

SELİN FULYA TOPRAK

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2020





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

(YÜKSEK LİSANS)

**HÜCRE DIŞI GENOM MATERYALLERİNİN
HEMATOPOETİK KÖK HÜCRELER ÜZERİNDEKİ
ETKİSİ**

SELİN FULYA TOPRAK

**DANIŞMAN
DOÇ.DR. SELÇUK SÖZER TOKDEMİR**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

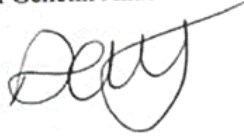
İSTANBUL-2020

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, Tezli Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans öğrencisi Selin Fulya Toprak tarafından Selçuk Sözer Tokdemir'in danışmanlığında hazırlanan “HÜCRE DIŞI GENOM MATERYALLERİNİN HEMATOPOETİK KÖK HÜCRELER ÜZERİNDEKİ ETKİSİ” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 11 /09/2020 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri

Prof. Dr. Ahmet Arman
Marmara Üniversitesi,
Tıp Fakülte,
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

**Jüri-Danışman**

Doç. Dr. Selçuk Sözer Tokdemir
İstanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı

**Jüri**

Dr. Öğr. Üyesi Mehveş Poda
İstanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Selin Fulya TOPRAK



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans hayatım boyunca bana inanan ve bu zorlu süreçte her zaman yol gösteren, çalışmalarımnda her türlü olanağı bana sağlayan ve bilim insanı kişiliğini örnek aldığım değerli tez danışmanım Doç. Dr. Selçuk Sözer Tokdemir'e,

Çalışmalarımızı birlikte yürüttüğümüz ekip arkadaşım Cemal Çağıl Koçana'ya ve çalışmamda yardımlarını eksik etmeyen, destek olan diğer ekip arkadaşlarım Büşra Yaşa Çevik, İldeniz Uslu Bıçak, Hilal Hekimoğlu ve Berkay Tokcan'a,

Yüksek lisansta tanıştığım ve her süreçte yanımda olan Buşra Kasap ve Gülnihal Bulut'a,

Tüm hayatım boyunca beni destekleyen bugünlere gelmemi sağlayan aldığım her kararın arkasında olan, her zaman maddi manevi olarak yanımda olan sevgili babam Şaban Toprak, annem Zuhal Toprak'a,

Her durumda beni motive edip devam etmemi sağlayan, zorluklar karşısında nasıl davranmam gerektiğini öğreten, tezimin yazım sürecinde yardımlarını esirgemeyen ve her daim bana doğru bildiği yolu gösteren sevgili abim Dr. Fatih Toprak'a,

İlkokuldan bu yana her zaman her koşulda yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen Gizem Yazıcı'ya,

Çalışmada kordon kanlarını bağışlayan gönüllü bireylere,

En içten dileklerle sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL- 2019- 33726

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	İİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XIV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hücre Dışı Genom Materyalleri.....	3
2.1.1. Hücre dışı DNA	3
2.1.1.1. Hücre dışı DNA'nın Pasif salınımı	5
2.1.1.2. Hücre dışı DNA'nın Aktif Salınımı	6
2.1.2. Genometastaz	7
2.2. Hematopoietik Kök Hücre	8
2.2.1. Hematopoietik Kök Hücrelerin Nişi	9
2.2.2. Hematopoietik Kök Hücrelerin Farklılaşması	10
2.2.3. Hematopoietik Kök Hücre Belirteçleri	12
2.2.4. Hematopoietik Kök Hücre ve Sitokinler.....	12
2.3. Kanser Kök Hücresi	14
2.4. Miyeloproliferatif Neoplazi	15
2.4.1. Miyeloproliferatif Neoplazilerin Sınıflandırılması	16
2.4.2. Miyeloproliferatif Neoplazilerin Patogenezi	18
2.4.2.1. JAK2V617F ve Ekzon 12 Mutasyonları	19
2.4.3. JAK-STAT yolağı	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Gereç	22
3.1.1. Deneyde kullanılan Hücre Tipleri.....	22

3.1.2. Deneyde kullanılan Kimyasal Maddeler, kitler ve cihazlar	23
3.1.3. Kullanılan Tampon çözeltiler.....	25
% 70'lik Etil Alkol çözeltisi.....	25
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. Kordon kanından Mononükleer Hücre İzolasyonu	25
3.2.2. Mononükleer hücreden CD34 ⁺ hücre izolasyonu	27
3.2.3. DNA İzolasyonu	28
3.2.4. Bromodeoksi Uridin (BrdU) ile Hücre Proliferasyon Analizi	29
3.2.5. Hücre Apoptoz Analizi	30
3.2.6. Akım Ölçer analizi	31
3.2.7. Transfeksiyon için Serum eldesi	31
3.2.8. CD34 [±] Hücrelerin Transfeksiyonu	31
3.2.9. Hematopoetik Progenitör Hücrelerin Metilselüloz Koloni Deneyleri	33
3.2.10. İmmünofenotipleme	34
3.2.11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	34
3.2.12. Allel spesifik Nested- PZR	35
3.2.13. Agaroz Jel	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Kordon kanından CD34 ⁺ hücre izolasyonu	38
4.2. CD34 ⁺ hücrelerin Transfeksiyonu.....	38
4.2.1. Transfekte hücrelerde JAK2V617F mutasyon tespiti.....	39
4.2.2. Transfekte hücrelerde BCR/ABL1 tespiti.....	43
4.3. Metilselüloz Hematopoietik Progenitör Hücre Koloni Deneyleri	44
4.4. Apoptoz Analizi	49
4.5. Hücre Proliferasyon Analizi	50
4.6. Hücre içi antikor Boyama	51
4.6.1. STAT 5 intrasitoplazmik boyama	51
4.6.2. İmmünofenotipleme	52
5. TARTIŞMA	56
KAYNAKLAR	64
FORMLAR	80
ETİK KURUL KARARI	85
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	86

ÖZGEÇMİŞ	87
----------------	----



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: hdDNA'nın farklı koşullar altında boyutları.....	4
Tablo 2-2: 2016 WHO' a göre MPN'lerin sınıflandırılması	16
Tablo 3-1: Deneyde kullanılan Hücre Hatları.....	22
Tablo 3-2: Deneyde kullanılan kimyasal maddeler	23
Tablo 3-3: Deneyde kullanılan kitler	24
Tablo 3-4: Kullanılan cihazlar	24
Tablo 3-5: Flow analizi için hücrelerin hazırlanması	31
Tablo 3-6: BCR/ABL geni için primer seti	35
Tablo 3-7: BCR/ABL PZR basamakları.....	35
Tablo 3-8: Allel spesifik nested PZR 1. Aşama ve 2. Aşama bileşenleri	36
Tablo 3-9: Allel spesifik Nested PZR reaksiyon basamakları.....	36
Tablo 3-10: JAK2 WT ve JAK2V617F mutasyonu primer setleri.....	37
Tablo 4-1: K562 serumu ile transfekte CD34 ^{+/+} ve Kontrol CD34 ^{+/+} hücrelerin immünofenotip sonuçları	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Hematopoetik kök hücre nişi	10
Şekil 2-2: Hematopoetik kök hücrelerin farklılaşması	11
Şekil 2-3: JAK-STAT yolağı	21
Şekil 3-1: Hemositometre formülü	26
Şekil 3-2: 24 kuyulu tabak hücre ekim planı	32
Şekil 4-1: CD34 ⁺ hücrelerin HEL serumu ile transfeksiyon öncesi ve transfeksiyon sonrası görüntüsü	39
Şekil 4-2: 24 saat boyunca HEL serum muamelesi yapılan CD34 ⁺ ve CD34 ⁻ hücrelerin agaroz jel görüntüsü.....	40
Şekil 4-3: 48 saat boyunca HEL serum ile muamele yapılan CD34 ⁺ ve CD34 ⁻ hücrelerin agaroz jel görüntüsü.....	40
Şekil 4-4: 24 saat boyunca HEL serum ile muamelesi yapılan mononükleer hücrelerin agaroz jel görüntüsü.....	41
Şekil 4-5: 48h saat boyunca 96 saat kültür edilmiş HEL serumu ile muamelesi yapılan mononükleer hücrelerin JAK2V617F mutasyonunun incelenmesi.	42
Şekil 4-6: 48 saat ve 96 saat boyunca K562 serumu ile muamele edilen CD34 ⁺ hücrelerin analizi.....	43
Şekil 4-7: Hematopoetik progenitörlerin oluşturduğu koloniler.....	44
Şekil 4-8: HEL serumu ile transfekte olan CD34 ⁺ hücrelerden elde edilem koloni sayıları.....	45
Şekil 4-9: Koloni verilerini Tukey testi kullanılarak ikili karşılaştırmalarının grafiksel gösterimi.	46
Şekil 4-10: 48 saat boyunca HEL serum muamelesi yapılan CD34 ⁺ hücrelerin koloni sonuçları.....	46
Şekil 4-11: 48 saat boyunca HEL serumu ile muamele yapılan CD34 ⁺ hücrelerin koloni sonuçları.....	47
Şekil 4-12: 48 saat boyunca HEL serumu ile muamele yapılan MNC koloni sonuçları	47
Şekil 4-13: K562 serum ile Transfekte olan CD34 ⁺ hücreleri kullanılarak yapılan metilselüloz progenitor deneyinde den elde edilen koloni sayıları.....	48
Şekil 4-14: Koloni verilerini Tukey testi kullanılarak ikili karşılaştırmalarının grafiksel gösterimi.	49

Şekil 4-15: HEL serumu ile transfekte olan CD34 ^{+/+} hücrelerin akış sitometre ile elde edilen apoptoz sonuçları	50
Şekil 4-16: K562 serumu ile transfekte olan CD34 ^{+/+} hücrelerin akış sitometre ile elde edilen apoptoz sonuçları	50
Şekil 4-17: CD34 ⁻ hücre kompartmanları BrdU ile etiketlenerek akış sitometrede hücre döngü analizleri sonucu elde edilen grafik.	51
Şekil 4-18: pSTAT5'in akış sitometre analiz sonuçları	52
Şekil 4-19: Kontrol ve BCR/ABL pozitif CD34 ⁻ hücrelerin immünofenotiplerinin akış sitometre ile analizi_.....	53
Şekil 4-20: CD34 ⁻ hücrelerin immünofenotip sonuçların t-test istatistik sonucu	53
Şekil 4-21: Kontrol ve BCR/ABL pozitif CD34 ⁺ hücrelerin immünofenotiplemesinin akış sitometre analizi	54
Şekil 4-22: CD34 ⁺ hücrelerin immünofenotip sonuçların t-test istatistik sonucu	54

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AML: Akut Miyeloid Lösemi
ATP: Adenozin Trifosfat
CFU-GEMM: Megakaryositler ve Makrofajlar
CLP: Ortak Lenfoid Progenitör
CMP: Ortak Miyeloid Progenitör
CSFR3: Koloni Uyarıcı Faktör 3 Reseptör
EPO: Eritropoietin
EPOR: Eritropoietin reseptörü
ET: Esansiyel trombositemi
Flt-3: FMS benzeri tirozin kinaz 3
G- CSF: Granülosit-Koloni Uyarıcı Faktörler
GM- CSF: Granülosit Makrofaj-Koloni Uyarıcı Faktörler
hdGM: Hücre dışı Genom materyal
HKH: Hematopoetik kök hücre
JAK: Janus Kinaz
JH: JAK homoloji domain
IL-3: İnterlökin 3
KKH: Kanser Kök Hücresi
KLL: Kronik Lenfositik Lösemi
KML: Kronik Miyeloid Lösemi
KNL: Kronik Nötrofilik Lösemi
LT- HKH: Uzun süreli hematopoetik kök hücre
MPN: Miyeloproliferatif neoplazi
MPP: Çok Potansiyelli Progenitör
mtDNA: Mitokondriyal DNA
NK: Doğal katil hücre
Ph: *Philadelphia*
PMF: primer miyeloproliferaif

PV: Polisitemia vera

RBC: Kırmızı Kan Hücresi

SCF: Kök Hücre Faktörü

SNO: Osteoblast hücre

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizm

ST-HKH: Kısa süreli Hematopoetik kök hücre

TLR9: Toll- like Reseptör 9

TPO: Trombopoietin

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

WT: Yabani tip



ÖZET

Toprak SF. Hücre Dışı Genom Materyallerinin Hematopoetik Kök Hücreler Üzerindeki Etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans. İstanbul. 2020.

Amaç:Bu tezin ana amacı HKH'leri(Hematopoetik kök hücreler) başarıyla transfekte etmek ve bunlarda oluşan hücresel fonksiyon değişimlerini saptamaktır.Tüm biyolojik sıvılarda bulunan hücre dışı genom materyallerinin(hdGM), hücrelerden salınarak komşu ve distal hücrelere entegre olabildiği bilinmektedir. Onkogen taşımaları halinde, hdGMler normal hücreleri onkojenik olarak transformasyona uğratabilir ve sonuçta genometastaz gelişebilir. Hücreler arasındaki etkileşimindeki bu rolleri nedeniyle, bu çalışmada hdGMler transfeksiyon için kullanılmış ve HKH'lerin kanser kök hücrelerine farklılaşabildikleri gösterilmeye çalışılmıştır.

Yöntem:Sağlıklı bireylerden kordon kanları toplanarak mononükleer hücre izolasyonu yapıldı. Ardından CD34⁺ hücreler seçildi. HEL hücre hattı JAK2V617F nokta mutasyonunu biallelik taşıması, K562 hücre hattıysa BCR/ABL pozitif olması nedeniyle kullanıldı. CD34⁺ hücreleriye, bu kültürlerden toplanan serumlarla transfekte edildi. Bu transfekte hücrelerde gerçekleşen değişimleri saptamak amacıyla, progenitör hücre koloni(PHK), apoptoz ve proliferasyon deneyleriyle immünofenotipleme yapıldı.

Bulgular:CD34⁺ hücreleri HEL serumuyla 24 saat boyunca muamele edildiğinde JAK2V617F mutasyonunu monoallelik geliştiği, süre 48 saat olduğunda mutasyonun biallelik geliştiği saptandı. BCR/ABL1 taşıyan K562 hücrelerinden elde edilmiş serumla transfeksiyon sonrasında HKH'lerin BCR/ABL1 pozitifliğinin tüm örneklerde geliştiği(%100) belirlendi. Transfekte PHK'lerde, JAK2V617F mutasyonu %50 oranında gösterilirken; BCR/ABL1 füzyon geniyse %6 oranında gösterildi. Transfeksiyon sonrasında yapılan hücre fonksiyon analizleriyle, apoptozda tutarlı değişiklik olmadığı, ancak HEL serumu uygulandığında pSTAT5 ekspresyonunun arttığı, K562 serumu eklendiğinde ise CD45,CD16+56,CD14'de artış görüldü.

Sonuç:Bulgularımız, hdGM'lerin taşıdıkları onkogenleri, salındıkları hücrelerden farklı hücrelere lateral olarak transfer edebildiği ve bu hücrelere onkojenik özellik kazandırarak hücrenin biyolojik özelliklerini değiştirebildiğine dair literatür bilgisini desteklemektedir. Bu çalışmayla ilk defa, JAK2V617F mutasyonu ve BCR/ABL1 füzyon genlerinin HKH'lere hdGM aracılığıyla entegrasyonunun mümkün olduğunu gösterdik. Bu veriler, hdGM'lerin hücreler arası iletişimde rolü olduğunu ve genometastaza katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: hücre dışı genomik materyaller (hdGM), Miyeloproliferatif neoplaziler (MPN), JAK2V617F mutasyonu, BCR/ABL, Hematopoetik kök hücre(HKH)

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL- 2019- 33726

ABSTRACT

Toprak SF. The Effect of Extracellular Genome Materials on Hematopoietic Stem Cells. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetic MSc. Thesis. İstanbul. 2020.

Aim: Main aim of thesis is successfully transfected HSC (Hematopoietic stem cells) and determine cellular function changes. Extracellular genome materials (EGM) found in all biological fluids which can be released from cells and integrated into neighboring and distal cells. EGMs may carry oncogenes, they can oncogenically transform normal cells. Because of roles in the interaction between cells, EGMs were used for transfection in this study and it was shown that HSCs can differentiate into cancer stem cells.

Methods: Cord blood was collected from donors and mononuclear cells were isolated. Then, CD34⁺ cells were sorted. HEL cell was used because it carries the JAK2-V617F biallelic and the K562 cell was BCR/ABL1 positive. CD34⁺ cells were transfected with serum collected from these cultures. In order to detect changes in transfected cells, immunophenotyping was performed with progenitor cell colony (PCC), apoptosis and proliferation assays.

Results: HEL serum transfected CD34⁺ cells were detected the JAK2-V617F mutation monoallelic in 24h. When the incubation period was 48 hours, HSCs were JAK2-V617F mutation biallelic. After transfection, all samples (100%) of K562 serum transfected HSCs were detected BCR/ABL1 positive. While JAK2-V617F mutation was shown at a rate of 50% in transfected PCC; BCR/ABL1 was shown at a rate of 6%. After transfection, the cell function analysis was performed. After transfection, the cell function analysis was increased as apoptosis of CD34⁺ cell, pSTAT5 in HEL/CD34⁺, lymphocyte count in K562 serum/CD34⁺.

Conclusion: Our findings support literature that EGMs can transfer the oncogenes, carry from the cells they are released to different cells laterally and change biological properties of cell by giving these cells oncogenic properties. In this study, we have shown for the first time that it is possible to integrate the JAK2-V617F mutation and BCR/ABL1 fusion genes into HSCs via EGMs. These data show that EGMs play a role in intercellular communication and contribute to genometastasis.

