvik, N. P. Phuyal, S. Brech, A. Sandvig, K. Llorente, A. 2012. "Profiling of microRNAs in exosomes released from PC-3 prostate cancer cells", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819(11-12), 1154-63.

Hruštinová, A. Votavová, H. Dostálová, Merkerová, M. 2015. "Circulating MicroRNAs: Methodological Aspects in Detection of These Biomarkers", *Folia Biologica (Praha)* 61(6), 203-18.

Huang, S. Lu, W. Ge, D. Meng, N. Li, Y. Su, L. Zhang, S. Zhang, Y. Zhao, B. Miao, J. 2015. "A new microRNA signal pathway regulated by long noncoding RNA TGFB2-OT1 in autophagy and inflammation of vascular endothelial cells", *Autophagy*, 11(12), 2172-83.

Iqbal, J. Shen, Y. Huang, X. Liu, Y. Wake, L. Liu, C. Deffenbacher, K. Lachel, C.M. Wang, C. Rohr, J. et al. 2015. "Global microRNA expression profiling uncovers molecular markers for classification and prognosis in aggressive B-cell lymphoma", *Blood*, 125, 1137–1145.

Ivashchenko, A. Berillo, O. Pyrkova, A. Niyazova, R. Atambayeva, S. 2014. "MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes", *Bioinformatics*, 22,10(7), 423-7.

Jaiswal, R. Luk, F. Gong, J. Mathys J. M. Grau, G. E. Bebawy, M. 2012. "Microparticle conferred microRNA profiles - implications in the transfer and dominance of cancer traits", *Molecular Cancer*, 11(1), 37.

Jones, K. Nourse, J. P. Colm, K. Bhatnagar, A. Gandhi, M. K. 2013, "Plasma microRNA are disease response biomarkers in classical hodgkin lymphoma", *Clinical Cancer Research*, 20, 253–264.

Jørgensen, M. Bæk, R. Pedersen, S. Søndergaard, E. K. Kristensen, S. R. Varming, K. 2013. "Extracellular Vesicle (EV) Array: microarray capturing of exosomes and other extracellular vesicles for multiplexed phenotyping", *Journal of Extracellular Vesicles*, 18, 2.

Kawaguchi, T. Miyazawa, K. Moriya, S. Ohtomo, T. Che, X. F. Naito, M. Itoh, M. Tomoda, A. 2011. "Combined treatment with bortezomib plus bafilomycin A1 enhances the cytotoxic effect and induces endoplasmic reticulum stress in U266 myeloma cells: crosstalk among

proteasome, autophagy-lysosome and ER stres”, *International Journal of Oncology*, 38(3), 643-54.

Keller, S. Sanderson, M. P. Stoeck, A. and Altevogt, P. 2006. “Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function”, *Immunology Letters*, 107(2), 102-08.

Khare, D. Goldschmidt, N. Bardugo, A. Gur-Wahnon, D. Ben-Dov, I. Z. Avni B. 2017. “Plasma microRNA profiling: Exploring better biomarkers for lymphoma surveillance”, *PLoS One*, 13,12(11), e0187722.

Klionsky, D. J. Elazar, Z. Seglen, P. O. Rubinsztein, D. C. 2008 “Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes”, *Autophagy*. 4(7), 849–850.

Koppers-Lalic, D. Hackenberg, M. Bijnsdorp, IV. van Eijndhoven, M. A. J. Sadek, P. Sie, D. Zini, N. Middeldorp, J. M. Ylstra, B. de Menezes, R. X. Würdinger, T. Meijer, G. A. Pegtel, D. M. 2014. “Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes”, *Cell Reports*, 25,8(6), 1649-1658.

Kowal, J. Arras, G. Colombo, M. Jouve, M. Morath, J. P. Primdal-Bengtson, B. Dingli, F. Loew, D. Tkach, M. Théry, C. 2016. “Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes”, *Proceedings of National Academy Sciences United States of America*, 113(8), 968-77.

