

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**KRONİK LENFOSİTER LÖSEMİ (KLL)'DE, KANDA VE EKSOZOM  
DÜZEYİNDE FOSFATİDİL SERİN (PS) VE TYRO3-AXL- MERTK (TAM)  
RESEPTÖR TİROZİN KİNAZ (RTK) DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Meltem BAY**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2022**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Doktora Tezi

### KRONİK LENFOSİTER LÖSEMİ (KLL)'DE, KANDA VE EKSOZOM DÜZEYİNDE FOSFATİDİLSEİN (PS) VE TYRO3-AXL- MERTK (TAM) RESEPTÖR TİROZİN KİNAZ (RTK) DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Meltem BAY

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ

Kronik Lenfositler Lösemi (KLL); yetişkinler arasında en yaygın görülen lösemi türlerinden biri olup; kanda, kemik iliğinde, lenf nodu ve dalakta neoplastik B lenfositlerinin klonal artışı ve birikimi ile karakterize bir hastalıktır. Bu çalışmada, KLL hastaları ile sağlıklı kişilerde plazma ve eksozom yüzeyinde fosfatidilserin (PS), Tyro-3, Axl ve MERTK (TAM) reseptör tirozin kinaz (RTK) düzeylerindeki farklılığının belirlenerek hastalığın oluşum sürecindeki etkisinin saptanması amaçlanmıştır.

Çalışmaya, ortanca yaş 61 yıl (38-93 arası) olan, Rai (O-I) evresinde yeni tanı alan/tedavisiz takip edilen 25 KLL hastası (11K/14E) dahil edilmiştir. Ayrıca, ortanca yaşları 37 yıl (22-55 arası) olan 15 sağlıklı kişi (11K/4E) kontrol grubu olarak çalışmaya katılmıştır. Hasta ve sağlıklı kişi plazmalarında, PS ve TAM RTK seviyelerine ELISA yöntemi ile, eksozomlardaki düzeyine ise akım sitometri yöntemi ile bakılmıştır. “Boyutça eleme kromatografisi” yöntemi ile saflaştırılan eksozomların karakterizasyonu; partikül boyut ölçümü ve CD9/CD81 belirteçleri işaretlenerek yapılmıştır.

Bu çalışma ile, KLL hastalarında PS seviyesinin plazma ve eksozom yüzeyinde sağlıklı kişilere göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır ( $p<0.0001$ ). Plazmada TAM RTK seviyeleri hastalarda sağlıklı kişilere göre azalmış görünmesine rağmen (sırasıyla;  $p<0.001$ ,  $p<0.0001$ ,  $p<0.0096$ ), eksozom yüzeyinde bu reseptörlerin hastalarda sağlıklı kişilere kıyasla anlamlı oranda arttığı tespit edilmiştir ( $p<0.0001$ ). Bu sebeple, KLL hastalarında TAM RTK'lar hedeflenerek yapılacak tedavilerde başarı sağlanabileceği, ancak PS miktarındaki azalma sebebiyle, solid tümörlerde uygulanan tedavilerin KLL hastalarında uygun olmayacağı düşünülmüştür. Bu bulguların, ileri klinik çalışmalar ile desteklendiğinde, gelecekte KLL hastaları için yeni tanı/tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi yönünde katkı sağlayabileceği ifade edilebilir.

**Haziran 2022, 78 sayfa**

**Anahtar kelimeler:** Kronik Lenfositler Lösemi (KLL), eksozom, fosfatidilserin (PS), Tyro3-Axl-Mertk (TAM) Reseptör Tirozin Kinaz (RTK)

## ABSTRACT

PhD Thesis

### PHOSPHATIDYLSERINE (PS) AND TYRO3-AXL-MERTK (TAM) RECEPTOR TYROSINE KINASE (RTK) LEVELS DETECTION FROM BLOOD AND EXOSOMES IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA (CLL)

Meltem BAY

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the existence of mature CD5-positive B cells in the blood, bone marrow, spleen and lymphoid organs and it is the most prevalent leukemia in adults. The aim of this study is to detect the differences in plasma and exosome Phosphatidylserine (PS), Tyro3, Axl and Mertk (TAM) receptor tyrosine kinase (RTK) levels in CLL patients and healthy donors and to investigate its effects on the course of the disease.

This study included, 25 newly diagnosed/untreated patients (11F/14M) with Rai stage (O-I) CLL whose the median age was 61 (range 38-93). The control group had 15 healthy donors (11F/4M) with a median age 37 (range 22-55). Patients' and donors' plasma PS and TAM RTK levels were detected by ELISA and flow cytometry was used to determine the exosome levels. Exosomes were purified by "size exclusion chromatography" technique and were characterized by particle size measurement and CD9/CD81 markers.

Compared with controls, there was a statistically significant decrease in PS levels of CLL patients ( $p<0.0001$ ). Similarly, a significant decrease in TAM RTK levels of the patients were found ( $p<0.001$ ,  $p<0.0001$ ,  $p<0.0096$ , respectively) while there was a significant increase in the receptor levels on the exosome surface in the patients ( $p<0.0001$ ). Therefore, TAM RTK targeted therapies may succeed but, PS targeting therapies may fail due to the decrease in the levels of these molecules in the CLL patients. These results have to be supported with advanced clinical trials, in order to develop new diagnostic methods and therapies in the future.

**June 2022, 78 pages**

**Key Words:** Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL), exosomes, phosphatidylserine (PS), Tyro3-Axl-Mertk (TAM), Receptor Tyrosine Kinase (RTK)

## TEŞEKKÜR

Bu zorlu ve meşakkatli doktora yolcuğumda, Pandemi süreci de dahil olmak üzere çeşitli sıkıntıların üstesinden gelerek nihai sona ulaşabilmenin mutluluğu içerisindeyim. Bu yolda öğrendiğim çok şey olduğu gibi, birçok kişi ve kuruluşun da desteğini alarak önümdeki uzun yolu tamamlayabildim.

Öncelikle hem üniversite yıllarımda, hem de doktora sürecimde derslerini alabilme şansı bulduğum, doktora başlamama vesile olan ve her aşamasında desteğini gördüğüm, disiplinli ama bir o kadar sevecen kişiliği ve engin tecrübeleriyle öğrencisi olmaktan onur duyduğum saygıdeğer hocam ve danışmanım Prof.Dr. Nesrin Özsoy Erdaş'a,

Doktora çalışmalarım süresince, eksozomlarla ilgili konulara beni yönlendirerek her aşamasında destekleyen, TİK üyesi olarak bu süreçte değerli katkılarını gördüğüm, ve çalıştığım kurum olan A.Ü Kök Hücre Enstitüsü'ndeki İdari görevi sürecinde de her zaman babacan kimliğiyle desteğini gördüğüm kıymetli hocam Prof.Dr. Kâmil Can Akçalı'ya,

İlk olarak üniversite yıllarımda tanıdığım, sonrasında tez sürecimde TİK üyesi olarak görmekten mutluluk duyduğum, ılımlı ve sevecen kişiliğiyle ve engin tecrübesiyle tez süreci boyunca desteğini gördüğüm hocam Prof.Dr. Reyhan Çolak'a,

İlk işe başladığım A.Ü Hematoloji BD'nda ve halen çalıştığım A.Ü Kök Hücre Enstitüsünde yöneticiliğinde çalışma fırsatına nail olduğum, yüksek lisans sürecimde derslerine girebilmiş olmanın mutluluğunu duyduğum ve bu tezde ayrıca Hematolog kimliği ile her aşamada desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Prof.Dr. Günhan Gürman'a,

Hematoloji BD'nda görev yapan, tezimde hasta örnekleri ve verilerine ulaşmamda sabırla desteğini esirgemeyen, bu süreçte Hematoloji alanındaki engin klinik bilgisinden faydalanma imkânı bulduğum sevgili Dr. Öğr.Gr.Güldane Cengiz Seval'e,

Tezimi tamamlayabilmemde büyük emeği geçen, malzeme temini dışında eksozomlar, qNano cihazı ve akım sitometri gibi konularında engin tecrübesi ile desteğini gördüğüm sevgili Dr. Mol.Bio. Tamer Kahraman'a,

Çalışma hayatına başladığım ve ayrıldıktan sonra dahi gönül bağıını kopartmadığım, tezimde gönüllü verici olacak kadar her daim yanımda olduklarını bildiğim, A.Ü. Terapötik Aferez Merkezi çalışanlarına,

Üniversite yıllarımdan bu yana eşsiz dostluğuyla ve doktoramın her aşamasında titiz, çalışkan bilimsel kimliğiyle hep yanımda olan sevgili dostum Prof.Dr. Sevgi Ertuğrul Karatay'a,

Tezimin deneylerinden, analizlerine ve yazımına kadar her aşamasında bilimsel desteğinin yanı sıra, çaresiz hissettiğim her an manevi desteği sayesinde güç aldığım,

Çalışma hayatının zorluklarına beraberce göğüs gerdiğimiz çalışma ve oda arkadaşım sevgili Dr. Bio. Öznur Coşkun'a,

Btce desteği ve malzeme temini konusunda deneylerimi yapabilmeme olanak sağlayan A. BAP Proje Koordinatörlüğü'ne (proje no: 21L0430002) ve tüm alt yapı imkanlarından faydalanabilmeme imkn sağlayan çalışanı olduğum A. Kök Hücre Enstitüsü yönetimi ve çalışanlarına,

Beni sevgiyle ve özveriyle yetiştirerek bugünlere getiren sevgili annem şefika Tol'a, hukukçu kimliğiyle disiplinli, adaletli ve hakkaniyetli bir insan olmamı sağlayan babam Afşin Tol'a ve manevi desteğiyle hep yanımda olan sevgili ablam iğdem Tol'a,

Beni her zaman kendi kızları gibi seven ve gören sevgili kayınvalidem Seniha Bay ve eşi Necat Bay'a,

Tanıştığımız ilk günden beri gerek iş hayatımda gerekse eğitim süreçlerimde, paylaştığımız iyi-kötü her günde daima sevgisi ve desteğiyle yanımda olan sevgili eşim Umut Bay'a,

Bana hayatta her şeyin üstesinden gelebilme gücünü veren ve eşsiz annelik duygusunu tattıran canım oğlum Görkem Bay ve biricik kızım Defne Bay'a,

Hayatımı güzelleştiren tüm bu kişilere,

Teşekkürlerimi sunarım...

Meltem BAY  
Ankara, Haziran 2022

## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAY SAYFASI

|                                                            |      |
|------------------------------------------------------------|------|
| ETİK.....                                                  | i    |
| ÖZET.....                                                  | ii   |
| ABSTRACT .....                                             | iii  |
| TEŞEKKÜR .....                                             | iv   |
| SİMGELER DİZİNİ .....                                      | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                      | x    |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                    | xi   |
| 1. GİRİŞ .....                                             | 1    |
| 2. KURAMSAL TEMELLER.....                                  | 3    |
| 2.1 Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) .....                   | 3    |
| 2.1.1 Epidemiyoloji.....                                   | 3    |
| 2.1.2 Etiyoloji .....                                      | 3    |
| 2.1.3 Klinik bulgular .....                                | 4    |
| 2.1.4 Tanı.....                                            | 4    |
| 2.1.5 Prognoz .....                                        | 4    |
| 2.2 Ekstrasellüler Veziküller (EV).....                    | 6    |
| 2.2.1 Eksozomlar .....                                     | 8    |
| 2.3 Fosfatidilserin (PS).....                              | 10   |
| 2.4 TAM Reseptör Tirozin Kinazlar (RTK) .....              | 14   |
| 2.5 Gerekçe ve Amaç.....                                   | 20   |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM.....                                 | 22   |
| 3.1 Materyal .....                                         | 22   |
| 3.1.1 Plazmanın eldesi.....                                | 22   |
| 3.2 Yöntem .....                                           | 22   |
| 3.2.1 Plazmada PS ve TAM RTK düzeylerinin tespiti.....     | 23   |
| 3.2.2 Eksozom izolasyonu .....                             | 25   |
| 3.2.3 Eksozom karakterizasyonu .....                       | 26   |
| 3.2.4 Eksozomlarda PS ve TAM RTK düzeylerinin tespiti..... | 29   |
| 3.2.5 İstatistiksel analizler .....                        | 30   |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....                                | 31   |

|                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.1 Plazmada PS ve TAM RTK Düzeylerinin Elisa Testi ile Tayininde Elde Edilen Bulgular .....</b>   | <b>32</b> |
| <b>4.2 Eksozom Karakterizasyonu Sonuçları.....</b>                                                    | <b>34</b> |
| <b>4.2.1 QNano cihazı ile miktar tayini.....</b>                                                      | <b>34</b> |
| <b>4.2.2 Akım sitometri ile karakter analizi .....</b>                                                | <b>35</b> |
| <b>4.3 Eksozomlarda PS ve TAM RTK Düzeylerinin Akım Sitometri Tayininde Elde Edilen Bulgular.....</b> | <b>37</b> |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>                                                                      | <b>40</b> |
| <b>5.1 Tartışma .....</b>                                                                             | <b>40</b> |
| <b>5.2 Sonuç .....</b>                                                                                | <b>50</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                                                | <b>52</b> |
| <b>EK ETİK KURUL ONAY FORMU.....</b>                                                                  | <b>69</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                                                                  | <b>71</b> |

## SİMGELER DİZİNİ

|              |                                                           |
|--------------|-----------------------------------------------------------|
| ALL          | Akut lenfositler lösemi                                   |
| AML          | Akut miyelositler lösemi                                  |
| $\beta$ 2GP1 | Beta 2 Glukoprotein 1                                     |
| BSA          | Bovin Serum Albumin                                       |
| C            | Celsius (Santigrat derece)                                |
| CAF          | Kanser ilişkili fibroblastlar                             |
| CD           | Cluster of differentiation                                |
| EGFR         | Epidermal büyüme faktörü reseptörü                        |
| ELISA        | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay                         |
| EMT          | Epitelial-Mezenkimal Geçiş                                |
| ER           | Endoplazmik Retikulum                                     |
| EV           | Ekstraselüler Vezikül                                     |
| Gas6         | Büyümeyi durdurucu spesifik faktör 6                      |
| GPI          | Glikozil fosfatidil inozitol                              |
| kDA          | kilodalton                                                |
| Kİ           | Kemik iliği                                               |
| KML          | Kronik miyelositler lösemi                                |
| KLL          | Kronik lenfositler lösemi                                 |
| MAM          | Mitokondriyal Membran                                     |
| MFI          | Mean Fluorescence Intensity (Ortalama floresan yoğunluğu) |
| mRNA         | Mesajcı ribonükleik asit                                  |
| miRNA        | Mikro ribonükleik asit                                    |
| $\mu$ g      | mikrogram                                                 |
| $\mu$ l      | mikrolitre                                                |
| MV           | Mikrovezikül                                              |
| MVC          | Mikroveziküler cisim                                      |
| ml           | mililitre                                                 |
| Na Az        | Sodyum Azid                                               |
| NaOH         | Sodyum hidroksit                                          |
| ng           | nanogram                                                  |
| NFkB         | Nükleer Faktör kappa B                                    |

|         |                                                     |
|---------|-----------------------------------------------------|
| NK      | Natural killer (doğal öldürücüler)                  |
| NKT     | Natural killer T hücresi (doğal öldürücü T hücresi) |
| nm      | nanometre                                           |
| OD      | Optik dansite                                       |
| PBS     | Fosfat buffer salin                                 |
| PC      | Fosfatidilkolin                                     |
| PE      | Fosfatidiletanolamin                                |
| ProS    | Protein S                                           |
| PS      | Fosfatidilserin                                     |
| SOCS    | Sitokin sinyallerini baskılayıcı proteinlerden      |
| TAM RTK | Tyros3-Axl-Mertk Reseptör Tirozin Kinaz             |
| TRPS    | Ayarlanabilir direnç darbe algılama                 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1 Ekstrasellüler veziküller (EV).....                                                                          | 8  |
| Şekil 2.2.Mitokondrial membranda (MAM) PS sentezi .....                                                                | 11 |
| Şekil 2.3 Tümör mikroçevrede PS .....                                                                                  | 12 |
| Şekil 2.4.Hematopoietik hücrelerde TAM reseptör ekspresyonu.....                                                       | 15 |
| Şekil 2.5 TAM RTK'ların, Gas6 ve Protein S ile PS'ne bağlanması .....                                                  | 16 |
| Şekil 2.6 TAM RTK ailesi sinyal mekanizması.....                                                                       | 17 |
| Şekil 3.1 Yöntem akış şeması .....                                                                                     | 23 |
| Şekil 4.1 KLL hastaları ve sağlıklı kişilerin plazma PS, TAM RTK grafiği .....                                         | 33 |
| Şekil 4.2 KLL hastaları ve sağlıklı kişilerin plazma PS, TAM RTK düzeyleri<br>cinsiyete göre dağılımı.....             | 34 |
| Şekil 4.3 Eksozom partikül konsantrasyon grafiği (1 hasta için).....                                                   | 35 |
| Şekil 4.4 Akım sitometride izotip kontrole göre kapı alma .....                                                        | 36 |
| Şekil 4.5 CD81 analiz örneği .....                                                                                     | 36 |
| Şekil 4.6.KLL hastaları ve sağlıklı kişilerin CD81 analiz grafiği .....                                                | 37 |
| Şekil 4.7KLL hastaları ve sağlıklı kişilerin eksozomlarda PS ve TAM RTK analizi ....                                   | 38 |
| Şekil 4.8 KLL hastaları ve sağlıklı kişilerin eksozomlarda PS ve TAM RTK grafiği ...                                   | 39 |
| Şekil 4.9 KLL hastaları ve sağlıklı kişilerin eksozomlarında PS, TAM RTK<br>düzeylerinin cinsiyete göre dağılımı ..... | 39 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2.1 Rai sistemine göre KLL evreleri.....                                     | 5  |
| Çizelge 2.2 Binet sistemine göre KLL evreleri.....                                   | 5  |
| Çizelge 2.3 KLL’de prognostik faktörler .....                                        | 6  |
| Çizelge 2.4 Ekstraveziküllerin sınıflandırılması .....                               | 7  |
| Çizelge 2.5 Solid tümörlerde Bavituximab ile ilgili yapılan klinik çalışmalar.....   | 13 |
| Çizelge 2.6 TAM RTK ektopik/ aşırı ekspresyonu ve kanserlerdeki rolü .....           | 19 |
| Çizelge 3.1 ELISA plate planı .....                                                  | 24 |
| Çizelge 3.2 Her moleküle özgü hazırlanan standart yoğunlukları .....                 | 24 |
| Çizelge 4.1 Hasta özellikleri ve klinik bilgileri .....                              | 31 |
| Çizelge 4.2 Sağlıklı kişilerin özellikleri.....                                      | 32 |
| Çizelge 4.3 Hasta ve sağlıklı kişilerin ELISA plazma konsantrasyonları (ng/ml) ..... | 32 |
| Çizelge 4.4 80-150 nm ve 150-300 nm boyutundaki partikül yüzde (%) değerleri.....    | 35 |

## 1. GİRİŞ

Dünyada her yıl 14 milyon kişinin yakalandığı ve 8,2 milyon kişinin ölümüne sebep olan kanser; yaş, cinsiyet, dil, din, ırk ayırımı yapmaksızın tüm insanları etkilemektedir. Kanserde benzer seyir devam ettiği takdirde, 2030 yılında 22 milyon yeni vaka ortaya çıkması beklenmektedir (Anonim T.C Sağlık Bakanlığı Türkiye Kanser İstatistikleri, 2017). Bu nedenle, gerek dünyada, gerekse ülkemizde kanser tanı ve tedavi yöntemlerine yönelik çalışmalar gün geçtikte artmaktadır.

Kanser çalışmalarında son yıllarda önem kazanan eksozomlar, 1980’li yıllarda ilk keşfedildiğinde, hücresel artıkları atmada görevli moleküller olarak bilinirken, son yıllarda yapılan çalışmalar ile hücrelerarası iletişim, sinyal iletimi, genetik materyal transferi ve immün yanıt gibi birçok önemli biyolojik aktivitede rol aldıkları gösterilmiştir (Kahraman vd., 2014). Bunu, genetik materyalden bilgi aktarımı yoluyla (miRNA vb.) yapabildikleri gibi, yüzey molekülleri aracılığıyla sinyal yollarını uyarak da yapabilmektedirler (Lea vd., 2017).

Hücre zarının yapısı incelendiğinde, lipid yapıda molekül ve reseptörlerin de kanser mekanizmalarında aktif rol aldığı bilinmektedir. Singer ve Nicolson’ın (1972) biyolojik membranlar için ortaya koyduğu “akıcı mozaik zar modeli” çift tabakalı lipidler içerisine gömülü proteinlerden oluşmaktadır (Singer ve Nicolson, 1972). Bu yapılar içerisinde bulunan, “*Lipid raft*” ‘lar hücre zarında mikrodomain olarak da bilinen komponentler olup, kolesterol, glikofosfolipit ve reseptörler açısından zengindir. Bu yapılar eksositoz, endositoz ve hücre sinyali gibi çeşitli hücresel faaliyetlere dahil olurlar (Kulkarni vd. 2022). Ökaryotik hücrelerde, fosfolipitlerin hücre zarındaki dağılımı şu şekildedir: Pozitif yüklü fosfatidilkolin (PC) ve sfingomiyelinler (SM) zarın dış yüzeyinde, negatif yüklü amino-fosfolipit fosfatidilserin (PS) ve fosfatidiletanolaminin (PE) ise zarın iç yüzeyinde lokalize olmaktadır (Balasubramanian vd., 2003; Vance vd., 2005; Leventis vd., 2010). Bu durum, virüs bakteri veya çeşitli patojenlerin etkisiyle ya da tümör mikroçevresinde değişkenlik gösterebilmektedir. Normal fizyolojik koşullarda, apoptoza giden hücreler PS’nin, zar iç yüzeyinden dış tarafa dönmesi (flipping) ile

makrofajlara ‘beni ye’ sinyali gönderir (Fadok vd. 1992; Callahan vd., 2000; Biermann vd. 2013). Bu sinyali alan, Tyro3-Axl-Mertk (TAM) Reseptör Tirozin Kinaz (RTK)’lar, ligandları olan Growth Arrest Specific Factor 6 (Gas 6) ve Protein S (ProS) aracılığıyla PS’e bağlanır ve makrofajları uyarır (Graham vd., 2014; Kasikara vd., 2017) Tümör söz konusu olduğunda ise; hücrelerin yüzeyinde PS varlığı, tümöre karşı immun yanıt oluşmasını engelleyen bir durumdur. Bu olayın, kanserleşme sürecinde etken olduğu düşünülmektedir (Belzile vd., 2018).

Bu konuda yapılmış çalışmalara bakıldığında; Lea ve ark. (2017); over kanserinde sağlıklı kişilere göre plazmadan elde ettikleri eksozomların yüzeyinde, PS miktarının anlamlı olarak arttığını göstermişlerdir. Ayrıca, PS+’lığının malign grupta benign gruba göre fazla olduğunu tespit etmişlerdir (Lea vd., 2017).

Yine PS gibi kanser hücrelerinin iletişimde önemli rolü olduğu düşünülen diğer bir grup ise Reseptör Tirozin Kinaz (RTK) ailesinden Tyro3-Axl-Mertk (TAM) reseptörleridir ve lökositlerin yanısıra çoğu tümör hücre tipleri tarafından eksprese edilirler (Zagorska vd., 2014). 2017 yılında Kasikara ve ark., PS ve TAM RTK’ların programlanmış ölüm ligandı-1 (PD-L1) aracılığı ile meme kanserinde yayılım ve kemoterapiye direnç yol açtığını göstermiştir (Kasikara vd., 2017).

Vouri ve ark.’nın (2017) yaptıkları çalışmada, kemoterapiye dirençli, epitelyal hücreden mezenkimal hücreye dönüşme (EMT) potansiyelindeki tümör hücreleri ile PS taşıyan hücrelerin, Gas6 geni  $\gamma$ -karboksil GLA domaini ve Protein S aracılığıyla bağlanması sonucu, bu tümör hücrelerinin makrofajlar tarafından yutulmasının sağlandığı gösterilmiştir (Şekil 2). Böylece, PS-aracılığıyla tümör hücrelerinin yok edilmesinin mümkün olabildiği de görülmüştür (Lemke vd, 2010, Vouri vd., 2017).

Bu doktora tez çalışmasında, yeni tanı alan ve/veya tedavisiz takip edilen KLL hastaları ile sağlıklı kişilerde, plazma ve eksozomlarda PS ve TAM RTK düzeylerinin tespiti amaçlanmaktadır. Böylece, bu moleküllerin KLL hastalığı oluşumu/seyrinde etkisi hakkında fikir sahibi olunabileceği öngörülmektedir.

## **2. KURAMSAL TEMELLER**

Lösemi; kan hücreleri oluşumuyla ilgili kanserlerin genel adıdır. Çoğunlukla beyaz kan hücrelerinde oluşur, ancak bazen diğer kan hücrelerinde de başlayabilir. Löseminin birkaç tipi vardır. Temelde; akut (hızlı gelişen) ya da kronik (yavaş gelişen) olarak gelişim hızına göre ayrılır. Ayrıca myeloid veya lenfoid hücre serisinde başlamasına göre de sınıflandırılır. Buna göre Akut Miyelositer Lösemi (AML), Akut Lenfositler Lösemi (ALL), Kronik Miyelositer Lösemi (KML) ve Kronik Lenfositler Lösemi (KLL) olarak başlıca 4 ana grupta sınıflandırmak mümkündür. Çok sayıda ve çeşitli alt tipleri de bulunan lösemiler, türüne göre değişik özellik gösterir ve farklı tedavi şekilleri gerektirir (Anonymus 2021) .