Key Words: Myeloproliferative neoplasm, extracellular genome material, hematopoietic stem cell, JAK2V617F mutation, BCR/ABL gene

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TYL- 2019- 33726

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kemik iliği, yetişkin yaşamı boyunca hematopoetik kök hücrelerin (HKH'lerin) ve farklı hematopoetik hücre hiyerarşisini barındıran özel bir niş bölgesini oluşturur [1]. Kemik iliği, HKH regülasyonunu, miyelopoezi ve lenfopoezi destekleyen karmaşık bir mikroçevredir [2]. Yetişkinlerde, HKH'lerin % 75'i sessiz halde (G0) ve % 8'i DNA sentezine (S) girerek kendini yenileyebilir ya da progenitör hücrelere farklılaşabilirler [3]. HKH'ler hücre dışı ve hücre içi faktörler ile etkileşim halindedir. Niş içerisindeki bu etkileşimle HKH'lerin homeostazı sağlanır. Bu denge halini koruyabilmek için HKH'ler kendi kendini yenileyebilir veya daha kararlı progenitör hücrelere farklılaşabilir ve bu durum organizmanın yaşamı boyunca ihtiyaç duyacağı tüm kan hücrelerinin üretilmesini sağlar [4].

HKH'ler veya progenitörlerdeki genetik değişiklikler; miyelodisplastik sendrom (MDS), miyeloproliferatif neoplazi (MPN), akut miyeloid lösemi (AML), kronik miyeloid lösemi (KML), kronik lenfositik lösemi (KLL) ve akut lenfositik lösemi (ALL) gibi hematolojik maligniteler ile ilişkilidir. HKH'ler ve progenitör hücreler yapılarında oluşan genetik değişiklikler sonucu kontrolsüz olarak farklılaşan kanser kök hücrelerine dönüşürler [5]. Oluşan kanser kök hücreleri sağlıklı HKH'lerle aynı niş içerisinde yer alırlar. Kanser kök hücreleri kemik iliği niş desteğinden yararlanırken aynı zamanda inhibisyon mekanizmalarını ortadan kaldırarak hematolojik malignitelerin meydana gelmesi için uygun bir ortam oluşturur [6].

Hücre dışı genomik materyaller (hdGM) köken aldıkları hücrelere özgü DNA, mitokondriyal DNA (mtDNA) ve çeşitli RNA molekülleri içerir. hdGM çeşitli mekanizmalarla salınarak tüm biyolojik sıvılarda ve hücre kültür besiyerlerinde serbest halde bulunurlar. hdGM hücreler arası iletişimi sağlarlar. Bu sebepten dolayı bazı hastalıkların tanısı ve prognozu için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılmaktadır. Tümör hücreleri de dahil olmak üzere ortamdaki diğer tüm hücrelerden hdGM'ler salgılanabilir. Dolaşımda serbest halde bulunan hdGM'ler komşu veya uzak konumdaki hücrelere girerek hücrelerin genetik yapısını değiştirebilir. Bunun sonucunda sağlıklı hücreler onkojenik özellikler kazanır ve metastaz gelişir [7].

Kemik iliği hücre popülasyonları, otokrin veya parakrin mekanizmalar yanı sıra hdGM dahil çok çeşitli çözünabilir faktörlerin salgılanması aracılığıyla tümör

mikroçevresini önemli ölçüde etkileyebilir. Anjiyogenik moleküllerin önemli bir aracı olan hdGM'ler, büyüme faktörleri, sitokinler ve enzimler genetik materyallerle alıcı hücreleri yeniden programlayabilen ve değiştirebilen çözünebilir faktörlerdir. Ancak malign klonun normal hematopoetik mekanizmalar ile nasıl etkileşime girdiği tam olarak bilinmemektedir. Kemik iliği, hdGM'ler gibi çözünebilir faktörler içerir ve onkogen taşıyan hdGM'ler aracılığı ile kemik iliği lösemik bir niş haline dönüşebilir [8].

HKH'lerin biyolojik özelliklerinden dolayı bu hücreler gen terapisi uygulamalarında kullanılmaktadır [9]. HKH'leri hedefleyen çoğu gen terapisi uygulaması iki ana gereksinimi karşılamalıdır: İlk olarak HKH'lere etkili nükleik asit verilmeli ve transgeninin kalıcı ekspresyonu sağlanmalıdır. İkinci olarak hem vektörün uzun süreli bakımı hem de transgeninin transkripsiyonu sağlanmalıdır.

Tez çalışmasındaki hipotezim hücre hatlarından elde edilen hdGM'leri içeren serumlarla, sağlıklı HKH'ler transfekte edilerek kanser kök hücrelerine dönüşebilir. Transfekte edildikleri onkogenlere özgü özellikleri HKH'ler bulundukları kolonilerde de gösterir. Bu nedenle, bu çalışmanın temel amacı, hdGM'lerin hücreler arasındaki iletişimde rolü olduğunu göstermektir. İnsan biyolojisinde yer alan hdGM'lerin kökeni, yapısı ve işlevini daha iyi anlaşılmasını sağlamaktır.

Bu amaca ulaşmak için öncelikle HEL ve K562 hücre hatları kültüre edildi. Hücre hatlarından besiyerleri toplanarak JAK2-V617F mutasyonu ve BCR/ABL1 füzyon geni içeren hdGM'ler elde edildi. Sağlıklı kordon kanından alınan HKH'lere *in-vitro* olarak besiyeri eklenerek hdGM'ler transfekte edildi. Transfeksiyonun başarısı genomik materyalde JAK2-V617F mutasyonu ve BCR/ABL1 füzyon genlerinin mevcut olup olmamasına bakılarak incelendi. Transfeksiyon sonrasında başarılı olan kök hücreler, hücre döngüsü, apoptoz ve hücre yüzey belirteçleri kullanılarak analiz edildi. Bu sayede hematolojik kanserlerde, kök hücrelerin kanserli kök hücrelere nasıl dönüştüğü gözlemlendi. Hematopoezin, bu mekanizmaların daha iyi anlaşılmasıyla malign MPN klonundan nasıl etkilendiğini anlamaya yardımcı olabilir ve terapötik müdahaleler için yeni hedefler sağlayabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre Dışı Genom Materyalleri

Nükleik asitler dolaşım sistemi içerisinde serbest halde, lipit veya proteinlerle kompleksler oluşturarak veya vezikül içerisinde yer alırlar. Bu yapılara hücre dışı genom materyalleri (hdGM) denir [10]. hdGM'ler nükleer DNA, mitokondrial DNA, hücre dışı DNA ve çeşitli hücre dışı RNA gibi molekülleri içeren yapıların tümüdür [11]. hdGM, bütün biyolojik sıvılarda veya kültür medyalarında bulunabilir [12][13]. hdGM'lerin kökenleri ya da hangi mekanizma ile salındıkları tam olarak bilinmemektedir [14]. Ancak yapılan çalışmalarda dolaşımda serbest halde bulunan hücre dışı DNA'ların (hdDNA) salındıkları dokulara veya hücrelere özgü sinyaller taşıdıkları ve bu durumun kökenlerini belirlemede yardımcı olabileceği düşünülmektedir[15]. hdDNA molekülleri hücrelerden apoptoz, nekroz veya aktif salım gibi çeşitli mekanizmalarla salınabilir [16]. Yapılan son çalışmalarda, nötrofil hücre dışı tuzakların (NET) yüksek seviyede olması hdDNA seviyeleri ile ilişkili olduğu gösterildi [17]. Bu durum NETosis sırasında hücrelerden salınan DNA parçalarının dolaşımdaki hdDNA oluşumunda rol oynadığını düşündürmektedir.

2.1.1. Hücre dışı DNA

Kanda ve diğer vücut sıvılarında serbest halde dolaşan ekstrasellüler DNA'lara hdDNA denir. hdDNA fragment uzunlukları $\sim 40-200$ baz çifti (bç) arasında değişmektedir (Tablo 2-1) [18][19]. hdDNA dolaşım sistemi içerisinde 15 dakika ila birkaç saat arasında kısa bir yarılanma ömrüne sahiptir [20].

Tablo 2-1: hdDNA'nın farklı koşullar altında boyutları

hdDNA kaynakları	hdDNA boyutları	hdDNA en sık görülen uzunluk	Referans
Sağlıklı birey	<200 bç ve >10.000 bç	~166 bç	[21][22]
Tümör	<150bç	-	[23][24]
Fetal	<150bç	~ 143 bç	[25]
Solid organ transplantasyonu	Donör< Alıcı	~ 166 bç	[26][27]
Hematopoetik kök hücre transplantasyonu	Donör> Alıcı, <250bç	~ 166 bç	[28][29]
Otoimmün hastalıklar	<155 bç	~ 166 bç daha az	[30]
Bakteri	<150 bç	-	[31]
Mitokondri	<100 bç	-	[32]

Genotoksik stres, DNA hasarının şiddetine bağlı olarak hücrenin sağkalımı ya da hücrel yaşlanmayı veya hücre ölümüne neden olan biyokimyasal tepkilerin sonucudur [33]. Genotoksik stres sıklıkla hücre zarı veya sitoplazma kaynaklı sinyal yollarını aktive eder [34]. cGAS – STING yolağı, DNA hasarı ile aktive olarak antitümör bağışıklığına, yaşlanmaya ve enflamatuvar yanıtlara aracılık eder [35]. STING sinyal yolağı, DNA için bir adaptördür ve endoplazmik retikulumda (ER) konumlanmıştır. Sıklık GMP-AMP (cGAMP) sentaz (cGAS) tarafından üretilen sıklık dinükleotitler STING ile etkileşime girerek yolak aktive hale gelir [36]. hdDNA'nın, sıklık GMP-AMP sentaz (cGAS) gibi sitoplazmik DNA algılama mekanizmaları yoluyla Toll-like reseptör 9 (TLR9) da bağımsız immünostimülasyona aracılık edebilir ve bu da interferon genlerinin (STING) aktivasyonuna yol açar [37]. STING ve TLR9 sinyalleri arasında güçlü bir sinerjistik etki vardır [38]. Bu iki sinyal yolu, önemli adaptör molekülleri (IRF3 / 7, STING ve MyD88) tarafından farklı şekilde düzenlenir.

TLR gen ailesi, patojene bağlı spesifik moleküler motifleri tanıyan ve doğal bağışıklık sistemini aktive eden membrana bağlı proteinlerdir. TLR9, metile edilmemiş sitozin-guanozin (CpG) dinükleotitleri içeren mikrobiyal ve memeli DNA'sını tanıyabilen bir DNA reseptörüdür [39]. Yapılan çalışmalarda hdDNA'ların TLR9 reseptörüne bağlanması sonucunda enflamatuvar yolları aktive edebildiği gösterildi. Ancak kanserde hdDNA ve TLR9 arasındaki ilişki tam olarak açıklanamamıştır [40]. Bu konu hakkında daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir [41].

Sağlıklı bireylerin dolaşım sistemlerinde hdDNA miktarı düşük (10-100 ng / mL) konsantrasyondadır [42]. Ancak çeşitli inflamasyon, travma, kalp krizi, inme veya

otoimmün hastalıklar ve çeşitli patolojik durumlarda dolaşımda bulunan hdDNA miktarı artar [43]. Yapılan çalışmalarda ileri evre ve metastatik kanser hastalarında ise hdDNA seviyeleri 1000 ng / mL'ye ulaştığı görülmüştür [44]. Bu durum hdDNA seviyeleri ile tümör yükü arasında kantitatif bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Konsantrasyon, stabilite ve bütünlük gibi hdDNA'nın çeşitli özellikleri, kanser hücrelerinde normal hücrelere kıyasla önemli ölçüde farklıdır [45]. Bunun yanı sıra hdDNA tümördeki genetik ve epigenetik değişiklikler hakkında bilgi verebilir [46]. Maternal kanda yapılan hdDNA analizleri ile fetüste gelişen trizomi 13, trizomi 8 ve trizomi 21 gibi kromozomal anöloidiler hakkında bilgi sağlayabilir. Bu özelliklerinden dolayı hdDNA'lar klinik uygulamada noninvaziv tarama, tanı ve prognostik testler için genetik materyal kaynağı olarak kullanılmaktadır. hdDNA hücrelerden pasif ve aktif olarak salınır. Salınma mekanizmasına bağlı olarak çeşitli boyutlarda dolaşım sistemi içerisinde yer alırlar [47][48].

2.1.1.1. Hücre dışı DNA'nın Pasif salınımı

Nükleozomlar, DNA stabilizasyonu ve DNA'nın kromozomlar halinde paketlenmesine izin veren moleküler komplekslerdir. Her nükleozom, çift zincirli DNA, histon oktameri ve bağlayıcı DNA' dan oluşur [49]. Nükleozomlar, 146 bç uzunluğundaki DNA'nın histon oktameri etrafında sarılması ve 20-90 bç'lik bağlayıcı DNA ile birbirine bağlanmasıyla oluşur [50]. Kromozomal DNA'nın apoptoz sonucu bozulmasıyla nükleozomlar hdDNA olarak dolaşıma salınır [51]. Bu nükleozomlar ~150- 200 bç uzunluğundadır. Bu moleküler kompleks DNA'nın nükleaz tarafından parçalanmasını engeller. hdDNA'lar parçalarının uzunluğu bir merdiven modeli göstermektedir. ~ 200 bç'den daha kısa parçalar, nükleozomal olmayan hdDNA'nın bozulmasının bir sonucu olabilir [12]. Mitokondriyal DNA (mtDNA) apoptoz, otofaji gibi durumlar sonucunda dolaşımda serbest halde bulunabilirler [52]. Nükleozomların aksine mtDNA, histonlarla korunmayan dairesel ve daha küçük DNA molekülleridir [53]. Kanda bulunan toplam hdDNA'nın büyük bir çoğunluğunu serbest haldeki mtDNA oluşturur [54]. Sağlıklı bireylerin kan dolaşımında dolaşan nükleer DNA'nın genel boyutunun esas olarak 70 ila 200 bç arasında değiştiği açıklanmıştır [55]. Buna karşılık, 10,000 bç'den daha büyük boyutlu uzun hdDNA molekülleri de nekrotik hücrelerden kaynaklı olduğu gösterildi [56]. Bu nedenle, farklı hdDNA uzunluğunun

çeşitliliği, hücrede oluşan apoptozun ve nekrozun sıklığına ve ayrıca hücrelerdeki farklı metabolik olaylara bağlıdır [16].

2.1.1.2. Hücre dışı DNA'nın Aktif Salınımı

Nükleik asitler, hücre dışı membran veziküllerinde bulunabilir ve aktif olarak ekzozom, mikrovezikül, virtozom gibi yapılarla taşınır ve bozulmaya karşı korunurlar [57]. Bu membran yapıları hücreler arası iletişime aracılık eder. Veziküller aktif olarak hem sağlıklı hem de tümör hücrelerinden salınabilir.

Ekzozomlar (50-100 nm), dendritik hücreler, B hücreleri, T hücreleri, tümör hücreleri ve epitelial hücreler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinden salgılanan küçük lipid membran vezikülleridir [58][59]. Endositoz sırasında, veziküller plazma zarında üretilir ve hücreye girerek erken endozomlar oluşturur. Bu nedenle, ekzozomlar membran ve lipidler, proteinler, hDNA ve RNA (esas olarak mRNA ve miRNA) gibi sitoplazmik bileşenler içerir [60]. Ekzozomlar, hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak veya endositoza benzer bir mekanizma yoluyla içselleştirilerek alıcı hücrelere girebilir ve bu nedenle hücreler arası iletişimci olarak işlev görebilir. Ekzozomlar tarafından iletilen proteinler, hücre fonksiyonunu değiştirerek farklı sinyal yollarını aktive edebilir veya inhibe edebilir [61]. Nükleik asitlerle ilgili olarak, mRNA'ların, miRNA'ların ve DNA'nın varlığı, ekzozomların genetik bilgi taşıyıcıları olarak rolünü vurgular [62]. Gerçekten de, ekzozom türevi miRNA'nın rolü geniş çapta gösterilmiştir. Hedef genine bağlı olarak miRNA, bir tümör baskılayıcı olarak veya bir tümör arttırıcı olarak işlev görebilir.

Mikroveziküller plazma membran tomurcuklanması ile oluşur. Ekzozomlardan daha büyük bir boyuta (100-1000 nm) sahiptirler [63]. Mikroveziküller HKH, endotelial hücreler ve kanser hücreleri gibi farklı hücre tipleri tarafından salgılanabilir [64]. Mikroveziküller, hem DNA hem de RNA taşıyarak hücreler arası iletişimi sağlar, alıcı hücre fenotipini modüle eden anahtar yapılarıdır [65].

Virtozom, canlı hücrelerden kendiliğinden salınan lipoproteinlerle ilişkili yeni sentezlenmiş DNA ve RNA tarafından oluşturulan makromoleküler bir komplekstir [66]. Bu yapıyı oluşturmak için çekirdekte yeni sentezlenen DNA sitozole aktarılır. Sitosolde DNA, nükleaz sindiriminden bir koruyucu görevi gören bir lipoprotein ile birleşir ve hücreden ayrılmadan önce komplekse bir RNA molekülü eklenir [67]. Canlı hücrelerden aktif olarak salınırlar ve hücreler arası iletişimde rol oynarlar. Virtosomlar

alıcı hücelere girebilir, DNA'larını genom içine dahil edebilir ve daha sonra bu hücelerin biyolojisini değiştirebilir. Bu modifikasyonlar çeşitli immünolojik değişiklikleri veya normal hücelerin tümör hücelerine dönüşümünü içerir [68].

Hücelerde NETosis sonucu dolaşıma aktif olarak hdDNA salınımı gerçekleşir. NET'ler antibakteriyel savunmadaki rollerinin yanı sıra, tümörlerde nötrofil birikme bölgelerinde bulunurlar. Bu NET'lerin tümör mikroçevresini etkileyebileceği, tümör büyümesini destekleyebileceği ve metastatik bir niş kurulmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir [69].

2.1.2. Genometastaz

Metastaz, neoplastik hücelerin birincil kanser bölgelerinden vücudun diğer bölgelerine yayılmasıyla yeni bir bağımsız neoplastik proliferasyon aşamasını başlatır. Metastaz, kanser tedavisinde önemli bir sorun olmaya devam eden karmaşık bir süreçtir [70].