Kowal, J. Tkach, M. Théry, C. 2014. “Biogenesis and secretion of exosomes”, *Current Opinion in Cell Biology*, 29, 116-25.

Kowal, J. Tkach, M. Théry, C. 2014. “Biogenesis and secretion of exosomes”, *Current Opinion in Cell Biology*, 29, 116-25.

Kwak, P. B. Iwasaki, S. Tomari, Y. 2010. “The microRNA pathway and cancer”, *Cancer Sciences*, 101(11), 2309-15.

Lacroix, R. Judicone, C. Mooberry, M. Boucekine, M. Key, N. S. Dignat-George, F. 2013. “The ISTH SSC Workshop. Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop”, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*.

Lacroix, R. Judicone, C. Mooberry, M. Boucekine, M. Key, N. S. Dignat-George, F. 2013. “The ISTH SSC Workshop. “Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle

determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop”, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*.

Lasser, C. Eldh, M. Lötvall, J. 2012. “Isolation and Characterization of RNA-Containing Exosomes”, *Journal of Visualized Experiments*, (59), 3037.

Lawrie, C. H. Gal, S. Dunlop, H. M. Pushkaran, B. Liggins, A. P. Pulford, K. Banham, A. H. Pezzella, F. Boulwood, J. Wainscoat, J. S. Hatton, C. S. Harris, A. L. 2008. “Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma”, *British Journal of Haematology*, 141(5), 672-5.

Lawrie, C. H. Gal, S. Dunlop, H. M. Pushkaran, B. Liggins, A.P. Pulford, K. Banham, A. H. Pezzella, F. Boulwood, J. Wainscoat, J. S. et al. 2008. “Detection of elevated levels of tumour-associated micrnas in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma”, *British Journal of Haematology*, 141, 672–675.

Lawrie, C. H. Gal, S., Dunlop, H. M. Pushkaran, B. Liggins, A. P. Pulford, K. Banham, A. H. Pezzella, F. Boulwood, J., Wainscoat, J. S. et al. 2008. “Detection of elevated levels of tumour-associated micrnas in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma”, *British Journal of Haematology*, 141, 672–675.

Le, M. Fernandez-Palomo, C. McNeill, F. E. Seymour, C. B. Rainbow, A. J. Mothersill, C. E. 2017. “Exosomes are released by bystander cells exposed to radiation-induced biophoton signals: Reconciling the mechanisms mediating the bystander effect”, *PLoS One*, 9,12(3), e0173685.

Lenz, G. Wright, G. W. Emre, N. C. Kohlhammer, H. Dave, S. S. Davis, R. E. Carty, S. Lam, L. T. Shaffer, A. L. Xiao, W. Powell, J. Rosenwald, A. Ott, G. Muller-Hermelink, H. K. Gascoyne, R. D. Connors, J. M. Campo, E. Jaffe, E. S. Delabie, J. Smeland, E. B. Rimsza, L. M. Fisher, R. I. Weisenburger, D. D. Chan, W. C. Staudt, L. M. 2008. “Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105(36), 13520–13525.

Lespagnol, A. et al. 2008. “Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice”, *Cell Death & Differentiation*, 15, 1723–1733.



Li, H. Huang, S. Guo, C. Guan, H. Xiong, C. 2012. "Cell-free seminal mRNA and microRNA exist in different forms", *PLoS One*, 7(4), e34566.

Lobb, R. J. Becker, M. Wen, S. W. Wong, C. S. Wiegmans, A. P. Leimgruber, A. Möller, A. "Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma", *Journal of Extracellular Vesicles*, 17(4), 27031.

Lötvall, J, Hill, A. F. Hochberg, F. Buzás, E. Di Vizio, D. Gardiner, C. Gho, Y. S. Kurochkin IV, Mathivanan, S. Quesenberry, P. Sahoo, S. Tahara, H. Wauben, M. H. Witwer, K. W. Théry, C. 2014. "Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles", *Journal Extracellular Vesicles*, 22, 3.