### **2.1 Kronik Lenfositler Lösemi (KLL)**

Kronik Lenfositler Lösemi (KLL); güncel tedavilere yanıt vermeyen ve yetişkinler arasında en yaygın görülen lösemi türlerinden biri olup (Pagetti vd., 2015); kanda, kemik iliğinde, lenf nodu ve dalakta neoplastik B lenfositlerinin klonal artışı ve birikimi ile karakterize bir hastalıktır. Genellikle 65 yaş civarı tanı konmakla birlikte, hastaların sadece %10-15 kadarı 50 yaş altında tanı almaktadır (Rozman ve Montserrat, 1995). Tanı anından itibaren ortalama yaşam süresi 1-10 yıl arasında değişmektedir.

#### **2.1.1 Epidemiyoloji**

KLL, erişkinlerde en sık gözlenen lösemi tipidir (%25). Hastaların çoğu semptomsuz olduğu için gerçek sıklığı saptamak zordur. Batı toplumlarında yıllık görülme sıklığı 3/100.000'dir. Asya ülkelerinde daha seyrek görülür. Erkeklerde kadınlara göre görülme potansiyeli iki kat fazladır (Soysal T, 2013).

#### **2.1.2 Etiyoloji**

Etiyolojisi henüz tam olarak bilinmemekle birlikte; çevresel faktörler, enfeksiyon, radyasyon, immün sistem hastalıkları, ilaç veya kimyasalların yarattığı toksik etkilerin

hastalığa yol açtığına dair çalışmalar olsa da bulgular kanıt niteliğinde değildir (Schubauer- Berigan 2007, Linet 2007). Bazı ailelerde KLL olgu sayısının birden fazla olması, genetik eğilim olabileceğini de düşündürmektedir (Rawstron 2010).

### **2.1.3 Klinik bulgular**

KLL olguları, çoğunlukla semptom göstermezler. Bu hastalarda, lenfadenopati (lenf ödemi), splenomegali (dalak büyüklüğü) ve otoimmün hemolitik anemi yaygındır (Zent ve Kay, 2010). Ekstramedullar olarak cilt, karaciğer, gastrointestinal sistem mukozası ve böbrek tutulumu yaygındır (Anonymus,2021 [www.pathologyoutlines.com](http://www.pathologyoutlines.com) ).

### **2.1.4 Tanı**

Tam kan sayımında anemi, nötropeni ve trombositopeni ile periferik yaymadaki morfolojik değişimler kullanılarak tanı koymak esastır. Ancak akım sitometri yöntemiyle; CD20, CD19 ve CD5 pozitifliğinin (genellikle CD23 pozitifliğiyle birlikte) fenotipik olarak gösterilmesi KLL'yi diğer lenfoproliferatif hastalıklardan ayırmayı sağlar. Ayrıca, direk antiglobulin testi (DAT), bilirubin ve laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyleri, tanı koyma ve hastalığın seyri açısından önemli parametrelerdir.

İn-situ hibridizasyon, karyotip analizi ve genetik anomalilerin tayini (11q ve 17p delasyonları gibi) ise tedavi yaklaşımlarını belirlemede etkili testlerdir. Bu testler, hastanın takibi, tedaviye ilaçsız mı devam edileceği ya da hangi tip tedavilerin uygulanacağı konusunda hekime yol göstermektedir (Anonymus, 2014).

### **2.1.5 Prognoz**

KLL için uluslararası standartlara uygun olarak iki çeşit evreleme sistemi mevcuttur. Bunlardan birincisi Rai ( izelge 2.1.), diğeri ise Binet ( izelge 2.2.) sistemine göre evrelemedir. (Hallek v.d, 2008). Hastalığın evresi, tanı anında bu parametrelere göre belirlenmektedir.

Çizelge 2.1 Rai sistemine göre KLL evreleri (Rai 1975)

|                       |                                                                                                                                                                         |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Evre 0:</b>        | Kanda çok sayıda lenfosit olması dışında bir bulgu yoktur. Yavaş seyirli hastalık durumudur.                                                                            |
| <b>Evre 1:</b>        | Kanda çok sayıda lenfosit olmasının yanında lenf bezleri normalden büyüktür.                                                                                            |
| <b>Evre 2:</b>        | Kanda çok sayıda lenfosit, lenf bezlerinde büyüme, karaciğer ve dalakta da büyüme söz konusudur.                                                                        |
| <b>Evre 3:</b>        | Kanda çok sayıda lenfosit vardır ve eritrosit sayılarında da düşme yani kansızlık söz konusudur. Lenf bezi, karaciğer ve dalak büyüklüğü de olabilir.                   |
| <b>Evre 4:</b>        | Kanda çok sayıda lenfosit vardır ve kanda pıhtılaşmayı sağlayan trombosit sayısı azalmıştır. Bunun yanında kansızlık, lenf bezi, karaciğer ve dalak büyüklüğü olabilir. |
| <b>Dirençli evre:</b> | Tedaviye rağmen düzelmeyen hastalık durumunu ifade eder.                                                                                                                |

Çizelge 2.2 Binet sistemine göre KLL evreleri (Binet 1981)

|   |                                                                            |
|---|----------------------------------------------------------------------------|
| A | Hb $\geq$ 10 g/dl, Plt $\geq$ 100 bin, $\leq$ 3 genişletilmiş alan         |
| B | Hb $>$ 10 g/dl, Plt $\geq$ 100 bin, $\leq$ 3 genişletilmiş alan            |
| C | Hb $<$ 10 g/dl, Plt $\geq$ 100 bin, herhangi bir sayıda genişletilmiş alan |

Tanı anında belirlenmiş olan parametrelerden (Çizelge 2.3), evre, lenfosit ikiye katlanma zamanı ve Kemik iliği (Kİ) infiltrasyon tipi hastanın takibi süresince değişim gösterebilmektedir. Bu değişim, iyi prognostik faktörlerin kötü olanlara dönüşümüyle, hastalığın ilerlemesi yani kötü prognoz olarak tanımlanır (Hallek vd. 2008).

Çizelge 2.3 KLL’de Prognostik Faktörler

|    | <b>İyi Prognostik faktörler</b>                                               | <b>Kötü prognostik faktörler</b>                                                            |
|----|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | Düşük Rai veya Binet klinik evreler                                           | Yüksek Rai veya Binet klinik evreler                                                        |
| 2  | İntertisyel veya nodüler patern’de Kemik iliği(Kİ)’nde lenfosit infiltrasyonu | Kİ’nde diffüz patern’de lenfosit infiltrasyonu                                              |
| 3  | Lenfosit ikiye katlanma zamanı > 12 ay                                        | Lenfosit ikiye katlanma zamanı< 12 ay                                                       |
| 4  | CD 38 (-)                                                                     | CD 38 (+)                                                                                   |
| 5  | Mutasyona uğramış ağır zincir genleri                                         | Mutasyona uğramamış ağır zincir genleri                                                     |
| 6  | ZAP 70(-) düşük düzeyler                                                      | ZAP 70(+)                                                                                   |
| 7  | Kromozom 13q14                                                                | Delesyon 11q23                                                                              |
| 8  |                                                                               | 17p – TP53 anomalileri                                                                      |
| 9  |                                                                               | P53 disfonksiyon veya aşırı ekspresyonu                                                     |
| 10 |                                                                               | TNF- $\alpha$ , $\beta_2$ mikroglobin, IL-6, IL-8, IL-10, LDH, UGGFR-2, CD20 ve CD52 artışı |
| 11 |                                                                               | NOTCH 1, SF3B1, BIRC3 gen mutasyonu (+)                                                     |

## 2.2 Ekstrasellüler Veziküller (EV)

Ekstrasellüler veziküller (EV), bilinen tüm organizmalar tarafından üretilen, hücrelerarası iletişimde ve fizyolojide rol oynayan önemli moleküllerdir (Zabeo vd., 2017). Kan, anne sütü ve meni gibi birçok vücut sıvısının yanı sıra, tümörleri de kapsayan birçok dokuda tespit edilmiştir (Poliakov vd., 2009; Lässer vd., 2011; Yuana vd., 2013; Arraud vd., 2014; Zonneveld vd., 2014; Hoog ve Lotval, 2015; Tkach ve

Thery, 2016). Çizelge 2.4.'de özellikleri gösterilen EV'lerin üç alt grubu tanımlanmıştır: a) Apoptotik cisimler; apoptoz sırasında plazma membranından oluşan kabarcıkların salıverilmesiyle oluşur (500-2.000 nm) b) Hücrel mikropartiküller/mikroveziküller/ektozomlar; direk plazma membranından değişik boyutlarda salınan küçük veziküllerdir (50-1.000 nm) c) Eksozomlar; multiveziküler cisimlerin (MVC), hücre dışı çevreyle etkileşimi sonucu plazma membranından salınan intraluminal veziküllerdir (ILV 40-120 nm) ( Colombo vd., 2014; Anonymus. 2015; Yanez vd., 2015; Skotland vd.; 2017) ( Şekil 2.1).

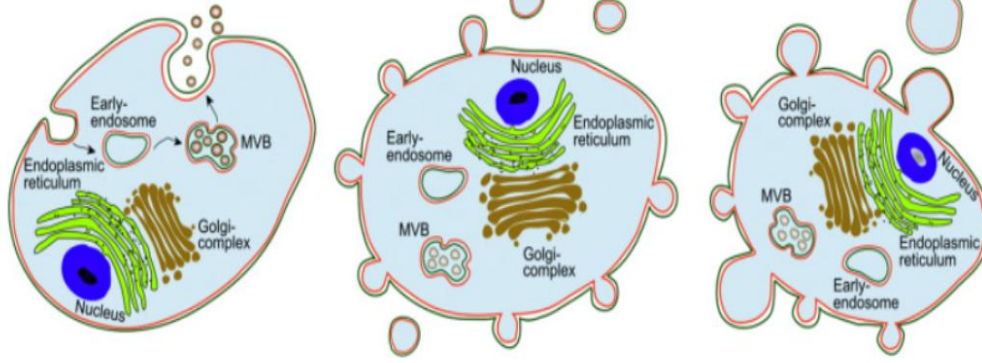
Çizelge 2.4 Ekstraveziküllerin sınıflandırılması (www.abcam.com)

|                     | <b>Eksozomlar</b>                                                         | <b>Mikroveziküller</b>                                                    | <b>Apoptotik cisimler</b>               |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>Köken</b>        | Endositik yolak                                                           | Plazma membranı                                                           | Plazma membranı                         |
| <b>Boyut</b>        | 40-120 nm                                                                 | 50-1000 nm                                                                | 500-2000nm                              |
| <b>Fonksiyon</b>    | Hücreler arası iletişim                                                   | Hücreler arası iletişim                                                   | Fagositoz                               |
| <b>Belirteçleri</b> | Alix, Tsg 101, tetraspainer, (CD 81, CD 63, CD 9), flotillin              | İntegrinler, selektinler, CD 40                                           | Annexin 5, fosfatidilserin              |
| <b>İçeriği</b>      | Proteinler ve nükleik asitler ( mRNA, miRNA ve diğer kodlanmamış RNA'lar) | Proteinler ve nükleik asitler ( mRNA, miRNA ve diğer kodlanmamış RNA'lar) | Nükleer fraksiyonlar, hücrel organeller |

## Eksozomlar

## Mikroveziküller

## Apoptotik Cisimler



Şekil 2.1 Ekstrasellüler veziküller (EV) (Skotland vd., 2017)

### 2.2.1 Eksozomlar

Eksozomlar ilk kez, Trams ve ark. tarafından 1981 yılında, neoplastik hücre serilerinden salınan 5'-nükleotidaz aktivitesine sahip mikroveziküller olarak tanımlanmıştır (Trams, 1981). Sonraki birkaç yıl içinde Pan ve ark.'nın yaptığı çalışmada, bu veziküllerin endositik orijinli oldukları gösterilmiştir (Pan, 1985). Bu tarihlerde sadece ölü hücre ve atık materyalin uzaklaştırılmasında görevli oldukları düşünülürken, Raposo ve ark., 1996 yılında yaptıkları çalışmada, Epstein- Barr ile enfekte B lenfositlerinden izole ettikleri eksozomları, antijen sunan veziküller olarak tanımlamıştır (Raposo, 1996). Böylece, immün sistem ile ilgili birçok konuda rol oynadığı da anlaşılmıştır.

Eksozomları, boyutlarının yanı sıra, bazı karakteristik özellikleri ile de ayırt etmek mümkündür (Santoni, 2015). İhtiva ettikleri protein ve genetik materyal (mRNA ve miRNA) kalıntıları salındıkları hücelere özgü olmakla birlikte, plazma membranları da eksozomları tanımlamak için birer belirteçtir (Keller, 2006). Morfolojik olarak yuvarlak, fincan şeklinde olmaları ve 1,13- 1,19 g/ml arasındaki yoğunlukları ayırt edici özelliklerinden bazılarıdır ( Simons, 2009).

Eksozomlar, çift tabakalı membran üzerinde çeşitli reseptörlere sahiptirler. Bunların en iyi bilinenleri; TSG101, Alix, Flotillin-1, CD63, CD9 ve CD81 olarak sayılabilir

(Schorey ve Bhatnagar, 2008; Soltani vd., 2015; Tang ve Wong, 2015; Yu vd., 2015; Kalluri ve Lebleu, 2020). Bunların yanı sıra, taşıyıcı proteinler, lipidler, mRNA'lar, miRNA'lar, ve küçük DNA parçaları ihtiva ederler. Bu yapıları sayesinde kendilerini bozunuma uğramaktan korurlar (Raimondo vd., 2011; Hwang, 2013; De Veirman vd., 2016; Wang vd., 2016).

Son 10 yılda yapılan çok sayıda çalışma, eksozomların tümör mikroçevrede bulunan çoğu hücre tipini kapsayacak şekilde hipoksiye bağlı Epitelyal Mezenkimal Transisyon (geçiş) (EMT), kanser kök hücresi oluşumu, anjiyogenez ve metastaz gibi majör kanser yollarında kanser hücrelerinin iletişimi ya da etkileşiminde görev aldığını göstermektedir (Azmi vd. 2013, Soung vd. 2016, Steinbichler vd. 2017, Weidle vd. 2017).

Ayrıca eksozomlar, biyolojik yapıları, sitotoksik olmamaları, düşük immünojeniteleri, kolay üretilibilmeleri, kolay saklanabilmeleri, uzun yaşam süreleri ve yüksek kargo taşıma kapasiteleri ile gen terapisi ve terapötik ilaç geliştirme için elverişli nanometrik yapılardır (Munagala vd., 2016; Srivastava vd., 2016; Wang vd., 2016).

Qi ve ark. 2016 yılında, manyetik tabanlı bir yöntem ile superparamanyetik-konjuge transferrin ile kandaki eksozomların yüzeyinde bulunan transferrin-pozitif reseptörünün bağlanmasını sağlamış ve direk hedef tümör hücrelerine etki ederek, tümör gelişimini baskılamıştır (Qi vd, 2016).

Bir başka çalışmada, doku mühendisliği ile bir nanocisimcik üzerine anti-epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) yerleştirilerek, ankor sinyal peptit glikozilfosfatidilinozitol (GPI) füzyon proteini bulunduran hücrelere transfekte edilmiş ve sonucunda EGFR için antijen sunan- nanocisimcikler (eksozomlar) oluşturulmuştur. Böylece eksozomların, direk EGFR-pozitif tümör hücreleri hedef alması sağlanmıştır (Kooijmans vd., 2016).

Oksvold ve ark. ise (2014) yaptıkları çalışmada, B hücreli lenfoma serilerinden izole ettikleri eksozomların yüzey antijenlerinin (CD19, CD20, CD24, CD 37 ve HLA-DR) salındıkları lenfoma hücreleriyle aynı özellikte olduğunu göstermişlerdir (Oksvold, 2014). Bu çalışmalar, eksozomların kanser hücrelerinin iletişimde rol oynadığını gösteren önemli kanıtlardır.

Pagetti ve ark. (2015), KLL hücrelerinden salınan eksozomların, ex vivo ve in vivo ortamlarda, stromal hücreleri kanser fibroblastlarına dönüştürdüğünü göstermiştir. Bunu, içeriğindeki protein ve miRNA'lar ile yapan eksozomlar, bilgileri stromal hücrelere aktarmak suretiyle bu dönüşümü gerçekleştirmektedir. Böylece bu hücreler, tümör destekleyici faaliyet (proliferasyon, migrasyon, inflamatuvar sitokin salınımı gibi) göstermeye başlamaktadırlar (Pagetti, 2015).

2017 yılında, Prieto ve ark. KLL hastalarının eksozomlarında tespit ettikleri S100-A9 kargo proteininin hastalığın ilerlemesinde etkili olduğunu, ayrıca NF-κB yolağını kullanarak tümör hücrelerinin iletişimde eksozomların rol oynadığını göstermiştir (Prieto vd., 2017).

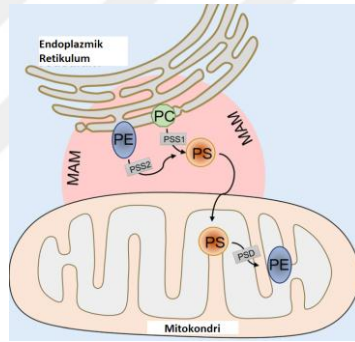
Koliha ve ark. ise, melanoma hücreleri ile yaptıkları çalışmada, EV içeriği ve sayısını hasta ve sağlıklı kişilerin plazmalarından alınan örneklerde değerlendirmişler ve 58 protein açısından analiz yapmışlardır. Sonuç olarak, melanoma hücrelerinin direkt olarak değil, indirekt olarak EV protein içeriğinde ve miktarında değişiklik yaptığını göstermişlerdir. Böylece, sağlıklı hücrelerden farklı olarak tümör hücrelerinin EV aracılığıyla hücreler üzerinde yaptığı değişimleri bu çalışmayla bir kez daha kanıtlamışlardır (Koliha vd. 2016).

### **2.3 Fosfatidilserin (PS)**

Fosfolipitler, ökaryotlarda asimetrik çift tabakalı bir membran oluştururlar (Bretscher, MS., 1972). 40 yılı aşkın süredir kabul gören “Akıcı mozaik zar modeli” sayesinde, hücre dışı (*ekstrasellüler*) moleküllerin, sinyaller aracılığıyla hücre içine (*intraseellüler*)

taşıması sağlanır (Alves vd., 2018). PS, hücre zarının iç tarafında konumlanmış negatif yüklü bir fosfolipittir (Kay ve Grinstein, 2011). Membran dış zarında, pozitif yüklü fosfolipitlerden PC ve SM yer alırken, negatif yüklü amino-fosfolipit olan PS ve PE, membran iç zarında lokalize olurlar (Balasubramanian ve Schroit, 2003; Vance ve Steinbergen, 2005; Leventis ve Grinstein, 2010).

Fosfatidilserin (PS) sentezi, memeli hücrelerinde endoplazmik retikulumun mitokondrial membran (MAM) olarak adlandırılan spesifik bir domaininde gerçekleşir (Şekil 2.2.). MAM'nın özelliği, endoplazmik retikulum ve mitokondri arasında moleküler değişim yapabilmesidir. Bu sebeple, hücrenin devamlılığı açısından çok önemli bir role sahiptir (Annunziata, vd., 2018; Missiroli, vd., 2018; Stacchiotti, A., 2019).

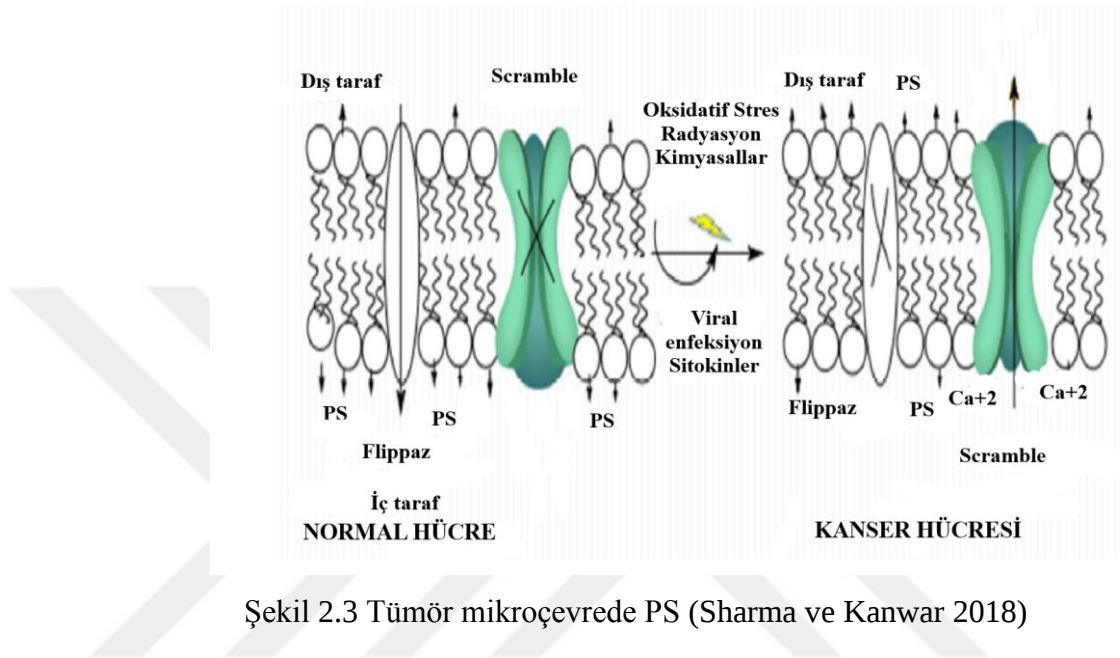


Şekil 2.2 Mitokondrial membranda (MAM) PS sentezi (Chang vd. 2020)

Şöyle ki, vücudumuzda günlük olarak yenilenen hücrelerin, otoimmün sistemi korumak ve inflamasyonu önlemek için sürekli olarak temizlenmesi gerekir (Galluzzi, vd. 2007). PS, bu hücrelerin “apoptoz” olarak bilinen fagositozla yutulması işleminde spesifik olarak tanınmayı sağlayan bir sinyal oluşturur (Shlomovitz, vd., 2019). Apoptoza giden hücrelerde, dönme hareketi (flip-flop) ile zar dış yüzeyine geçen PS molekülü, inflamasyon dışı zamanlarda fagositik olarak bu hücrelerin yutulmasını sağlar.

Tümör mikroçevrede ise, reaktif oksijen türlerinin oluşumu, kaspaz aktivasyonu ve hücre aktivasyonuna bağlı  $Ca^{++}$  geçişleri gibi çeşitli biyoreaksiyonları kullanarak PS'nin hücre zarı dış tabakasında yer alabildiği gösterilmiştir (Mates ve Sanchez-

Jimenez., 2000; Simon vd., 2000; Mandal vd., 2005, Zwaal vd., 2005) (Şekil 2.3.). PS'nin bu etkiyi, sadece yüzeyinde yer aldığı tümör hücreleri ile değil, aynı zamanda tümör hücrelerinden salınan mikroveziküller ile de yaptığı, Kelleher ve ark. tarafından 2015 yılında yapılan çalışmada, tümör hücre-kaynaklı mikroveziküllerde bulunan PS'nin T hücre cevabını baskılaması şeklinde gösterilmiştir (Kelleher vd. 2015).



Şekil 2.3 Tümör mikroçevrede PS (Sharma ve Kanwar 2018)

Hücre zarı yüzeyinde PS artışı, tüm immünsupresif sinyallere katkı sağlayarak lokal ve sistemik olarak anti-tümör immün yanıt oluşumunu engeller (Belzile, 2018). PS'nin, kanser hücrelerinin yüzeyinde artışı, bu hücrelerin diğer hücrelerden ayırt edilmesine ve böylece kanser hücrelerinin tespitine olanak sağlayabilmektedir (Blanco vd.,2014; Davis vd., 2016; Ayasa vd., 2016). Bu sebeple, PS-aracılı immünsupresyonu önlemek için PS hedefli monoklonal antikorlar, antikor-ilaç konjugasyonları, lipozomal taşıyıcılar ve doğal ürünler gibi çeşitli ajanlar geliştirilmiştir. Bununla ilgili olarak yapılmış çok sayıda klinik öncesi ve erken faz klinik çalışma bulunmaktadır. Bunlardan bazıları, tümör anjiyogenezini inhibe etmek için PS'ne Annexin bağlanarak tümör vaskülarizasyonunun önlenebileceğini ve PS-hedefli sentetik peptitlerin membran porlarından girerek PS'ne bağlanarak tümör hücrelerin yok edilebileceğini gösteren çalışmalardır (DeRose vd., 2011; Yin vd., 2013; Leite vd., 2015; Zhang vd., 2017).