Son zamanlarda dolaşımda serbest halde bulunan hdGM'nin keşfedilmesi ile hdDNA parçalarının komşu veya uzak konumdaki hücelere girebildiği ve hdDNA'nın alıcı hücelerin biyolojisini değiştirebildiği gösterildi [71]. Bu durum normal hücelerin onkojenik transformasyonu ve metastaz gelişimi ile ilişkilendirilebilir [72]. Ancak hdDNA'nın bu işlevleri tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen hdDNA mekanizmalarıyla ilgili çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmalar: ilk olarak, hdDNA TLR9'dan bağımsız olarak birkaç prometastatik geni aktive ettiği, bu durumun alıcı hücelerdeki metastazı indüklediği gösterildi [73]. İkinci olarak, İnsan kemik osteosarkoma (143B) hücelerinden salınan hdDNA'ların büyük çoğunluğunun tekrarlayan DNA dizilerinden oluştuğu yani insan genomunda aktif olan spesifik transpozonlardan kaynaklandığı gösterildi [74]. Bu durum göz önüne alındığında, transpozonların bir konakçı genomuna yanal transferi ve anormal yerleştirilmesi kodlama bölgelerini bozabilir ve onkogenleri aktive edebildiği düşünüldü [75].

Kanser hücelerinden salınan hdDNA'lar sağlıklı hücelere girerek genomlarına entegre olması, metastaz gelişimine katkı sağlar bu olaya genometastaz denir [76][77]. hdDNA taşıyan birçok yapı bu genometastazda rol oynayabilir: apoptotik cisimler, mikrozom ve eksozom gibi. hdDNA'nın insan genomuna nasıl entegre olduğu konusunda net bir cevap olmamasına rağmen, araştırmalar homolog olmayan

birleştirme (NHEJ) yoluyla gerçekleştirebileceğini düşünmektedir [78][79]. hdDNA'nın insan biyolojisindeki rolü tam olarak keşfedilmemiştir. Ancak yapılan çalışmalar, hdDNA'nın kanser patolojisinin altında yatan bazı moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması için yeni bir bakış açısı sağlayabilir.

Tümör dinamiklerini ve klonal heterojeniteyi daha iyi anlamak için dolaşımdaki tümör kaynaklı hdDNA seviyeleri incelenmelidir [80]. Çünkü dolaşımdaki hdDNA konsantrasyonu tümör boyutu, hastalık evresi ve metastatik yük ile ilişkili olduğu gösterildi [81]. Bu durumda tümör kaynaklı hdDNA'ları bir biyobelirteç olarak kullanılmasına olanak sağlar.

Hipoksi, tümör büyümesi, istilası ve metastazında önemli bir süreçtir [82]. hdDNA'nın lateral transferi, kanser hücrelerinin radyasyon ve kemoterapiye karşı arttırılmış direncinde rol oynar [83]. Radyasyon tedavisi sırasında oksitlenmiş DNA üretilir [84]. Komşu hücreler tarafından serbest haldeki okside hdDNA asimile edilerek DNA kırıklarının oluşumu indükler, reaktif oksijen türlerinin biyogenezini uyarır ve DNA hasar yanıt yollarını aktive eder. Tümör dinamiklerini, mutasyon yükünü, tümörün ilerlemesi veya tedavinin etkinliğini daha iyi belirleyebilmek için dolaşım sistemi içindeki hdDNA'nın mutant ve WT oranları belirlemesi gerekir. Bir başka yaklaşımda hdDNA'ların metilasyon paternlerinin belirlenmesidir [85]. DNA metilasyonları bulundukları doku ve hücre tipleri özgüdür. Son çalışmalarda hdDNA'lar salındıkları tümör hücreleriyle aynı metilasyon paterni içerdiği gösterildi. Tümöre özgü hdGM'lerin tespit edilmesiyle kanser tiplerinin belirlenmesi ve birincil kaynağı bilinmeyen kanserlerin tanımlanmasında işlevsel olarak kullanılabileceği düşünülmektedir [86].

2.2. Hematopoietik Kök Hücre

Hematopoietik sistem, hücrel kan bileşenlerinin üretiminde rol alan kemik iliği, dalak, timus ve lenf düğümlerinin dahil olduğu doku ve organ sistemidir [87]. Bu sistemin tepesinde bulunan hematopoietik kök hücreler (HKH'ler) yaşam boyunca kan hücreleri havuzunun yenilenmesi ve homeostazdan sorumludur [88]. HKH'ler kendi kendini yenilemeyi, farklılaşmayı, kemik iliğinde kalmayı, apoptoz veya migrasyon yapmayı seçebilirler. Bu durum HKH'lerin kararlı bir durumda kalmasını veya farklı hematopoietik soylar için sürekli progenitör üretimini sağlar. HKH'ler, simetrik olarak

bölünerek kendileri ile aynı özelliklere sahip iki kardeş hücre üretme yeteneğine sahiptir [89]. Ayrıca HKH'ler asimetrik olarak bölünebilirler böylece HKH ve progenitör hücre oluştururlar. HKH kendini yenileme faaliyetini düzenleyen mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte, kanıtlar Notch, Sonic hedgehog ve Wnt sinyal yollarının yanı sıra *Hox* genlerinin bu mekanizmalarda yer aldığını göstermektedir [90][91].

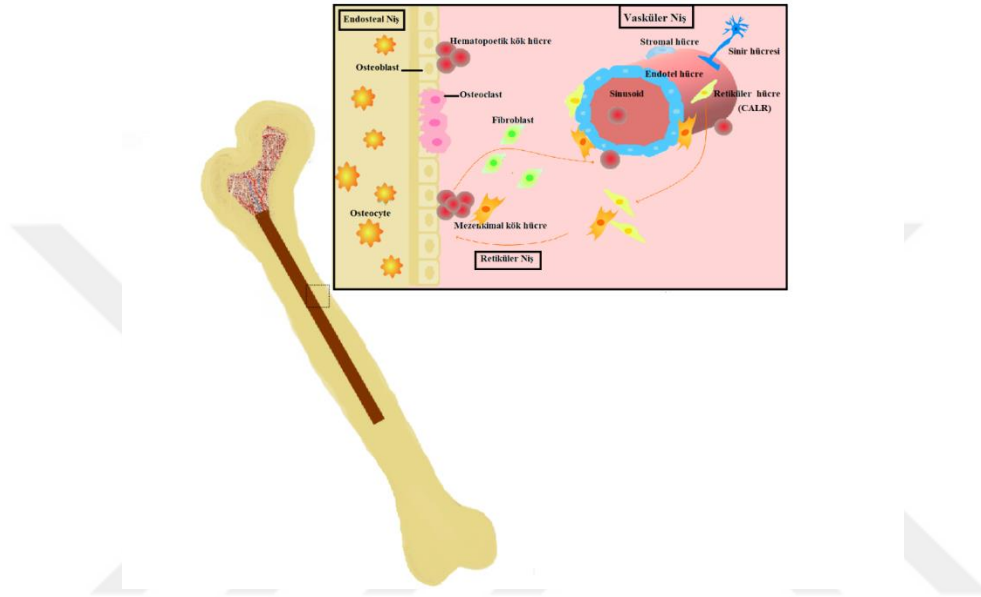
Olgun kan hücrelerinin sınırlı bir ömrü vardır ve yaşam boyu sürekli olarak yeniden üretilmeleri gerekir [92]. Kan hücreleri, kendini yenileme yeteneği olan multipotent özelliğe sahip HKH'lerin çoğalması ve farklılaşmasıyla üretilir [93]. HKH'ler tarafından üretilen kan hücreleri: Kırmızı kan hücreleri (eritrositler) dokulara oksijen taşır. Plateletler (megakaryositlerden türetilmiş) kanamayı önlemede görevlidir. Granülositler ve makrofajlar bakteri, mantar ve diğer parazitlerden kaynaklanan enfeksiyonlarla savaşır. B-lenfositler antikor üretirken, T-lenfositler vücuda yabancı olarak tanımlanan inflamasyon hücrelerini doğrudan öldürebilir [94]. Klinik uygulamada; HKH kaynağı olarak büyük ölçüde periferik kan, kemik iliği ve göbek kordonu kullanılır.

2.2.1. Hematopoietik Kök Hücrelerin Nişi

HKH'ler embriyogenez gelişimi sırasında en erken gebeliğin 5. haftasında ve genellikle olgun HKH'lerde gebeliğin 9. haftasında tespit edilebilir [95][96]. Embriyolar tam olarak geliştikten sonra HKH'ler fetal karaciğere göç eder ve erişkin yaşam boyunca kemik iliği endosteal bölgesinde görülür [97][98].

HKH'ler, osteoblastlar, endotel ve retiküler hücre arasındaki iletişimden oluşan bir endosteal ve vasküler niş içinde bulunur [99] (Şekil 2-1). Endosteal niş osteoblastlar, osteoklastlar ve stromal fibroblastlardan oluşur. Osteoblast hücreleri (SNO) kemik iliğinde bulunan mezenkimal kök hücrelerden köken alır. Osteoklast hücreleri ise $CD34^+$ HKH'lerden meydana gelir [100]. HKH'ler SNO hücreleri ile temas halindedir [101]. Osteoblastlar, HKH havuzunun kontrolü ve devamlılığına aracılık eden Notch ligandları, anjiyopoietin-1 (Ang-1), CXCL12 ve katepsin X gibi birkaç sinyal molekülü üretirler. Vasküler nişin bileşenleri HKH'lerin devamlılığını, hücre döngüsünü ve hücre içi aktivitesini kontrol eder [102]. Çoğu HKH, sinüzoidlerde, özellikle sinüzoidal endotelial hücreleri çevreleyen CAR hücrelerine bağlı bulunur. Benzer şekilde, CAR hücreleri esas olarak HKH devamlılığı için CXCR4 sinyali ile birlikte CXCL12 üretir

[103]. Ayrıca stromal hücreler ve mezenkimal kök hücreler HKH oluşumunu destekleyen retiküler bir ağ oluşturur. HKH'ler nişte hücre döngüsünün G0 fazında ve trabeküler kemiğe yakın kemik iliği alanlarının çevresinde bulunur [104][105]. HKH'lerin kendi kendini yenilemesi ve farklılaşması çeşitli sitokinler, kemokinler, reseptörler ve hücre içi sinyal molekül kümesi tarafından düzenlenir [106]. Bu durum HKH'lerin kemik iliğine yerleşmesinin kontrolünü sağlar.



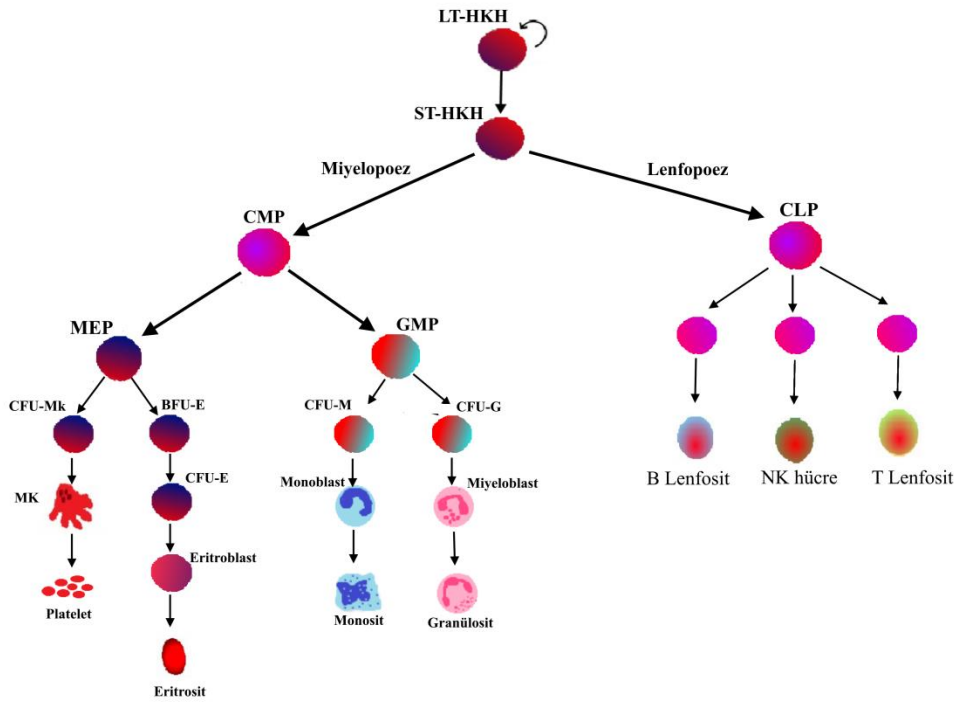
Şekil 2-1: Hematopoetik kök hücre nişi

HKH'ler kemik iliğinde endosteal ve vasküler niş içerisinde konumlanırlar. Kemik iliği içerisinde HKH'ler hücre-hücre etkileşimleri ve kemik iliğine salınan çözünür faktörler aracılığıyla iletişim kurarlar. Bu durum da farklı soylardan çok sayıda hücre tipinin bulunduğu dinamik ve karmaşık bir ortam meydana getirir.

2.2.2. Hematopoietik Kök Hücrelerin Farklılaşması

Kemik iliği, insanlarda ana hematopoez bölgesidir ve normal koşullar altında periferik kanda sadece az sayıda hematopoietik kök ve progenitor hücre bulunur. HKH'ler, kendi kendini yenilemeyi sürdürebilen uzun süreli hematopoietik kök hücreler (LT-HKH'ler) veya belirli bir aralıkta kendini yenileyen kısa süreli hematopoietik kök hücreler (ST-HKH'ler) üretir. ST-HKH'ler, kendi kendini yenileyemeyen çok potansiyelli progenitörlere (MPP'ler) farklılaşır. Farklılaşma sırasında, HKH'lerin soyu, çeşitli ara olgunlaşma aşamalarında ilerler ve olgunluğa ulaşmadan önce kökene bağlı olarak progenitor hücreler üretilir (Şekil 2-2). HKH multipotent progenitörleri heterojen

bir popülasyon olarak tanımlanabilir ve iki oligopotent progenitörden oluşur: ortak miyeloid progenitör (OMP) ve ortak lenfoid progenitör (OLP) [107]. OMP'ler, granülositik, makrofaj ve eozinofil progenitörleri üretebilen granülosit-makrofaj progenitörleri (GMP) ve megakaryosit-eritroid progenitörlerine (MEP) dönüşebilirler [108]. Dentritik hücreler, OMP veya OLP' den oluşturulabilir [109].



Şekil 2-2: Hematopoetik kök hücrelerin farklılaşması

HKH'lerin uyarılması ile nötrofil, eozinofil, monosit, mast hücre, eritosit(RBC),megakaryosit, doğal katil (NK) hücresi, T ve B lenfosit hücreleri oluşabilir.

HKH'ler farklılaşmadan önce seyrek olarak bölünür. LT-HKH'den ST-HKH (MPP) farklılaştıklarında, kendi kendini yenileyebilme yeteneklerini giderek kaybederler ve daha çok mitotik olarak aktif hale gelirler. Genellikle, HKH'ler hücre döngüsüne ayda bir girerler. LT-HKH popülasyonunun yaklaşık % 8'i rastgele asimetrik bölünme geçirir. HKH'lerin sessiz halde olma yetenekleri onları kontrolsüz çoğalmadan korur ve genomik bütünlüğünü korunmalarını sağlar [110].

HKH'lerin hematopoietik sistem dışındaki hücre tiplerine transdiferansiyasyon yapma yeteneği vardır. Dolayısıyla, plastisite aynı germ tabakası içindeki geçiş bariyerleri olarak ifade edilebilir. Kemik iliği kaynaklı HKH'lerin plastisitesi sonucu

endotel öncüllerine, beyin mikroglia ve makroglia, hepatik hücreler, iskelet kası ve kalp kası hücrelerine farklılaştığı gösterilmiştir [111].

2.2.3. Hematopoetik Kök Hücre Belirteçleri

HKH'leri tanımlamak ve izole etmek için çeşitli belirteçler keşfedilmiştir. İlk olarak kullanılan belirteçlerde lektinlerin hücre boyutu, yoğunluğu ve tanınmasına odaklanıldı. Ancak sonraki çalışmalarda monoklonal antikorlar tarafından tanımlanan hücre yüzeyi protein belirteçleri üzerinde duruldu. İnsan HKH'leri için, Lin, CD34, CD38, CD43, CD45RO, CD45RA, CD59, CD90, CD109,44 CD117, CD133, CD166 ve HLA DR gibi belirteçler tanımlandı. *in vitro* ve *in vivo* olarak insan HKH progenitörleri tanımlaya bilmek için CD34, CD38, Lin, CD90, CD133, CD45RA,CD49f gibi belirteçler kullanılır [112][113].

CD34, hematopoietik kök ve progenitör hücreler üzerinde tanımlanan bir transmembran fosfoglikoproteinidir [114]. CD34 için en yaygın olarak açıklanan ligand, l-Selektin'dir [115]. Sessiz halde bulunan HKH popülasyonunun CD34⁺ olduğu ancak hücre bölünmesinden hemen önce pozitif (CD34⁺) olduğu ileri sürülmektedir [116]. Bu negatif popülasyonu incelemek zordur çünkü tanımlanması için gerekli olan bir belirteç hala eksiktir. CD34⁺ hücreler ile CD34⁺ hücreler karşılaştırıldığında CD34⁺ hücreler son derece zayıf yerleşim (homing) ve engraftment yetenekleri gösterirler [117]. CD34⁺ HKH'ler hematopoietik soyun tüm alt gruplarına farklılaşma ve çoğalma kapasitesine sahiptir. *in vivo* çalışmalarda CD34⁺ HKH'lerin solunum epitel hücreleri, hepatositler ve kardiyomiyositlere farklılaşabildikleri gösterildi. İnsan HKH kompartmanları heterojendir ve tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle daha fazla araştırma yapılması gereklidir [118].

2.2.4. Hematopoetik Kök Hücre ve Sitokinler

Sitokinler, hematopoezin birçok yönünü özellikle immün yanıt ve inflamasyonu düzenleyen salgı proteinlerdir. Birçok sitokin HKH'lerin üzerinde bulunan reseptörlere doğrudan bağlanarak, HKH'lerin kendi kendini yenilemesi, farklılaşması, apoptoz, G0 fazında kalması ve mobilitesi gibi fonksiyonlarını düzenleyebildiği bilinmektedir. Ancak niş içerisinde hangi hücrelerin spesifik sitokin ürettiği tam olarak belirlenememiştir.