Ludwig, N. Leidinger, P. Becker, K. Backes, C. Fehlmann, T. Pallasch, C. Rheinheimer, S. Meder, B. Stähler, C. Meese, E. Keller, A. 2016. "Distribution of miRNA expression across human tissues", *Nucleic Acids Reserch*, 5,44(8), 3865-77.

Malumbres, R. Sarosiek, K. A. Cubedo, E. Ruiz, J. W. Jiang, X. Gascoyne, R. D. Tibshirani, R. Lossos, I. S. 2009. "Differentiation stage-specific expression of microRNAs in B lymphocytes and diffuse large B-cell lymphomas", *Blood*, 113(6), 3754-3764.

Margue, C. Reinsbach, S. Philippidou, D. Beaume, N. Walters, C. Schneider, J. G. Nshan, D. Behrmann, I. Kreis, S. 2015. "Comparison of a healthy miRNome with melanoma patient miRNomes: are microRNAs suitable serum biomarkers for cancer", *Oncotarget*, 6, 12110–27.

Mateescu, B. Kowal, E. J. van Balkom, B. W. Bartel, S. Bhattacharyya, S. N. Buzás, E. Buck, A. H. de Candia, P. Chow, F. W. Das, S. Driedonks, T. A. Fernández-Messina, L. Haderk, F. Hill, A. F. Jones, J. C. Van Keuren-Jensen, K. R. Lai, C. P. Lässer, C. Liegro, I. D. Lunavat, T. R. Lorenowicz, M. J. Maas, S. L. Mäger, I. Mittelbrunn, M. Momma, S. Mukherjee, K. Nawaz, M. Pegtel, D. M. Pfaffl, M. W. Schifflers, R. M. Tahara, H. Théry, C. Tosar, J. P. Wauben, M. H. Witwer, K. W. Nolte-t Hoen, E. N. 2017. "Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper", *Journal of Extracellular Vesicles*, 7,6(1).

Mathivanan, S. Ji, H. Simpson, R. J. 2010. "Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication" *Journal of Proteomics*, 73(10), 1907-20.



Matsuzaki, J. Ochiya, T. 2017. "Circulating microRNAs and extracellular vesicles as potential cancer biomarkers: a systematic review", *International Journal of Clinical Oncology*, 22(3), 413-420.

McCready, J, Sims, J. D. Chan, D. Jay, D. G. 2010. "Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation", *BMC Cancer*, 16(10), 294.

McDonald, M. K. Capasso, K. E. Ajit, S. K. 2013. "Purification and microRNA profiling of exosomes derived from blood and culture media", *Journal of Visualized Experiment*, 14(76), e50294.

McDonald, M. K. Capasso, K. E. Ajit, S. K. 2013. "Purification and microRNA profiling of exosomes derived from blood and culture media", *Journal of Visualized Experiments*, (76), e50294.

Monique, A. J. van Eijndhoven, J. Zijlstra, M. Nils, J. Groenewegen, Esther, E. E. Drees, Stuart, van Niele, S. Rubina, B. Danijela, K. L. Hans van der, V. Libregts, S. Marca, H. M. W., Renee, X. de M. Jan, R. T. Van, W., Rienk, N. Lydia, V. Anke, van den B. Daphne de, J. and D. Michiel, P. 2016, "Plasma vesicle miRNAs for therapy response monitoring in Hodgkin lymphoma patients", *JCI Insight*, 17,1(19), e89631.

Morimura, T. Fujita, K. Akita, M. Nagashima, M. Satomi, A. 2008. "The proton pump inhibitor inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoblastoma", *Pediatric Surgery International*, 24,1087–1094.