PS'ni bloke etmede kullanılan diğer bir ajan, SapC-DOPS (Bavituximab) molekülüdür ve Beta2Glukoprotein1 ( $\beta$ 2GP1) aracılığıyla, PS'i indirekt olarak bağlar (Chang vd., 2020). Bu moleküle özgü çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar, N'Guessan ve ark. tarafından 2020 yılında yayınlanan derlemede yer almaktadır. Buna göre, Bavituximab molekülünün tümör hücrelerinde bulunan PS'ne bağlanmasıyla, tümör hücrelerinin gelişimine yönelik sinyallerin bloke edilmesi sözkonusudur (N'Guessan, vd., 2020). Bavituximab ile ilgili yapılan klinik çalışmalar Çizelge 2.5.'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.5 Solid tümörlerde Bavituximab ile ilgili yapılan klinik çalışmalar (N'Guessan, vd. 2020)

| Klinik çalışma Faz | Tümör tipi                                                             | İlaç adı                                 | Tedavi süresi                              | Kemo/radyoterapi kombinasyonları | Makale                 |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| Faz Ib             | İleri evre küçük hücreli olmayan akciğer kanseri 1.basamak             | Bavituximab (0.3, 1 or 3 mg/kg)          | Her 3 haftada bir (6 kür)                  | Carboplatin pemetrexed           | Grilley-Olson vd. 2018 |
| Faz II             | İleri evre küçük hücreli olmayan akciğer kanseri 1.basamak             | Bavituximab (3 mg/kg)                    | Her 3 haftada bir (6 kür) sonra monoterapi | Carboplatin Paclitaxel           | Digumarti vd. 2014     |
| Faz II             | İleri evre Non-sküamoz küçük hücreli olmayan akciğer kanseri 2.basamak | Bavituximab (1 or 3 mg/kg) ya da plasebo | Her 3 haftada bir (6 kür)                  | Docetaxel                        | Gerber vd. 2016        |
| Faz III            | İleri evre küçük hücreli olmayan akciğer kanseri 2.basamak             | Bavituximab (3 mg/kg) ya da plasebo      | Haftada bir                                | Docetaxel                        | Gerber vd. 2018        |
| Faz I              | HER-2 negatif metastatik meme kanseri 1.basamak                        | Bavituximab (3 mg/kg)                    | Her 4 haftada bir (4 kür)                  | Paclitaxel                       | Chalasani vd. 2015     |
| Faz II             | 2.basamak ileri evre ya da metastatik meme kanseri                     | Bavituximab (3 mg/kg)                    | 28 gün ilk 3 hafta haftada bir             | Docetaxel                        | Tabagari vd. 2010      |
| Faz I              | Rektal adenokarsinoma preoperatif tedavi                               | Bavituximab (0.3, 1 or 3 mg/kg)          | 8 hafta, haftada bir                       | Radyasyon ve capecitabine        | Meyer vd. 2018         |
| Faz I              | Hepatosellüler karsinoma                                               | Bavituximab (0.3, 1 or 3 mg/kg)          | 8 hafta, haftada bir                       | Sorafenib ya da monotherapy      | Bonar vd. 2017         |

Çizelge 2.5 Solid tümörlerde Bavituximab ile ilgili yapılan klinik çalışmalar (N'Guessan, vd. 2020) (devam)

|        |                                               |                                            |                                |                                                               |                    |
|--------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------|
| Faz II | İleri evre Hepatosellüler karsinoma 1.basamak | Bavituximab (3 mg/kg)                      | Haftada bir                    | Sorafenib                                                     | Yopp vd. 2015      |
| Faz I  | İleri evre solid tümörler                     | Bavituximab (0.3, 1 or 3 mg/kg)            | 8 hafta, haftada bir           | -                                                             | Gerber vd. 2011    |
| Faz Ib | İleri evre solid tümörler 1.basamak           | Bavituximab (3 mg/kg)                      | 8 hafta, haftada bir           | Docetaxel ya da gemcitabine ya da paclitaxel plus carboplatin | Digumarti vd. 2008 |
| Faz II | İleri evre-stage 4 Pankreas kanseri           | Bavituximab (3 mg/kg) / sadece Gemcitabine | 28 gün ilk 3 hafta haftada bir | Gemcitabine                                                   | Pandya vd. 2013    |

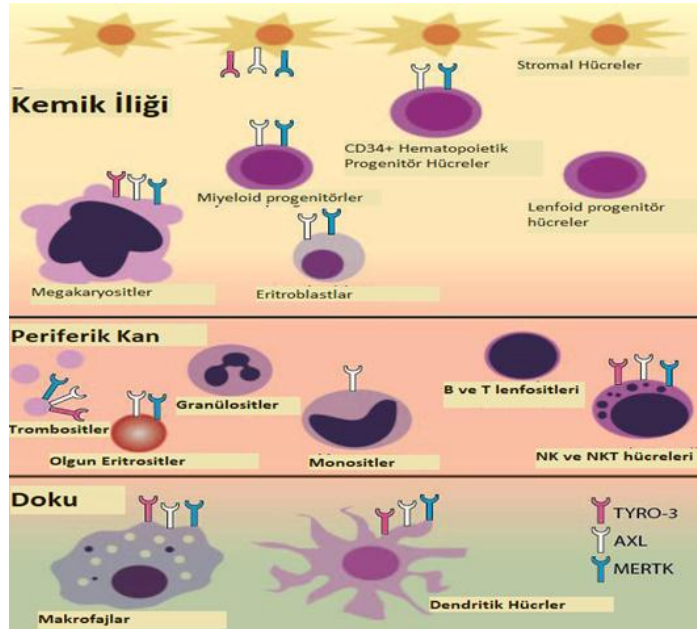
Bavituximab ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında, daha çok solid tümörler üzerine yoğunlaştığı, bunun yanı sıra Hepatit C ve Ebola virüs gibi çeşitli virüslerle ilgili de bu moleküle özgü çalışmalar olduğu görülmektedir (Ahn ve Flamm, 2011; Dowall, vd., 2015). Ancak, henüz KLL ve diğer lösemi türlerine ait bir çalışma bulunmamaktadır.

#### 2.4 TAM Reseptör Tirozin Kinazlar (RTK)

TAM ailesi reseptörleri adını, **TYRO3** (sinonimleri; BYK, Dtk, RSE, Rek, Sky, Tif, ya da Etk-2), **Axl** (sinonimleri; ARK, UFO, JTK11, ya da Tyro7) ve **Mertk** (Sinonimleri; MER, RP38, c-Eyk, c-Mer, Tyro12) reseptörlerinin ilk harflerinin kısaltmasından alır (Prasad vd., 2006). Bu reseptörler inflamasyon, otoimmünite, kanser progresyonu ve kanser immünolojisiindeki rolleri sebebiyle kanser araştırmalarında giderek önem kazanan moleküllerdir (Hochreiter-Hufford ve Ravichandran., 2013; Lemke, 2013; Graham vd.,2014; Rothlin vd., 2015).

TAM RTK'lar, homolog tip 1 reseptör tirozin kinazlar olup, çok hücreli organizmalarda apoptotik hücrelerin yok edilmesinde kritik bir role sahiptirler (Geng vd., 2017). Bu RTK'lar, bir ekstrasellüler domain, bir tek zincirli helix transmembran domain ve bir intrasellüler domain olmak üzere üç bölümden oluşan belirgin bir yapıya sahiptirler. Bu domainlerden ekstrasellüler domain, iki adet tip III fibronektin ve iki adet Ig domaininden oluşmaktadır. Sitoplazmik domain, kinaz aktivitesini yürütür ve diğer moleküller için bir bağlanma bölgesi oluşturur (Crosier vd., 2009).

Hematopoietik sistemde ise TAM reseptörlerinin farklı ekspresyonları Şekil 2.4.'de gösterilmiştir. Kemik iliği (Kİ) stromal hücrelerinde Axl reseptörü ekspresyonu görülürken, Mertk ve Axl reseptörlerinin Kİ'nde CD34+ hematopoietik progenitör hücreler ile öncü eritrositleri de kapsayacak şekilde miyeloid farklılaşmanın bazı basamaklarında da eksprese edildiği bilinmektedir. TAM RTK'ların üçü de, megakaryositler, olgun trombositler, doku makrofajları ve dendritik hücrelerde bulunmaktadır. TAM RTK'lar, lenfoid progenitörler ve olgun lenfositlerde eksprese edilmezken, doğal öldürücü (*natural killer*, NK) ve doğal öldürücü T (NKT) hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edilirler(Huey vd. 2016).

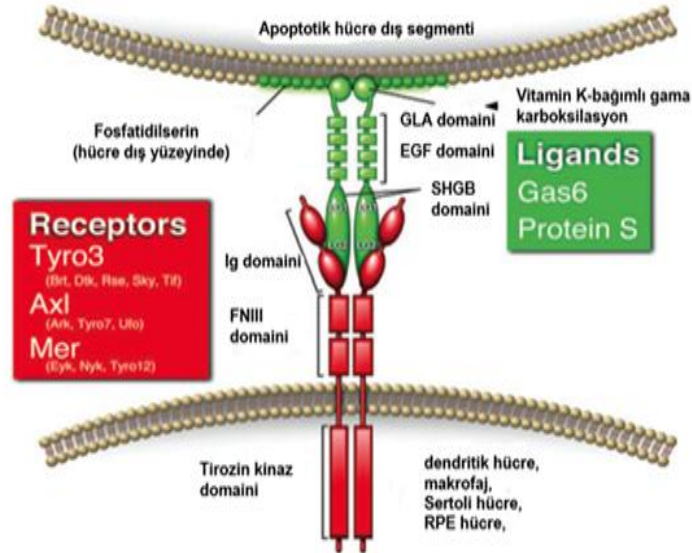


Şekil 2.4 Hematopoietik hücrelerde TAM reseptör ekspresyonu (Huey vd., 2016)

TAM RTK'ların, tümör hücrelerinin sağkalım, kemorezistans ve metastaz özelliklerini destekleyen birer etken olarak iş gördüğü bilinmektedir. Çeşitli insan kanserlerinde ektopik olarak eksprese edilirler veya aşırı ekspresyonları söz konusudur. Bu da tümör hücrelerinin sağ kalımına avantaj sağlayan bir durumdur (Graham vd., 2014). Birçok hematolojik malignitenin yanı sıra, epitelyal malignitelerde de TAM RTK'ların aşırı ekspresyonu görülmektedir (Crosier vd., 1995; Lee-Sherick vd., 2012).

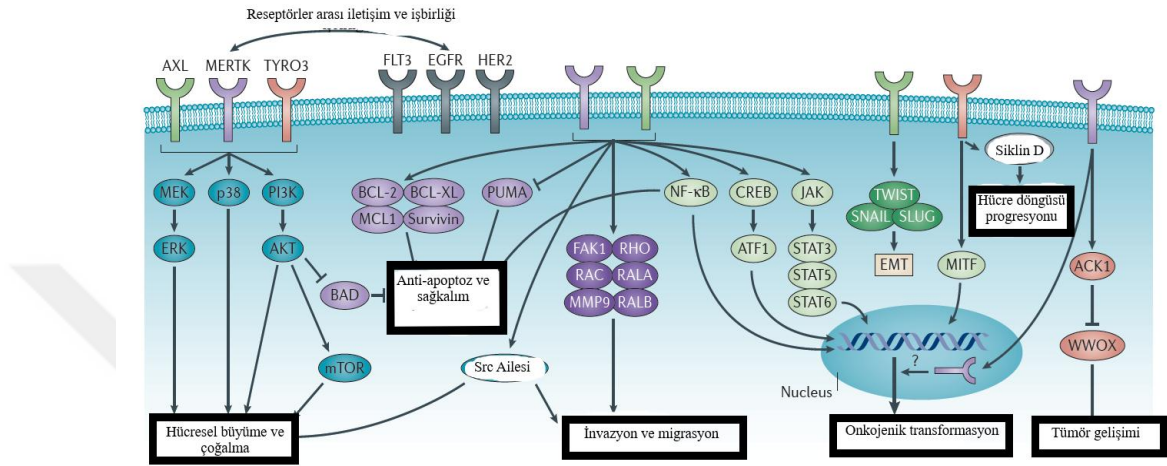
TAM reseptör aktivasyonu, PS ve  $Ca^{++}$  varlığında artış göstermektedir. Optimal koşullarda, TAM RTK'ların ligandı olan Gas6 ve ProS apoptotik hücrelerdeki PS ile bağlanmayı sağlar (Şekil 2.5.) ve hücre sağkalımı, invazyon, migrasyon, kemoterapi-direnci, metastaz gibi birçok onkojenik sürece katkıda bulunmaktadır. Gas 6 ligandına her üç molekül de bağlanabilirken, ProS sadece Mertk ve Tyro3 molekülü ile bağlanabilir. Ayrıca, Gas6 ligandına bağlanma konusunda Axl molekülünün afinitesi diğer iki reseptöre göre 3-10 kat fazladır. Tümör mikroçevrede, bu reseptörlerin ekspresyonları genellikle kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (Davra vd, 2016; Wu vd., 2017).

Apoptotik hücre boşluğu ve TAM sinyal mekanizması



Şekil 2.5 TAM RTK'ların, Gas6 ve Protein S ile PS'ne bağlanması (Lemke vd., 2010)

Tümör mikroçevrede, TAM RTK’larda çoklu mutasyonlar olduğu bilinmektedir ancak hepsi tam olarak karakterize edilememiştir. Bunlar, geleneksel onkogenler gibi direkt proliferasyona etki etmeyip lösemi hücrelerinde varlığı veya ektopik ekspresyonları ile, tümör hücre sağkalımını uyararak öncü- sağkalım sinyallerini aktive ederler (şekil 2.6.). (Graham vd.,2014; Lew vd. 2014; Shaver vd. 2016).



Şekil 2.6 TAM RTK ailesi sinyal mekanizması (Graham vd. 2014)

Bu receptörlerden biri olan Tyro3 ilk kez, Lai ve ark. tarafından 1994 yılında fare santral sinir sisteminden (SSS) izole edilmiştir. Aynı çalışmada, 125 kD ağırlığındaki bu molekülün, SSS sinapslarında eksprese edildiği ve nöronların bir ürünü olduğu gösterilmiştir (Lai vd. 1994). Son yıllardaki çalışmalar, Tyro3’ün kanserdeki rolüne yoğunlaşmıştır ve bu doğrultuda Tyro3’ün hedeflenmiş tedavilerde kullanılabileceği gösterilmektedir (Smart vd. 2018).

Tyro3, özellikle sinir sisteminde öne çıkmakla birlikte çeşitli dokularda fizyolojik olarak eksprese edilmektedir. Beyinde; endotelial hücrelerde, nöronlarda, oligodendrositlerde ve hipokampusün yanı sıra periferik sinir sistemi Schwan hücrelerinde Tyro3 eksprese edilmektedir (Pierce vd. 2008; Zhu vd. 2010; Guo vd. 2011; Miyamoto vd. 2015, Zhu vd. 2016; Akkermann vd. 2017). Hematopoietik sistemde ise; dendritik hücreler, doğal öldürücü (NK) hücreler, monosit ve makrofajlar, trombosit ve megakaryositler ve osteoklastlarda eksprese edilirler (Nakamura vd., 1998;

Katagiri vd. 2001; Lu ve Lemke, 2001; Angelillo-Scherrer vd., 2005; Gould vd., 2005; Caraux vd., 2006; Seitz vd., 2007; Wang vd. 2007., Cosemans vd., 2010; Zhong vd., 2010; Chan vd., 2016). Ayrıca üreme sisteminde, erkek primordiyal germ hücreleri ile gonat destekleyici hücreleri ve testislerde Sertoli hücreleri ile overde granüler hücrelerde Tyro3 ekspresyonu gösterilmiştir (Matsubara vd., 1996). Bunun yanı sıra, böbrek, akciğer, iskelet-kas sistemi, karaciğer, pankreas ve miyokardiyumda eksprese edildiği de bilinmektedir (Higuchi vd., 2012).

Axl molekülü ilk kez 1991 yılında, O'Bryan ve ark. tarafından iki Kronik Miyeloid Lösemi (KML) hastasının DNA'sından izole edilmiştir (O'Bryan, vd., 1991). 894 amino asitten oluşan bu molekül, 98 kDa büyüklüğünde bir protein kodlar ve geçirdiği post-transkripsiyonel modifikasyonlar sonucunda (glikolizasyon, fosforilasyon, birkaç bölgede monoubikuitinasyon gibi) 100-140 kDa arası aktive forma dönüşür (Lu vd., 1999; Mosesson vd., 2003; Valverde, P., 2005; Sather vd., 2007). Transforme olmayan hücrelerde olduğu kadar epitelyal, mezenkimal ve hematopoietik orijinli hücre serilerinde de eksprese edilirler (Dormady vd., 2000). 1999 yılında Rochlitz ve ark. tarafından yapılan çalışmada, RT-PCR yöntemi ile AML hastalarının %34'ünde Axl reseptörünün aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, AML hastalarında Axl molekülünün aşırı ekspresyonunun sağkalım süresini azaltan bir etken olduğu görülmüştür (Rochlitz vd., 1999; Ben-Batalla vd., 2013). Diğer lösemi türleri ile kıyaslandığında, Axl molekülü ALL'de daha az eksprese edilirken (Graham vd., 2014) AML, KLL ve KML'de ekspresyonu daha çok görülmektedir (Neubauer vd., 1994; Dirks vd., 1999; Rochlitz vd., 1999; Gosh vd., 2011; Ben-Batalla vd., 2013; Park vd., 2013).

Gosh ve ark., Axl molekülünün MV kaynaklı fosforile Axl (P-axl) formuna dönüştüğü ve kemik iliği stromal hücrelerinde AKT sinyal yolağını tetikleyerek normal hücre fonksiyonlarını değiştirdiği ya da yeniden programladığını söylemektedirler. Buna ek olarak, KLL hastalarında spesifik olarak artan CD52 ve CD20 belirteçlerinin MV'lerle girdiği etkileşimin sonucunda arttığını belirtmişlerdir. Bu moleküllerin hedeflendiği (CD52 için, alemtuzumab; CD20 için, rituximab) tedavilerdeki direncin de MV'ler sebebiyle olabileceğini öngörmüşlerdir. Ancak, MV miktarı ile hastalığın derecesi ve

prognostik süreci arasında bir bağlantı bulamadıklarını da ifade etmişlerdir (Gosh vd., 2010, 2011).

Mertk reseptörü ise ilk kez Graham ve ark. tarafından (1994) insan lenfoblastik ve miyeloid lösemi hücrelerinde ektopik ekspresyonları gösterilerek tespit edilmiştir (Graham vd., 1994). Bu durum olgun lenfositlerde ve lenfoid, miyeloid prekürsör hücrelerde görülmemektedir. Yine bu molekülün pediatrik B-ALL ve T-ALL hastalarının %30-50'sinde, pediatrik ve erişkin AML hastalarının %70-90'ında ve MM hastalarında anormal olarak eksprese edildiği gösterilmiştir (Lee-Sherick vd., 2013; Brandao vd., 2013; Linger vd., 2013; Waizenegger vd., 2014).

TAM RTK'ların ektopik/aşırı ekspresyonu görülen kanser türleri ve bu kanserlerdeki fonksiyonları Çizelge 2.6.'de gösterilmiştir (Graham vd., 2014).

Çizelge 2.6 TAM RTK ektopik/aşırı ekspresyonu görülen kanserler ve fonksiyonları

| TAM kinaz/li gand | Ektopik/Aşırı ekspresyon                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Prognostik önemi                                                                                                                                                                                                | Fonksiyonel rolü                                                                                                                                                             | Metastatik rolü                                                                                                                                                                                                       | Kemo-rezistans rolü                                             |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <b>Axl</b>        | AML, KML, B-KLL, akciğer kanseri, glioblastoma, meme, kolorektal, mide, pankreas ve özofagus kanseri, melanoma, skümoz hücreli cilt kanseri, prostat, endometriyal ve over kanseri, oral sküamoz hücreli karsinoma, troid, mesane, renal kanser, schawan, mezotelyal, Kaposi sarkom ve osteosarkom kanserleri | AML, akciğer kanseri, glioblastoma, osteosarkom, oral sküamoz hücreli karsinoma, kolorektal, mide, pankreatik ve özefagal kanser, troid, mesane, renal kanser, schawan, mezotelyal, Kaposi sarkom ve kanserleri | Prostat, over, meme, troid, akciğer, pankreas kanseri, melanoma, hepetosellüler karsinoma, glioblastoma, schawan, mezotelyal, Kaposi sarkom ve osteosarkom, özofagus kanseri | Meme, akciğer, melanoma, prostat, pankreas ve over kanseri, hepatosellüler karsinoma, troidve mesai kanseri, glioblastoma, mezotelyal, Kaposi sarkom ve osteosarkom, özofagus kanseri, servikal karsinom, nöroblastom | AML, KML, meme, akciğer kanseri, over ve özofagus kanseri       |
| <b>Mertk</b>      | AML, ALL, akciğer kanseri, glioma, melanoma, prostat, schawan, mantle cell lenfoma, rabdomiyosarkoma                                                                                                                                                                                                          | Mide kanseri                                                                                                                                                                                                    | AML, ALL, glioma, akciğer kanseri ve melanoma                                                                                                                                | Glioblastoma ve melanoma                                                                                                                                                                                              | B-ALL, T-ALL, glioma, akciğer kanseri, pankreas ve meme kanseri |

Çizelge 2.6 TAM RTK ektopik/aşırı ekspresyonu görülen kanserler ve fonksiyonları (devam)

| TAM kinaz/li gand | Ektopik/Aşırı ekspresyon                                                                                         | Prognostik önemi | Fonksiyonel rolü           | Metastatik rolü            | Kemo-rezistans rolü |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------|
| Tyro3             | AML, multiple myeloma, akciğer kanseri, melanoma, prostat kanseri, endometriyal kanser, tiroid ve schwan kanseri | Bilinmiyor       | Melanoma ve tiroid kanseri | Melanoma ve tiroid kanseri | Bilinmiyor          |

## 2.5 Gerekçe ve Amaç

“KLL hastalarında sağlıklı kişilere göre, kanda ve eksozom yüzeyinde PS ve TAM RTK molekül düzeyleri artmaktadır” hipotezinden yola çıkarak, bu doktora tezindeki amaç;

- 1- KLL hastaları ve sağlıklı kişilerin plazmalarında, PS ve TAM RTK düzeylerinin tespit edilmesi ve karşılaştırılması,
- 2- Eksozom düzeyinde KLL hastaları ve sağlıklı kişilerin örneklerinde PS ve TAM RTK düzeylerinin belirlenerek karşılaştırılmasıdır.

Bu amaçlar doğrultusunda hedefler ise;

- 1- Kanserde yeni tanı yöntemleri geliştirme: Elde edilecek bulgular ile plazmada ve eksozomlarda PS ve TAM RTK molekül düzeylerinin hastalarda sağlıklı kişilere göre farklı olmasının ayırt edici bir tanı kriteri olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, bu moleküllerin miktarına bağlı olarak hastalığın derecesi ve/veya seyri hakkında bilgi edinilebilir. Bu çalışmadan elde edilecek verilerle, tanı sırasında prognostik belirteç olarak eksozomların kullanılmasının, doğru tedavi protokollerinin seçilmesine katkı sağlaması hedeflenmektedir.
- 2- Moleküle özgü tedavi yöntemleri geliştirme: KLL hastalarında eksozom yüzeyindeki PS ve TAM RTK düzeylerinin belirlenmesi ve sağlıklı kişilerle karşılaştırılması ile hastalığa dair daha fazla bilgi sahibi olunabilecek, böylece bu

moleküllerin hastalık oluşumu, metaztaz ve prognostik sürecine etkisine dair fikir edinilebilecektir. Bunun yanısıra, bu moleküllerin hedeflendiği/ bloke edildiği tedavi stratejileri ile KLL hastaları için hedefe yönelik tedaviler geliştirilebilecektir. Kemoterapiye/tedaviye direnç konusunda bu moleküllerle ilgili yapılabilecek ileri klinik araştırmalara/ ilaç çalışmalarına faydalı bilgiler sağlanabileceği düşünülmektedir.



### **3. MATERİYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1 Materyal**

##### **3.1.1 Plazmanın eldesi**

Bu çalışmada yaş/cinsiyet fark etmeksizin, yeni tanı almış ve/veya tedavisiz takip edilen, Rai (0-I) derecelerinde 25 KLL hastası, 28 Ocak 2019 tarihinde 02-132-19 karar no ile A.Ü Etik Kurulu'ndan alınan onay ile çalışmaya dahil edilmiştir. Bu doğrultuda, A.Ü. Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'na başvuran ve çalışmaya uygunluğu belirlenen hastalardan “Bilgilendirilmiş gönüllü onamı” alınarak çalışmaya katılması sağlanmıştır.

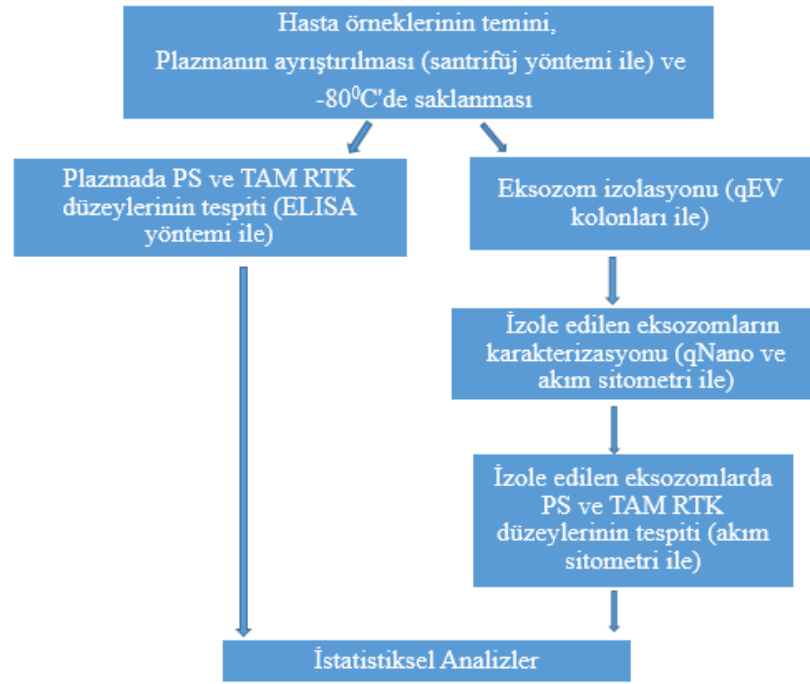
Tedavi süreçlerinin, bu molekül düzeylerine etkisi henüz tam olarak bilinmediğinden ve klinik/ilaç çalışması niteliğinde daha kapsamlı çalışmalara gerek duyulacağından, ilaç/kemo-radyoterapi almış olan hastalar bu çalışmaya dahil edilmemiştir.