Kök hücre faktörü (SCF), HKH ve progenitör hücrelerin hücre döngüsüne girişlerini, çoğalmalarını, farklılaşmalarını kolaylaştırmak için diğer sitokinlerle etkileşime giren temel bir hematopoietik sitokindir [119]. SCF, tüm HKH'lerde eksprese edilen bir tirozin kinaz reseptörü c-Kit'e bağlanarak çalışır [120]. SCF, fetal karaciğerde bulunan HKH'lerin simetrik bölünmesini ve kendi kendine yenilenme yeteneklerini artırır [121][122]. Ek olarak SCF'nin HKH'lerin *in vitro* ortamda hayatta kalmasını, hareketliliğini ve kendi kendini yenilemesini sağladığı bilinmektedir [123][124]. Yapılan birçok çalışmada HKH'lerin SCF ile muamelesi sonucun apoptotik ölümlerini engellediği gösterilmektedir [125]. SCF, diğer sitokinlerle birleştirildiğinde tüm soylardan hematopoietik progenitör hücrelerin klonlama etkinliğini artırır [126]. Bu yüzden HKH'lerin kültürlerinde kullanılan tüm sitokin kombinasyonlarında SCF kullanılmaktadır.

FMS benzeri tirozin kinaz 3 ligand (FLT3) reseptörünün aktivasyonu, primitif HKH'lerin normal proliferasyonu için önemlidir [127]. FL, tip I transmembran (TM) proteinidir; kemik iliği fibroblastları dahil olmak üzere hematopoietik kemik iliği mikro çevresinde bulunan hücrelerde bulunur. Ayrıca miyeloidin hematopoietik hücre hatlarında ve B- ve T-hücre soylarında eksprese edilir [128][129]. Hem zara bağlı hem de çözünür formları, reseptörün tirozin kinaz aktivitesini artırır. Ayrıca kemik iliği ve kandaki progenitör hücrelerin büyümesini uyarabilir [130]. SCF gibi FL, kendi başına normal miyeloid ve lenfoid progenitörlerin proliferasyonunu uyaramaz. Ancak diğer hematopoietik büyüme faktörleri ve interlökinlerle birlikte sinerjistik etki gösterir [131]. FL, olgunlaşmamış miyeloid hücreler ve kök hücreler için bir büyüme faktörüdür ve CD34⁺ hücrelerin *in vitro* ve *in vivo* genişletebilir [132]. FLT3 immün cevap yanıtında da önemli rol oynar [133].

Trombopoietin(TPO), Mpl reseptörü aracılığıyla sinyal üretir ve megakaryosit gelişimini düzenleyen ana sitokindir [134]. Mpl'nin ekspresyon paterni, TPO'nun fonksiyonu ile ilgili bilgi verir. Mpl ağırlıklı olarak megakaryositler, trombositler, hemanjiyoblastlar ve HKH üzerinde ifade edilir [135]. Yapılan *in vitro* çalışmalarda TPO HKH havuzunun devamlılığı ve hayatta kalmasında rol oynadığı gösterildi [136].

İnterlökin 3 (IL-3), hematopoietik ve bağışıklık sisteminde bulunan hücrelerin büyümesi ve gelişimlerinin düzenlenmesinde önemli rol oynar [137]. IL-3, HKH'lerin ve progenitörlerin çoğalmalarını, farklılaşmasını destekler. Ayrıca T hücreleri, B

hücreleri, eozinofiller, bazofiller ve monositler dahil olmak üzere hedef hücre popülasyonları üzerinde çeşitli biyolojik etkileri vardır [138]. Çalışmalarda hematopoezin IL-3'e bağlı olmadığını HKH'lerin farklılaşmasını destekleyebilecek ek sitokinler ile kombine edilmesi gerektiği belirtilmektedir.

2.3. Kanser Kök Hücre

Kök hücreler, kendi kendini yenileme ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneği ile karakterize edilir. Bu grup içerisinde kanser kök hücreleride (KKH'ler) yer almaktadır. Tümör başlatma kapasitesine sahip kanser hücrelerinin alt popülasyonu tümör oluşumunun temel kaynağıdır ve bu alt popülasyona KKH denir. KKH kavramı, belirli bir dokudaki tümörlerin genellikle köken aldıkları dokularda bulunan hücresel heterojeniteyi yeniden oluşturmaya çalıştığı fikrine dayanır [139]. Bu heterojenite hem genetik hemde KKH kaynaklı olabilir [140]. KKH'leri asimetrik olarak bölünürler. Bir grup kendi kendilerini yenileyerek uzun süreli klon üretim kapasitesine sahip olur. Diğer grup post mitotik farklılaşma ve hücre bölünmesi geçirir. Asimetrik bölünme tümörün erken evresinde KKH'lerde görülür, geç evre tümörlerde asimetrik bölünme bastırılırken çoğalmayı teşvik etmek için simetrik olarak bölünürler [141].

KKH'ler, hücre bölünmelerinin simetrisi ve gen ekspresyonlarındaki değişiklikler ile tümör içerisindeki diğer hücrelerden ayırt edilebilir. KKH'leri sınıflandırma kriterleri üzerinde henüz bir fikir birliğine varılamamıştır. Bu nedenle belirli bir tümörde KKH alt popülasyonunun oranını, KKH'lerin klinik sonuçla ilgisini ve KKH'lerin kökenini kesin olarak tanımlamak mümkün olmamıştır [142].

Tam olarak belirlenememiş olmasına rağmen bir hücrenin KKH olup olmadığını tanımlamada bulunduğu niş düzeninden anlaşılabileceği düşünülmektedir [143]. Tümör mikroçevresi, tümör hücresine yakın bulunan hücreler tarafından tanımlanır. Bu hücre grupları epitelyal, mezenkimal, immunolojik veya endotel kaynaklı olabilir [144]. Niş hipoksi gibi ekstrinsik faktörlerle değişebilir [145]. Niş içerisindeki parakrin ve otokrin sinyallenmeler, bir tümör hücresinin KKH özelliğine sahip olup olmadığını belirleyebileceği varsayılmaktadır [146].

Kök hücreler ve KKH'ler benzer sinyal yollarını kullanırlar [147]. Kök hücre mekanizmaları kanser tiplerinin karakteristiğine bağlı olarak KKH'lerini değiştirebilir. Bu durum kanser modellerinin hücre dinamiklerini daha karmaşık hale getirir [148]. Plastisite bu bağlamda "dinamik sapma" olarak adlandırılabilir [139]. Bu nedenle,

genellikle mikroçevre sinyallerinin aracılık ettiği plastisite tümör çevresinde bulunan kök hücrelerin aşırı kendi kendini yenileme özelliklerinin kazanılması için önemli bir araç olduğu düşünülmektedir [149].

Tümörlerde bulunan mutasyonların çoğu KKH'lerin kendi kendini yenilemelerinin sürekli aktif olmasına, tümör ilerlemesine ve metastaza teşvik eder [150]. Bu nedenle, tümörlerde farklılaşma dengesi üzerinde patojenik bir kendini yenileme, mutasyon birikimi sürecini daha da ağırlaştırır. Bu durum tümörün tıbbi tedaviye dirençli olmasına ve nüks etmesine neden olur. Tedavi sonrası tümör büyümesi ve nüks etme sırasında KKH'lerin önemli rolleri vardır. Kanser tedavisinin amacı ortadan kaldırılması veya terminal farklılaşması olmalıdır. Fare modellerinde yapılan ablasyon deneylerinde KKH'lerin ortadan kaldırılmasının tümörlerin gerilemesine ve kemoterapiden sonra tekrarlamasına dair kanıtlar vardır [151][152]. Ek olarak, tedavi sırasında mikroçevrenin hedeflenmesi, KKH olmayanların KKH benzeri bir duruma ve sonuç olarak tümörün tekrar oluşmasını önlemek için önemlidir [153].

2.4. Miyeloproliferatif Neoplazi

Miyeloproliferatif neoplaziler (MPN), kronik fazda olan farklılaşmış hücrelerin aşırı üretimi ile karakterize edilen klonal hematopoietik bozukluklardır [154]. *Philadelphia* (Ph) kromozomu, 9. kromozomda bulunan ABL geninin 22. kromozomda bulunan BCR genine translokasyonu t(9;22) sonucu oluşan BCR-ABL füzyon genini taşıyan 22. kromozoma denir. BCR/ABL füzyon geni kronik miyeloid lösemili (KML) çoğu hastada ve akut lenfoblastik lösemili (ALL) veya akut miyeloid lösemili (AML) bazı hastalarda bulunur. MPN'ler BCR/ABL geni bulunduran Ph⁺, BCR/ABL genini bulundurmayanlar Ph⁻ olarak iki gruba ayrılır. Ph⁻ MPN'ler, polisitemi vera (PV), esansiyel trombositemi (ET), birincil miyelofibrozis (PMF) bu grup klasik MPN'leri oluşturur.

MPN kök hücreleri, kemik iliği içerisinde hücrenin iç ve dış kaynaklı etkisinin kombinasyonu sonucu klonal genişlemeye neden olan MPN' yi başlatan bir somatik mutasyon barındırır [155]. MPN vakalarının % 95 'inde JAK2, CALR veya MPL genlerinde oluşan somatik mutasyonlar MPN fenotiplerinin gelişmesini yönlendirmektedir.

2.4.1. Miyeloproliferatif Neoplazilerin Sınıflandırılması

2016 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO), yeni oluşan mutasyonların keşfi hücrelerin morfolojik özelliklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamış olup yeni bir sınıflama ihtiyacını doğurmuştur. Bunun üzerine MPN hasta grubunun sınıflandırmasını yeniden düzenlemiştir [156]. 2016 WHO sınıflamasına göre, MPN' ler PV, ET, PMF, KML, kronik nötrofilik lösemnin yanı sıra NOS ve sınıflandırılmayan MPN' ler olarak alt gruplara ayrılır [157] [158] (Tablo 2-2). PV, ET, PMF ve KML genellikle klasik MPN sınıfını oluşturur.

Tablo 2-2: 2016 WHO' a göre MPN'lerin sınıflandırılması

Miyeloproliferatif Neoplaziler
Kronik miyeloid lösemi (KML)
Kronik nötrofilik lösemi (KNL)
Polisistemia vera (PV)
Primer miyelofibrozis (PMF)
PMF, prefibrotik/ erken evre
PMF, overt fibrotik evre
Esansiyal trombositemia (ET)
Kronik eozinofilik lösemi,not otherwise specified (NOS)
MPN, sınıflandırılmayan
Mastositosis

KML, hematopoietik kök hücrenin neoplastik transformasyonundan kaynaklanır. BCR/ABL füzyon proteini KML'nin başlatılması, sürdürülmesi ve ilerlemesi için gereklidir. Ancak KML'nin kronik fazdan blast fazına dönüşümü için ek genetik veya epigenetik anormallikler gereklidir. KML'nin bir kök, progenitör veya öncü hücrede başlayıp başlamadığı bilinmemektedir [159]. B hücreler gibi diğer soylarda Ph kromozomunun varlığının belirlenmesi KML'nin bir kök hücrede başlaması

gerektiğini kanıtlanmasında, BCR/ABL1'in pozitifliği, indüklenmiş pluripotent kök hücreler de olduğu gibi, olgun kök hücrelere farklılaşma özellikleri sağlayabileceği düşünülmektedir [160].

PV, eritroid progenitörlerin eritropoietine (EPO) karşı aşırı duyarlı olan anormal eritropoez ile ortaya çıkan klonal kök hücre hastalığıdır [161]. Bazı durumlarda da EPO uyarımından bağımsız olarak kök hücrelerde klonal çoğalma meydana gelebilir [162]. PV her yaşta görülebilir, ancak genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkar. Klinik seyri sırasında, PV hastaları arasında en önemli ölüm nedeni, tromboz riskinin artmasıdır. Bu nedenle, trombozun önlenmesi PV tedavisinin temel amacıdır [163]. Semptomlar, mikrosirkülasyonu bozan ve hiperviskozitesinin artmasından kaynaklanan durumların oluşması sonucu gelişir. JAK2 mutasyonu, bu hastaların % 90 'ından fazlasında görülür. JAK 2 geninin ekzon 14 'deki somatik mutasyonu (JAK2- V617F) hastaların büyük çoğunluğunda görülür [164]. JAK2 ekzon 12' deki somatik mutasyonlar ise daha az sıklıkla ortaya çıkar [165].

PV, kardiyovasküler komplikasyonlar nedeniyle veya lösemiye ilerlemesinden dolayı sağkalım oranı oldukça azalmıştır [166]. Yapılan çalışmalarda kardiyovasküler olayların insidansı flebotomi ve aspirin gibi antiagreganların tedavisiyle azaldığı gösterilmiştir [167]. PV'nin klinik özellikleri hafif-orta dereceli splenomegali, baş ağrısı, yorgunluk, kaşıntı, hiperviskozite, trombotik ve kanama komplikasyonları şeklindedir [168]. Ayrıca PV klinik seyri sırasında lösemik transformasyon veya fibrotik progresyon gösterme riski vardır [169].

ET, kemik iliği megakaryosit hiperplazisiyle ve periferik kan trombosit sayısında artış ile karakterize edilir [170]. ET özellikle daha agresif seyirli miyeloid neoplazi olan miyelofibroza dönüşebilir. ET'nin birincil nedeni *JAK2*, *CALR* veya *MPL* gen bölgelerindeki somatik mutasyondur. ET hastalarında değişken semptomlar görülebilir. Asemptomatik hastalarda trombositoz genellikle tam kan sayımı sırasında görülür. Semptomatik hastalar için en yaygın semptomlar migren, baş ağrısı ve baş dönmesidir [171].

PMF, malign bir klonal miyeloproliferatif hastalıktır. Kemik iliğinde megakaryositlerin proliferasyonuna, düzensiz sitokin üretimine ve kemik iliği yetmezliğine neden olur [172]. Bu durum progenitör hücrelerin periferik kan içerisinde mobilizasyonuna ve ekstramedüller hematopoezise yol açar. PMF' nin klinik belirtileri

arasında ağır anemi, hepatosplenomegali, kaşıntı, kemik ağrısı, tromboz, dalak enfarktüsü ve kanama yer alır. PMF'nin fibrotik evresi, gözyaşı şeklindeki kırmızı hücrelerle ve hepatosplenomegali sonucu kanda lökoeritroblastoz tablosunun gelişmesi ile karakterizedir.

2.4.2. Miyeloproliferatif Neoplazilerin Patogenezi

Miyeloid progenitör hücrelerde oluşan somatik mutasyonların neden olduğu klonal hematopoez, MPN'lerin ayırt edici özelliğini oluşturur. Ph⁻ MPN'ler için üç tip moleküler belirteç belirlenmiştir. Bu belirteçler *JAK2*, *MPL* ve *CALR* genlerinde oluşan mutasyonlardır. *JAK2*-V617F, *MPL*-W515L / K veya *CALR* mutasyonlarının hiçbirisi belirli bir MPN alt tipine özgü değildir. Ayrıca MPN hastalarının küçük bir grubunda da *JAK2*, *MPL* ve *CALR* genlerinde herhangi bir mutasyon taşımamaktadır.

CALR gen mutasyonları, ekzon 9 da okuma çerçevesinde insersiyon veya delesyon sonucu baz çifti (bç) değişikliği ile somatik mutasyonlar oluşur. Bunun sonucunda da alternatif bir okuma çerçevesi meydana gelir [173]. PMF ve ET'de *CALR* mutasyonları görülürken PV'de bu mutasyonlar nadiren görülür [174].

CALR, bir JAK-STAT sinyal molekülü değildir ancak mutant *CALR* yeni C-terminal peptidi yoluyla *MPL* ile etkileşime girerek downstream sinyal yollarını indükler [175]. . Yapılan bir çalışmada MPN'lerin patogenezinde proenflamatuar sitokin ekspresyonu, ER stres yanıtı gibi biyolojik süreçlerde *CALR*'nin rol aldığı ileri sürülmektedir. Bununla beraber hematopoez boyunca WT *CALR* ekspresyonunun hematopoetik progenitör hücrelerin eritroid ve megakaryosit soylarına farklılaşmasını etkileyebileceği gösterildi [176].

Trombopoietin reseptörü olan *MPL*' de oluşan mutasyonlar genellikle ekzon 10'da meydana gelir [136]. *MPL* W515L mutasyonu, hematopoietik hücrelere sitokinden bağımsız bir çoğalma kapasitesi sağlar. Bu durum JAK-STAT sinyalleme sinin yapısal bir aktivasyonu ile sonuçlanır. TPO/*MPL* mutasyonları, hematopoietik kök hücrelerin düzenlenmesinde ve trombosit üretiminde önemli bir rol oynar [177]. *MPL*, PV hastalarında W515 L / K varyantları bulunmazken, ET'de % 3-5, PMF'de % 5-10 ile sınırlıdır [178].

Koloni uyarıcı faktör 3 reseptör (*CSF3R*) geninde sürücü bir mutasyon ligand bağlanmasından bağımsız olarak JAK-STAT yolağının sürekli aktif olmasına neden

olur. Bu durum olgun nötrofillerin çoğalmasını teşvik eder [179]. Bunun sonucunda CSFR3R mutasyonu kronik nötrofilik lösemiye (KNL) yol açar. KNL ile atipik KML'nin klinik özelliklerinin benzerliği nedeniyle ayırıcı tanısı güçtür. Ancak CSFR3 mutasyonun keşfedilmesiyle ayırıcı tanısı kolaylaşmıştır. CSFR3 mutasyonu KNL hastaların %80'inde görülürken, aKML' de ise rastlanmamıştır [180].

JAK2, MPL, CALR ve CSF3R'deki somatik sürücü mutasyonlar MPN'lerin heterojenitesini tam olarak açıklayamamaktadır. Yeni nesil sekanslama ile MPN'li hasta grupları için daha fazla mutasyonlar tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar MPN'lerin belli bir grubuna özgü değildir. Miyeloid genlerde meydana gelen mutasyonlar farklılaşma sürecini değiştirir ve hastalığın miyelodisplastik özelliklerini artırır.