Moshiri, F. Salvi, A. Gramantieri, L. Sangiovanni, A. Guerriero, P. De Petro, G. Bassi, C. Lupini, L. Sattari, A. Cheung, D. Veneziano, D. Nigita, G. Shankaraiah, R. C. Portolani, N. Carcoforo, P. Fornari, F. Bolondi, L. Frassoldati, A. Sabbioni, S. Colombo, M. Croce, C. M. Negrini, M. 2018. "Circulating miR-106b-3p, miR-101-3p and miR-1246 as diagnostic biomarkers of hepatocellular carcinoma", *Oncotarget*, 27,9(20), 15350-15364.

Mulcahy, L. A. Pink R. C. Carter, D. R. F. 2014. "Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake", *Journal of Extracellular Vesicles*, 3, 10.

Muller, L. Hong, C. S. Stolz, D. B. Watkins, S. C. Whiteside, T.L. 2014. "Isolation of biologically-active exosomes from human plasma", *Journal of Immunology Methods*, 411, 55-65.

Muringampurath-John, D. Jaye, D. L. Flowers, C. R. Saxe, D. Chen, Z. Lechowicz, M. J. Weisenburger, D. D. Bast, M. Arellano, M. L. Bernal-Mizrachi, L. Heffner, L. T. McLemore, M. Kaufman, J. L. Winton, E. F. Lonial, S. Armitage, J. O. Khoury, H. J. 2012, "Characteristics and outcomes of diffuse large B-cell lymphoma presenting in leukaemic phase". *British Journal of Haematology*, 158(5), 608-14.

Pashaei, E. Pashaei, E. Ahmady, M. Ozen, M. Aydin, N. 2017. "Meta-analysis of miRNA expression profiles for prostate cancer recurrence following radical prostatectomy", *PLoS One*, 26,12(6), e0179543.

Peinado, H. Alečković, M. Lavotshkin, S. Matei, I. Costa-Silva, B. Moreno-Bueno, G. Hergueta-Redondo, M. Williams, C. García-Santos, G. Ghajar, C. Nitadori-Hoshino, A. Hoffman, C. Badal, K. Garcia, B. A. Callahan, M. K. Yuan, J. Martins, V. R. Skog, J. Kaplan, R. N. Brady, M. S. Wolchok, J. D. Chapman, P. B. Kang, Y. Bromberg, J. Lyden, D. 2012. "Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET.", *Nature Medicine*, 18(6), 883-91.

Rabinowits, G. Gerçel-Taylor, C. Day, J. M. Taylor, D. D. Kloecker, G. H. 2009. "Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer", *Clinical Lung Cancer*, 10(1), 42-6.

Raposo, G. Stoorvogel, W. 2013. "Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends", *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373-83.

Redmann, M. Benavides, G. A. Berryhill, T. F. Wani, W. Y. Ouyang, X. Johnson, M. S. Ravi, S. Barnes, S. Darley-Usmar, V. M. Zhang, J. 2017. "Inhibition of autophagy with bafilomycin and chloroquine decreases mitochondrial quality and bioenergetic function in primary neurons", *Redox Biology*, 11, 73-81.

Redmann, M. Benavides, G. A. Berryhill, T. F. Wani, W. Y. Ouyang, X. Johnson, M. S. Ravi, S. Barnes, S. Darley-Usmar, V. M. Zhang, J. 2017. "Inhibition of autophagy with bafilomycin and chloroquine decreases mitochondrial quality and bioenergetic function in primary neurons", *Redox Biology*, 11, 73-81.

Reza, A. M. M. T. Choi, Y. J. Yuan, Y. G. Das, J. Yasuda, H. Kim, J. H. 2017. "MicroRNA-7641 is a regulator of ribosomal proteins and a promising targeting factor to improve the efficacy of cancer therapy", *Scientific Reports*, 21,7(1), 8365.

Roccaro, A. M. Sacco, A. Maiso, P. Azab, A. K. Tai, Y. T. Reagan, M. Azab, F. Flores, L. M. Campigotto, F. Weller, E. Anderson, K. C. Scadden, D. T. Ghobrial, I. M. 2013. “BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression”, *Journal of Clinical Investigation* 123(4),1542-55.