Kontrol grubu olarak; 15 sağlıklı kişi yaş/cinsiyet ayırt edilmeksizin “Bilgilendirilmiş gönüllü onamı” alınarak aynı sayılı etik kurul kararı onayı ile çalışmaya dahil edilmiştir. Sağlıklı kişilerin bilinen herhangi bir kronik hastalığı olmaması yeterli koşul olarak belirlenmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubu kan örnekleri (mavi kapaklı plazma tüpü içerisinde), oda sıcaklığında en az 30 dk bekledikten sonra 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen plazmalar temiz tüplere alınmış ve birkaç tüpe bölünerek, çalışılacağı güne kadar -80 °C dondurucuda muhafaza edilmiştir.

#### **3.2 Yöntem**

Bu tez kapsamında yapılan tüm deneylere ait akış şeması Şekil 3.1’de Yöntem Akış Şeması’nda özetlenmiştir.



Şekil. 3.1 Yöntem Akış Şeması

### 3.2.1 Plazmada PS ve TAM RTK düzeylerinin tespiti

Bu çalışmada, plazma içerisinde PS ve TAM RTK moleküllerinin düzeylerinin tespitinde ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) tekniği kullanılmıştır. Bu yöntem, antijen-antikor reaksiyonunu göstermek amacıyla enzimle işaretli konjugat ve enzim substratı kullanılarak reaksiyonun renklendirilmesi esasına dayalı bir yöntemdir (Anonim. 2021). Temin edilen kitlerde bulunan her bir moleküle özgü antikorlar PS (BT Lab Cat.No E1419Hu), Mertk (BT Lab Cat.No E4708Hu), Tyro3 (BT Lab Cat.No E6363Hu) ve Axl (BT Lab Cat.No E3271Hu) üretici firma talimatına uygun olarak hasta ve kontrol gruplarına uygulanmış ve aşağıda yöntem detaylı olarak açıklanmıştır. Çalışılacak her moleküle özgü (PS, Mertk, Tyro3 ve Axl ve antikorları için) 4 ayrı kit ve 4 ayrı plate kullanılmıştır.

Plate düzeni Çizelge 3.1.'de gösterildiği şekilde yapılmıştır.

Çizelge 3.1 ELISA plate planı

|   | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9     | 10    | 11    | 12    |
|---|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| A | H1   | H1   | H2   | H2   | H3   | H3   | H4   | H4   | H5    | H5    | H6    | H6    |
| B | H7   | H7   | H8   | H8   | H9   | H9   | H10  | H10  | H11   | H11   | H12   | H12   |
| C | H13  | H13  | H14  | H14  | H15  | H15  | H16  | H16  | H17   | H17   | H18   | H18   |
| D | H19  | H19  | H20  | H20  | H21  | H21  | H22  | H22  | H23   | H23   | H24   | H24   |
| E | H25  | H25  | D1   | D1   | D2   | D2   | D3   | D3   | D4    | D4    | D5    | D5    |
| F | D6   | D6   | D7   | D7   | D8   | D8   | D9   | D9   | D10   | D10   | D11   | D11   |
| G | D12  | D12  | D13  | D13  | D14  | D14  | D15  | D15  | Std1  | Std1  | Std2  | Std2  |
| H | Std3 | Std3 | Std4 | Std4 | Std5 | Std5 | Std6 | Std6 | Blank | Blank | Blank | Blank |

Hasta ve kontrol örnekleri ile ELISA kitleri, uygulamadan 30 dk önce oda sıcaklığına çıkartılmıştır. Bu sürenin bitiminde, örnekler kit içerisindeki dilüent ile 1:1 oranında dilüe edilmiştir. Yıkama solüsyonu kit içinde belirtildiği şekilde (1:25 oranında distile su ile) seyreltilerek hazırlanmıştır. Aynı şekilde standartlar da kit içerisinde belirtilen oranlarda dilüent ile seyreltilerek 6 farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2 Her moleküle özgü hazırlanan standart yoğunlukları

|               | Std1 | Std2 | Std3 | Std4 | Std5 | Std6 |
|---------------|------|------|------|------|------|------|
| MER (ng/ml)   | 16   | 8    | 4    | 2    | 1    | 0,5  |
| AXL (ng/ml)   | 4000 | 2000 | 1000 | 500  | 250  | 125  |
| TYRO3 (ng/ml) | 64   | 32   | 16   | 8    | 4    | 2    |
| PS (ng/ml)    | 400  | 200  | 100  | 50   | 25   | 12,5 |

Plate planında belirlenen kuyucuklara hasta ve kontrol örnekleri 40 µl, standartlar 50 µl olarak yüklenmiştir. Standart kuyucuklar hariç, tüm kuyucuklara 10'ar µl kit içerisinde

bulunan ilgili antikor eklenmiştir. Daha sonra standart kuyucuklar dahil tüm kuyulara, streptavidin-HRP eklenip üstü kapatılarak, 1 saat 37 °C %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatöre kaldırılmıştır. İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama yapıp, her kuyucuğa sırasıyla, 50'şer µl Substrat A ve B solüsyonu eklenmiştir. Plate'ler kapatılıp, 10 dk 37 °C %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatöre kaldırıldıktan sonra tüm kuyucuklara, 50'şer µl stop solüsyonu eklenerek enzimatik reaksiyon durdurulmuştur. Plate'lerdeki mavi rengin sarıya dönmesi reaksiyonun durduğunun göstergesidir. Bu aşamada, en geç 10 dk içinde ölçüm yapılması gerekmektedir. Örnekler, Biotech Epoch (USA) cihazında 450 nm'de kolorimetrik olarak değerlendirilmiş ve cihaza bağlı "Gen5 Mikroplate Reader and Imaginer Software v.3.03" (Biotech, USA) programında analiz edilmiştir. Tüm örnekler ve standartlar iki tekrarlı olarak çalışılmıştır.

### 3.2.2 Eksozom izolasyonu

Eksozom izolasyonunda, qEVoriginal eksozom izolasyon kiti (qEVoriginalRack, qEVoriginal, 500µl, IzonScience, New England) üretici firma talimatlarına uygun olarak kullanılmıştır (Web: <https://www.izon.com> ). Bu kitin özelliği eksozomları "Boyutça eleme kromatografisi" (*Size exclusion chromatography*) tekniği ile özel kolonlarda tutarak saflaştırmasıdır (Navajas vd.,2019).

Bu teknik; kompleks biyosıvılar içerisindeki ekstrasellüler vezikülleri (EV), boyutları ve membran yapısına göre ayırmaktadır. İdrar, plazma, hücre kültürü süpernatantı ve bronkoalveoler sıvı (BAL) gibi çeşitli biyolojik materyallerden eksozomları hızlı ve etkin şekilde saflaştırabilmektedir. Kolonların çalışma prensibi, büyük moleküllerin pora girmeden erken süreçte kolondan geçmesi ve tam aksine, küçük moleküllerin ise porlara girerek daha geç olarak kolondan süzülmesiyle eksozomların elde edilmesi esasına dayanır. Plazmadan eksozom saflaştırma için 35 nm boyutundaki kolonlar seçilerek ayrıştırma yapılmıştır. 35-350 nm boyut aralığında partiküller için kullanılan bu kolon, 110nm ve altındaki molekülleri seçmede etkin olması sebebiyle tercih edilmiştir (Web: <https://www.izon.com>).

Saflaştırma için Bölüm 3.1.1’de tarif edildiği şekilde ayrıştırılıp saklanan hasta ve kontrol örnekleri ile qEV kolonları uygulamadan 1 saat önce oda sıcaklığına çıkartılmıştır. Oda sıcaklığında çözünen örnekler (500 µl/tüp), vortekslendikten sonra, 1500 g’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar temiz birer tüpe aktararak debriler uzaklaştırılmıştır. İkinci bir santrifüjle 20.000g’de 30 dk çevirilen örneklerin, supernatantları temiz tüplere aktarılmış ve kolonlarda saflaştırmak üzere numuneler hazırlanmıştır.

Kolonlar kolon tutucuya yerleştirildikten sonra, alt ve üst kapakları sırasıyla açılmıştır ve altlarına boş falkon tüpler (15 ml) yerleştirilmiştir. Kolon içeriğindeki sıvı, kolon yüzeyine yaklaştığında 1,5 kolon hacmi kadar (~ 15ml) Phosphate Buffer Saline (PBS) eklenmiştir. PBS kolon yüzeyine yaklaştığında örnek, kolona yüklenmiştir. Kolon içine geçtikten sonraki 3,5 ml atık hacim olarak kabul edilip alta konan falkonda toplandıktan sonra yerine eksozomları toplamak üzere temiz bir ependorf tüp (1,5 ml) hızlıca yerleştirilmiştir. 1ml saflaştırılmış eksozom bu tüpte toplandıktan sonra, 250’şer µl olarak temiz tüplere paylaştırılmıştır. Sonraki testlerde çalışılmak üzere, önce sıvı azotta 1-2dk hızlı donma işlemi yapıp sonrasında uzun süreli saklama için -80 °C dolaplara kaldırılmıştır. Bir örnekteki eksozom saflaştırma işlemi tamamlandıktan sonra, alt kısma yeniden falkon tüp yerleştirilerek 1,5 hacim PBS kolondan geçirilmiştir. İzolasyonlar tamamlandıktan sonra 1 hacim %0.05 Na Azide geçirilip, üst hazne boşalır boşalmaz alt ve üst vidalar kapatılarak kolon +4°C’ye kaldırılmıştır. Kolonlarda tıkanıklık olması durumunda, NaOH ile muamele edilmiştir.

### **3.2.3 Eksozom karakterizasyonu**

#### **A) qNano partikül ölçümü ile karakterizasyon;**

Eksozom karakterizasyonu için partikül büyüklüğü ölçümü, qNano (qNano, Izon, UK) cihazı ile ayarlanabilir direnç darbe algılama (Tunable Resistive Pulse Sensing, TRPS) yöntemi ile yapılmıştır (www.jove.com). qNano cihazı, herhangi bir işaretleme olmaksızın elektroforeze bağlı olarak bir nanopordaki partikül değişimini ölçmeye yarayan bir alettir (Licudine vd. 2010).

qNano cihazı ile ölçüm yapmadan önce, ölçüm elektroliti (*measurement electrolyte*), Wetting solüsyonu, ve kaplama solüsyonları kullanıcı talimatlarına uygun şekilde hazırlanmıştır (qNano User Manual, 2021). Numunelerin ölçümüne başlanmadan önce, CPC100B (Izon) kalibrasyon boncukları 1/5000 oranında dilüe edilerek cihaz kalibre edilmiştir. Sonrasında, 50-330 nm ölçüm aralığı ve 100 nm por çapına sahip olan NP100 poru ile, 500 partikül sayısına ulaşana dek numunelerdeki partikül sayımı yapılmıştır. Veriler, cihaza bağlı bilgisayarda bulunan “Izon Control Suit v.3.4 ” programına eş zamanlı aktarılarak analiz edilmiştir (Vogel vd., 2016).

### **B) Akım sitometri ile karakterizasyon;**

Akım sitometri ile eksozom karakterizasyonu, eksozoma özgü CD9 (ELK, cat no# ES1999) ve CD81 (Elabscience, cat no# E-A-F1073D) belirteçleriyle işaretlenen eksozomların akım sitometri cihazında (ACEA NovoCyte® © ACEA Biosciences, Inc.) okunması ve analiziyle yapılmıştır.

Bu yöntemde, eksozomların boyutlarının çok küçük olması sebebiyle, öncelikle özel karboksil lateks boncuklarla (Biolegend, cat no# 312102) CD9 belirteci kaplanarak daha sonra eksozomların bu komplekse bağlanması sayesinde ölçüm yapılabilir. Bu kaplama işlemi, 3 gün süren aşamalı bir işlem olup, 3.gün akım sitometri değerlendirmesi yapılmıştır.

İlk gün, 20 µl boncuk 100 µl PBS (Phosphate Buffer Saline) içine eklenerek 20.000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra, üzerine 40 µl CD9 antikoru eklenerek pipetasyonla homojenize edilmiştir. PBS ile hacmi 100 µl'ye tamamlanarak rotatorda 30 dk inkübe edilmiştir. Böylece boncuk-CD9 bağlanması sağlanmış, ancak daha etkin bir bağlanma için rotatorda +4 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Aynı zamanda ertesi gün bağlanacak olan saflaştırılmış eksozom örneklerinden 1'er tüp (250 µl) gece boyu çözülmesi için -80°C'den, +4 °C'ye alınmıştır.

İkinci gün boncuk-CD9 içeren tüp 20.000 g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra, süpernatant atılıp, pellet 1 ml %5 BSA (Bovine serum albümin) içeren PBS içinde

özölmüştür. Rotatorda, 4 saat +4 °C’de inkübe edilmiştir. Tekrar aynı hızda santrifüjlendikten sonra pellet, bu sefer 300 µl %1 BSA içeren PBS içinde özölmüştür. Her bir örnek için (25 hasta ve 15 donör), 250 µl saflaştırılmış eksozom içeren örnek tüpüne bu karışımdan 6’şar µl eklenmiştir. Her tüpte 256 µl olan hacim, %1 BSA içeren PBS ile 300 µl’ye tamamlanmıştır. 30 dk rotatorda inkübe edildikten sonra hacim 500 µl’ye tamamlanarak gece boyu +4 °C’de inkübasyona bırakılmıştır.

Üçüncü gün tüm örnekler (toplam 40 adet) 10.000 g’de 10 dk santrifüj edilip, süpernatantı atılmıştır. Pellet, %1 BSA içeren PBS içinde resüspanse edildikten sonra karakterizasyonda kullanılacak olan 2 tüpe (işaretlenmeyecek olan izotip kontrol ve CD81 ile işaretlenecek olan) 10’ar µl boncuk- CD9-eksozom kompleksinden konulmuştur. İşaretlenmeyen tüpler (izotip kontrol), CD81 işaretli tüplerdeki örneklerin analizi için kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Bu aşamada karakterizasyon için CD81 işaretleme yapılarak deneylere devam edilmiştir. Hazırlanan boncuk- CD9-eksozom stoğunun kalanı ayrıca PS ve TAM RTK düzeylerinin akım sitometri cihazında ölçümünde kullanılmak üzere ayrılmıştır. Sonraki bölümde bu testlere ayrıntılı olarak değinilmiştir.

Karakterizasyon testinde kullanılmak üzere, 1µl/test CD81 antikoruna içerecek şekilde bir stok hazırlanmıştır. Bu stok, 40 örnek için (pipetasyon hatası riskine karşı 45 gibi düşünölerek) 45 µl antikorun 405 µl %1 BSA içeren PBS içine eklenmesi ile 450 µl olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stoktan her örnek için, 10’ar µl boncuk- CD9-eksozom içeren tüpe 10 µl eklenmiştir. Üzeri %1 BSA içeren PBS ile 50 µl’ye tamamlanan tüpler 2 saat oda ısısında ve karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde hacim 150 µl’ye tamamlanarak akım sitometri cihazında okuması yapılmıştır.

### 3.2.4 Eksozomlarda PS ve TAM RTK düzeylerinin tespiti

Eksozomlarda, PS ve TAM RTK düzeylerinin tespitinde de akım sitometri yöntemi uygulanmıştır. Boncuk-CD9-eksozom kompleksi, bir önceki bölümde karakterizasyon testleri için hazırlanan stoktan kullanılmış, farklı olarak 3. gün CD81 yerine çalışılacak antikorlar eklenmiştir. Her örnek için 10'ar µl boncuk-CD9-eksozom kompleksi tüplere dağıtılmış ve her antikor kendi kullanıcı talimatına uygun olarak stok olarak hazırlandıktan sonra uygulama yapılmıştır. Mertk (Biolegend, cat no# 367607) antikoru hazırlanması ve uygulanması CD81 antikoru ile aynı şekilde yapılmıştır.

Annexin V (TONBO) ise yine CD81 ve Mertk antikoru gibi hazırlanmış ancak farklı olarak dilüsyonlarda %1 BSA içeren PBS yerine, annexin binding solüsyonu kullanılmıştır. Bu solüsyon, 1:6 oranında distile su ile dilüe edilerek hazırlanmıştır (225µl annexin binding solüsyonu ve 1125µl distile su). Her örnek için 1 µl/test olacak şekilde, 10'ar µl annexin V antikoru eklendikten sonra hacim, annexin binding solüsyonu ile 50 µl'ye tamamlanmıştır. 2 saat oda ısısında ve karanlıkta inkübasyon sonrasında, örneklerin hacmi bu sefer 1:10 oranında hazırlanan (450 µl annexin binding solüsyonu ile 4050 µl distile su) annexin binding solüsyonu ile 150 µl 'ye tamamlanarak akım sitometri cihazında okuması yapılmıştır.

**Tyro3** (R&D, anti h-Tyro3/DTK cat no# MAB859) ve **Axl** (R&D, anti h-Axl cat no# MAB154) RTK için ise, **sekonder antikor** (Biolegend, cat no# 406607) ile işaretleme sonrası okuma yapılmıştır. Öncelikle Tyro ve Axl antikorlarının stokları diğer antikorlarla aynı şekilde (Mertk ab ile aynı; 0,5 µl/test olacak şekilde) hazırlanmıştır. Her örnek için 10'ar µl boncuk-CD9-eksozom kompleksi dağıtılan tüplere 10'ar µl çalışılacak antikor eklenmiştir (Tyro için Tyro, Axl için Axl). Üzeri %1 BSA içeren PBS ile 50 µl'ye tamamlanan tüpler 2 saat oda ısısında ve karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre zarfında kullanılacak sekonder antikor hazırlanmıştır. Bunun için 0,2 µl/test olacak şekilde 1000 µl (20 µl antikor, 980 µl PBS içinde çözülerek) sekonder antikor hazırlanmıştır. 2 saatlik inkübasyon sonrasında

hazırlanan sekonder antikor da her tüpe 10'ar µl dağıtılmıştır. Son hacim PBS ile 160 µl olacak şekilde tamamlanarak akım sitometri cihazında okuma yapılmıştır.

### **3.2.5 İstatistiksel Analizler**

ELISA ve akım sitometri sonuçlarının istatistiksel analizinde, GraphPad Prism 9 programı kullanılmıştır. Örnek sayılarının farklı olması sebebiyle, Student's T testi, Non-parametric grup seçilerek Mann-Whitney U testi 2 kuyruklu analiz uygulanmış,  $p < 0.05$  değeri kurulan hipoteze göre anlamlı fark olarak kabul edilmiştir.



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu tez çalışmasında hasta grubu olarak, Rai evre (0-I) ve ortalama yaş 61 yıl (38-93 arası) olan 25 KLL hastası (11K/14E) çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta özellikleri ve klinik bilgileri Çizelge 4.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1 Hasta özellikleri ve klinik bilgileri

| Özellik                                                 | Hasta (n=25)                                                                                          |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Cinsiyet</b>                                         |                                                                                                       |
| Kadın                                                   | 11 (%44)                                                                                              |
| Erkek                                                   | 14 (%56)                                                                                              |
| <b>Ortanca tanı yaşı (yıl)</b>                          | 61(38-93 arası)                                                                                       |
| <b>Ortanca lenfosit sayısı (<math>10^9/L</math>)</b>    | 11 (5,3-294)                                                                                          |
| <b>Rai evresi, (n%)</b>                                 |                                                                                                       |
| 0                                                       | 16 (%64)                                                                                              |
| I                                                       | 9(%36)                                                                                                |
| <b><math>\beta_2</math> – mikroglobulin (g/l), (n%)</b> |                                                                                                       |
| < 3,5                                                   | 5(%20)                                                                                                |
| $\geq 3,5$                                              | 20(%80)                                                                                               |
| <b>CD38, (n%)</b>                                       |                                                                                                       |
| < %30                                                   | 5(%20)                                                                                                |
| $\geq$ %30                                              | 20(%80)                                                                                               |
| <b>CD49d, (n%)</b>                                      |                                                                                                       |
| < %30                                                   | 12(%48)                                                                                               |
| $\geq$ %30                                              | 13(%52)                                                                                               |
| <b>ZAP-70, (n%)</b>                                     |                                                                                                       |
| < %20                                                   | 10(%40)                                                                                               |
| $\geq$ %20                                              | 15(%60)                                                                                               |
| <b>FISH analizi, (n%)</b>                               |                                                                                                       |
|                                                         | 17p delesyonu (n=3)<br>trizomi 12 (n=2)<br>11q delesyonu (n=1)<br>13q delesyonu (n=11)<br>Normal(n=6) |

Ayrıca, ortalama yaşları 37 yıl ( 22-55 arası) olan 15 sağlıklı verici (11K/4E) kontrol grubu olarak çalışmaya katılmıştır. Sağlıklı vericilere ait özellikler Çizelge 4.2’de yer almaktadır.

Çizelge 4.2 Sağlıklı kişilerin özellikleri

| Özellik                  | Sağlıklı kişiler(n=15) |
|--------------------------|------------------------|
| <b>Cinsiyet</b>          |                        |
| <b>Kadın</b>             | 11 (% 73)              |
| <b>Erkek</b>             | 4 (% 27)               |
| <b>Ortanca yaş (yıl)</b> | 37 (22-55 arası)       |

#### 4.1 Plazmada PS ve TAM RTK Düzeylerinin Elisa Testi ile Tayininde Elde Edilen Bulgular

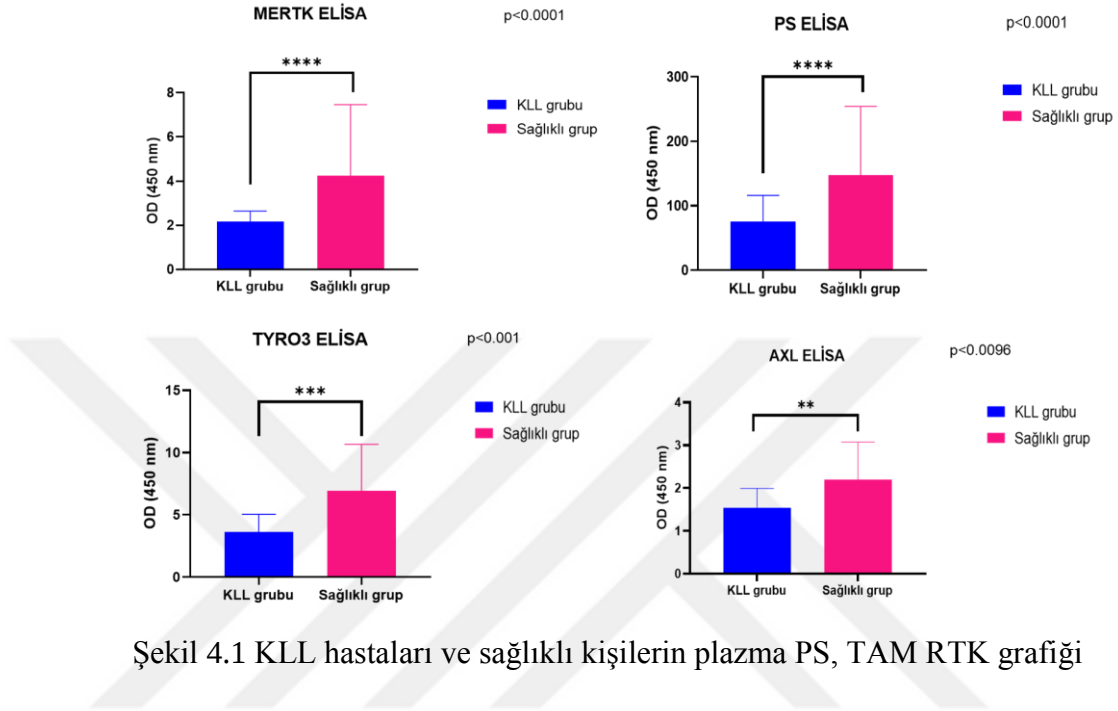
PS, TYRO3, Axl ve Mertk moleküllerinin her biri için 450 nm’de yapılan kolorimetrik değerlendirme ile önce absorbans düzeyleri belirlenmiş ve her molekül için oluşturulan standart eğriye göre konsantrasyon miktarları (ng/ml) hesaplanmıştır. Buna göre sırasıyla, hasta ve sağlıklı kişiler için PS, TYRO3, Axl ve Mertk moleküllerinin ortanca değerleri çizelge 4.3.’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 Hasta ve sağlıklı kişilerin ELISA plazma konsantrasyonları (ng/ml)

|                              | Hasta                      | Sağlıklı kişiler           |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>Ortanca PS (ng/ml)</b>    | 71,71 (29,39-269,35 arası) | 104,4 (68,80-408,17 arası) |
| <b>Ortanca Tyro3 (ng/ml)</b> | 3,71 (1,56-6,22 arası)     | 5,33 (3,47-16,22 arası)    |
| <b>Ortanca Axl (ng/ml)</b>   | 1,46 (0,92-3,24 arası)     | 1,86 (1,20-4,77 arası)     |
| <b>Ortanca Mertk (ng/ml)</b> | 2,12 (0,80-3,20 arası)     | 3,44 (2,34-13,46 arası)    |

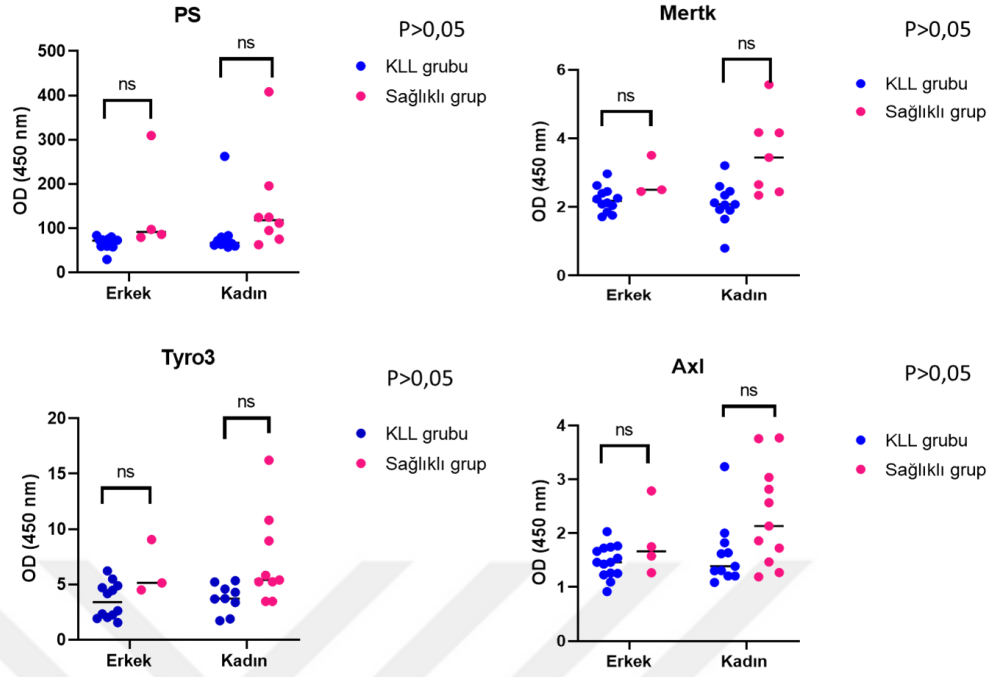
Çalışmada konsantrasyonları ölçülen, PS ve TAM RTK plazma düzeylerinin istatistiksel analizi, GraphPad programıyla yapılmıştır. Örnek sayılarının farklı olması sebebiyle, Student’s T testi, Non-parametric Mann Withney 2 kuyruklu testi uygulanmış ve  $p<0.05$

değeri kurulan hipoteze göre anlamlı fark olarak kabul edilmiştir. Buna göre; tüm parametrelerde (PS, TYRO3, Ax1 ve Mertk), sağlıklı kişilerin plazma konsantrasyonları, hasta gruba kıyasla anlamlı olarak ( $p<0.05$ ) daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 KLL hastaları ve sağlıklı kişilerin plazma PS, TAM RTK grafiği

Ayrıca, KLL hastalarında plazmada PS ve TAM RTK düzeylerinin kadınlar ve erkekler arasında farklı olup olmadığına bakıldığında anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür. Sağlıklı kişilerde de plazma PS ve TAM RTK değerlerini cinsiyete göre incelediğimizde, yine anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Bu durumda, bu moleküllerin plazma seviyelerinde cinsiyetin etkili olmadığı söylenebilir (Şekil 4.2).