MPN'deki sürücü mutasyonlara ek olarak, MPN'li hastaların diğer genlerinde de mutasyonlar eş zamanlı olabilir. Bu mutasyonlar, kansere bağlı genlerdeki mutasyonlara (örn., P53) ek olarak epigenetik regülasyonda yer alan genlerdeki mutasyonlar (örn., TET2, ASXL1, DNMT3A, EZH2, IDH1/2) [181], sinyal transdüksiyon genlerindeki mutasyonlar (RAS genleri) [182] ve RNA ekleme (SRSF2, SF3B1, U2AF1) [183] mutasyonlarını içerir. Toplam mutasyon sayısı, hayatta kalma süresi ve MPN'de lösemik dönüşüm oluşma ihtimali ile ters orantılıdır.

KML patogenezinde önemli bir rol oynayan BCR/ABL1 füzyon geni, hiperproliferatif ve anti-apoptotik mekanizmalar aracılığı ile anormal hematopoeze neden olur. Bu tek mutasyonun tanımlanması, aynı zamanda KML teşhisinin oluşturulması için tek moleküler gerekliliktir [184]. KML, kronik, akselere ve blast krizi olarak üç gruba ayrılmıştır [185]. Gruplar temel olarak kandaki veya kemik iliğindeki olgunlaşmamış blast sayısına bağlıdır. Blast krizi, miyeloid veya lenfoid gruplara gerçekleşebilir. Bu durum BCR/ABL1'in pluripotent kök hücrede geliştiği hipotezini destekler[186]. KML'li bireylerde lenfoid veya miyeloid blast krizinde olmalarına bağlı olarak mutasyon profillerinde farklılıklar oluşur. KML hastalarının genomik profil çalışmaları sonucunda aksele fazdan, blast fazına ilerleyen hastaların % 54'ünde ek olarak kanser gen varyantları (*ASXL1*, *IKZF1* ve *RUNX1*) olduğu görüldü. Bu durum da blast krizinin erken başlangıcını açıklar[187].

2.4.2.1. JAK2V617F ve Ekzon 12 Mutasyonları

JAK2 gen bölgesinde psödokinaz alanında oluşan nokta mutasyon, 617 pozisyonunda bulunan valinin fenilalanin (JAK2 V617F) ile yer değiştirmesine neden

olur. Oluşan bu mutasyon JAK2-V617F kinaz domain aktivasyonunun bir sonucu olarak STAT proteinleri, özellikle STAT5 ve STAT3, yapısal olarak aktive eder. JAK2-V617F'nin EpoR, TpoR veya G-CSFR'ye bağlanması PV, ET ve PMF'de etkilenen eritroid, megakaryositik ve granülositik soylarının genişlemesini uyardığı tahmin edilmektedir. Bu mutasyon MPN'lerin yaklaşık %70' inde bulunabilir. Bunlar %95 PV ve % 50 ila % 60 ET ve PMF şeklinde kendi içinde dağılır [188].

JAK2 hematopoietik gelişimde önemli bir rol oynarken, JAK2-V617F mutasyonu ekstramedüller hematopoezise neden olur [189]. Homozigot JAK2-V617F mutasyonu olan MPN hastalarında beyaz kan hücresi (WBC) sayıları önemli ölçüde artar ve splenomegali gelişir [190]. Ek olarak homozigot JAK2-V617F mutasyonu, miyelofibroz gelişme riski ile ilişkilendirilmiştir. Bu durum JAK2 WT alel kaybının MPN'nin şiddetine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir [191]. Homozigot JAK2-V617F mutant eritroid kolonileri hemen hemen tüm PV'li hastalarda bulunur, ancak ET'li hastalarda nadir olarak görülür [192]. JAK2-V617F mutasyonu varlığında eritrosit ve trombosit seviyelerinin artmasıyla kan viskozitesi artar ve trombotik komplikasyonlar oluşur. Bu durum kardiyovasküler hastalıkların oluşma riskini artırır [193]. Bu JAK2-V617F mutasyon ileri yaşta gelişen klonal hematopoezde sık görülür. Bununla birlikte bu mutasyon yenidoğan da dahil olmak üzere normal popülasyonda çok düşük seviyede (% 1'den düşük) tespit edilmiştir.

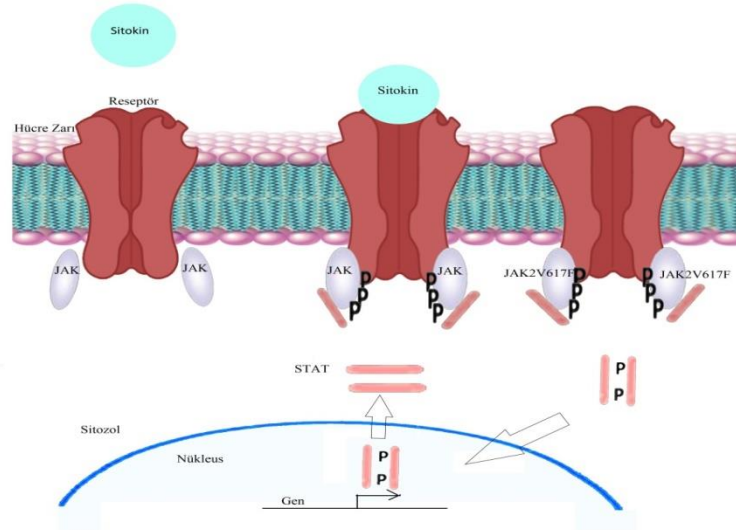
JAK2-V617F- negatif olan PV hastalarının %1-2 oranında JAK2 ekzon 12 mutasyonları görülür. JAK2 ekzon 12 mutasyonu SH2 bölgesinde 536 ile 547 amino asitleri arasındaki insersiyon ya da delesyonlar sonucu ortaya çıkan çerçeve kayması mutasyonudur. Bu mutasyon PV' de bulunurken ET ve PMF ile ilişkili değildir. Bu mutasyon PV'li sekonder MF' ye ilerleyebilir. En sık görülen mutasyonlar N542-E543del (% 23), E543-D544del (% 11) ve F537-K539delLL ve K539L (% 10)'dir. JAK2 ekson 12 mutasyonu olan hastalar genç yaşta daha belirgin eritrositoz gösterir. Bu durum artmış JAK2'nin polisitemik fenotipi teşvik ettiğini gösterir.

2.4.3. JAK-STAT yolağı

İnsanlarda 9p24 kromozomu üzerinde bulunan yaklaşık 1132 amino asitlik bir proteini kodlayan 25 ekzon içeren bölgeye Janus kinaz (JAK) geni denir. JAK'lar, bir N-terminal FERM-alanı, bir SH2 benzeri alan, psödokinaz alanı (JH2) ve JH1 alanlarından oluşur. FERM ve SH2 benzeri alanlar, JAK'ların reseptörleri ile etkileşime

girmesine aracılık eder. Ancak sitokin reseptöre bağlanana kadar katalitik olarak inaktiftir. JH2, kritik düzenleyici fonksiyonlara sahiptir ve hematopoietik malignite (JAK2 mutasyonları), lösemi ve lenfoma (tüm JAK'lar) ve kanser (JAK1, JAK3) gibi hastalıklarla ilgili mutasyonlar için kilit bir noktadır.

Memelilerde, JAK/STAT yolağı geniş bir sitokin dizisi ve büyüme faktörleri için sinyalleşme mekanizmasıdır (Şekil 2-3). JAK aktivasyonu hücre çoğalmasını, farklılaşmasını, hücre göçünü ve apoptozu uyarır. Bu hücrel olaylar hematopoez, immün gelişim, meme bezi gelişimi ve laktasyon, adipogenez, cinsel açıdan dimorfik büyüme ve diğer işlemler için kritiktir. JAK reseptörlerine interlökin, interferon ve büyüme faktörleri gibi sitokinler bağlanarak aktif hale gelir ve dimerize olurlar. Reseptör dimerizasyonu, iki JAK'ı birbirine yaklaştırarak fosforlanmasını sağlar ve fosforlanan JAK' lar STAT' ları aktive eder. Aktive olan STAT'lar da nükleusa geç ederek hedef genlerin aktivasyonunu sağlar.



Şekil 2-3: JAK-STAT yolağı

Sitokinler transmembran reseptörlerine bağlanarak, reseptör dimerizasyonunu gerçekleştirir. Bunun sonucunda serbest haldeki JAK proteinleri reseptöre bağlanarak fosforile olur ve STAT proteinlerinin bağlanması için uygun ortam oluştururlar. STAT'lar, JAK'lar tarafından fosfat bağlanarak aktifleştirilir ve dimer oluşturarak nükleusa geç ederler.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması, İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Araştırma Enstitüsü, Genetik Bölümü’nde bulunan laboratuvarlarda yapılmıştır.

3.1. Gereç

3.1.1. Deneyde kullanılan Hücre Tipleri

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Doğum Bölümü’nde çalışmaya katılmayı kabul eden 10 sağlıklı gönüllüden doğum sonrası kordon kanı toplandı. Toplanan kordon kanlarının çalışmada kullanılabilmesi için doğum öncesi gönüllülerden kendi rızaları ile onam formları imzalatılarak onam alındı.

Deneylerde kullanılmak üzere kordon kanından mononükleer hücre izolasyonu, ardından CD34⁺ hematopoetik kök hücre izolasyonu yapıldı. Transfeksiyon için MPN hasta grubuna özgü hücre hatları kullanıldı. *JAK2-V627F* mutasyonunu monoallel olarak taşıyan *HEL* (İnsan Eritrolösemi Hücre Hattı) hücre hatının serumu ve yabancı tip *JAK2* taşıyan hücre olarakta *HUVEC* (İnsan Umbilikal Ven Hücre Hattı) hücre hattı kullanıldı. BCR/ABL çalışmaları içinse *K562* (İnsan Kronik Miyeloid Lösemi Hücre Hattı) hücre hattı kullanıldı. Çalışmada kullanılan hücre çeşitleri Tablo 3-1’ de özetlenmiştir.

Tablo 3-1: Deneyde kullanılan Hücre Hatları

Hücre Hattı	Morfolojisi	Organizma	Hücre tipi	Kültür Özelliği	Mutasyon
<i>HEL</i>	Lenfoblast	<i>Homo Sapiens</i>	Eritroblast	Süspanse	<i>JAK2V617F</i> Biallelik
<i>K562</i>	Hematopoetik	<i>Homo Sapiens</i>	Eritroblast	Süspanse	<i>BCR/ ABL</i>

3.1.2. Deneyde kullanılan Kimyasal Maddeler, kitler ve cihazlar

Deneyde kullanılan kimyasal maddeler, kitler ve cihazlar Tablo 3-2, Tablo 3-3, Tablo 3-4’ de verilmiştir.

Tablo 3-2: Deneyde kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Firma
Agaroz	Sigma
IMDM (Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium)	Gibco
Etidyum Bromid	M.Biotech
Etil alkol	Merc
İzopropanol	Merc
DPBS (Fosfat Tampon Çözeltilisi)	Gibco
Fikol	GE Lifesciences
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco
Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)	Gibco
Steril, nükleaz içermeyen su	
Metilselüloz	Stemcell Technologies
50 bp Ladder	BioRad
Propidium Iodide	Glenthams
BSA	Gibco
EDTA	Gibco
CD34 PE (8G12) Antikor	BD Pharming
Rekombinant Human SCF Protein	Boster Biological Technology
Rekombinant Human IL-3 Protein	Boster Biological Technology
Rekombinant Human TPO Protein	Boster Biological Technology
Rekombinant Human Flt3- Ligand Protein	Boster Biological Technology

Tablo 3-3: Deneyde kullanılan kitler

Kit	Marka
CD34 microbead kit	MACs Miltenyi Biotec
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Pharmingen
BrdU Flow Kits	BD Pharmingen™
Quick-DNA Miniprep Plus Kit	Zymo Research
Extract-N-Amp Blood PCR Kits	Sigma
Q1Aseq cfDNA Extraction Kit	Qiagen

Tablo 3-4: Kullanılan cihazlar

Buzdolabı ve Derin Dondurucular (+4°C, -20°C, -80°C)	Samsung, Haier, Haier
Buz Makinası	Cornelius
Çeker ocak	Kermanlar
Otoklav	Kermanlar
Jel görüntüleme sistemi	UVP
Vorteks	Kermanlar
Otomatik Pipetler	Eppendorf
PZR Aleti	Bio-Rad T100, Thermo-Cycler
Elektroforez Aleti	Bio-Rad
Güç Kaynağı	E-C Apparatus Corporation
Distile Su Cihazı	Millipore
Masaüstü Mini Santrifüj	Beckman Coulter
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Coulter
Su Banyosu	Memmert
Laminer Akış Kabini	NUAIRE
Hücre Ayırım Ünitesi	FACS Aria Akım Sitometri Cihazı, BD Bioscience
Nanodrop 2000	Thermo Scientific
Mikroskop	Olympus
Hassas Terazı	Shimadzu

Mikrodalga Fırın	Arçelik
Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Cihazı	LightCycler 480 II - Roche

3.1.3. Kullanılan Tampon çözeltiler

% 70'lik Etil Alkol çözeltisi

- 70 ml Etil alkol
- Steril distile sudan 30 ml eklenerek 100 ml'lik % 70'lik etil alkol çözeltisi hazırlandı.

50 X TAE (Tris-Asetik asit-EDTA)

- Satın alınan 50X TAE solüsyonunu 1X TAE çevrildi.
- 50X TAE' den 490 ml
- Steril distile sudan 10 ml eklenerek 490 ml' lik 1X TAE çözeltisi hazırlandı.

Hücre yıkama Solusyonu (MACS)

- 500 ml PBS, % 0.5 (7.5 M) BSA, 2Mm (0.5M) EDTA çözeltileri 0,20 µm filtreli kap kullanılarak 500 ml MACS solüsyonu hazırlandı.

Propidoum Iodide Solüsyonu

- 10µl Propidoum iodide MACS solüsyonu ile 10 ml' ye tamamlandı.

Hücre Dondurma Solüsyonu

- Dondurma medyaları hazırlanır: %80 FBS (Fetal Bone Serum), %20 DMSO ve %80 IMDM, %20 FBS (Fetal Bone Serum) 1:1 oranında hazırlanarak 0,20 µm filtreli kullanılarak hazırlanır. Dondurma medyası ile hücreler buzda 20 dk inkübe edilir.

Hücre Çözdürme Solüsyonu

- %2 FBS (Fetal Calf Serum) ve IMDM 0,20 µm filter kullanılarak çözdürme solüsyonu hazırlanır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kordon kanından Mononükleer Hücre İzolasyonu

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Doğum Bölümü'nden toplanan 10 kordon kanı örneği (150 ml) fikel yardımı ile ayrıldı. Örnekler santrifüj yapılarak fikel- gradient ayrımı yapıldı ve mononükleer hücreler (MNH) toplandı. Toplanan

MNH'den CD34⁺ hücre izolasyonu yapıldı. Elde edilen hücreler belirlenen miktarlarda hücre hattı serumlarıyla muamele edilerek transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyon sonucunda bromo-deoksi uridi (BrdU), Annexin V, Metilselüloz hematopoietik progenitor deneyleri yapılarak belirlenen deney tasarımı gerçekleşmiş oldu. CD34⁺ hücrelerden artan hücreleri hücre dondurma protokolüne uygun olarak donduruldu.

1. Kan torbası içerisinde bulunan kordon kanı steril bir kabın içinde 1:1 oranında DPBS eklenerek dilue edilir.
2. 50 ml falkon içerisine serolojik pipet yardımı ile 15 mililitre (ml) fikal eklenir ve ardından yavaşça DPBS, kordon kanı karışımı eklenir.
3. Falkonlar 2000 rpm' de 30 dk 15° de ivmesi ve yavaşlaması en az hızda santrifüj yapılır.
4. Santrifüjden alınan örnekler de fikal- gradient ayrımı sonucu en üstte plazma, mononükleer hücre, fikal ve en alt kısımda eritrositlere ayrılır. Bu basamakta mononükleer hücreler 15 ml MACS bulunan falkonlarda toplanır.
5. 2500 rpm de 15 dakika(dk) maksimum hızda santrifüj yapılır.
6. Santrifüj sonrası falkonlarda bulunan supernatant uzaklaştırılarak pellet 10 ml MACS eklenir ve pipetaj veya vorteks yapılarak pellet çözülür. Birden fazla falkon var ise tek falkon kalana kadar birleştirilir.
7. 2500 rpm (Revelution Per Minute) de 15 dakika maksimum hızda santrifüj yapılır. Supernatant uzaklaştırılır ve 10 ml IMDM solüsyonunda çözülür.
8. IMDM'li solüsyonundaki hücrelerden uygun görülen miktarda seri dilüsyon yapılarak seyreltilir. 90 mikrolitre (µl) IMDM içerisine hücrelerden 10 µl eklenerek dilüsyonlar hazırlanır. Hazırlanan seyreltiden 10 µl alınarak 10 µl tripan mavisi ile karıştırılarak hemositometre ile sayım yapılır (Şekil 3-1).

$$\frac{\text{Hücre Sayısı}}{4} \times 10^4 \times 2 \times 10^{\text{dilüsyon katsayısı}} = \text{Hücre sayısı/ ml}$$

Şekil 3-1: Hemositometre formülü

Hücre sayımında ml'de kaç hücre olduğunu bulmak için kullanılan formüldür. Her 1mm kare içerisindeki ortalama hücre sayısı çarpı boyanın kat sayısı çarpı hemositometrenin kat sayısı (10⁴) çarpı dilüsyon katsayısı sonucu ml'deki hücre sayısı elde edilir.

3.2.2. Mononükleer hücreden CD34⁺ hücre izolasyonu

Elde edilen mononükleer hücrelerden CD34 microbead kiti kullanılarak CD34⁺ hücre izolasyonu yapıldı. Tüm izolasyon boyunca MACS buz içerisinde kalmalıdır.