Ronquist, K. G. Sanchez, C. Dubois, L. Chioureas, D. Fonseca, P. Larsson, A. Ullén, A. Yachnin, J. Ronquist G. & Panaretakis, T 2016. “Energy-requiring uptake of prostasomes and PC3 cell-derived exosomes into non-malignant and malignant cells”, *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(5), 29877.

Saddoughi, S. A. Garrett-Mayer, E. Chaudhary, U. O'Brien, P.E. Afrin, L. B. Day, T. A. Gillespie, M. B. Sharma, A. K. Wilhoit, C. S. Bostick, R. et al. 2011. “Results of a phase II trial of gemcitabine plus doxorubicin in patients with recurrent head and neck cancers: serum C(1)(8)-ceramide as a novel biomarker for monitoring response”, *Clinical Cancer Research*, 17, 6097-105.

Scholer, N. Langer, C. Dohner, H. Buske, C. Kuchenbauer, F. 2010. “Serum microRNAs as a novel class of biomarkers: A comprehensive review of the literature” *Experimental Hematology*, 38(12), 1126–1130.

Sentelle, R. D. Senkal, C. E. Jiang, W. Ponnusamy, S. Gencer, S. Selvam, S. P. Ramshesh, V. K. Peterson, Y. K. Lemasters, J. J. Szulc, Z. M. et al. 2012. “Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy”, *Nature Chemical Biology*, 8, 831-8.

Shelke, G. V. Lässer, C. Gho, Y. S. Lötvall, J. 2014. “Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum”, *Journal of Extracellular Vesicles* 30, 3.

Shelke, G. V. Lässer, C. Gho, Y. S. Lötvall, J. 2014. “Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum”, *Journal Extracellular Vesicles*.

Swerdlow, S. H. Campo, E. Harris, N. L. Jaffe, E. S. Pileri, S. A. Stein, H. Thiele, J. Vardimanet, J. W. 2008. “WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues”, IARC, Lyon.

Szajnik, M. Derbis, M. Lach, M. Patalas, P. Michalak, M. Drzewiecka, H. Szpurek, D. Nowakowski, A. Spaczynski, M. Baranowski, W. Whiteside, T. L. 2013. "Exosomes in Plasma of Patients with Ovarian Carcinoma: Potential Biomarkers of Tumor Progression and Response to Therapy", *Gynecology Obstetrics (Sunnyvale)*, 29(4), 3.

Szczepanski, M. J. Szajnik, M. Welsh, A. Whiteside, T. L. Boyiadzis, M. 2011. "Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor-beta1", *Haematologica*, 96(9), 1302-9.

Tang, M. Jiang, L. Lin, Y. Wu, X. Wang, K. He, Q. Wang, X. Li, W. 2017. "Platelet microparticle-mediated transfer of miR-939 to epithelial ovarian cancer cells promotes epithelial to mesenchymal transition", *Oncotarget*, 27,8(57), 97464-97475.

Taylor, D. D. Gercel-Taylor, C. 2008. "MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer", *Gynecologic Oncology*, 110(1),13-21.

Théry, C. Amigorena, S. Raposo, G. Clayton, A. 2006. "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids", *Current Protocol Cell Biology*, 3(3), 22.

Tiansuo, Z. He, R. Xiuchao, W. Pengfei, L. Fan, Y. Wenna, J. Yang, L. Jing, L. John, G. G. Li, J. Jihui, H. 2015. "Rituximab-induced HMGB1 release is associated with inhibition of STAT3 activity in human diffuse large B-cell lymphoma", *Oncotarget*, 6(29), 27816–27831.

Trivedi, M. Talekar, M. Shah. P. Ouyang, Q. Amiji, M. 2016. "Modification of tumor cell exosome content by transfection with wt-p53 and microRNA-125b expressing plasmid DNA and its effect on macrophage polarization", *Oncogenesis*. 8,5(8), e250.

van der Goot, F. G. and Gruenberg, J. 2006. "Intra-endosomal membrane traffic", *Trends in Cell Biology*, 16(10), 514-21.