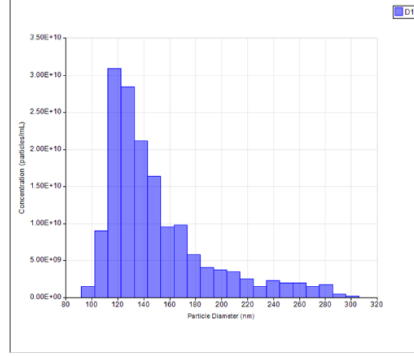
Şekil 4.2 KLL hastaları ve sağlıklı kişilerin plazmada PS, TAM RTK düzeylerinin cinsiyete göre dağılımı

## 4.2 Eksozom Karakterizasyonu Sonuçları

### 4.2.1 QNano cihazı ile miktar tayini

qEV kolonlarında saflaştırılarak elde edilen eksozomlar; boyut ve miktar tayini için Q-Nano Gold cihazında analiz edilmiştir. Her hasta için veriler, cihaza bağlı bilgisayarda bulunan “Izon Control Suit v.3.4 ” programı ile analiz edilmiştir. Partikül konsantrasyonu ve dağılımını gösteren grafik (Şekil 4.3.) aşağıda gösterilmiştir (1 hasta için).

Concentration [0-∞] (particles/ml)  
Measured Concentration: 1.58e+10  
Raw Concentration: 1.58e+11



Şekil 4.3 Eksozom partikül konsantrasyon grafiği (1 hasta için)

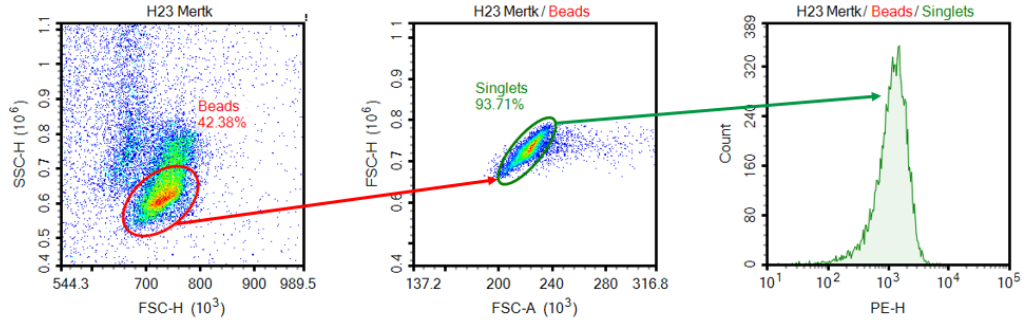
Ayrıca, partikül büyüklüğü ve yoğunluğunu, 80-150 nm ve 150-300 nm aralığında incelediğimizde, 80-150 nm boyutundaki (eksozom boyutu) partiküllerin %80'nin üzerinde olduğu görülmüştür (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 80-150 nm ve 150-300 nm boyutundaki partikül yüzde (%) değerleri

| Örnek adı       | Total partikül sayısı (partikül/ml) $\times 10^{10}$ | 80-150 nm'de (partikül/ml) $\times 10^{10}$ | 80-150 nm (%) | 150-300 nm arası (partikül/ml) $\times 10^{10}$ | 150-300 nm (%) |
|-----------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------|-------------------------------------------------|----------------|
| Sağlıklı kişi 1 | 1,58                                                 | 1,33                                        | 84            | 0,25                                            | 16             |
| Sağlıklı kişi 2 | 0,88                                                 | 0,71                                        | 80            | 0,17                                            | 20             |
| Sağlıklı kişi 3 | 3,80                                                 | 3,13                                        | 82            | 0,67                                            | 18             |
| Hasta 1 (H1)    | 6,00                                                 | 5,21                                        | 86            | 0,79                                            | 14             |
| Hasta 2 (H2)    | 1,10                                                 | 0,88                                        | 80            | 0,22                                            | 20             |
| Hasta 3 (H3)    | 1,83                                                 | 1,49                                        | 81            | 0,34                                            | 19             |

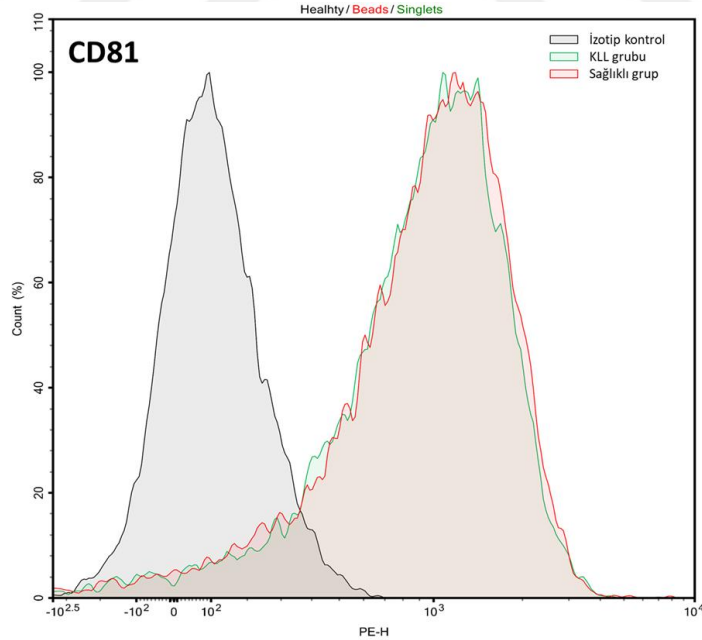
#### 4.2.2 Akım sitometri ile karakter analizi

Akım sitometride analiz yapabilmek için, öncelikle sadece boncuk-CD9-eksozom kompleksi içeren (işaretlenmemiş) izotip kontrol tüpünün okuması yapıp kaydedilmiştir. Daha sonra, CD81 içeren (işaretli) tüpler de okutularak (her örnek için), işaretli olmayan tüpe göre kapı alınmış ve analiz yapılmıştır. Kapı alma (*gating*) Şekil 4.4' de gösterilmiştir.



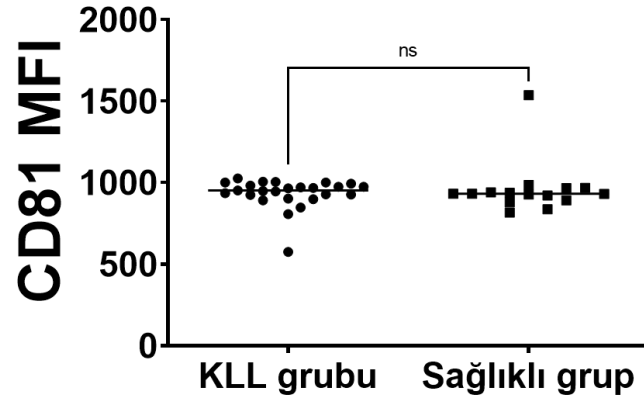
Şekil 4.4 Akım sitometride izotip kontrole göre kapı alma

Şekil 4.5’de görülen grafikte, gri pik izotip kontrolü, kırmızı pik CD81 işaretli sağlıklı kişilerin eksozomlarını göstermektedir. Benzer oranlarda ( $p=0.2245$ ) tespit edilen hasta eksozomları ise yeşil pik ile gösterilmektedir. Buna göre hasta ve sağlıklı kişi örneklerinin üst üste çakışması yakın miktarda olmalarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca her iki grubun da izotip kontrolden yatay düzlemde en az bir log veya daha fazla ötede olması, hasta ve sağlıklı kişi örneklerimizin eksozoma özgü CD81 belirtecini taşıdığını göstermektedir. Bu da elde ettiğimiz materyalin eksozom içeriğini doğrulamaktadır.



Şekil 4.5 CD81 analiz örneği

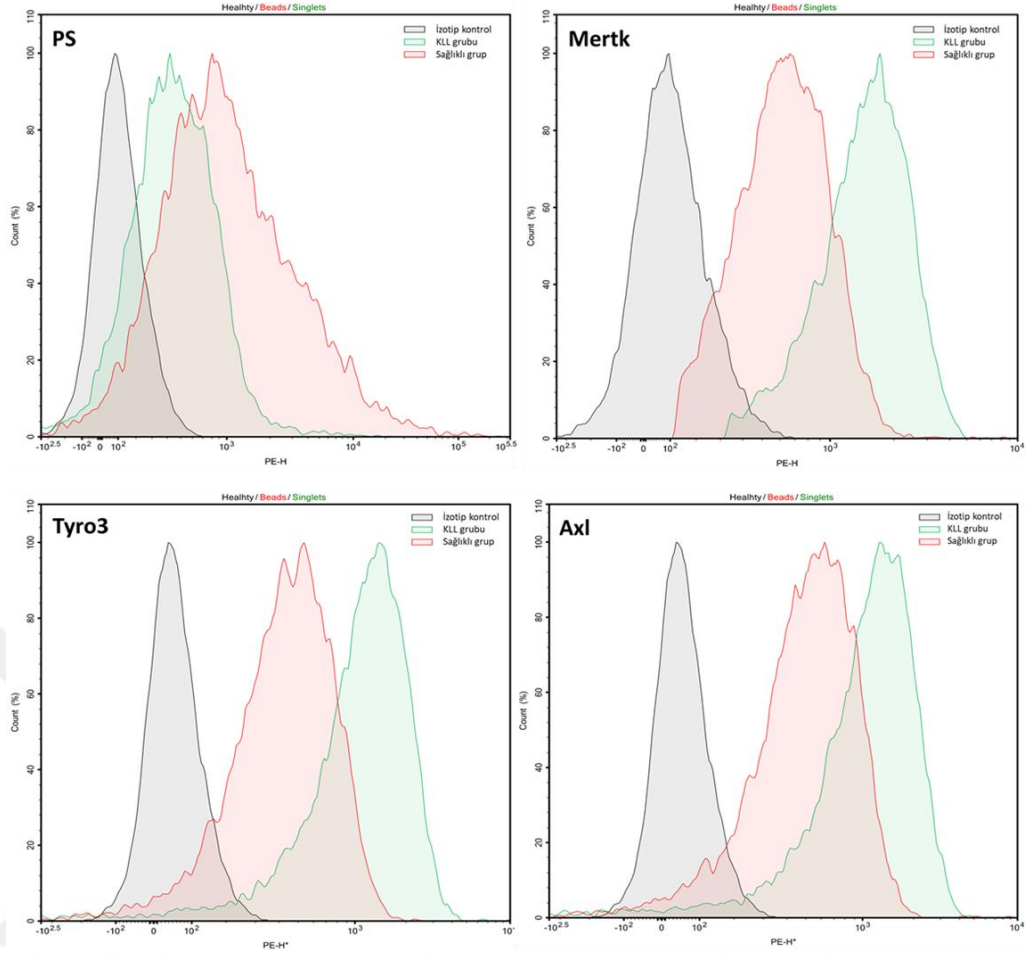
Buna göre, yapılan analizin istatistiki değerdendirmesi Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



Şekil 4.6 KLL hastaları ve sağlıklı kişilerin CD81 analiz grafiğı

#### 4.3 Eksozomlarda PS ve TAM RTK Düzeylerinin Akım Sitometri Tayininde Elde Edilen Bulgular

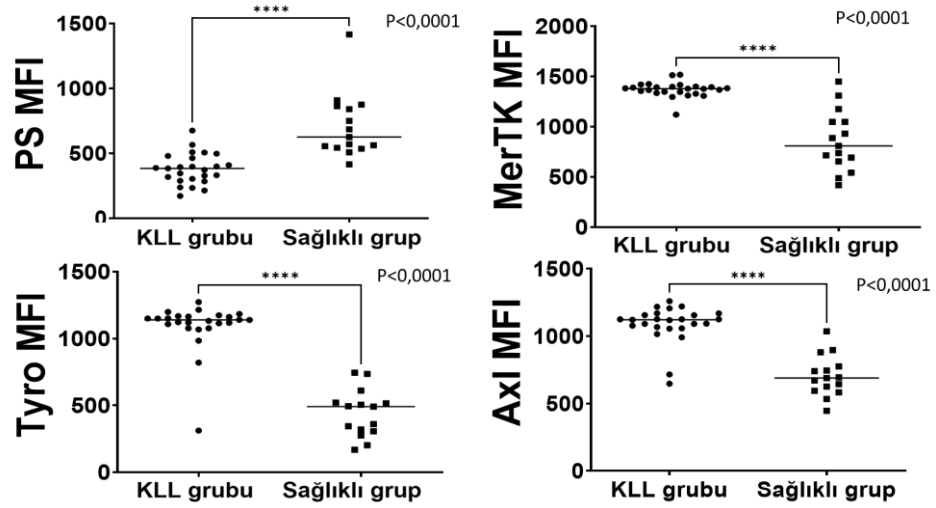
Akım sitometride yapılan analiz sonucu, işaretli olmayan izotip kontrol tüpüne göre hasta ve sağlıklı kişi PS ve TAM RTK düzeyleri eksozom düzeyinde değerdendirilmiştir. Buna göre gri renkli eğri işaretlenmeyen örneğı, yeşil renkli eğri hastalardaki molekül düzeylerini ve kırmızı renkli eğri ise sağlıklı kişilerdeki molekül miktarlarını temsil etmektedir. Bu üç eğrinin her bir molekül için karşılaştırmalı analizi (*overlay*), Şekil 4.7’de gösterilmektedir.



Şekil 4.7 KLL hastaları ve sağlıklı kişilerin eksozomlarda PS ve TAM RTK analizi

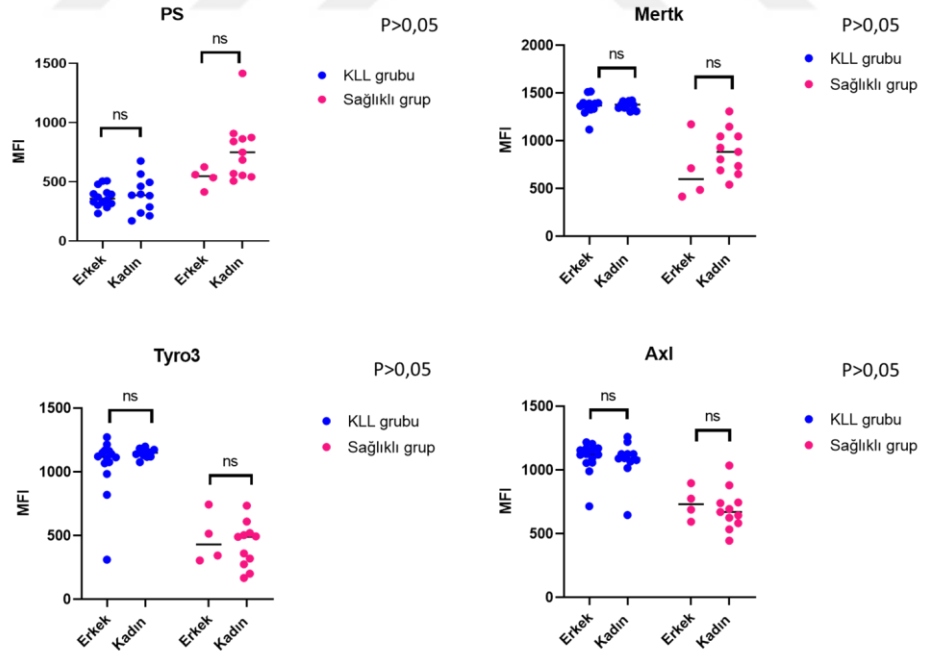
Hastaların ve sağlıklı kişilerin eksozomlarında PS ve TAM RTK düzeylerinin istatistiksel analizinde, GraphPad Prism 9 programı kullanılmıştır. Örnek sayılarının farklı olması sebebiyle, Student's T testi, Non-parametric grup seçilerek Mann-Whitney U testi 2 kuyruklu analizi uygulanmıştır.  $p < 0.05$  değeri kurulan hipoteze göre anlamlı fark olarak tanımlanmıştır.

Buna göre PS molekülünün düzeyi hastalarda, sağlıklı kişilere göre anlamlı olarak az bulunmuştur ( $p < 0.0001$ ). Buna karşın, TAM RTK'ların her biri ayrı ayrı incelendiğinde hastalarda sağlıklı kişilere göre anlamlı artış saptanmıştır ( $p < 0.0001$ ). PS ve TAM RTK analiz grafikleri Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8 KLL hastaları ve sağlıklı kişilerin eksozomlarda PS ve TAM RTK grafiği

Plazmada elde edilen bulgulara benzer şekilde, eksozom düzeyinde PS ve TAM RTK düzeylerini cinsiyete göre değerlendirdiğimizde gerek sağlıklı kişilerde kadın- erkek arasında fark görülmezken, gerekse hastalarda bu reseptör düzeylerinde cinsiyete göre anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9 KLL hastaları ve sağlıklı kişilerin eksozomlarında PS, TAM RTK düzeylerinin cinsiyete göre dağılımı

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 5.1 Tartışma

**KLL**, lösemiler içinde en sık görülen lösemi tipi olup, batı ülkelerinde oldukça yaygındır. Uzun süre ilerleme olmaksızın, hastanın sağlık durumu bozulmadan seyredebilen bir hastalık olan KLL, ülkemizde de sık görülmesine rağmen kayıtlı istatistiksel bir bilgi bulunmamaktadır (Anonim. [www.thd.org](http://www.thd.org)). Amerika’da ise, 2019 yılı KLL istatistiklerine göre, yılda 20.720 yeni vaka ve 3.930 ölüm oranı bildirilmiştir (Sharma ve Rai, 2019). Güncel tedavilere yanıt vermeyen bu hastalığa çözüm üretebilmek ve yeni tanı/tedavi yöntemleri geliştirebilmek için yapılan bilimsel çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır.

Günümüzde, bu çalışmaların çoğunluğu, bireyselleştirilmiş/hedefe yönelik tedavilere yoğunlaşmış durumdadır. Bu bağlamda, eksozomlar gibi nanopartiküller ve immün sistemde rol oynayan birçok reseptörün yanı sıra sinyal yolları da bu araştırmaların konusunu oluşturmaktadır. Kanser oluşumuna etki eden mekanizmaların tam olarak anlaşılmasıyla, bu süreçte rolü olan moleküllerin hedeflendiği tedaviler geliştirilebilir ve çoğu kanser tipi için çözüm olabilir.

Bu tez çalışmasında, “KLL hastalarında sağlıklı kişilere göre, kanda ve eksozom yüzeyinde PS ve TAM RTK molekül düzeyleri artmaktadır” hipotezinden yola çıkarak, KLL hastalarında ve sağlıklı kişilerde plazma ve eksozom yüzeyinde PS ve TAM RTK düzeyleri belirlenmiş ve bu moleküllerin hastalığa etkisi araştırılmıştır.

**PS’nin görevi**, vücudumuzda günlük olarak hücrelerin yenilenmesi ve böylece otoimmün sistemin korunması ile inflamasyonun önlemesidir (Galluzzi, vd., 2007). Bunun için, apoptoza giden hücrelerde membran iç yüzeyinden dönme hareketi (flip-flop) ile zar dış yüzeyine geçerler. Bu durumda oluşan sinyaller, bu hücrelerin tanınmasını ve fagositozla yutulmasını sağlar (Shlomovitz, vd., 2019). Tümör mikroçevrede ise, reaktif oksijen türlerinin oluşumu, kaspaz aktivasyonu ve hücre

aktivasyonuna bağılı  $Ca^{++}$  geçişleri gibi çeşitli biyoreaksiyonları kullanarak PS'nin hücre zarı dış tabakasında yer alabildiği gösterilmiştir (Mates ve Sanchez-Jimenez., 2000; Simon vd., 2000; Mandal vd., 2005, Zwaal vd., 2005). Ayrıca, Park ve Kang'ın (2019) yaptığı çalışmada, tümör hücreleri için PS'nin bir hedef halini aldığı ve böylece tümör vaskülaritesi, tümör kaynaklı eksozomların artışı ile strese bağılı tümör hücrelerinin çoğalması gibi etkilerle tümör gelişimine katkı sağladığı gösterilmiştir (Park ve Kang, 2019). Bu nedenle, tümör mikroçevrede önemli bir sinyal iletilici olduğu bilinen PS reseptör (PSR) sinyallerini engellemek üzere çeşitli antikörler geliştirilmiş ve bunlarla ilgili çok sayıda prelinik ve klinik çalışma yapılmıştır. Buna rağmen, halen PS hedefli tedavilerin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (Dayoub ve Brekken, 2020) Bu antikörlardan en çok çalışılanlardan biri, Bavituximab (SapC-DOPS) molekülü olup, bu molekülle ilgili çalışmalara bakıldığında daha çok solid tümörler üzerine yoğunlaştığı görülmektedir (Chang vd. 2020; N'Guessan, vd., 2020). KLL ve/veya diğer lösemilerde, Bavituximab ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

PS'nin tümör gelişimine etkisinde, tümör hücrelerinden salınan mikroveziküllerin de rolü olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Kelleher ve ark. tarafından 2015 yılında yapılan çalışmada tümör hücresi kaynaklı mikroveziküllerde bulunan PS'nin, T hücre cevabını baskıladığı bildirilmektedir (Kelleher, vd., 2015). Bununla ilgili yapılan çalışmalardan bir diğeri ise, Lea ve ark. 2017 yılında over kanserinde yaptıkları çalışmadır. Bu çalışmada, PS'nin eksozom yüzeyinde tespitini sağlayan, geliştirdikleri yüksek hassasiyette (picogram düzeyinde) ELISA testi ile over kanserli hastalarda, PS düzeylerine baktıklarında, malign hastalarda benign olanlara göre anlamlı bir artış olduğunu ayrıca, benign hastalarda da sağlıklı kişilere göre PS seviyesinin anlamlı olarak arttığını göstermişlerdir (Lea vd., 2017).