1. Mononükleer hücreler 2000 rpm' de 5 dk santrifüj yapılır.
2. Santrifüj sonrası supernatant dökülür, pellet 300 µl MACS ile çözündürülür.
3. FCR blocking reagent kullanmadan önce ışık kapatılır ve 10⁸ hücreye kadar 100 µl FCR blocking reagent eklenir.
4. Karanlıkta devam edilir. 10⁸ hücreye kadar 100 µl CD34 microbeads eklenir ve iyicene karıştırılır, 30 dk boyunca buzda ve karanlıkta inkübe edilir.
5. İnkübasyon sonrasında hücrelere 5-10 ml MACs eklenir, alt üst yaparak karıştırılır.
6. 1500g' de 5 dakika santrifüj yapılır. Santrifüj sonrası supernatant atılır.
7. Pellet 500 µl MACS eklenerek çözündürülür.
8. Manyetik ayırma geçilir. LS kolon MACs separator deki manyetik alanına yerleştirilir. Kolonun altına bir toplama tübü yerleştirilir ve bu tüpte CD34⁺ hücreler toplanacaktır.
9. Kolonun filtresi öncelikle 3 ml MACs ile yıkanır ve tüm işlemlerde filtreden yerçekimi ile geçmesi beklenir.
10. Filtre yıkandıktan sonra 500 µl MACs içerisinde bulunan hücreler kolona aktarılır.
11. LS kolon 3 defa 3ml MACs ile yıkanır.
12. LS kolon manyetik seperatörden ayrılır ve yeni bir toplama tüpüne alınır. Filtreye 5 ml MACs eklenir ve hızlıca itilir. Bu işlemin sonucunda toplama tüpünde CD34⁺ hücreler izole edilmiş olur.
13. Elde edilen CD34⁺ hücreler ve CD34⁻ hücreler hemositometre yardımı ile sayılır.

14. Safılıklarını ölçmek içinde bir miktar CD34⁺ hücre ayrılarak flow analizi yapılır.

3.2.3. DNA İzolasyonu

Kordon kanından elde edilen CD34⁺ hücreler, K562 ve HEL hücre hatlarından elde edilen hücrelerden ‘Quick- DNA Miniprep Plus Kiti’ kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. İzolasyona başlamadan önce ‘DNA Elution Buffer’ 65 °C’de inkübe edilir.

1. Hücre kültüründe 24 kuyucuklu tabaklarda kültüre edilen hücreler ependorflara toplandı. 2000 g ‘de 5 dk santrifüj yapıldı. Üst sıvı mikropipet yardımı ile çekilir ve hücreler pellet haline getirilir. Hemen izolasyon yapılacaksa hücreler kit protokolünde belirtildiği 200 µl örnek olacak şekilde pellet halindeki hücrelere 200 µl PBS eklenir. İzolasyon hemen yapılmayacaksa pellet -20 °C’ de saklanır.
2. 200 µl örneğe 200 µl ‘Biofluid and Cell Buffer’ ve 20 µl ‘Proteinaz K’ eklenir. 10-15 sn vorteks yapılarak 55 °C’de 10 dakika inkübasyon yapılır.
3. 1:1 ‘Genomic Binding Buffer’ eklenir. 10- 15 saniye vortekslenir. Karışım ‘Zymospin 11C- XL Column’ aktarılır. 13.000 x g’ de 2 dakika santrifüj yapılır ve toplama tüpündeki sıvı atılır.
4. 400 µl ‘DNA Prewash Buffer’ spin kolona aktarılır. 13.000 x g’ de 2 dakika santrifüj yapılır ve toplama tüpündeki sıvı atılır.
5. 700 µl ‘gDNA Wash Buffer’ kolona eklenir. 13.000 x g’ de 2 dakika santrifüj yapılır ve toplama tüpündeki sıvı atılır.
6. 200 µl ‘gDNA Wash Buffer’ kolona eklenir. 13.000 x g’ de 2 dakika santrifüj yapılır ve toplama tüpündeki sıvı atılır.
7. ‘Zymospin 11C- XL Column’ yeni bir ependorfa geçirilir. 60 µl ‘DNA Elution Buffer’ kolona eklenir. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir. Maksimum hızda 1 dakika santrifüj yapılır. Bu basamak tekrar 60 µl ‘DNA Elution Buffer’ kullanılarak tekrar edilebilir.

Elde edilen DNA uzun süreli saklanmak üzere -20 °C kaldırılır.

3.2.4. Bromodeoksi Uridin (BrdU) ile Hücre Proliferasyon Analizi

CD34⁺ hücreler 120 µl HEL ve 120 µl K562 serumu ile 48 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin proliferasyon analizi için ‘Bromodeoxyuridine / 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) Flow Kiti’ kullanıldı. İzlenen basamaklar aşağıda belirtildiği gibidir.

BrdU etiketleme

1. Transfekte edilen hücreler ve kontrol hücrelerini *in vitro* etiketlemek için 10 µl BrdU solüsyonu direk olarak hücre medyasına eklendi. (1ml besiyeri için 10 µl BrdU solüsyonu)
2. Hücre grubuna göre inkübasyon süresi değişmektedir. CD34⁺ hücreleri 1 saat boyunca 37°C’ de etüvde inkübe edildi.

BrdU boyama

1. CD34⁺ hücreler ‘Cell Dissociation Buffer’ kullanılarak kaldırıldı ve flow tüpünde toplandı. 300 x g’ de 5 dakika santrifüj yapılarak hücreler pellet haline getirildi.
2. 100 µl ‘BD Cytotfix/ Cytoperm Buffer’ ile hücreler çözüldü.
 - 15- 30 dakika oda sıcaklığında hücreler inkübe edildi.
 - İnkübasyon sonrası hücrelere 1ml 1 X ‘BD Perm- Wash Buffer’ eklenerek yıkandı.
 - 5 dakika 300 x g’ de santrifüj yapıldı. Üst sıvı atıldı.
3. 100 µl ‘BD Cytoperm Permeabilization Buffer’ ile hücreler çözüldü.
 - 10 dakika buzda hücreler inkübe edildi.
 - İnkübasyon sonrası hücrelere 1ml 1 X ‘BD Perm- Wash Buffer’ eklenerek yıkandı.
 - 5 dakika 300 x g’ de santrifüj yapıldı. Üst sıvı atıldı.
4. 100 µl ‘BD Cytotfix/ Cytoperm Buffer’ ile hücreler çözüldü.

- 5 dakika oda sıcaklığında hücreler inkübe edildi.
 - İnkübasyon sonrası hücrelere 1ml 1 X 'BD Perm- Wash Buffer' eklenerek yıkandı.
 - 5 dakika 300 x g' de santrifüj yapıldı. Üst sıvı atıldı.
5. Hücrelere 100 µl DNaz solüsyonu ile çözüldü.
- 37°C' de hücreler 1 saat inkübe edildi.
 - İnkübasyon sonrası hücrelere 1ml 1 X 'BD Perm- Wash Buffer' eklenerek yıkandı.
 - 5 dakika 300 x g' de santrifüj yapıldı. Üst sıvı atıldı.
6. 50µl 'anti-BrdU solüsyonu' içinde hücreler çözüldü.
- Hücreler 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
 - İnkübasyon sonrası hücrelere 1ml 1 X 'BD Perm- Wash Buffer' eklenerek yıkandı.
 - 5 dakika 300 x g' de santrifüj yapıldı. Üst sıvı atıldı.
7. Hücreler 20 µl ' 7- AAD solüsyonunda' çözülür. (10^6 hücreye kadar 20 µl ' 7- AAD solüsyonu' kullanılabilir.)
8. Tüm örnekler 500 µl PBS eklenerek analize geçilir. Hemen analiz edilemeyecekse +4' de gece boyunca örnekler bırakılabilir.

3.2.5. Hücre Apoptoz Analizi

CD34⁺ hücreler 120 µl HEL ve 120 µl K562 serumu ile 48 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin apoptoz analizi için 'PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I' kullanıldı. İzlenilen basamaklar aşağıda belirtildiği gibidir.

1. İnkübasyon sonrası toplanan hücreler 2.000 x rpm de santrifüj yapıldı. Üst sıvı atıldı ve hücreler pellet haline getirildi.
2. Pellet halindeki hücrelere 100 µl '1X Binding Buffer' eklendi. (10^5 hücre/ ml)
3. 5 µl ' Annexin PE' ve 5 µl '7- AAD' eklendi. 5- 10 saniye vorteks yapılır.
4. 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.

5. 400 µl '1X Binding Buffer' eklendi. 1 saat içinde analiz yapıldı.

3.2.6. Akım Ölçer analizi

İzole edilen CD34⁺ kök hücreleri , CD34⁻ hücreler ve mononükleer hücrelerden bir miktar hücre alınarak saflık tayini yapılır, Tablo 3-5 de basamaklar anlatılmaktadır.

Tablo 3-5: Flow analizi için hücrelerin hazırlanması

	CD34 ⁺	CD34 ⁻	CD34 ⁻ boyasız	PMNC
Hücre eklenir	500 x 10 ³ hücre olacak şekilde hesaplanarak her hücre grubundan eklenir			
APC boya	10µl	10µl	-	-
MACs	1000µl	1000µl	-	-
1800 g' de 5 dk santrifüj				
PI+ MACs ekle	500µl	500µl	500µl	500µl

3.2.7. Transfeksiyon için Serum eldesi

HEL ve K562 hücre hatları kullanılır. Bu hücre hatlarının atılacak olan süpernatantları bizim transfeksiyon için kullanacağımız serumu oluşturur. Serum, hücreye ait her türlü hücre dışı materyali taşımaktadır. Kültür sırasında elde edilen serumlar ependorflara ayrılır ve transfeksiyon için kullanılmak üzere -80 ° C de saklanır ve bir kısımda DNA izolasyonu için ayrılır.

1-HEL ve K562 hücre hatları kültüre edilir.

2- Hücreler pasajlanmak için kaldırılır ve 15 ml'lik falkonlarda toplanır.

3- 2000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılır.

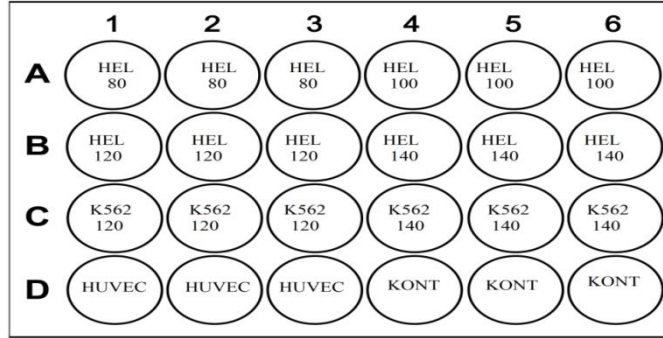
4- Santrifüj sonrası süpernatant başka bir falkona aktarılır. Süpernatant transfeksiyon için kullanacağımız serumu temsil eder.

5- Pellet hücrelere uygun besiyeri ile çözünür ve sayılarak T 75 flasklara ekim yapılır.

3.2.8. CD34⁺/CD34⁻ Hücrelerin Transfeksiyonu

CD34⁺ ve CD34⁻ hücre grupları HEL ve K562 hücre hattlarından elde edilen serumlar kullanılarak transfekte edildi (Şekil 3-2). Serumlardan farklı

konsantrasyonlarda (10 µl, 20 µl, 40 µl, 60 µl, 80 µl, 100 µl, 120 µl, 140 µl) kullanıldı. Transfeksiyon basamakları aşağıda belirtildiği gibidir.



Şekil 3-2: 24 kuyulu tabak hücre ekim planı

24 saat inkübe edilen CD34⁺ hücrelere belirlenen miktarlarda üçlü tekrarlar halinde HEL, K562, HUVEC hücre hatlarının serumu eklenir.

1. İzole edilen CD34⁺ hücreler 24 kuyulu tabağa her kuyuda 20×10^3 hücre olacak şekilde ekilir. Hazırlanan IMDM + %10 FBS besiyerinden totalde bir kuyuda 500 µl olacak şekilde medyadan eklenir.
2. Ekim işlemi gerçekleştirildikten sonra hücreler 24 saat 37 ° C de etüvde inkübe edilir.
3. 24 saat sonra hücrelere belirlenen kondisyonlar da üçlü tekrarlar halinde HEL ve K562 hücre hatlarından elde edilen serumlar eklenir, Şekil 5' de gösterilmektedir.
4. Hücre hatlarından elde edilen serum ile transfekte edilen CD34⁺ kök hücreler 48 saat 37 ° C de etüvde inkübe edilir.
5. 48 saat sonunda her kuyuda bulunan CD34⁺ kök hücrelere 200 µl hücre dissosiyasyon solüsyonu eklenir ve 5 dakika 37 ° C de inkübatörde inkübe edilir.
6. 5 dakikanın sonunda hücre dissosiyasyon solüsyonunu inhibe etmek için 1:1 oranında IMDM eklenir ve hücreler yıkama işlemi yapılarak ependorflarda toplanır.

7. CD34⁺/⁻ hücreler hemositometre yardımı ile sayılarak bir kısmı DNA izolasyonu için ayrılır, bir kısmı da ‘Colony- Forming Units’ (CFU) de kullanılmak üzere ayrılır.

3.2.9. Hematopoetik Progenitör Hücrelerin Metilselüloz Koloni Deneyleri

CFU, *in vitro* ortamda metilselüloz ve sitokin içeren medya kullanılarak 14 ile 16 gün boyunca kültüre edilen hematopoietik kök hücrelerin optimal büyümesi ve farklılaşmasının analiz edildiği bir sistemdir.

- Firmadan satın alınan MethoCult™ her falkon da 3 ml metilselüloz olacak şekilde ayrılarak -20° C de saklanır.
 - Flt-3, SCF, IL3 ve TPO sitokinler 50 µg olarak firmadan alındı. Flt-3 ve SCF’ nin son konsantrasyonu 2, 5 µg/ 100 µl, IL3 ve TPO’ nun son konsantrasyonu 5 µg/100 µl olmalıdır. %0,1 BSA ve dH₂O kullanılarak sitokinlerin son konsantrasyonları ayarlanır ve - 20° C’ de saklanır.
1. Deneye başlamadan önce belirlenen her koşul için bir adet 3ml’ lik metilselüloz oda sıcaklığında eriyene kadar bırakılır.
 2. %30 FBS içeren IMDM solüsyonu hazırlanır. Besiyeri içerisinde sitokinlerin son konsantrasyonu 100 ng/ ml olmalıdır. 1ml IMDM + %30 FBS içerisinde 2, 5 µg/ 100 µl olan Flt-3 ve SCF sitokinlerden 4 µl, 5 µg/100 µl olan IL-3 ve TPO sitokinlerden 2 µl eklenir.
 3. 24 kuyulu tabaktan toplanan CD34⁺ hücreler 2000 rpm’ de 5 dk santrifüj yapılır. Supernatant atılır ve pellet 1 ml IMDM ile çözülür ve sayım yapılır.
 4. Metilselüloz için her 35 mm tabak için 600 hücre olmalıdır.
 5. Hazırlanan %30 FBS içeren IMDM solüsyonu içerisine hücreler eklenir ve vorteks yapılır.
 6. Her 3 ml metilselüloz içerisine 1ml IMDM + %30 FBS+ hücre karışımı eklenir ve iyi bir şekilde karıştırmak önemli bir basamak. Karıştırdıktan sonra oluşan baloncukların tamamen ortadan kaybolması beklenir.
 7. Hazırlanan metilselülozlu karışım özel pipet yardımı ile toplanarak her tabakta 1 ml olacak şekilde 3 adet 35mm tabaklara dağıtılır.

8. Hazırlanan 35mm tabaklar daha büyük petri içerisinde yerleştirilir. Ortamın nemi için petri içersine 8 ml PBS eklenir. 37 ° C' de inkübatörde 10- 14 gün boyunca inkübe edilir.
9. Koloni sayımı için asetat kağıdına kareler çizilerek bir şablon oluşturulur ve her bir 35 mm tabak üzerine asetat kağıdı konulur, inverted mikroskop kullanılarak 40X objektif ile koloni sayımı yapılır. Koloniler tek tek mikroskop altında toplanır ve her koloniden DNA izolasyonu ve nested PZR yapılır.

3.2.10. İmmünofenotipleme

K562 serumu ile transfekte olan CD34⁺ ve CD34⁻ hücre kompartmanları 48 saat inkübe edildikten sonra immünofenotipleme yapıldı. İmmünofenotipleme için CD56+16 FITC, CD45 PE, CD3 FITC, CD19 Per-cyc5, CD14 PE, CD45 APC, CD8 PE, CD4 PE antikorları kombinasyonlar halinde eklendi.

- 1- CD34⁺ ve CD34⁻ hücre kompartmanları kültürden toplanır ve sayıma gidilir.
- 2- Her flow tüpünde 60.000 hücre olacak HKH'ler eklenir.
- 3- Boyalardan konsantrasyonlarına göre 10 µl- 5 µl eklenir.
- 4- Karanlıkta oda sıcaklığında 15-30 dk bekletilir.
- 5- 1 ml MACs eklenerek 1800 g'de santrifüj yapılır.
- 6- Supernatları atıldı. Pellete 500 µl MACs eklenerek akış sitometrede analiz yapılır.

3.2.11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

K562 serumu ile transfekte edilen CD34⁺ ve CD34⁻ hücrelerde transfeksiyon sonrası BCR/ABL gen varlığı araştırıldı.

- 1- Tüm örnekler için total PZR mix solüsyonu hazırlanır.Tablo 3-6'da kullanılan forward ve reverse primer dizileri gösterilmektedir. Forward ve reverse primerlerden 1µl, PZR solüsyonundan 10 µl, steril sudan 6 µl eklenerek hazırlanır.
- 2- Her PZR tüpüne hazırlanan mix'den 18 µl eklenir.
- 3- Örneklerden 2 µl DNA ekleyerek PZR analizi yapılır.
- 4- PZR döngüsü 40 cycle olup PZR basamakları tablo 3-7'de gösterilmektedir.