Van Deurs, B. Holm, P. K. & Sandvig, K. 1996. "Inhibition of the vacuolar H(+)-ATPase with bafilomycin reduces delivery of internalized molecules from mature multivesicular endosomes to lysosomes in HEp-2 cells", *European Journal of Cell Biology*, 69, 343–350.



van Deurs, B. Holm, P. K. Sandvig, K. 1996. "Inhibition of the vacuolar H(+)-ATPase with bafilomycin reduces delivery of internalized molecules from mature multivesicular endosomes to lysosomes in HEp-2 cells" *European Journal of Cell Biology*, 69(4), 343-50.

van Schooneveld, E. Wouters, M. C. Van der Auwera, I, et al. 2012. "Expression profiling of cancerous and normal breast tissues identifies microRNAs that are differentially expressed in serum from patients with (metastatic) breast cancer and healthy volunteers", *Breast Cancer Research*, 14(1), R34.

Vickers, K. C. Palmisano, B. T. Shoucri, B. M. Shamburek, R. D. Remaley, A. T. 2011. "MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins", *Nature Cell Biology*, 13(4), 423-433.

Wang, B. Shen, Z. L. Gao, Z. D. Zhao, G. Wang, C. Y. Yang, Y. Zhang, J. Z. Yan, Y. C. Shen, C. Jiang, K. W. Ye, Y. J. Wang, S. 2015. "MiR-194, commonly repressed in colorectal cancer, suppresses tumor growth by regulating the MAP4K4/c-Jun/MDM2 signaling pathway", *Cell Cycle*, 14(7), 1046-58.

Wang, K. Yuan, Y. Cho, J. H. McClarty, S. Baxter, D. Galas, D. J. 2012. "Comparing the MicroRNA Spectrum between Serum and Plasma", *PLoS One*, 7(7), e41561.

Weber, J. A. Baxter, D. H. Zhang, S. Huang, D. Y. Huang, K. H. Lee, M. J. Galas, D. J. Wang, K. 2010. "The microRNA spectrum in 12 body fluids" *Clinical Chemistry*, 56(11), 1733–1741.

Whiteside, T. L. 2016. "Tumor-derived exosomes and their role in cancer progression", *Advance in Clinical Chemistry*. 74, 103–141.

Willms, E. Johansson, H. J. Mäger, I. Lee, Y. Blomberg, K. E. Sadik, M. Alaarg, A. Smith, C. I. Lehtiö, J. El Andaloussi, S. Wood, M. J. Vader, P. 2016. "Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties", *Scientific Reports*, 2(6), 22519.

Witwer, K. W. Buzás, E. I. Bemis, L. T. Bora, A. Lässer, C. Lötvall, J. Nolte-'t Hoen, E. N. Piper, M. G. Sivaraman, S. Skog, J. Théry, C. Wauben, M. H. Hochberg, F. 2013. "Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research", *Journal of Extracellular Vesicles*.

Witwer, K. W. Buzás, E. I. Bemis, L. T. Bora, A. Lässer, C. Lötvall, J. Nolte-'t Hoen, E. N. Piper, M. G. Sivaraman, S. Skog, J. Théry, C. Wauben, M. H. Hochberg, F. 2013. "Standardization

of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research”, *Journal of Extracellular Vesicles*, 2.

Witwer, K. W. Soekmadji, C. Hill, A. F. Wauben, M. H. Buzás, E. Di Vizio, D. Falcon-Perez, J. M. Gardiner, C. Hochberg, F. Kurochkin IV, Lötvall, J. Mathivanan, S. Nieuwland, R. Sahoo, S. Tahara, H. Torrecilhas, A. C. Weaver, A. M. Yin, H. Zheng, L. Ghossein, Y. S. Quesenberry, P. Théry, C. 2017. “Updating the MISEV minimal requirements for extracellular vesicle studies: building bridges to reproducibility”, *Journal of Extracellular Vesicles*, 15,6(1), 1396823.