Buna göre, Lea ve ark.'nın çalışmasından farklı olarak, KLL hasta örneklerinde, sağlıklı kişilere göre PS seviyesinin, hem plazmada hem de eksozomlarda anlamlı oranda azaldığı tespit edilmiştir (plazmada,  $p < 0,0001$  ve eksozomlarda,  $p < 0,0001$ ). Clodi ve ark. (2000) ve Hakobyan ve ark.'nın (2018) yaptığı çalışmalarda, KLL hastalarında plazmada PS seviyesinin sağlıklı kişilere göre anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (Clodi vd. 2000; Hakobyan vd., 2018). Bizim sonuçlarımız da araştırmacıların bulguları

ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca, bu iki çalışmadan farklı olarak çalışmamızda, sadece plazmada değil eksozom düzeyinde de PS seviyelerinin KLL hastalarında sağlıklı kişilere göre anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Bu konuda yapılmış ilk çalışma olması açısından literatüre önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

PS seviyesinin KLL’de azaldığının gösterilmiş olması, solid tümör tedavilerinde kullanılan Bavituximab (SapC-DOPS) gibi PS’ne özgü moleküllerin, KLL için uygun olmayacağını ve solid tümörlerdeki başarının sağlanamayacağını düşündürmektedir. Ancak, ileri evre KLL hastalarını kapsayan, daha fazla sayıda hastanın yer aldığı çalışmalar yapılarak, KLL’de PS etkinliğine dair daha net sonuçlar elde edilebileceği öngörülmektedir.

**Eksozomlar,** kanser araştırmalarında son yıllarda oldukça önem kazanan nanopartiküller olup, doğal birer nano-taşıyıcı olmaları sebebiyle, kanser tedavileri için iyi bir potansiyele sahiptirler. Kanser hücresi kaynaklı eksozomların, fonksiyonel birer kargo taşıyıcı olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bunlardan biri, Skog ve ark’nın 2008 yılında glioblastoma hastalarında yaptığı çalışmadır. Bu çalışmada, glioma hücre serilerinde eksozomların mRNA, miRNA ve angiogenetik proteinler aracılığıyla genetik bilgi aktarımı yaptığı ve tümör hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, sağlıklı kişilerden farklı olarak 25 glioblastoma hastasının 18’inin, serumdan izole edilen eksozomlarda EGFRvIII reseptörünü spesifik olarak taşıdıkları tespit edilmiştir. Bu sebeple, glioblastoma için eksozomların tanı ve tedavi yaklaşımlarında yardımcı bir parametre olabileceğini belirtmektedirler (Skog vd.2008).

KLL’de eksozomlarla ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında ise, hem kargo içeriklerine hem de miktarlarına yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Aung ve ark. 2011 yılında yaptıkları çalışmada, B-KLL hücrelerinin yüzeyindeki CD20 belirtecinin hedef alındığı tedavilerde (Rituximab), ABC taşıyıcı proteinlerin etkisiyle salınımı artan eksozomların ilacın hedefi olan lenfoma hücreleri yerine ilaca bağlanarak tedavinin etkinliğini düşürdüğünü bildirilmişlerdir. Ayrıca, kanserde ilaç ve antikor tedavilerinde ABC taşıyıcı protein yollarının etkisiyle artan eksozom salınımının, ilaç/tedavi direncine

sebepe olduğu, bu sebeple plazmadaki eksozomlar uzaklaştırıldıktan sonra yapılacak tedavilerde (Rituximab) başarı oranının artabileceğini belirtmektedirler (Aung vd. 2011).

Bir başka çalışmada ise Pagetti ve ark.(2015), KLL kaynaklı eksozomların içeriğindeki proteinler ve miRNA'lar aracılığıyla, endotelial ve mezenkimal hücrelerin kanser ilişkili fibroblastlara (CAF) dönüştüğünü göstermektedir. Bu çalışmada, KLL eksozomları içeriğinde bulunan, miR150 ve miR146a proteinlerinin hedef hücrelerde yarattığı fenotipik değişikliklerin, tümör hücre proliferasyonu, sağkalım ve migrasyonuna yol açtığını belirtmektedirler. Ayrıca, KLL eksozomlarının hedef hücrelerde fosforilasyona aracı olarak, PI3K, Akt, ERK1/2 ve NF-κB sinyal yollarını uyardıklarını göstermişlerdir (Pagetti vd. 2015)

Eksozomlarla ilgili diğer bir grup çalışma ise; eksozom miktarının, çeşitli tümörlerde, hastalarda sağlıklı kişilere göre arttığını gösteren çalışmalardır. Bununla ilgili olarak, Silva ve ark. 2012 yılında yaptığı çalışmada, 91 kolorektal hasta plazması ve HCT116 hücre serilerinde plazmadaki eksozom miktarlarına ve bunların salınımında TP53 geninin etkisine bakmışlardır. Buna göre, eksozom miktarının, hastalarda sağlıklı kontrole göre anlamlı olarak arttığını ve bu hastalarda aynı zamanda karsino-embriyogenik antijen seviyelerinin de artmış olduğunu göstermişlerdir. Bunun kötü prognoz ve kısa sağkalım sürelerine yol açtığını belirledikleri bu çalışmada, dolaşımdaki eksozom miktarındaki artışın kötü prognoz ve kısa sağkalım ile korelasyonu sebebiyle bir tümör belirteci olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Ancak TP53 geninin eksozom salınımına etkisine dair bir bulgu elde edememişlerdir (Silva vd. 2012). Başka bir çalışmada ise; Melo ve ark. (2015); sağlıklı bireylerde 1ml kanda 1,5 milyon eksozom bulunduğunu ancak, pankreas kanseri hastalarında bu oranın neredeyse iki katına çıktığını tespit etmişlerdir (Melo vd., 2015). Kalluri ve ark. (2016) da yaptıkları çalışmada, kanserli hücre ve dokularda sağlıklı dokulara göre daha fazla eksozom oluşturulduğunu göstermişlerdir (Kalluri, 2016).

Bizim çalışmamızda bu bulgulardan farklı olarak, KLL hastaları ve sağlıklı kişilerdeki eksozom miktarları arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ( $p=0.2245$ ). Bu bulgulardan farklı olarak, Gosh ve ark 2010 yılında yaptıkları çalışmada, 60 KLL hastası ile 5 sağlıklı kişinin plazma MV seviyelerini karşılaştırdıklarında, KLL hastalarında sağlıklı kişilere göre MV sayısının artmış olduğunu belirlemişlerdir. Ancak, değişik evrelerdeki (Rai 0-IV) hastalar arasında MV miktarı açısından belirgin bir fark tespit edemediklerini bildirmişlerdir (Gosh vd., 2010, 2011). Başka bir çalışmada Luca ve ark. (2017), KLL hastalarında serum mikrovezikül (MV) miktarlarının sağlıklı kişilere göre artmış olduğunu rapor etmişlerdir. Gosh ve ark.'nın çalışmasından farklı olarak bu çalışmada, ileri evre (Rai III –IV) KLL hastalarında, sağkalım oranı düşük ve tedavi süreci uzun olanlarda, MV miktarlarının erken evre hastalara göre oldukça yüksek oranda olduğunu belirlemişlerdir (Luca vd, 2017). Buna bağlı olarak, bizim çalışmamızda eksozom miktarı açısından KLL ve sağlıklı kişiler arasında anlamlı bir fark görülmemesinin sebebi, çalışmada erken evre/yeni tanı alan hastaların seçilmiş olması ve MV sayılarının hastalığın ileri seviyelerinde artıyor olabileceği şeklinde açıklanabilir.

**TAM RTK'ların görevi**, normal fizyolojik koşullarda, ligandları (GAS6 ve ProS) aracılığıyla apoptoza giden hücrelerin yüzeyinde bulunan PS reseptörlerine bağlanmak ve makrofajlar tarafından yutulmasını sağlamaktır. İlginç bir şekilde tümör mikroçevrede ise; tümör hücreleri için sağkalım, metastaz, anjiogenez, kemo-radyoterapiye direnç gibi özellikler kazanırlar ve kanser hücrelerinin immün yanıtı kaçırmalarına yol açarlar (Graham vd., 2014; Kasikara vd., 2017; Belzile vd., 2018).

TAM RTK'larla ilgili, çok sayıda çalışma olmasına rağmen bunlar genellikle fonksiyonel etkileri ve sinyal mekanizmaları üzerine etkilerinin gösterildiği çalışmalardır (Lemke vd., 2010, 2013; Kasikara vd, 2017). TAM RTK'ların KLL'deki rolüne dair ise çok fazla çalışma olmadığı görülmektedir (Gosh vd., 2010, 2011; Sinha vd. 2015).

TAM RTK’lardan Axl ve Mertk reseptörlerinin tümör hücre serilerinden izole edildiği ve birer proto-onkogen olarak görev yaptığını gösteren çalışmalar 30 yıl öncesine kadar dayanmaktadır (Janssen vd. 1991; O’Bryan vd. 1991; Graham vd. 1994). Tyro3 için ise, gene o yıllarda yapılmış beyin ve üreme organlarında eksprese edildiğini gösteren çalışmaların yanı sıra, Src kinaz ailesi üzerinden fonksiyon gösterdiğine dair çalışmalar da mevcuttur (Mark vd. 1994; Crosier vd. 1994; Ohashi vd. 1994; Toshima vd. 1995).

Graham ve ark.’nın 2014 yılında yayınladığı derlemede, birçok kanser türünde TAM RTK’ların ektopik veya aşırı ekspresyonunu gösteren çalışmalar özetlenmektedir. Buna göre, bu reseptörlerin aktivasyonu ile, MEK/Erk, PI3K/Akt, JAK/STAT, p38, NFκB ve FAK/RAC sinyal yolları uyarılarak, tümör hücrelerinin proliferasyon, sağkalım, migrasyon, invazyon, ve kemoterapiye direnç kazanmalarına katkı sağladığı gösterilmiştir (Graham vd. 2014). TAM RTK’ların ektopik veya aşırı eksprese edildiği bu durumlarda, tümörün agresif seyir gösterdiği ve kötü prognoza sebep olduğu görülmektedir. Bu da, bu reseptörlerin klinik tedavilerde kullanılmak üzere hedef moleküller olabileceğini göstermektedir (Linger vd. 2008; Hutterer vd. 2008; Rea vd. 2015).

Bu konuda yapılmış çalışmalara bakıldığında, Chien ve ark. 2016 yılında yaptıkları çalışmada, kolon kanseri tedavisi için geliştirdikleri insan anti-Tyro-3 monoklonal antikorunun kanser hücrelerinin migrasyonu ve invazyonunu engellediğini rapor etmişlerdir (Chien vd. 2016). Baumann ve ark. (2017) ise; Axl reseptörünün Gas6 ligandı ile bağlanması sonucunda kanser ilaç direncinin oluştuğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca, meme kanseri ve küçük hücreli akciğer kanserinde, 3 boyutlu sferoid hücre serilerinde PDK-RSK-ERK-mTOR sağkalım yolağının TAM RTK ve Gas 6 ile etkileşimini göstermişlerdir. Bu sebeple bu moleküllerin ilaç tedavilerinde hedef molekül olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Baumann vd. 2017). Akalu ve ark. (2017) çalışmalarında, TAM RTK’ları hedef alarak immün kontrol noktalarının bloke edilmesiyle T hücre aktivasyonu ve immün yanıt sağlanabileceğini göstermişlerdir (Akalu vd. 2017). Shao ve ark. ise, 2018 yılında yaptıkları çalışmada, melanomada, Tyro3’ün bir aktin bağlama protein ailesi üyesi olan ACTN4 molekülünü fosforile etmesi sonucu fibroblastlar üzerinden tümör invazyonu ve metastazına yol açtığını

göstermişlerdir (Shao vd. 2018). Bir başka çalışmada, Wu ve ark. (2018), TAM RTK /Gas6 moleküllerinin ayrı ayrı bloke edilebildiğini ve bunun için hedef geni susturmayı sağlayan küçük çift sarmallı RNA'ların (shRNA) kullanıldığını göstermektedirler (Wu vd. 2018). Kabir ve ark.'nın 2018 yılında yaptıkları çalışmada, Tyro3 reseptörünün hepatosellüler karsinomada invazyon ve metastazda rol oynadığı ve tedavilerde ilaç direncine sebep olduğu bildirilmektedir. Aynı çalışmada, Tyro3 molekülü gen ekspresyonunu, miRNA7 ile bloke ederek bu etkilerin ortadan kalktığını rapor etmişlerdir (Kabir vd. 2018). Smart ve ark. (2018) ise, Tyro3 ekspresyonunun, çeşitli kanser tiplerinde PI3K/AKT, MAP/ERK gibi onkogenik sinyal yollarını etkileyerek tümör hücreleri sağkalımı, invazyon ve metastazına yol açtığını bildirmektedir. Ayrıca, yüksek oranda Tyro3 ekspresyonunun, kötü prognoza yol açtığı da bu çalışmada gösterilmiştir. Buna göre, Tyro3'ü hedef alan seçici küçük molekül inhibitörleri veya nötralize antikorlar ile yapılan klinik uygulamaların ve tedavilerin geliştirilebileceğini bildirmektedirler (Smart vd. 2018).

Bizim çalışmamızda, KLL hastalarında ve sağlıklı kişilerde Tyro 3 düzeyine plazmada Elisa, eksozom düzeyinde ise akım sitometri yöntemi ile bakılmıştır. Buna göre, Tyro3'ün plazmada KLL hastalarında sağlıklı kişilere göre anlamlı oranda azaldığı ( $p<0.001$ ), ancak eksozom düzeyinde ise anlamlı oranda arttığı gösterilmiştir ( $p<0.0001$ ). Plazmadaki seviyenin azalmış olarak tespit edilmesi, erken evre hastalarda hastalığa dair farklılaşmaların henüz plazma düzeyinde görülmediği şeklinde yorumlanabilir. Eksozomlardaki artışın ise erken evrede dahi hastalığın tespiti ya da seyri için fikir verebileceği düşünülmektedir. Bulgularımız, eksozom düzeyinde Tyro3 artışı yönünde olup, literatür ile uyumludur ve KLL'de bu moleküllerin arttığına dair hipotezimizi desteklemektedir.

Axl reseptörünün aşırı ekspresyonu ve bu ekspresyonun engellenmesiyle tümör gelişimin önlenmesine dair bilgiler, birçok insan kanserinde rapor edilmiştir (Graham vd. 2014). Ye ve ark. 2010 yılında, Axl molekülü için faj-kaynaklı bir monoklonal antikor (YW) geliştirerek etkilerinin gösterildiği bir çalışma yapmışlardır. Buna göre, bu antikoru (YW) ksenograft modellerinde ve meme kanserinde prelinik çalışmalarda, tümör kaynaklı makrofajlardan salınan inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu

engellendiği, vasküleritede azalmayı sağladığı, erlotinib ile birlikte EGFR inhibisyonuna yol açtığı ve aynı zamanda metastazı azalttığı gösterilmiştir (Ye vd. 2010). Bir başka çalışmada, Elkabets ve ark. (2015), Axl molekülünün EGFR ile etkileşiminin özofagus, baş ve boyun kanserlerinde ilaç direncine sebep olduğunu göstermiştir (Elkabets vd. 2015). Sinha ve ark.'nın 2015 yılında yaptıkları çalışmada, B-KLL'de fosforile Axl (p-Axl) aktivasyonunun gösterilmesiyle, bu molekülü hedef alan tek ajanlı tedavi ya da Bruton tirozin kinaz (BTK) ile kombinasyonlu tedavilerde p-Axl molekülünün etkinliğinin bloke edilebildiği gösterilmiştir (Sinha vd., 2015). Zhu ve ark.'larının 2019 yılında yaptıkları derlemede ise, Axl molekülünün birçok tümör dokuda anormal olarak eksprese edildiği ve bunun metastatik özellik ve kötü prognozla ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmektedir (Zhu vd., 2019).

Biz çalışmamızda, KLL hastalarında eksozom düzeyinde Axl miktarının sağlıklı kişilere göre anlamlı olarak artmış olduğunu tespit ettik ( $p < 0.0001$ ). Ancak, bunun tersi olarak, Tyro3 reseptöründe olduğu gibi, bu reseptörün de plazma seviyesinin, KLL hastalarında sağlıklı kişilere göre anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir ( $p < 0.0096$ ). Bunun sebebi, eksozom düzeyinde hastalık gelişimiyle ilgili değişimlerin gözlenebilir olmasına rağmen, henüz plazmada belirgin bir artış görülmemesi olabilir. Bunun için, bu hastaların ileri evrelerde plazma seviyelerinde artış olup olmadığının belirlenmesi ya da çeşitli evrelerdeki hastalarda plazma düzeyinde bu moleküllerin seviyesinin araştırılmasının uygun olacağı düşünülmektedir.

Mertk reseptörüne özgü geliştirilmiş antikorlarla ilgili prelinik çalışmalarda ise, küçük hücreli akciğer kanserinde bu reseptörün inhibe edilmesiyle STAT6, Akt ve Erk1/2 sinyal yolları aktivasyonunun engellendiği, tümör hücreleri koloni oluşumunda azalma ve apoptozda artış olduğu tespit edilmiştir (Cummings vd. 2014).

Davra ve ark. (2021) meme kanseri ile hayvan modeli çalışmasında, farelerde Axl geninin CRISPR/Cas9 ile tümör hücrelerinden çıkarılması sonucunda, tümör gelişiminde ve akciğer metastazında azalma, ortalama sağkalım süresinde ise artış olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada, Mertk reseptörünün makrofajlar üzerindeki

fonsiyonu bloke edildiğinde; eferositozda azalma, çevresel sitokinlerde değişim ve makrofoj gen ekspresyon yollarının baskılanmasına yol açtığını belirlemişlerdir (Davra vd. 2021). Bu çalışma, her iki reseptörün de onkojenik birer tirozin kinaz olarak kanser gelişiminde immün cevabın baskılanması konusundaki rolünü göstermesi bakımından oldukça önemlidir.

Bizim çalışmamızda, diğer iki TAM RTK'da olduğu gibi, Mertk reseptör seviyesinde de, plazmada KLL hastalarında sağlıklı kişilere göre anlamlı oranda azalma görülürken ( $p<0.0001$ ), eksozomlarda ise anlamlı oranda artış olduğu belirlenmiştir ( $p<0.0001$ ). Bu bulgular doğrultusunda, her üç molekül için de, KLL'de TAM RTK'ların bloke edildiği/hedef alındığı tedavilerde, plazma yerine eksozomlar hedef alınarak çok daha başarılı sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir.

**TAM RTK ile PS** ilişkisine bakıldığında, normal koşullarda apoptozda, TAM RTK'ların PS ile etkileşime girmesi ile ölü hücrelerin fagosite edilmesi için makrofajları uyardığı bilinmektedir. Ayrıca, TAM RTK'ların inflamasyonu baskılamadaki fonksiyonlarını, Gas6 ve ProS ligandları aracılığıyla PS'ne bağlandıktan sonra aktive olarak gösterdikleri ve hücrel inflamasyon sinyallerini bloke ettikleri birçok çalışmada gösterilmiştir (Burstyn-Cohen ve Maimon, 2019). Bunu, sitokin sinyallerini baskılayıcı proteinlerden (SOCS), SOCS1 ve SOCS3 proteinlerinin artışı, NFkB yolağının inaktivasyonu ve STAT-1'e bağlı pro-inflamuvuar sitokinlerin salınımının durdurulmasıyla yaparlar (Camenisch vd. 1999; Zagorska vd. 2014; Rothlin vd. 2015; Lumbroso vd. 2018).

Tümör mikroçevrede ise bu moleküllerin birbiriyle etkileşimi tümör gelişimine katkı sağlar. TAM RTK'lar ve PS arasındaki bağlantı ilk kez 2003 yılında Anderson ve ark. tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmada, PS ile Pros 1 bağlantısının  $Ca^{++}$  etkisiyle gerçekleştiği gösterilmiştir (Anderson vd. 2003). Rajotte ve ark. ise 2008 yılında, insan vasküler endotelial hücrelerinde PS ile Gas6 ligandının glutamik asitten zengin (GLA) domaini ile bağlanmasının hücre içi Akt sinyal yolağını uyardığını ve böylece hücrenin sağkalımında rol oynadığını göstermişlerdir (Rajotte vd. 2008).

Kaiskara ve ark. tarafından (2017) yapılan çalışmada, Mertk ve Tyro3 reseptörlerinin PS ile girdiği etkileşim sonucu, TAM reseptör-aracılı Akt yolağının aktive olduğu ve bir T-hücre kontrol noktası olan programlı hücre ölüm ligandı 1(PD-L1) molekülünün artışına yol açtığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, ayrıca Mertk ve Tyro3 reseptörlerinden farklı olarak, Axl molekülünün PS'den bağımsız da aktivasyon gösterebildiğini bildirilmektedir (Kasikara vd. 2017).

TAM RTK ve PS arasındaki ilişkiyi detaylı olarak araştıran bir diğer çalışma ise, Geng ve ark. tarafından 2017 yılında yapılmıştır. Bu çalışma, Gas6 molekülünün GLA domaininde, K vitamini etkisiyle N-terminal ucunda  $\gamma$ -karboksilasyonu olduğu ve PS ile TAM RTK'ların bu şekilde bağlanabildiğini göstermektedir. Bunun kanıtı olarak, pıhtılaşma önleyici bir ajan (warfarin) bulunan ortamda,  $\gamma$ -karboksilasyon olmadığı ve bu nedenle TAM RTK aktivasyonu görülmediğini belirtmektedirler. Aynı zamanda, hücre serilerinde hücreler arasında daha düşük etkinlikte olan bu PS-TAM RTK bağlanmasının, ortamda eksozomlar olduğunda çok daha fazla olabildiğini de bu çalışma ile göstermektedirler (Geng vd. 2017).

Bizim çalışmamızda ise, KLL hastalarında ve sağlıklı kişilerde PS ve TAM RTK düzeylerine plazmada ve eksozomlarda bakılmıştır ancak bu moleküllerin birbirleriyle olan ilişkilerine değinilmemiştir. İlerideki çalışmalarda, bu reseptörler arasındaki ilişkinin, KLL üzerine etkisinin araştırılacağı çalışmaların planlanması ile KLL'de bu moleküllerin etkilerine dair daha fazla bilgi sahibi olunabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada ayrıca, plazmada ve eksozomlarda KLL hastaları ve sağlıklı kişilerde PS ve TAM RTK seviyelerinde kadın-erkek arasında fark olup olmadığına bakıldığında, anlamlı bir fark olmadığını görülmüştür (tüm moleküller için plazmada ve eksozomda,  $p>0.05$ ).

Çalışmamızda, PS ve TAM RTK seviyeleri, KLL hastalarında sağlıklı kişilere göre plazma düzeyinde azalmış olarak tespit edilse de, eksozom düzeyinde PS hariç diğer üç reseptör düzeyindeki artış hipotezimizi destekler yöndedir. Bulgularımız, klinik

alışmalarla desteklendiğinde KLL hastaları için tanı/tedavi yöntemlerine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## 5.2 Sonuç

Bu alışmada, KLL hastaları ile sağlıklı bireyler arasında eksozom miktarları bakımından belirgin bir fark saptanmamıştır ( $p=0.2245$ ). Hastaların erken evrede olması ve hasta/ sağlıklı kişi sayısının azlığı bunun sebebi olabilir. Ayrıca, plazma ve eksozomda PS ve TAM RTK düzeyleri belirlenerek, iki grup arasında benzerlik/farklılıklar incelenmiştir. PS düzeylerine bakıldığında, hem plazma, hem de eksozomlarda PS seviyelerinin, KLL hastalarında sağlıklı kişilere göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur ( $p<0.0001$ ).

TAM RTK'lar için ise plazmada seviyelerine bakıldığında, KLL hastalarında sağlıklı kişilere göre anlamlı azalma (sırasıyla;  $p<0.001$ ,  $p<0.0001$ ,  $p<0.0096$ ) tespit edilirken, eksozomlarda anlamlı oranda bir artış olduğu belirlenmiştir (her bir molekül için,  $p<0.0001$ ).

Bu çalışmada ayrıca, PS ve TAM RTK düzeyleri ile ilgili olarak plazmada ve eksozomlarda, KLL hastaları ve sağlıklı kişiler kendi içinde cinsiyete göre değerlendirildiğinde, kadınlar ve erkekler arasında anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir ( $p>0.05$ ).

Bu sonuçlar ele alındığında, KLL hastalarında sağlıklı kişilere göre PS miktarındaki azalma sebebiyle, PS'ne özgü tedavilerde solid tümörlerde olduğu gibi başarı sağlanamayacağı düşünülebilir. Ayrıca, plazmada azalmış görünmesine rağmen, eksozom düzeyinde KLL hastalarında artmış olduğunu tespit ettiğimiz TAM RTK seviyeleri sebebiyle, bu moleküllerin plazmada değil eksozomlarda hedeflendiği tedavilerin daha iyi sonuç verebileceği söylenebilir.

Tüm bu veriler ışığında, hasta sayısının arttırıldığı, ileri evre KLL hastalarını kapsayan ve PS ile TAM RTK'lar arasındaki ilişkinin KLL hastalarında da gösterildiği çalışmalar planlanarak, KLL hastaları için yeni tanı/tedavi yöntemleri geliştirilmesine olanak sağlanacağı düşünülmektedir.