Tablo 3-6: BCR/ABL geni için primer seti

Primer (Forward)	5'-TCCACTCAGCCACTGGATTTAAGCA -3'
Primer (Reverse)	5'-GGTGAATTGGAAAGAAGCAGCAGGT -3'

Tablo 3-7: BCR/ABL PZR basamakları

94° C	5 dakika
94° C	30 saniye
58° C	45 saniye
72° C	45 saniye
6° C	∞

3.2.12. Allel spesifik Nested- PZR

HEL serumu ile transfekte edilen HKH'lerden izole edilen DNA'larda allel düzeyinde JAK2V617F mutasyon tespiti için iki aşamalı allel spesifik nested- PZR yapıldı. Nested- PZR' da kullanılan primerler JAK2V617F mutasyonuna spesifik olarak tasarlanmıştır. İki aşamalı olan PZR' da ilk primer seti hedef gen bölgesinin dışından bağlanarak daha büyük parçaları çoğaltır. İkinci primer seti ise sadece mutasyonu içeren hedef gen bölgesini çoğaltır. Agaroz jel elektroforez analizi ilk primer seti sonucu elde edilen DNA parçalarının uzunluğu 512 bazdır. İkinci primer seti sonucu 279 bp'lık JAK2V617F ve 229 bp'lık JAK2 WT elde edilir.

Allel spesifik nested- PZR deney protokolü:

1. PZR' da kullanılan primerler, sigma mix solüsyonu ve örnekler -20° C'de saklanır. Tüm örnekler ve PZR solüsyonları buz içerisinde tutularak çalışma yapılmalıdır.
2. Tüm örnekler için total bir PZR karışımı hazırlanır. Her bir PZR tüpüne 18 µl olacak şekilde dağıtılır. Bu basamak hem 1. aşama için hemde 2.aşama için tekrarlanır(Tablo 3-8).

Tablo 3-8: Allel spesifik nested PZR 1. Aşama ve 2. Aşama bileşenleri

Nested- PZR	1.Aşama(20 µl)	Nested- PZR	2. Aşama (20 µl)
Primer 1 (Forward)	1µl	Primer 3 (Forward)	0,8 µl
Primer 2 (Reverse)	1µl	Primer 4 (Reverse)	0,8 µl
Sigma PZR Mix	10µl	Primer 5 (Forward)	0,8 µl
dH2O	6µl	Primer 6 (Reverse)	0,8 µl
DNA	2µl	Sigma PZR Mix	10 µl
		dH2O	4,8 µl
		DNA	2 µl

3. PZR tüplerine 18 µl karışımdan eklendikten sonra her birine 2 µl DNA eklenir. Deneyde negatif kontrol olarak belirlenen örneğe 2 µl steril su eklenir.
4. Nested PZR reaksiyonu 35 döngüden oluşmaktadır. Reaksiyon basamakları Tablo 3-9’ da gösterilmektedir.

Tablo 3-9: Allel spesifik Nested PZR reaksiyon basamakları

1. Aşama		2. Aşama	
94° C	1 dakika	94° C	1 dakika
95° C	30 saniye	95° C	30 saniye
60° C	30 saniye	59° C	25 saniye
72° C	30 saniye	72° C	25 saniye
72° C	2 dakika	72° C	2 dakika
6° C	∞	6° C	∞

5. 1. aşama ve 2. aşamada kullanılan primer setleri Tablo 3-10’ da gösterilmektedir. 2. aşama primerlerinde Primer 3 ve Primer 4 mutasyona özgü spesifik primelerdir. Primer 5 ve Primer 6 WT özgü primer setleridir.

Tablo 3-10: JAK2 WT ve JAK2V617F mutasyonu primer setleri**1. Aşama Primer setleri**

Primer 1 (Forward)	5'-GATCTCCATATTCCAGGCTTACACA-3'
Primer 2 (Reverse)	5'-TATTGTTTGGGCATTGTAACCTTCT-3'

2. Aşama Primer setleri

Primer 3 (Forward)	5'-CCTCAGAACGTTGATGGCA-3'
Primer 4 (Reverse)	5'-ATTGCTTTCCTTTTTCACAAGA-3'
Primer 5 (Forward)	5'-AGCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATATG-3'
Primer 6 (Reverse)	5'-GTTTTACTTACTCTCGTCTCCACAAAA-3'

6. PZR'da 1. aşama bittikten sonra 2. aşamada 1. Aşamadan çıkan örnekler 1/ 40

oranında dilue edilerek kullanılır. Her aşamanın kendine ait negatif kontrolü vardır. Burada da aynı şekilde 2. Aşamının negatif kontrolüne de 2 µl distile su eklenir.

3.2.13. Agaroz Jel

Agaroz jelin hazırlanması:

%2 lik agaroz jel hazırlanır. Bunun için 1gr agaroz jel ve 1X TAE çözeltisinden 50 ml eklenir. Hazırlanan karışım tamamen çözünmesi için karıştırılır ve mikrodalga fırında ısıtılır. Karışımın içerisine 3 µl Etidyum bromür eklenir. Karışım uygun tarakların yerleştirildiği kasete dökülür ve donması beklenir.

Agaroz jelin yüklenmesi:

Jel donduktan sonra taraklar çıkartılır. Jel kaseti tankın içerisine alınarak 1X TAE tamponu eklenir. Nested PZR sonucu elde edilen örnekler 6,5 µl alınarak 2,5 µl yürütme boyası (loading dye) ile karıştırılır ve jelde uygun olan kuyucuklara yüklenir. En son jelde bant boyutlarının ayrımı yapabilmek için marker yüklenir. 75 voltta 40- 45 dakika arasında yürütülür ve UV altında bant analizi yapılır.

4. BULGULAR

Çalışmada JAK2-V617F mutasyonunu biallelik olarak taşıdığı bilinen HEL hücre hattı ve BCR/ABL pozitif hücre hattı olan K562 kullanıldı. Farklı saatlerde kültüre edilen hücre hatların besiyerleri toplanarak santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası oluşan süpernantlar toplandı. Hücre hatlarından elde edilen süpernantlar bu tez çalışmasında serum olarak adlandırılmaktadır. Sağlıklı kordon kanlarından toplanan CD34⁺ ve CD34⁻ hücreler HEL ve K562 serumu kullanılarak *in vitro* olarak transfeke edildi. Transfeksiyon sonrası CD34⁺ ve CD34⁻ hücreler JAK2-V617F mutasyonu ve BCR/ABL pozitiflikleri PZR yapılarak analiz edildi. Transfeke olan HKH'ler fonksiyonel olarak; hücre döngüsü, apoptoz, koloni oluşturma birim (CFU) ve immüohistokimyasal boyama yapılarak analiz edildi. Bu sayede hematolojik kanserlerde sağlıklı kök hücrelerin kanserli kök hücreye nasıl dönüştüğü hücre-hücre iletişimleri gözlemlendi.

4.1. Kordon kanından CD34⁺ hücre izolasyonu

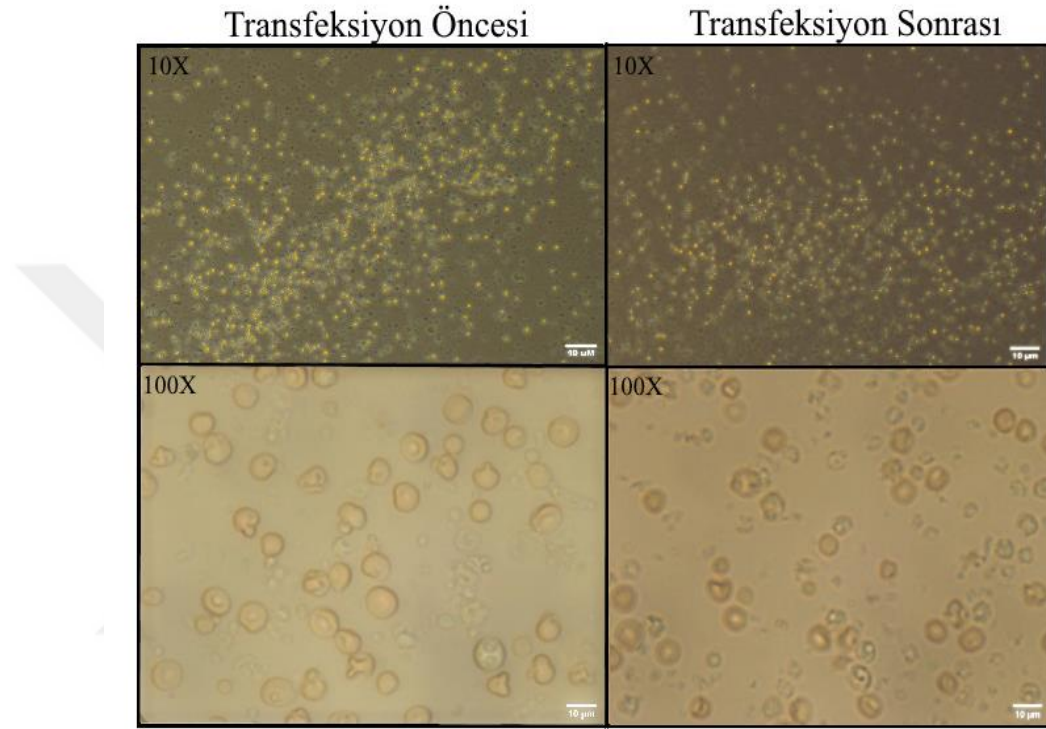
Sağlıklı bireylerden toplanan kordon kanlarından mononükleer hücre izolasyonu yapıldı. Ardından MACS manyetik kolon ayrımı kullanılarak CD34⁺ ve CD34⁻ hücreler izole edildi. Hücre canlılığı, CD34 hücre saflığı ve karakterizasyonu tespiti için, APC anti- human CD34 antikoru kullanıldı ve akım ölçerde %80 olarak belirlendi.

4.2. CD34⁺ hücrelerin Transfeksiyonu

CD34⁺ hücrelerin HEL serumu kullanılarak transfeksiyon deneyleri yapıldı. Transfeksiyon için uygun HEL serum konsantrasyonu belirlendi. Farklı konsantrasyonlarda ve farklı zamanlarda toplanan serumlar ile CD34⁺ hücreleri transfeke edildi. Bunun yanı sıra HEL serumu ile transfeke olan CD34⁺ hücreler farklı sürelerde inkübe edilerek, inkübasyon sürelerinin transfeksiyon üzerinde etkisi olup olmadığı araştırıldı.

CD34⁺ hücreler izole edildikten sonra 96 kuyucuklu tabaklara ekildi ve 24 saat inkübe edildi. 96 saat ve 72 saat kültür sonucu elde edilen HEL serumlarından farklı konsantrasyonlarda (20 ul, 40 ul, 60 ul, 80 ul, 100 ul, 120 ul) kullanılarak hücreler transfeke edildi. Transfeksiyon süresi 24 saat ve 48 saat olarak belirlendi. Olympus CKX41 inverted mikroskop yardımı ile farklı objektiflerde CD34⁺ hücrelerin

transfeksiyon öncesi ve sonrası görüntüleri kaydedildi (Şekil 4-1). Transfeksiyon öncesi ve transfeksiyondan 48 saat sonra elde edilen mikroskop görüntüleri gözlemlendiği zaman, transfeksiyon öncesi hücreler bulundukları kuyunun tüm yüzeyini kapladı. HEL serumu eklendikten 48 saat sonra transfekte olan hücreler, serumun verildiği bölgeye toplanarak koloniler oluşturduğu gözlemlendi.

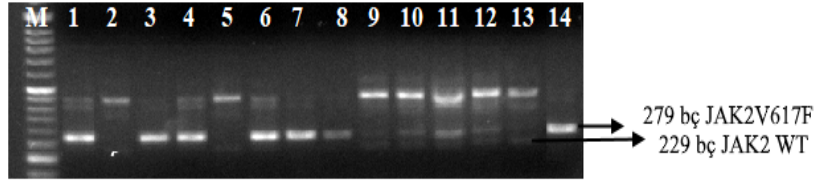


Şekil 4-1: CD34⁺ hücrelerin HEL serumu ile transfeksiyon öncesi ve transfeksiyon sonrası görüntüsü

HEL serumu eklendikten sonra 48 saat transfekte olan CD34⁺ kök hücreler kültüre edilir. Transfeksiyon öncesi hücreler ile transfeksiyon sonrası hücreler kıyaslandığı zaman hücreler daha çok bir araya gelerek koloni oluşturmuşlardır.

4.2.1. Transfekte hücrelerde JAK2V617F mutasyon tespiti

Transfekte olan CD34⁺ kök hücrelerden elde edilen DNA'lar, iki aşamalı allel spesifik nested- PZR kullanılarak JAK2V617F mutasyonu analiz sonuçları yapılmıştır. PZR sonuçları Şekil 4-2, Şekil 4-3, Şekil 4-4'de gösterilmektedir. İki aşamalı PZR' da pozitif kontroller: JAK2V617F mutasyonu taşıdığı bilinen biallellik karakterde olan HEL hücre hattı, mutasyonu taşımayan HUVEC hücre hattı ve K562 hücre hattı kullanıldı. Negatif kontrol olarak steril su kullanıldı. %2'lik agaroz jelde JAK2V617F mutasyonu taşıyan hücrelerin bant uzunluğu 279 bp ve JAK2 yabanil tip olan hücrelerin bant uzunluğu ise 229 bp'dir.

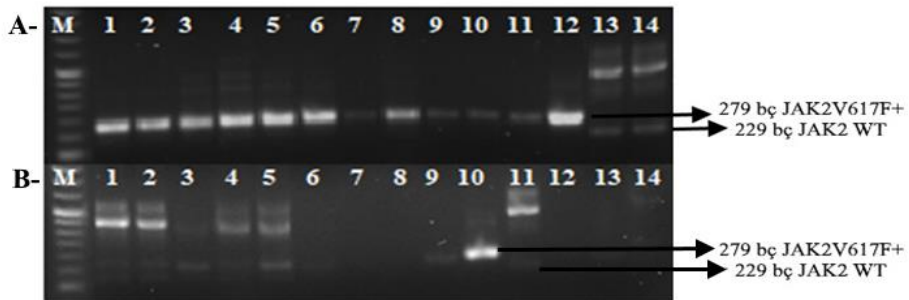


Şekil 4-2: 24 saat boyunca HEL serum muamelesi yapılan CD34⁺ ve CD34⁻ hücrelerin agaroz jel görüntüsü

96 saat ve 72 saat kültür sonucu elde edilen HEL serumu 20 µl ve 40µl hacimlerde kullanılarak hücreler transfeke edilmiştir. 50 bç uzunluğunda markır kullanılmıştır.

1-2: CD34 ⁺ 72h HEL serum 20 µl	3-4: CD34 ⁺ 72h HEL serum 40 µl	5-6 :CD34 ⁺ 96h HEL serum 20 µl	7- 8: CD34 ⁺ 96h HEL serum 40 µl	9-CD34 ⁻ 96h HEL serum 20 µl,
10- 72h HEL serum 20 µl 10-CD34 ⁻	11- 12:CD34 ⁻ 72h HEL serum 40 µl	13-HUVEC Kontrol	14-HEL Kontrol	

CD34⁺ ve CD34⁻ hücre kompartmanlarında 72h ve 96h HEL serumu kullanılarak yapılan transfeksiyon başarıyla gerçekleşmiştir. 1, 3, 4, 6, 7 ve 8 numaralı örnekler JAK2V617F biallelik mutasyon taşıırken 9, 10, 11 ve 12 numaralı örnekler monoalleliktir. 2 ve 5 numaralı örnek ise yabancı tip allel taşımaktadır. Örnekler ikili tekrarlar halinde çalışılmıştır. 1,2 ve 5,6 aynı örneklerdir. 1. ve 6. örnekler transfeke görülmektedir. Ancak 2. ve 5. örneklerin bantları net olarak görülmemektedir. Bu yüzden de transfeksiyonları için kesin bir yorum yapılamamaktadır. (Şekil 4-2).



Şekil 4-3: 48 saat boyunca HEL serum ile muamele yapılan CD34⁺ ve CD34⁻ hücrelerin agaroz jel görüntüsü.

96 saat ve 72 saat kültür sonucu elde edilen HEL serumu 20 µl ve 40µl hacimlerde kullanılarak hücreler transfekte edilmiştir. Analiz için 50 bç uzunluğunda markır kullanılmıştır. Örneklerden 1-5 arasındakiler JAK2 yabanil tipi taşımaktadır..

A-

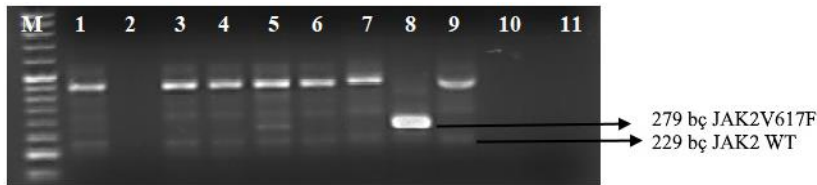
1-2: CD34 ⁺ 72h HEL serum 20 µl	3-4: CD34 ⁺ 72h HEL serum 40 µl	5-6:CD34 ⁺ 96h HEL serum 20 µl	7-8: CD34 ⁺ 96h HEL serum 40 µl	9-CD34 ⁺ 96h HEL serum 20 µl
10-CD34 ⁻ 72h HEL serum 20 µl	11- CD34 ⁻ 72h HEL serum 40 µl	12-HEL kontrol	13-HUVEC kontrol	14-K562 kontrol

B-

1-2: CD34 ⁻ 72h HEL serum 40 µl	3-4: CD34 ⁻ 96h HEL serum 20 µl	5-6: CD34 ⁻ 96h HEL serum 40 µl	7-8: CD34 ⁺ Kontrol	9-10: HEL kontrol
11- HUVEC kontrol	12-K562 kontrol	13-Negatif 1 kontrol	14-Negatif 2 kontrol	

CD34^{+/+} hücre kompartmanlarında yapılan transfeksiyon sonuçları: Şekil 4-3 deki A bölümünde bulunan agaroz jel görüntüsündeki tüm örnekler JAK2V617F mutasyonunu biallelik olarak taşımaktadır. B bölümündeki agaroz jel görüntüsündeki CD34⁻ hücrelerinin 1 ile 5 arasındaki tüm örnekler yabancı tip allel taşımaktadır. 24 saat ve 48 saat HEL besiyeri ile transfekte edilen CD34^{+/+} hücreler karşılaştırıldığı zaman 24 saat inkübasyonun sonucunda monoallelik JAK2V617F mutasyonu taşıyan örnekler 48 saat inkübasyon sonra JAK2V617F mutasyonu bakımından biallelik olarak görülmektedir.