Xiao, C. Calado, D. P. Galler, G. Thai, T. H. Patterson, H.C. Wang, J. Rajewsky, N. Bender, T. P. Rajewsky, K. 2007. “Mir-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb”, *Cell*, 131, 146–159.

Xiaodong, L. Lufang, C. Yuanyuan, C. Qixiang, S. Wenxin, Q. 2015. “Bafilomycin A1 inhibits the growth and metastatic potential of the BEL-7402 liver cancer and HO-8910 ovarian cancer cell lines and induces alterations in their microRNA expression”, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(5), 1829–1834.

Yan, S. Han, B. Gao, S. Wang, X. Wang, Z. Wang, F. Zhang, J. Xu, D. Sun, B. 2017. “Exosome-encapsulated microRNAs as circulating biomarkers for colorectal cancer”, *Oncotarget*, 16,8(36), 60149-60158.

Yeh, Y. Y. Ozer, H. G. Lehman, A. M. Maddocks, K. Yu, L. Johnson, A.J. Byrd, J. C. 2015. “Characterization of CLL exosomes reveals a distinct microRNA signature and enhanced secretion by activation of BCR signaling”, *Blood*. 125(21), 3297-305.

Yuan, N. Song, L. Zhang, S. Lin, W. Cao, Y. Xu, F. Fang, Y. Wang, Z. Zhang, H. Li, X. Wang, Z. Cai, J. Wang, J. Zhang, Y. Mao, X. Zhao, W. Hu, S. Chen, S. Wang, J. 2015. “Bafilomycin A1 targets both autophagy and apoptosis pathways in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia”, *Haematologica*, 100(3), 345-56.

Yuan, N. Song, L. Zhang, S. Lin, W. Cao, Y. Xu, F. Fang, Y. Wang, Z. Zhang, H. Li, X. Wang, Z. Cai, J. Wang, J. Zhang, Y. Mao, X. Zhao, W. Hu, S. Chen, S. Wang, J. 2015. “Bafilomycin A1 targets both autophagy and apoptosis pathways in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia”, *Haematologica*, 100(3), 345-56.

Yuan, N. Song, L. Zhang, S. Lin, W. Cao, Y. Xu, F. Fang, Y. Wang, Z. Zhang, H. Li, X. Wang, Z. Cai, J. Wang, J. Zhang, Y. Mao, X. Zhao, W. Hu, S. Chen, S. Wang, J. 2015. “Bafilomycin



A1 targets both autophagy and apoptosis pathways in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia”, *Haematologica*, 100(3), 345-56.

Yuan, T. Huang, X. Woodcock, M. Du, M. Dittmar, R. Wang, Y. Tsai, S. Kohli, M. Boardman, L. Patel, T. Wang, L. 2016. “Plasma extracellular RNA profiles in healthy and cancer patients”, *Scientific Reports*, 6, 19413.

Zhang, J. X. Xu, Y. Gao, Y. Chen, C. Zheng, Z. S. Yun, M. Weng, H.W. Xie, D. Ye, S. 2017. “Decreased expression of miR-939 contributes to chemoresistance and metastasis of gastric cancer via dysregulation of SLC34A2 and Raf/MEK/ERK pathway”, *Molecular Cancer*, 23,16(1), 18.

Zhang, Y. Liu, D. Chen, X. et al. 2010. “Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration”, *Molecular Cell*, 39(1), 133-144,

Zhao, T. Ren, H. Wang, X. Liu, P. Yan, F. Jiang, W. Li, Y. Li, J. Gribben, J. G. Jia, L. Hao, J. 2015. “Rituximab-induced HMGB1 release is associated with inhibition of STAT3 activity in human diffuse large B-cell lymphoma”, *Oncotarget*, 6(29), 27816-31.