## KAYNAKLAR

- Ahn, J. and Flamm, S.L. 2011. Hepatitis C therapy: other players in the game. *Clin River Dis.* 15(3): 641-56.
- Akalu, Y.T., Rothlin, C.V., Ghosh, S. 2017. TAM receptor tyrosine kinases as emerging targets of innate immune checkpoint blockade for cancer therapy. *Immunol Rev.* 276(1):165–177
- Akkermann, R., Aprico, A., Perera, A.A., Bujalka, H., Cole, A.E., Xiao, J., Field, J., Kilpatrick, T.J., Binder, M.D. 2017. The TAM receptor Tyro3 regulates myelination in the central nervous system. *Glia*, 65: 581–591.
- Alves, A.C.S., Junior, R.A.D., Kagami, L.P., Machado das Neves, G., Torres, F.C., Eifler-Lima, V.L., Carvalho, I., De Miranda Silva, C., Kawano, D.F. 2018. Beyond the "Lock and Key" Paradigm: Targeting Lipid Rafts to Induce the Selective Apoptosis of Cancer Cells. *Current Medical Chemistry*; 25:1-23.
- Anderson, H.A., Maylock, C.A., Williams, J.A., Paweletz, C.P., Shu, H., Shacter, E. 2003. Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol.* 4:87–91.
- Angelillo-Scherrer, A., Burnier, L., Flores, N., Savi, P., DeMol, M., Schaeffer, P., Herbert, J.M., Lemke, G., Goff, S.P., Matsushima, G.K., Earp, H.S., Vesin, C., Hoylaerts, M.F., Plaisance, S., Collen, D., Conway, E.M., Wehrle-Haller, B., Carmeliet, P. 2005. Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J. Clin. Invest.* 115: 237–246.
- Annunziata, I., Sano, R., D'Azzo, A. 2018. Mitochondria-associated ER membranes (MAMs) and lysosomal storage diseases. *Cell Death Dis.* 9(3): 328.
- Anonim. 2014. T.C.Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu “Türkiye Kanser İstatistikleri” Erişim Tarihi: 16.04.2019
- Anonim. 2021. Protein Analiz Yöntemleri; Elisa ve Western Blot docs.neu.edu.tr>staff>serdar Erişim Tarihi:25.06.2021
- Anonim. 2022. [https://www.thd.org.tr/thd\\_halk/?sayfa=kronik\\_lenfositer](https://www.thd.org.tr/thd_halk/?sayfa=kronik_lenfositer) Erişim Tarihi: 10.06.2022
- Anonim. <https://acikders.ankara.edu.tr/mod/resource/view.php?id=46999> Erişim tarihi: 06.05.2021
- Anonymus. 2014. <http://www.who.int/applications/cancer> Chronic Lymphocytic Leukemia. Union for international cancer control 2014 review of cancer medicines on the WHO list of essential medicines. Erişim Tarihi: 22.09.2017
- Anonymus. 2015. <http://www.abcam.com/primary-antibodies/extracellular-vesicles-an-introduction> Erişim Tarihi: 22.09.2017
- Anonymus. 2021. [https://cdn.brandfolder.io/qNano\\_User\\_Manual](https://cdn.brandfolder.io/qNano_User_Manual) Erişim:02.07.2021
- Anonymus. 2021. <https://www.jove.com/v/51623/quantification-size-profiling-extracellular-vesicles-using-tunable> Erişim Tarihi: 11.12.2021

- Anonymus. 2021. Web sitesi: [http:// www.izon.com](http://www.izon.com) > qev. Isolate Extracellular Vesicles with qEV Isolation Columns. Erişim Tarihi: 15.12.2021
- Anonymus. 2021. Web sitesi: <https://www.cancer.org/cancer/leukemia.html>.
- Anonymus. 2021. Web sitesi: <https://www.pathologyoutlines.com/Lymphoma&relateddisorders/CLL/SLL.html>
- Arraud, N., Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Pasquet, JM., Mornet, S., Brisson, AR. 2014. "Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration." *J ThrombHaemost*, 12(5), 614-627.
- Aung, T., Chapuy, B., Vogel, D., Wenzel, D., Oppermann, M., Lahmann, M., Weinlage, T., Menck, K., Hupfeld, T., Koch, R., Trümper, L., Wulf, GG. 2011. Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3. *Proc Natl Acad Sci USA* 13;108(37):15336-41.
- Ayesa, U., Gray, BD., Pak, KY., Chong, PL. 2016. Liposomes Containing Lipid-Soluble Zn (II)- Bis-dipicolylamine Derivatives Show Potential To Be Targeted to Phosphatidylserine on the Surface of Cancer Cells. *Mol Pharm.* 14(1):147-56
- Azmi, AS., Bao, B., Sarkar, FH. 2013. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev* 32(3-4):623-42.
- Balasubramanian, K., Schroit, AC. 2003. Aminophospholipid asymmetry: a matter of life and death. *Annu Rev Physiol*, 65:701-734.
- Baumann, C., Ullrich, A., Torka, R. 2017. GAS6-expressing and self-sustaining cancer cells in 3D spheroids activate the PDK-RSK-mTOR pathway for survival and drug resistance. *Mol Oncol.* 11(10):1430-1447.
- Belzile, O., Huang, X., Gong, J., Carlson, J., Schroit AJ, Brekken, RA., Freinmark, BD. 2018. "Antibody targeting of phosphatidylserine for the detection and immunotherapy of cancer." *Immuno Targets and Therapy*, (7), 1-14.
- Ben-Batalla, I., Schultze, A., Wroblewski, M., Erdmann, R., Heuser, M., Waizenegger, JS., Riecken, K., Binder, M., Schewe, D., Sawall, S., Witzke, V., Cubas-Cordova, M., Janning, M., Wellbrock, J., Fehse, B., Hagel, C., Krauter, J., Ganser, A., Lorens, JB., Fiedler, W., Carmeliet, P., Pantel, K., Bokemeyer, C., Loges, S. 2013. AXL, a prognostic and therapeutic target in acute myeloid leukemia mediates paracrine crosstalk of leukemia cells with bone marrow stroma. *Blood* 122, 2443-2452 .
- Biermann, M., Maueroeder, C., Brauner, JM., Chaurio, R., Janko, C., Herrmann, M., Munoz, LE. 2013. Surface-code biophysical signals for apoptotic cell clearance. *Phys Biol.* 10(6):065007.
- Binet, JL., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguet, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, MT., Monconduit, M., Belabbes, S., Gremy,

- F. 1981. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 48(1): 198-206
- Blanco, VM., Chu, Z., Vallabhapurapu, SD., Sulaiman, MK., Kendler, A., Rixe, O., Warnick, RE. Franco, RS., Qi, X. 2014. Phosphatidylserine-selective targeting and anticancer effects of SapC-DOPS nanovesicles on brain tumors. *Oncotarget*; 5(16):7105–18.
- Bonar, EE., Goldstick, JE., Collins, RL., Cranford, JA., Cunningham, RM., Brandao, LN., Wings, A., Christoph, S., Sather, S., Migdall-Wilson, J., Schlegel, J., McGranahan, A., Gao, D., Liang, X., DeRyckere, D., Graham, DK. 2013. Inhibition of MERTK increases chemosensitivity and decreases oncogenic potential in T- cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J.* 3, e101.
- Bretscher MS. 1972. Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nat New Biol.* 236(61): 11-2.
- Burstyn-Cohen, T. and Maimon, A. 2019. TAM receptors, Phosphatidylserine, inflammation, and Cancer. *Cell Commun Signal.* 17: 156.
- Callahan, MK, Williamson, P., Schlegel RA. 2000. Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Cell Death Differ.* 7(7): 645-653.
- Camenisch, TD., Koller, BH., Earp, HS., Matsushima, GK. 1999. A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF-alpha production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Immunol.* 162:3498–3503.
- Caraux, A., Lu, Q., Fernandez, N., Riou, S., Di Santo, JP., Raulet, DH., Lemke, G., Roth, C. 2006. Natural killer cell differentiation driven by Tyro3 receptor tyrosine kinases. *Nat. Immunol.* 7: 747–754.
- Chalasani, P., Marron, M., Roe, D., Clarke, K., Iannone, M., Livingston, RB., Shan, JS., Stopeck, AT. 2015. A phase I clinical trial of baviximab and paclitaxel in patients with
- Chan, PY., Carrera Silva, EA., De Kouchkovsky, D., Joannas, LD., Hao, L., Hu, D., Huntsman, S., Eng, C., Licon-Limon, P., Weinstein, JS., Herbert, DR., Craft, JE., Flavell, RA., Repetto, S., Correale, J., Burchard, EG., Torgerson, Dg., Gosh, S., Rothlin, CV. 2016. The TAM family receptor tyrosine kinase TYRO3 is a negative regulator of type 2 immunity. *Science*, 352: 99–103.
- Chang, Wenguang., Fa, H., Xiao, D., Wang, J. 2020. Targeting phosphatidylserine for Cancer therapy: prospects and challenges. *Theranostics.* 10(20): 9214-9229.
- Chermack, ST., Blow, FC., Walton, MA. 2017. Daily associations between cannabis motives and consumption in emerging adults. *Drug Alcohol Depend.* 178:136-42.
- Chien, CW., Hou, PC., Wu, HC., Chang, YL., Lin, SC., Lin, SC., Lin, BW., Lee, JC., Chang, YJ., Sun, HS., Tsai, SC. 2016. Targeting TYRO3 inhibits epithelial-mesenchymal transition and increases drug sensitivity in colon cancer. *Oncogene.* 35(45):5872–5881.

- Clodi, K., Kliche, KO., Zhao, S., Weidner, D., Schenk, T., Consoli, U., Jiang, S., Snell, V., Andreeff, M. 2000. Cell-surface exposure of phosphatidylserine correlates with the stage of fludarabine-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and expression of apoptosis-regulating genes. *Cytometry* 40:19–25.
- Colombo, M., Raposo, G., Thery, C. 2014. Biogenesis, secretion and intercellular vesicles. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 30:255-89.
- Cosemans, JM., Van Kruchten, R., Olieslagers, S., Schurgers, LJ., Verheyen, FK., Munnix, IC., Waltenberger, J., Angelillo-Scherrer, A., Hoylaerts, M.F., Carmeliet, P., Heemskerk, JWM. 2010. Potentiating role of Gas6 and Tyro3, Axl and Mer (TAM) receptors in human and murine platelet activation and thrombus stabilization. *J. Thromb. Haemost.*, 8: 1797–1808.
- Crosier, PS., Hall, LR. Vitas, MR., Lewis, PM., Crosier, KE. 1995. Identification of a novel receptor tyrosine kinase expressed in acute myeloid leukemic blasts. *Leuk. Lymphoma*, 18: 443–449.
- Crosier, PS., Lewis, PM., Hall, LR., Vitas, MR., Morris, CM., Beier, DR., Wood, CR., Crosier, KE. 1994. Isolation of a receptor tyrosine kinase (DTK) from embryonic stem cells: structure, genetic mapping and analysis of expression. *Growth Factors*. 11:125–136.
- Crosier, PS., Lewis, PM., Hall, LR., Vitas, MR., Morris, CM., Beier, DR., Wood, CR., Crosier, KE. 2009. Isolation of a Receptor Tyrosine Kinase (DTK) from Embryonic Stem Cells: Structure, Genetic Mapping and Analysis of Expression. *Growth Factors*, 11: 125–136.
- Cummings, CT., Linger, RM., Cohen, RA., Sather, S., Kirkpatrick, GD., Davies, KD., DeRyckere, D., Earp, HS., Graham, DK. 2014. Mer590, a novel monoclonal antibody targeting MER receptor tyrosine kinase, decreases colony formation and increases chemosensitivity in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 5(21):10434–10445.
- Davis, HW., Hussain, N., Qi, X. 2016. Detection of cancer cells using SapC-DOPS nanovesicles. *Mol Cancer*. 15(1):33.
- Davra, V., Kumar, S., Geng, K., Calianese, D., Mehta, D., Gadiyar, V., Kasikara, C., Lahey, KC., Chang, YJ., Wichroski, M., Gao, C., De Lorenzo, MS., Kotenko, SV., Bergsbaken, T., Mishra PK, Gause, WC., Quigley, M., Spires, TE., Birge RB. 2021. Axl and Mertk Receptors Cooperate to Promote Breast Cancer Progression by Combined Oncogenic Signaling and Evasion of Host Antitumor Immunity. *Cancer Res*, 1;81(3):698-712.
- Davra, V., Kimani, SG., Calianese, D., Birge, RB. 2016. Ligand Activation of TAM Family Receptors-Implications for Tumor Biology and Therapeutic Response. *Cancers* 8(12):107
- Dayoub, AS. and Brekken, RA. 2020. TIMs, TAMs, and PS- antibody targeting: implications for cancer immunotherapy. *Cell Commun Signal*. 18: 29.
- De Veirman, K., Wang, J., Xu, S., Leleu, X., Himpe, E., Maes, K., De Bruyne, E., Van Valckenborgh, E., Vanderkerken, K., Menu, E., Van Riet, I. 2016. Induction of

- miR-146a by multiple myeloma cells in mesenchymal stromal cells stimulates their pro-tumoral activity. *Cancer Lett.* 10;377(1):17-24.
- DeRose, P., Thorpe, PE., Gerber, DE. 2011. Development of bavituximab, a vascular targeting agent with immune-modulating properties, for lung cancer treatment. *Immunotherapy*; 3(8):933–44.
- Digumarti, R., Bapsy, PP., Shan, JS. 2008. A phase Ib safety and pharmacokinetic study of bavituximab plus chemotherapy in patients with refractory advanced solid tumor malignancies. *J Clin Oncol*, 26(Suppl 15):S3038.
- Digumarti, R., Bapsy, PP., Suresh, AV., Bhattacharyya, GS., Dasappa, L., Shan, JS., Gerber, DE. 2014. Bavituximab plus paclitaxel and carboplatin for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 86(2): 231-6.
- Dirks, W., Rome, D., Ringel, F., Jager, K., Macleod, RA., Drexler, HG. 1999. Expression of the growth arrest-specific gene 6 (GAS6) in leukemia and lymphoma cell lines. *Leuk. Res.* 23, 643–651.
- Dormady SP, Zhang XM, Basch RS. 2000. Hematopoietic progenitor cells grow on 3T3 fibroblast monolayers that overexpress growth arrest-specific gene-6 (GAS6). *Proc Natl Acad Sci*; 97: 12260–12265.
- Dowall, SD., Graham, VA., Corbin-Lickfett, K., Empig, C., Schlunegger, K., Bruce, CB., Easterbrook, L., Hewson, R. 2015. Effective binding of a phosphatidylserine-targeting antibody to Ebola virus infected cells and purified virions. *J Immunol Res.* 2015:347903. doi: 10.1155/2015/347903. Epub 2015 Mar 1.
- Elkabets, M., Pazarentzos, E., Juric, D., Sheng, Q., Pelosof, RA., Brook, S., Benzaken, AO., Rodon, J., Morse, N., Yan, JJ., Liu, M., Das, R., Chen, Y., Tam, A., Wang, H., Liang, J., Gurski, JM., Kerr, DA., Rosell R., Teixidó, C., Huang, A., Ghossein, RA., Rosen, N., Bivona, TG., Scaltriti, M., Baselga, J. 2015. A XL mediates resistance to PI3Ka inhibition by activating the EGFR/PKC/mTOR axis in head and neck and esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Cell.* 2015;27:533–46.
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL., Henson, PM. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of the apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* 148(7):2207-2216.
- Galluzzi, L., Maiuri, MC., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., Kroemer, G. 2007. Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 14(7): 1237-43.
- Geng, K., Kumar, S., Kimani, SG., Kholodovych, V., Kasikara, C., Mizuno, K., Sandiford, O., Rameshwar, P., Kotenko, SV., Birge, RB. 2017. Requirement of gamma-carboxyglutamic acid Modification and phosphatidylserine binding for the activation of Tyro3, Axl and Mertk receptors by growth-arrest specific 6. *Front Immunol.* 8:1521
- Gerber, DE., Horn, L., Boyer, M., Sanborn, R., Natale, R., Palmero, R., Bidoli, P., Bondarenko, I., Germonpre, P., Ghizdavescu, D., Kotsakis, A., Lena, H.,

- Losonczy, G., Park, K., Su, WC., Tang, M., Lai, J., Kallinteris, NL., Shan JS., Reck, M., Spigel DR. 2018. Randomized phase III study of docetaxel plus bavituximab in previously treated advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*, 29(7): 1548-53.
- Gerber, DE., Spigel, DR., Giordadze, D., Shtivelband, M., Ponomarova, OV., Shan, JS., Menander, KB., Belani, CP. 2016. Docetaxel combined with bavituximab in previously treated, advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*, 17(3): 169-76.
- Gerber, DE., Stopeck, AT., Wong, L., Rosen, LS., Thorpe, PE., Shan, JS., Ibrahim, NK. 2011. Phase I safety and pharmacokinetic study of bavituximab, a chimeric phosphatidylserine-targeting monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*, 17(21): 6888-96.
- Gosh, AK., Secreto, C., Boysen, J., Sassoon T., Shanafelt, TD., Mukhopadhyay, D., Kay, NE. 2011. The novel receptor tyrosine kinase AXL is constitutively active in B cell chronic lymphocytic leukemia and acts as a docking site of nonreceptor kinases: implications for therapy. *Blood* 117, 1928–1937.
- Gosh, AK., Secreto, CR., Knox, TR., Ding, W., Mukhopadhyay, D., Kay, NE. 2010. Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. *Blood.*, 115(9):1755–1764.
- Gould, WR., Baxi, SM., Schroeder, R., Peng, YW., Leadley, RJ., Peterson, JT., Perrin, LA. 2005. Gas6 receptors Axl, Sky and Mer enhance platelet activation and regulate thrombotic responses. *J. Thromb. Haemost*, 3:733–741.
- Graham, DK., Dawson, TL., Mullaney, DL., Snodgrass, HR., Earp, HS. 1994. Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth Differ*. 5, 647–657.
- Graham, DK., DeRcykere, D., Davies, KD., Earp, HS. 2014. “The TAM Family:phosphatidylserine-sensing reseptor tyrosine kinases göne awry in cancer.” *Nat. Rev.Cancer* 14 (12); 769-785.
- Grilley-Olson, JE., Weiss, J., Ivanova, A., Villaruz, LC., Moore, DT., Stinchcombe, TE., Lee, C., Shan, JS., Socinski, MA. 2018. Phase Ib study of bavituximab with carboplatin and pemetrexed in chemotherapy-naïve advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*, 19(4): e481-7.
- Guo, H., Barrett, TM., Zhong, Z., Fernandez, JA., Griffin, JH., Freeman, RS., Zlokovic, BV. 2011. Protein S blocks the extrinsic apoptotic cascade in tissue plasminogen activator/N-methyl D-aspartate-treated neurons via Tyro3-Akt-FKHRL1 signaling pathway. *Mol. Neurodegener*, 6: 13.
- Hakobyan, G., Davtyan, H., Harutyunyan, K., Alexanyan, K., Amirkhanyan, Y., Gharibyan, AL., Asatryan, T., Tadevosyan, Y. 2018. Similarities in Blood Mononuclear Cell Membrane Phospholipid Profiles during Malignancy. *Med Sci (Basel)*, 23; 6(4):105.
- Hallek, M., Cheson, BD., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., Hillmen, P., Keating, MJ., Montserrat, E., Rai, KR., Kipps, TJ. 2008.

- International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 15;111(12):5446-56.
- Her2 negative metastatic breast cancer. *Cancer Med*, 4(7): 1051-9.
- Higuchi, Y., Kubota, T., Koyanagi, M., Maeda, T., Feldman, A.M., Makino, N. 2012. Upregulation of anticoagulant proteins, protein S and tissue factor pathway inhibitor, in the mouse myocardium with cardio-specific TNF- overexpression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*, 302: H2352–H2362.
- Hochreiter-Hufford, A., Ravichandran, KS. 2013. Clearing the dead: Apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a008748.
- Hoog, J.L., and Lotval, J. 2015. “Diversity of extracellular vesicles in human ejaculates revealed by cryo-electron microscopy.” *J Extracell Vesicles*, 4, 28680.
- Huey, MG., Minson, KA., Earp, HS., DeRyckere, D., Graham, DK. 2016. Targeting the TAM receptors in leukemia. *Cancers*, 8:101
- Hutterer, M., Knyazev, P., Abate, A., Reschke, M., Maier, H., Stefanova, N., Knyazeva, T., Barbieri, V., Reindl, M., Muigg, A., Kostron, H., Stockhammer, G., Ullrich, A. 2008. Axl and growth arrest–specific gene 6 are frequently overexpressed in human Gliomas and predict poor prognosis in patients with Glioblastoma Multiforme. *Clin Cancer Res*. 14:130–138.
- Hwang, I. 2013. Cell-cell communication via extracellular membrane vesicles and its role in the immune response. *Mol Cells* 36(2):105-11.
- Janssen, JW., Schulz, AS., Steenvoorden, AC., Schmidberger, M., Strehl, S., Ambros, PF., Bartram, CR. 1991. A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene*. 6:2113–2120.
- Kabir, TD., Ganda, C., Brown, RM., Beveridge, DJ., Richardson, KL., Chaturvedi, V., Candy, P., Epis, M., Wintle, L., Kalinowski, F., Kopp, C., Stuart, LM., Yeoh, GC., George, J., Leedman, PJ. 2018. A microRNA-7/growth arrest specific 6/TYRO3 axis regulates the growth and invasiveness of sorafenib-resistant cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 67(1):216–231.
- Kahraman, T., Güçlüer, G., Gürsel, İ. 2014. “Eksozomlar: Tanı ve Tedavide Kullanılabilen Doğal Nanokesecek Adayları” *Turk J Immunol* 2(2):34-40
- Kalluri, R. 2016. The biology and function of exosomes in cancer. *J.Clin.Invest*. 126(4): 1443-1452
- Kalluri, R., and Lebleu, VS. 2020. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* 367:6478.
- Kasikara, C., Kumar, S., Kimani, S. et al. 2017. “Phosphatidylserine sensing by TAM receptors regulates AKT-dependent chemoresistance and PD-L1 expression.” *Mol. Cancer Res*, 15(6), 753-764.

- Katagiri, M., Hakeda, Y., Chikazu, D., Ogasawara, T., Takato, T., Kumegawa, M., Nakamura, K., Kawaguchi, H. 2001. Mechanism of stimulation of osteoclastic bone resorption through Gas6/Tyro 3, a receptor tyrosine kinase signaling, in mouse osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 276:7376–7382.
- Kay, JG. and Grinstein, S. 2011. Sensing phosphatidylserine in cellular membranes. *Sensors*;11(2):1744–55.
- Kelleher, RJ., Jr. Balu-Iyer, S., Loyall, J., Sacca, AJ., Shenoy, GN., Peng, P., Iyer, V., Fathallah, AM., Berenson, CS., Wallace, PK., Tario, J., Odunsi, K., Bankert RB. 2015. Extracellular vesicles present in human ovarian tumor microenvironments induce a phosphatidylserine-dependent arrest in the T-cell signaling cascade. *Cancer Immunol Res.* 3(11): 1269-78.
- Keller, S., Sanderson, MP., Stoek, A., Altevogt, P. 2006. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol. Lett.* 107(2): 102-108
- Koliha, N., Heider, U., Ozimkowski, T., Wieman, M., Bosio, A., Wild, S. 2016. Melanoma affects the composition of blood cell-derived extracellular vesicles. *Frontiers in Immunology*, 7:282
- Kooijmans, SAA., Aleza, CG., Roffler, SR., Van Solinge, WW., Vader, P., Schiffelers, RM. 2016. Display of GPI-anchored anti-EGFR nanobodies on extracellular vesicles promotes tumour cell targeting. *J Extracell Vesicles* 14;5:31053.
- Kulkarni, R., Wiemer, EAC., Chang, W. 2022. Role of Lipid Rafts in Pathogen-Host Interaction - A Mini Review. *Front. Immunol.*, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.815020>
- Lai C, Gore M, Lemke G. 1994. Structure, expression, and activity of Tyro 3, a neural adhesion-related receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 9: 2567–2578.
- Lässer, C., Alikhani, VS., Ekström, K., Eldh, M., Paredes, PT., Bossios, A., Sjöstrand, M., Gabrielsson, S., Lötvall, J., Valadi, H. 2011. “Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages.” *J Transl Med*, 9, 9.
- Lea, J., Sharma, R., Yang, F., Zhu, H., Ward, ES., Schroit, AJ. 2017. “Detection of phosphatidylserine-positive exosomes as a diagnostic marker for ovarian malignancies: a proof of concept study.” *Oncotarget*, 8 (9), 14395-14407.
- Lee-Sherick, AB., Eisenman KM., Sather, S., McGranahan, A., Armistead, PM., McGary, CS., Hunsucker, SA., Schlegel, J., Martinson, H., Cannon, C., Keating, AK., Earp, HS., Liang, X., DeRyckere, D., Graham, DK. 2013. Aberrant MER receptor tyrosine kinase expression contributes to leukemogenesis in acute myeloid leukemia. *Oncogene* 32, 5359–5368.
- Lee-Sherick, AB., Menachof, K., Eisenman, KM., McGranahan, A., McGary, C., Hunsucker, SA., Schlegel, J., Armistead, PM., Liang, X., Kireev, D., Janzen, V., Liu, J., Stashko, M., Norris-Drouin, J., Earp, HS., Wang, X., Fyre, S., DeRyckere, D., Graham, DK. 2012. Mer receptor tyrosine kinase is a potential therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood*, 120: 1317.