Zhua, H. Guarigliab, S. Yua, R. Y. L. Lia, W. Branchoa, D. Peinadoc, H. Lydenc, D. Salzerd, J. Bennette, C. Chowa, C. W. 2013. “Mutation of SIMPLE in Charcot–Marie–Tooth 1C alters production of exosomes”, *Molecular Biology of the Cell*, 24(11), 1619-37.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. VİLDAN CANER
Proje No:	114S442
Proje Başlığı:	Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma Patogenezinde Tümör-Kökenli Ekzozomların Fonksiyonel Önemi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	30
Araştırmacılar:	GÖKHAN OZAN ÇETİN, SİBEL HACIOĞLU, EMRE TEPELİ, GÜLSEREN BAĞCI, NİLAY ŞEN TÜRK
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü. TIP F. DAHİLİ TIP BİLİMLERİ B. TIBBİ GENETİK ABD.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/11/2014 - 01/03/2018
Onaylanan Bütçe:	367800.0
Harcanan Bütçe:	325858.16

TÜBİTAK

<p>Öz:</p>	<p>Proje No: 114S442 Proje Başlığı: Diffüz Büyük B-hücreli Lenfoma patogenezinde tümör-kökenli eksozomların fonksiyonel önemi Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof.Dr. Vildan CANER (Yürütücü) Doç.Dr. Gökhan Ozan ÇETİN (Araştırmacı) Doç.Dr. Sibel KABUKÇU-HACIOĞLU (Araştırmacı) Doç.Dr. Emre TEPELİ (Araştırmacı) Doç.Dr. Nilay ŞEN TÜRK (Araştırmacı) Prof.Dr. Gülseren BAĞCI (Araştırmacı)</p> <p>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı</p> <p>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu Atatürk Bulvarı No: 221 06100 Kavaklıdere / ANKARA</p> <p>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 31.10.2014-01.03.2018</p> <p>Öz DBBHL hastalarının ve sağlıklı bireylerin eksozom özelliklerini karşılaştırdığımız araştırmamızda, ayrıca DBBHL hücre hatlarıyla normal B-hücreleri arasındaki eksozomal etkileşim değerlendirildi. DBBHL hastalarında plazma eksozom konsantrasyonu anlamlı derecede yükseldi. DBBHL hastalarının eksozomlarında 33 adet miRNA'nın ekspresyonunda anlamlı değişim gözlemlendi. Normal B-hücrelerinin DBBHL-kökenli eksozomları etkin biçimde internalize ettikleri belirlendi. Farklı lenfoma-kökenli eksozomların B-hücrelerinde farklı miRNA ekspresyon profiline neden oldukları gözlemlendi. Bafilomisin ilavesinin, lenfoma hücrelerini R-CHOP tedavisine karşı daha duyarlı hale getirdikleri belirlendi.</p> <p>Anahtar Kelimeler: Diffüz Büyük B-hücreli lenfoma, eksozom, miRNA, B-hücresi, Bafilomisin A1, R-CHOP tedavi</p> <p>Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet 0 Gerekli Değil X Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.</p> <p>Projeden Yapılan Yayınlar: 1. Caner V, Baris IB, Cetin GO, Tepeli E, Turk NS, Zencir S, Sari I, Hacioglu S, Bagci G. An-ultracentrifugation-based protocol for exosome isolation in diffuse large B-cell lymphoma. ISEV 2016, 4-7 May, Rotterdam, Hollanda. 2. Caner V, Baris IB, Cetin GO, Tepeli E, Turk NS, Zencir S, Sari I, Hacioglu S, Bagci G. Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma Hastalarının Plazma Eksozom Konsantrasyonlarının Klinik Evre İle İlişkisi. XII. Tıbbi Genetik Kongresi, 5-9 Ekim 2016, Çeşme, İzmir.</p>
<p>Anahtar Kelimeler:</p>	<p>Diffüz Büyük B-hücreli lenfoma, eksozom, miRNA, B-hücresi, Bafilomisin A1, R-CHOP tedavi</p>
<p>Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:</p>	<p>Hayır</p>