- Leite, NB., Aufderhorst-Roberts, A., Palma, MS., Connell, SD., Neto, JR., Beales, PA. 2015. PE and PS lipids synergistically enhance membrane poration by a peptide with anticancer properties. *Biophys J.*;109(5):936–47.
- Lemke, G. 2013. Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5(11): a009076
- Lemke, G., Burstyn-Cohen, T. 2010. “TAM receptors and clearance of apoptotic cells”. *Ann.N.Y Acad Sci* 1209: 23-29.
- Leventis, PA., Grinstein, S. 2010. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys.* 39:407-427.
- Lew, ED., Oh, J., Burrola, PG., Lax, I., Zagorska, A., Traves, PG., Schlessinger, J., Lemke, G. 2014. Differential TAM receptor-ligand-phospholipid interactions delimit differential TAM bioactivities. *eLife* 29;3:e03385
- Licudine, EG., Deo, D., Yu, S., Zaman, AU., Dunbar, WB. 2010. Portable nanoparticle quantization using a resizable nanopore instrument - the IZON qNano™. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* ; 2010: 5736-9. doi: 10.1109/IEMBS.2010.5627861.
- Lin, MS., Mary K, Schubauer-Berigan., Weisenburger, DD., Richardson, DB., Lendgren, O., Aaron Blair, A., Silver, S., Field, WR., Caldwell, G., Hatch, M., Dore, MG. 2007. Chronic lymphocytic leukemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. *Br J Haematol.* 139:672-86
- Linger, RM., Keating, AK., Earp, HS., Graham, DK. 2008. TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res.* 100:35–83.
- Linger, RMA., Lee-Sherick, AB., DeRyckere, D., Cohen, RA., Jacobsen, KM., McGranahan, A., Brandao, LN., Wines, A., Sawczyn, KK., Liang, X., Keating, AK., Tan, AC., Earp, HS., Graham, DK. 2013. MER receptor tyrosine kinase is a therapeutic target in pre- B- cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 122, 1599–1609.
- Lu, Q., and Lemke, G. 2001. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science*, 293: 306–311
- Lu, Q., Gore, M., Zhang, Q., Camenisch, T., Boast, S., Casagrande, F., Lai, C., Skinner, MK., Klein, R., Matsushima, GK., Earp, HS., Goff, SP., Lemke, G. 1999. Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature*.398(6729):723–728.
- Luca, LD., D’Arena, A., Simeon, V., Trino, S., Laurenzana, AC., La Rocca, F., Villani, O., Mansueto, G., Deaglio, S., Innocenti, I., Laurenti, L., Molica, S., Pietrantonio, G., De Stradis, A., Del Vecchio, L., Musto, P. 2017. Characterization and prognostic relevance of circulating microvesicles in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia&Lymphoma.* 58(6): 1424-1432
- Lumbroso, D., Soboh, S., Maimon, A., Schiff-Zuck, S., Ariel, A., Burstyn-Cohen, T. 2018. Macrophage-derived protein S facilitates apoptotic Polymorphonuclear

- cell clearance by resolution phase macrophages and supports their reprogramming. *Front Immunol.* 9:358.
- Mandal, D., Mazumder, A., Das, P., Kundu, M., Basu, J. 2005. Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem.* 280(47): 39460- 39467.
- Mark, MR., Scadden, DT., Wang, Z., Gu, Q., Goddard, A. 1994. Godowski PJ: rse, a novel receptor-type tyrosine kinase with homology to Axl/Ufo, is expressed at high levels in the brain. *J Biol Chem.* 269:10720–10728.
- Mates, JM., Sanchez-Jimenez, FM. 2000. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 32(2): 157-170.
- Matsubara, N., Takahashi, Y., Nishina, Y., Mukouyama, Y., Yanagisawa, M., Watanabe, T., Nakano, T., Nomura, K., Arita, H., Nishimune, Y., Obinata, M., Matsui, Y. 1996. A receptor tyrosine kinase, Sky, and its ligand Gas 6 are expressed in gonads and support primordial germ cell growth or survival in culture. *Dev. Biol.* 180: 499–510.
- Melo, SA., Luecke, LB., Kahlert, C., Fernandez, AF., Gammon, ST., Kaye, J., LeBleu, VS., Mittendorf, EA., Weitz, J., Rahbari, N., Reissfelder, C., Pilarsky, C., Fraga, MF., Piwnica-Worms, D., Kalluri, R. 2015. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer *Nature* 523(7559):177-182
- Meyer, J., Arriaga, Y., Anandam, J., Karri, S., Syed, S., Verma, U., Abdelnaby, A., Raja, G., Dong, Y., Beg, MS., Balch, G. 2018. A phase I clinical trial of the phosphatidylserine-targeting antibody bavituximab in combination with radiation therapy and capecitabine in the preoperative treatment of rectal adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol*, 41(10): 972-6.
- Missiroli, S., Patergnani, S., Caroccia, N., Pedriali, G., Perrone, M., Previati, M., Wieckowski, MR., Giorgi, C. 2018. Mitochondria-associated membranes (MAMs) and inflammation. *Cell Death Dis.* 9(3): 329.
- Miyamoto, Y., Torii, T., Takada, S., Ohno, N., Saitoh, Y., Nakamura, K., Ito, A., Ogata, T., Terada, N., Tanoue, A. Yamauchi, J. 2015. Involvement of the Tyro3 receptor and its intracellular partner Fyn signaling in Schwann cell myelination. *Mol. Biol. Cell*, 26: 3489–3503.
- Mosesson, Y., Shtiegman, K., Katz, M., Zwang, Y., Vereb, G., Szollosi, J., Yarden, Y. 2003. Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. *J Biol Chem.* 278(24):21323–21326.
- Munagala, R., Aqil, F., Gupta, RC. 2016. Exosomal miRNAs as biomarkers of recurrent lung cancer. *Tumour Biol.* 37(8):10703-14.
- N'Guessan, K., Patel, PH., Qi, X. 2020. SapC-DOPS - a Phosphatidylserine-targeted Nanovesicle for selective Cancer therapy. *Cell commun signal.* 18(1):6.
- Nakamura, YS., Hakeda, Y., Takakura, N., Kameda, T., Hamaguchi, I., Miyamoto, T., Kakudo, S., Nakano, T., Kumegawa, M., Suda, T. 1998. Tyro 3 receptor

- tyrosine kinase and its ligand, Gas6, stimulate the function of osteoclasts. *Stem Cells*, 16: 229–238.
- Navajas R, Corrales FJ, Paradela A. 2019. Serum exosome isolation by size-exclusion chromatography for the discovery and validation of preeclampsia-associated biomarkers. *Proteomics for Biomarker Discovery*. page 39-50
- Neubauer, A., Fiebeler, A., Graham, DK., O'Bryan JP., Schmidt, CA., Barckow, P., Serke, S., Siegert, W., Snodgrass, HR., Huhn, D., Liu, ET. 1994. Expression of AXL, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood* 84, 1931–1941.
- O'Bryan, JP., Frye, RA., Cogswell, PC., Neubauer, A., Kitch, B., Prokop, C., Espinosa, R., 3rd, Le Beau, MM., Earp, HS., Liu, ET. 1991. Axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*. 11(10):5016–5031.
- Ohashi, K., Mizuno, K., Kuma, K., Miyata, T., Nakamura, T. 1994. Cloning of the cDNA for a novel receptor tyrosine kinase, sky, predominantly expressed in brain. *Oncogene*. 9:699–705.
- Oksvold, MP., Kullmann, A., Forfang, L., Kierulf, B., Li, M., Brech, A., Vlassov, AV., Smeland, EB., Neuraater, A., Pedersen, KW. 2014. “Expression of B-cell surface antigens in subpopulations of exosomes released from B-cell lymphoma cells.” *Clinical Therapeutics*, 36(6), 847-862.
- Paggetti, J., Hader, F., Seiffert, M., Janji, B., Distler, U., Ammerlaan, W., Kim, YJ., Adam, J., Lichter, P., Solary, E., Berchem, G., Moussay, E. 2015. “Exosome released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer.” *Blood*, 127, 126(9), 1106- 117
- Pan, BT., Teng, K., Wu, C., Adam, M., Johnstone, RM. 1985. Electron microscobic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes, *J.Cell Biol*.101(3): 942-948
- Pandya, SS., Wong, L., Bullock, AJ., Grabelsky, SA., Shum, MK., Shan, J., Menander, KB., Reid, TR. 2013. Randomized, open-label, phase II trial of gemcitabine with or without bavituximab in patients with nonresectable stage IV pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol*, 31(Suppl 15): S4054.
- Park, IK., Mishra, A., Chandler, J., Withman, SP., Marcucci, G., Caligiuri, MA. 2013. Inhibition of the receptor tyrosine kinase AXL impedes activation of the FLT3 internal tandem duplication in human acute myeloid leukemia: implications for AXL as a potential therapeutic target. *Blood* 121, 2064–2073.
- Park, M., and Kang, KW. 2019. Phosphatidylserine receptor-targeting therapies for the treatment of cancer. *Arch. Pharm. Res*. 42:617–628.
- Pierce, A., Bliesner, B., Xu, M., Nielsen-Preiss, S., Lemke, G., Tobet, S., Wierman, ME. 2008. Axl and Tyro3 modulate female reproduction by influencing gonadotropin-releasing hormone neuron survival and migration. *Mol. Endocrinol*, 22: 2481–2495.
- Poliakov, A., Spilman, M., Dokland, T., Amling, CL., Mobley JA. 2009.

- “Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen.” *Prostate*, 69(2), 159-167
- Prasad, D., Rothlin, CV., Burrola, P., Burstyn-Cohen T, Lu Q, Garcia de Frutos P, Lemke G. 2006. TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol Cell Neurosci*
- Prieto, D., Sotelo, N., Seija, N., Sembo, S., Abreu, C., Duran, R., Gil, M., Sicco, E., Irigoien, V., Oliver, C., Landoni, AI., Gabus, R., Dighiero, G., Oppezio, P. 2017. S100-A9 protein in exosomes from chronic lymphocytic leukemia cells promotes NF- $\kappa$ B activity during disease progression.
- Qi, H., Liu, C., Long, L., Ren, Yu., Zhang, S., Chang, X., Qian, X., Jia, H., Zhao, J., Sun, J., Hou, X., Yuan, X., Kang, C. Blood Exosomes Endowed with Magnetic and Targeting Properties for Cancer Therapy. *ACS Nano* 22;10(3):3323-33.
- Rai, KR., Sawitsky, A., Cronkite, EP., Chanana, AD., Levy, RN., Pasternack, BS. 1975. Clinical stage of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46(2): 219-34.
- Raimondo, F., Morosi, L., Chinello, C., Magni, F., Pitto, M. 2011. Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. *Proteomics* 11(4):709-20.
- Rajotte, I., Hasanbasic, I., Blostein, M. 2008. Gas6-mediated signaling is dependent on the engagement of its gamma-carboxyglutamic acid domain with phosphatidylserine. *Biochem Biophys Res Commun*. 376:70–73.
- Raposo, G., Nijman, HW., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, CV., Melief, CJ., Geuze, HJ. 1996. B lymphocytes secrete antigen –presenting vesicles. *J.Exp.Med*. 183(3):1161-72
- Rawstron, AC., Hillmen, P. 2010. Clinical and diagnostic implications of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Best Prac Res Clin Haematol*. 23:61-69
- Rea, K., Pinciroli, P., Sensi, M., Alciato, F., Bisaro, B., Lozaneanu, L., Raspagliesi, F., Centritto, F., Cabodi, S., Defilippi, P., Avanzi, GC., Canevari, S., Tomassetti, A. 2015. Novel Axl-driven signaling pathway and molecular signature characterize high-grade ovarian cancer patients with poor clinical outcome. *Oncotarget*. 2015;13:30859–30875.
- Rochlitz, C., Lohri, A., Bacchi, M., Schmidt, M., Nagel, S., Fopp, M., Fey, MF., Hermann, R., Neubauer, A. 1999. AXL expression is associated with adverse prognosis and with expression of BCL-2 and CD34 in de novo acute myeloid leukemia (AML): results from a multicenter trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Leukemia* 13, 1352–1358 .
- Rothlin, CV., Carrera-Silva, EA., Bosurgi, L., Ghosh, S. 2015. TAM receptor signaling in immune homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.*, 33, 355–391.
- Rozman, C. and Montserrat E. 1995. Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New Eng J of Med*, 333, 1052-1057.
- Santoni, M., Piva, F., Scarpelli, M., Cheng, L., Lopez-Beltran, A., Massari, F., Lacovelli, R., Berardi, R., Santini, Danielle., Montironi, R. 2015. The origin of prostate metatases: emerging insights. *Cancer Metastasis Rew*. 34(4): 765-763

- Sather, S., Kenyon, KD., Lefkowitz, JB., Liang, X., Varnum, BC., Henson, PM., Graham, DK. 2007. A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation. *Blood*. 109(3):1026–1033.
- Schorey, JS. and Bhatnagar, S. 2008. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic* 9(6):871-81.
- Schubauer- Berigan MK, Daniels RD, Fleming DA, Markey AM, Couch JR, Ahrenholz SH, Burphy JS, Anderson JL, Tseng CY. 2007. Chronic lymphocytic leukemia and radiation: findings among workers at five US nuclear facilities and a review of the recent literature. *Br J Haematol*. 139:799-808
- Seitz, H.M., Camenisch, TD., Lemke, G., Earp, HS., Matsushima, GK. 2007. Macrophages and Dendritic Cells Use Different Axl/Mertk/Tyro3 Receptors in Clearance of Apoptotic Cells. *J. Immunol*, 178: 5635–5642.
- Shao, H., Wang, A., Lauffenburger, D., Wells, A. 2018. Tyro3-mediated phosphorylation of ACTN4 at tyrosines is FAK-dependent and decreases susceptibility to cleavage by m-Calpain. *Int J Biochem Cell Biol*. 95:73–84.
- Sharma, B., Kanwar, SS. 2018. Phosphatidylserine: A cancer cell targeting biomarker. *Seminars in Cancer Biology*, 52:17–25.
- Sharma, S., and Rai, KR. 2019. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) treatment: So many choices, such great options. *Cancer*. 1;125(9):1432-1440.
- Shaver, TM., Lehmann, BD., Beeler, JS., Li, CI., Li, Z., Jin, H., Stricker, TP., Shyr, Y., Pietenpol, JA. 2016. Diverse, biologically relevant, and targetable gene rearrangements in triple-negative breast cancer and other malignancies. *Cancer Res*. 76, 4850–4860.
- Shlomovitz, I., Speir, M., Gerlic, M. 2019. Flipping the dogma - phosphatidylserine in non-apoptotic cell death. *Cell Commun Signal* 29;17(1):139.
- Silva, J., Garcia, V., Rodriguez, M., Compte, M., Cisneros, E., Veguillas, P., Garcia, JM., Dominguez, G., Campos-Martin, Y., Cuevas, J., Peña, C., Herrera, M., Diaz, R., Mohammed, N. 2012. Bonilla, F. Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*;51(4):409-18.
- Simon, HU., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F. 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*. 5(5): 415-418.
- Simons, M., Raposo, G. 2009. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell biol*. 21(4): 575-581
- Singer SJ. and Nicolson GL. 1972. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* 175(4023):720–31.
- Sinha, S., Boysen, J., Nelson, B., Secreto, C., Warner, SL., Bears, DJ., Lesnick, C., Shanafelt, TD., Kay, NE., Ghosh, AK. 2015. Targeted Axl Inhibition Primes Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells to Apoptosis and Shows Synergistic/Additive Effects in Combination with BTK Inhibitors. *Clin Cancer Res*, 1;21(9):2115-26.

- Skog, J., Würdinger, T., Van Rijn, S., Meijer, DH., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry Jr, WT., Carter, BS., Krichevsky, AM., Breakefield, XO. 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*;10(12):1470-6.
- Skotland, T., Sandvig, T., Llorente, A. 2017. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Progress in Lipid Research*. 66: 30-41
- Smart, SK., Vasileiadi, E., Wang, X., DeRyckere, D., Graham, DK. 2018. The Emerging Role of TYRO3 as a Therapeutic Target in Cancer. *Cancers*, 10: 474
- Soltani, F., Parhiz, H., Mokhtarzadeh, A., Ramezani, M. 2015. Synthetic and Biological Vesicular Nano-Carriers Designed for Gene Delivery. *Curr Pharm Des*. 21(42):6214-35.
- Soung, YH., Nguyen, T., Cao, H., Lee, J., Chung, J. 2016. Emerging roles of exosomes in cancer invasion and metastasis. *BMB Rep*. 49(1):18-25
- Soysal T. 2013. “Kronik lenfositik lösemi- Küçük lenfositik lenfoma” web sitesi: [thd.org.tr/boks/kroniklenfositiklösemi](http://thd.org.tr/boks/kroniklenfositiklösemi) Erişim tarihi:16.03.2021
- Srivastava, A., Babu, A., Filant, J., Moxley, KM., Ruskin, R., Dhanasekaran, D., Sood, AK., McMeekin, S., Ramesh, R. 2016. Exploitation of Exosomes as Nanocarriers for Gene-, Chemo-, and Immune-Therapy of Cancer. *J Biomed Nanotechnol*. 12(6):1159-73.
- Stacchiotti A. 2019. Exploring cellular stress response and chaperones. *Cells*. 8(5): 408.
- Steinbichler, TB., Dudas, J., Riechelmann, H., Skvortsova, II. 2017. The role of exosomes in cancer metastasis. *Seminars in Cancer Biology* 44: 170-181
- Tabagari D, Nemsadze G, Janjalia M, Jincharadze M, Shan J. 2010. Phase II study of bavituximab plus docetaxel in locally advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 28(Suppl 15): S1042
- Tang, MKS. and Wong, AST. 2015. Exosomes: Emerging biomarkers and targets for ovarian cancer. *Cancer Lett* 10;367(1):26-33.
- Tkach, M., Thery, C. 2016. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell*,164(6):1226-1232
- Toshima, J., Ohashi, K., Iwashita, S., Mizuno, K. 1995. Autophosphorylation activity and association with Src family kinase of sky receptor tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 209:656–663.
- Trams, EG., Lauter, CJ., Salem Jr, M., Heine, U. 1981. Exfoliation membran ectoenzymes in the form of microvesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 645(1): 63-70
- Valverde, P. 2005. Effects of Gas6 and hydrogen peroxide in Axl ubiquitination and downregulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 333(1):180–185
- Vance, JE., Steenbergen, R. 2005. Metabolism and function of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res*. 44(4): 207-234
- Vogel, R., Coumans, FAW., Maltesen, RG., Böing, AN., Bonnington, KE., Broekman, ML., Broom, MF., Buzás, EI., Christiansen, G., Hajji, N., Kristensen, SR., Kuehn, MJ., Lund, SM., Maas, SLN., Nieuwland, R., Osteikoetxea, X.,

- Schnoor, R., Scicluna, BJ., Shambrook, M., Vrij, J., Mann, SI., Hill, AF., Pedersen, S. A standardized method to determine the concentration of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing. *Journal of Extracellular Vesicles*. 27;5:31242 doi: 10.3402/jev.v5.31242. eCollection 2016
- Vouri, M., Hafizi, S. 2017. TAM receptor tyrosine kinases in cancer drug resistance. *Cancer Res*, 77(11), 2775-2778
- Waizenegger, JS., Ben Batalla, I., Weinhold, N., Meissner, T., Wroblewski, M., Janning, M., Riecken, K., Binder, M., Atanockovic, D., Taipaleenmaeki, H., Schewe, D., Sawall, S., Gensch, V., Cubas-Cordova, M., Seckinger, A., Fiedler, W., Hesse, E., Kröger, N., Fehse, B., Hose, D., Klein, B., Raab, MS., Pantal, K., Bokemeyer, C., Loges, S. 2014. Role of growth arrest-specific gene 6–MER axis in multiple myeloma. *Leukemia* <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2014.236>.
- Wang, HK., Chen, S., Chen, YM., Wang, HZ., Wu, H., Tang, HM., Xiong, WP., Ma, J., Ge, Y.H., Lu, QX., Han, D. 2007. The role of Tyro 3 subfamily receptors in the regulation of hemostasis and megakaryocytopoiesis. *Haematol.-Hematol. J*, 92, 643–650
- Wang, J., Faict, S., Maes, K., De Bryne, E., Van Valckenborgh, E., Schots, R., Vanderkerken, D., Menu, E. 2016. Extracellular vesicle cross-talk in the bone marrow microenvironment: implications in multiple myeloma. *Oncotarget*. 21; 7(25): 38927-38945
- Web: <https://www.izon.com> > qev. Isolate Extracellular Vesicles with qEV Isolation Columns. Erişim: 15.12.2021
- Weidle, UH., Birzele, F., Kollmorgen, G., Rüger, R. 2017. The multiple roles of exosomes in metastasis. *Cancer Genomics& Proteomics*. 14: 1-16
- Wu G, Ma Z, Cheng Y, Hu W, Deng C, Jiang S, Li, T., Chen, F., Yang, Y. 2018. Targeting Gas6/TAM in cancer cells and tumor microenvironment. *Mol Cancer*. 17(1):20.
- Wu, G., Ma, Z., Hu, W., Wang, D., Gong, B., Fan, C., Jiang, S., Li, T., Gao, J., Yang, Y. 2017. Molecular insights of Gas6/TAM in cancer development and therapy. *Cell Death and Disease*, 8: e2700
- Wu, X., Liu, X., Koul, S., Lee, CY., Zhang, Z., Halmos, B. 2014. AXL kinase as a novel target for cancer therapy. *Oncotarget*. 2014;5(20):9546–9563.
- Yanez-Mo, M., Siljander, MPR., Andreu, Z., Zavec, AB., Borrás, FE., Buzas, EI., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colas, E., Silva, AC., Fais, S., Perez, JMF., Ghobrial, IM., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., Gursel, M., Heegard, NHH., Hendrix, A., Kierulf, P., Kokubun, K., Kosanovic, M., Iglic, VK., Kramer-Albers, EM., Laitinen, S., Lasser, C., Lener, T., Ligeti, E., Line, A., Lipps, G., Llorente, A., Lötvall, J., Keber, MM., Marcilla, A., Mittelbrunn, M., Nazarenko, I., Hoen, ENMN., Nyman, TA., O’Driscoll, L., Olivan, M., Oliveire, C., Pallinger, E., Portillo, HA., Reventos, J., Rigau, M., Rohde, E., Sammar, M., Madrid, FS., Santarem, N., Schalmoser, K., Ostendorf,

- MS., Stoorvegel, W., Stukelj, R., Van der Grain, SG., Vasconcelos, MH., Wauben, MHM., De, Wever, O. 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles* 4:27066
- Ye, X., Li, Y., Stawicki, S., Couto, S., Eastham-Anderson, J., Kallop, D., Weimer, R., Wu, Y., Pei, L. 2010. An anti-Axl monoclonal antibody attenuates xenograft tumor growth and enhances the effect of multiple anticancer therapies. *Oncogene*. 29(38):5254–5264
- Yin, Y., Huang, X., Lynn, KD., Thorpe, PE. 2013. Phosphatidylserine-targeting antibody induces M1 macrophage polarization and promotes myeloid-derived suppressor cell differentiation. *Cancer Immunol Res.*;1(4):256–68
- Yopp, AC., Singal, AG., Arriaga, YE., Verma, UN., Shan, J., Kallinteris, NL., Beg, MS., Mansour, JC., Zhu, H. 2015. A phase II study of bavituximab and sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *J Clin Oncol*, 33(Suppl 3):S345.
- Yu, S., Cao, H., Shen, B., Feng, J. 2015. Tumor-derived exosomes in cancer progression and treatment failure. *Oncotarget* 6(35):37151-68.
- Yuana, Y., Koning, RI., Kuil, ME., Rensen, PC., Koster AJ., Bertina, RM., Osanto, S. 2013. “Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles in fresh plasma.” *J Extracell Vesicles*, 2, 21494.
- Zabeo, D., Cvjetkovic, A., Lässer, C., Schorb, M., Lötvall, J. and Höög, LJ. 2017. Exosomes purified from a single cell type have diverse morphology. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6:1, 1329476.
- Zagorska, A., Traves, PG., Lew ED., Dransfield, I., Lemke, G. 2014 “Diversification TAM receptor tyrosine kinase function.” *Nat Immunol*. 15(10):920-928
- Zent SC and Kay, NE. 2010. Autoimmune complications in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Best Prac Res Clin Haematol*. 23:47-59
- Zhang, X., Huo, L., Jin, H., Han, Y., Wang, J., Zhang, Y., Lai, X., Le, Z., Zhang, J. Hua, Z. 2017. Anti-cancer activity of Annexin V in murine melanoma model by suppressing tumor angiogenesis. *Oncotarget* ;8(26):42602–12.
- Zhong, Z., Wang, Y., Guo, H., Sagare, A., Fernandez, JA., Bell, RD., Barrett, TM., Griffin, JH., Freeman, RS., Zlokovic, BV. 2010. Protein S protects neurons from excitotoxic injury by activating the TAM receptor Tyro3-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway through its sex hormone-binding globulin-like region. *J. Neurosci*, 30: 15521–15534.
- Zhu, C., Wei, Y., Wei, X. 2019. AXL receptor tyrosine kinase as a promising anti-cancer approach: functions, molecular mechanisms and clinical applications. *Mol Cancer*. 18: 153.
- Zhu, D., Wang, Y., Singh, I., Bell, RD., Deane, R., Zhong, Z., Sagare, A., Winkler, EA., Zlokovic, BV. 2010. Protein S controls hypoxic/ischemic blood-brain barrier disruption through the TAM receptor Tyro3 and sphingosine 1-phosphate receptor. *Blood*, 115: 4963–4972.

- Zhu, YZ., Wang, W., Xian, N., Wu, B. 2016. Inhibition of TYRO3/Akt signaling participates in hypoxic injury in hippocampal neurons. *Neural Regen. Res*, 11: 752–757.
- Zonneveld, MI., Brisson, AR., Van Herwijnen, MJ., Tan, S., Van de Lest, CH., Redegeld, FA., Garssen, J., Wauben, MH., Nolte-'t Hoen, EN. 2014. "Recovery of extracellular vesicles from human breast milk is influenced by sample collection and vesicle isolation procedures." *J Extracell Vesicles*, 3, 24215.
- Zwaal, RF., Comfurius, P., Bevers, EM. 2005. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol. Life Sci.* 62(9): 971-988.