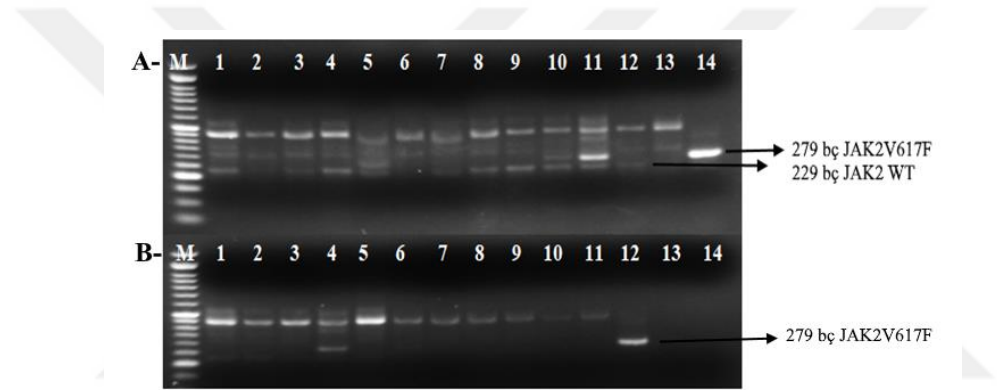
CD34⁺ hücre kompartmanlarında farklı konsantrasyonlarda 96 saat ve 72 saat kültüre edilmiş HEL serumu eklenerek 24 saat ve 48 saat sonunda transfeksiyon gerçekleşmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak sağlıklı kordon kanından izole edilen mononükleer hücrelerde de 96 saat HEL serumu farklı konsantrasyonlarda kullanılarak transfeksiyon yapılmıştır.



Şekil 4-4: 24 saat boyunca HEL serum ile muamelesi yapılan mononükleer hücrelerin agaroz jel görüntüsü.

1-2-3: CD34 ⁺ 96h HEL serum 40 µl	4-5-6: CD34 ⁺ 96h HEL serum 60 µl	7-HUVEC kontrol	8-HEL kontrol	9-K562 kontrol
10-Negatif 1 Kontrol	11- Negatif 2 kontrol			

24 saat HEL serumu ile inkübe edilen mononükleer hücrelerin 1, 2, 3, 4, 6 örnekleri transfekte olmamıştır. 5. örnek JAK2V617F mutasyonu biallelik olarak görülmektedir. Örnekler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. 4, 5, 6 numaralı örnekler aynı miktarda HEL serumu (60 ul) ile transfekte olmalarına rağmen transfeksiyon sonuçları arasında farklılıklar görülmektedir (Şekil 4-4).



Şekil 4-5: 48h saat boyunca 96 saat kültür edilmiş HEL serumu ile muamelesi yapılan mononükleer hücrelerin JAK2V617F mutasyonunun incelenmesi.

A-

1-2-3:96h HEL serum 40 µl	4-5-6:96h HEL serum 90 µl	7-8-9: 96h HEL serum 60 µl	10-11-12:96h HEL serum 100 µl
13-HUVEC Kontrol	14- HEL Kontrol		

B-

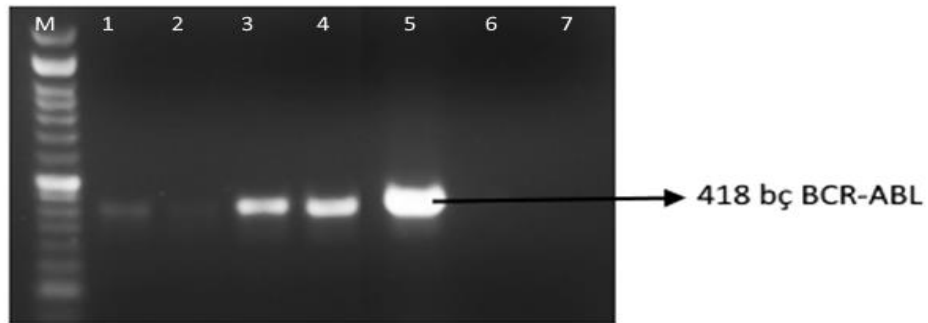
1-2-3:96h HEL serum 80 µl	4-5-6:96h HEL serum 120 µl	7-8-9: MPN Hasta serum 100 µl	10-MNC Kontrol
11-K562 Kontrol	12-HEL Kontrol	13-Negatif 1 Kontrol	14- Negatif 2 Kontrol

48 saat HEL serumu ile inkübe edilen mononükleer hücrelerden A sırasında bulunan 5,10,11 örnekler JAK2V617F mutasyonu bakımından monoallelik olarak görülmektedir. 1,2,3,4,6,7,8,9, örnekler ise yabani tip olarak görülmektedir. B kısımdaki agaroz jelde örneklerin bantları çok net değil ancak 4. örnek JAK2V617F mutasyonu taşımaktadır(Şekil 4-5).

MNH, CD34⁺, CD34⁺ hücre kompartmanlarında HEL serumu ile transfeksiyon sonucu JAK2V617F mutasyonu varlığı görülmektedir. Bu durum hücre hatlarından elde edilen serumların içerisinde HKH'leri uyaran aktive edici sinyaller içeren mutasyonların varlığının göstergesidir. Elde edilen veriler sonucunda transfeksiyon için belirlenen en uygun koşul 72/96 sa kültüre edilmiş HEL serumundan 120 ul konsantrasyonda kullanılması ve hücrelerin 48 saat serum ile muamele edilmesidir.

4.2.2. Transfekte hücrelerde BCR/ABL1 tespiti

HKH'lerde BCR/ABL 1 transfeksiyonu için K562 hücre hattından elde edilen serum kullanılarak yapıldı. BCR / ABL1 pozitif hücrelerden salınan BCR / ABL1 füzyon geni hdGM içerisinde yer alabilir, salındığı hücreden bağımsız olarak başka bir hücreye aktarılabilir. BCR / ABL1 füzyon geni (418 bç) JAK2V617F mutasyonundan (279 bç) daha büyük parça uzunluğuna sahiptir. Büyük parça uzunluğuna sahip olan genleri içeren serum kullanılarak HKH'ler transfekte olabilir mi sorusunu araştırdık. Transfeksiyon için BCR / ABL1 pozitif olan K562 hücre hattının 72 saat kültürü sonucu elde edilmiş serum farklı konsantrasyonlarda (100 ul ve 140 ul) kullanılarak CD34⁺ hücre kompartmanları 48 ve 96 saat boyunca serum ile muamele edildi. 48sa ve 96 sa inkübasyon sonucu CD34⁺ hücreler BCR / ABL1 pozitif olarak görülmektedir(Şekil 4-6).



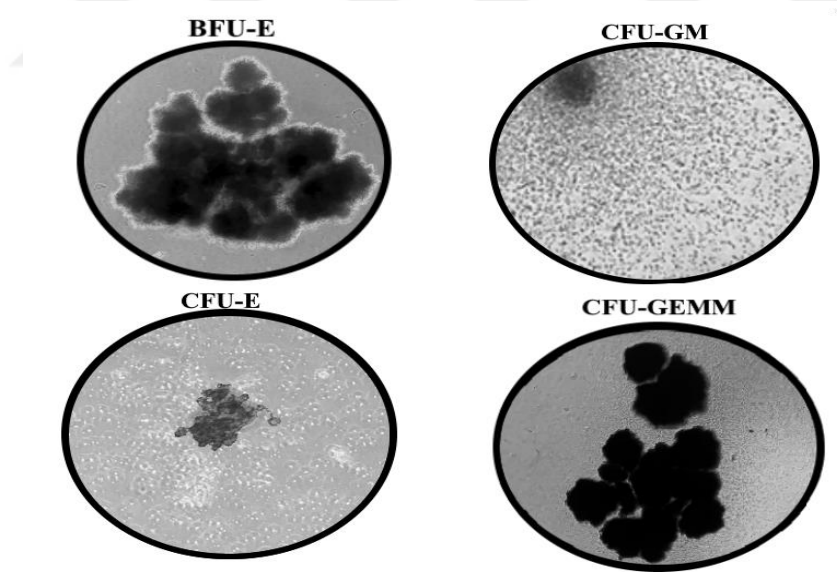
Şekil 4-6: 48 saat ve 96 saat boyunca K562 serumu ile muamele edilen CD34⁺ hücrelerin analizi.

1- 48sa CD34 ⁺ 100 µl K562	3- 96sa CD34 ⁺ 100 µl K562	5- K562 Kontrol	7- Negatif kontrol
2-48sa CD34 ⁺ 140 µl K562	4- 96sa CD34 ⁺ 140 µl K562	6- HUVEC Kontrol	

CD34⁺ hücre kompartmanları JAK2V617F mutasyonu taşımaları bakımından değerlendirildiği zaman transfeksiyon için en uygun koşul 72h/ 96h HEL serumu 120 ul konsantrasyon ile 48 saat inkübe edilmesi olarak belirlendi.

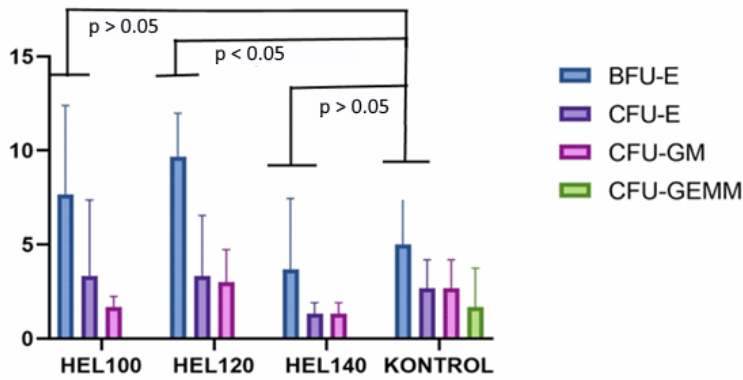
4.3. Metilselüloz Hematopoietik Progenitör Hücre Koloni Deneyleri

Transfekte olan CD34⁺ hücre kompartmanları yarı katı metilselüloz bazlı bir ortamda IL-3, TPO, Flt-3, SCF gibi sitokinler eklenerek hematopoietik progenitör hücrelerin farklılaşmaları için ortam hazırlandı. 10 ila 12 gün kültüre edildikten sonra Olympus CKX41 inverted mikroskop yardımı ile BFU-E, CFU-E, CFU-GM ve CFU-GEMM kolonilerin sayımı yapıldı ve toplandı (Şekil 4-7).



Şekil 4-7: Hematopoietik progenitörlerin oluşturduğu koloniler

Toplanan kolonilerin analizleri için GraphPad istatistiksel programı kullanıldı[194]. Kolonilerin ortalamaları ve standart sapma değerleri hesaplanarak şekil 4-8 deki grafik elde edildi. Şekil 4-8' e göre BFU-E, CFU-GM kolonileri en fazla HEL 120 besiyeri ile enfekte olan grupta görülmektedir. CFU-E kolonileri HEL120 ile HEL100 transfekte olan gruplarda aynı oranlarda görülmektedir. CFU-GEMM kolonileri sadece kontrol grubunda görülmüştür. Kontrol grubu ile transfekte edilen CD34⁺ hücreler kıyaslandığı zaman en anlamlı artış $p < 0,05$ olarak BFU-E koloni grubundadır.

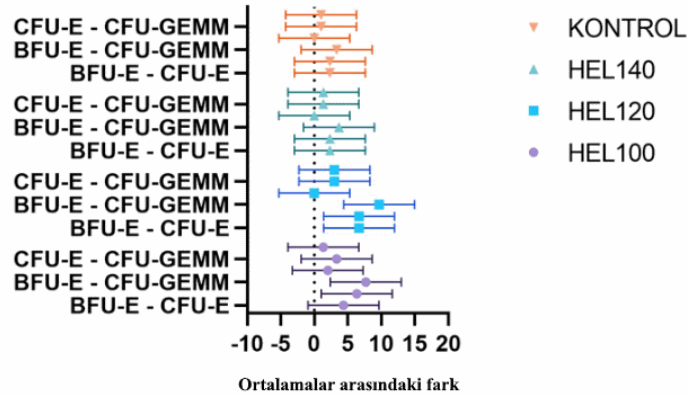


Şekil 4-8: HEL serumu ile transfekte olan CD34⁺ hücrelerden elde edilem koloni sayıları

Grafikteki veriler kolonilerin ortalamaları ve standart sapma değerleri hesaplanarak gösterilmiştir. HEL serumu kullanılarak 100 µl , 120 µl ve 140 µl eklenerek HKH'ler transfekte edilmiştir. HEL 100 olan grup 100 µl HEL serumu, HEL 120 grubu 120 µl HEL serumu, HEL 140 ise 140 µl HEL serumu eklenmiştir. Kontrol grubuna ise sadece IMDM besiyeri eklenmiştir.

Koloniler arasındaki farklılıkları değerlendirmek için bir istatistiksel yöntem olan 'tek yönlü Anova testi' kullanıldı. Analiz sonucu elde edilen $p < 0,05$ olup istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmektedir. Kolonilerin arasında farkı araştırmak içinde Tukey testi kullanıldı. HEL120 olan örneğin BFU-E kolonilerinin CFU-E ($p < 0,05$) , CFU-GM ($p < 0,05$), CFU- GEMM ($p < 0,001$) kolonileri ile karşılaştırmalarına bakıldığında koloniler arasında fark olduğu görülmektedir. HEL 100 olan örneğin ise BFU-E kolonilerinin CFU-GM ($p < 0,05$), CFU- GEMM ($p < 0,05$) kolonileri ile karşılaştırmaları arasında anlamlı fark tespit edilmiştir (Şekil 4-9).

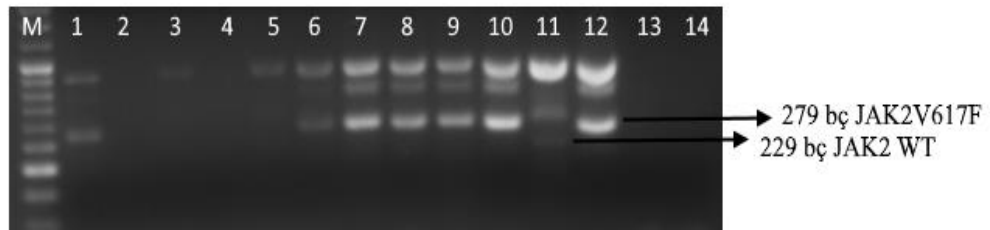
%95 Güven Aralığı (Tukey)



Şekil 4-9: Koloni verilerini Tukey testi kullanılarak ikili karşılaştırmalarının grafiksel gösterimi.

0 içermeyen güven aralıkları gruplarda bir fark olduğuna dair kanıt sağlar. Fark olan koloniler için $p < 0,001$ 'dır.

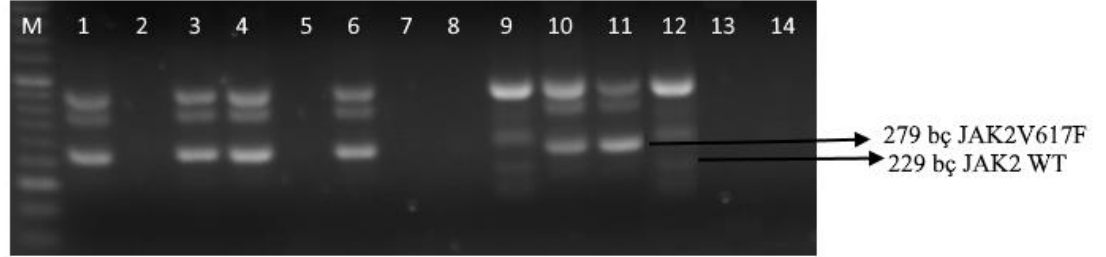
Farklı konsantrasyonda HEL serumu ile transfekte olan $CD34^+$ hücre kompartmanlarının kültürü sonucu elde edilen kolonilerin her biri ayrı ayrı PZR tüplerinde toplandı. Toplanan kolonilerden DNA izolasyonu yapıldı. Kolonilerden elde edilen DNA'larda JAK2V617F mutasyonu varlığını tespit etmek için nested PZR yapıldı. Şekil 4-10 daki agaroz jel sonucuna göre CFU-E kolonisi olan 6, 7, 9 ve 10. örnekler ve BFU-E kolonisi olan 8. örnek biallelik olarak JAK2V617F mutasyonunu taşımaktadır.



Şekil 4-10: 48 saat boyunca HEL serum muamelesi yapılan $CD34^+$ hücrelerin koloni sonuçları

1-100 μ l CFU-E	2-100 μ l CFU-E	3-100 μ l CFU-E	4-100 μ l CFU-E	5-100 μ l BFU-E
6-100 μ l CFU-E	7-100 μ l CFU-E	8-100 μ l BFU-E	9-100 μ l CFU-E	10-120 μ l CFU-E
11-HUVEC Kontrol	12- HEL Kontrol	13- Negatif 1 kontrol	14- Negatif 2 kontrol	

Şekil 4-11’ deki agaroz jel görüntüsünden elde edilen sonuçlara göre BFU-E kolonisinden elde edilen 1, 3, 4, 10. örnekler ile CFU-E kolonisi olan 6. örnek biallelik olarak JAK2V617F mutasyonunu taşımaktadırlar.



Şekil 4-11: 48 saat boyunca HEL serumu ile muamele yapılan CD34⁺ hücrelerin koloni sonuçları

1-120 µl BFU-E	2-120 µl CFU-GM	3-120 µl BFU-E	4-120 µl BFU-E	5-120 µl CFU-E
6-120 µl CFU-E	7-120 µl CFU-E	8-120 µl CFU-E	9-120 µl CFU-E	10-120 µl BFU-E
11-HEL Kontrol	12- HUVEC Kontrol	13- Negatif 1 kontrol	14- Negatif 2 kontrol	

Mononükleer hücrelerin transfecte edilerek elde edilen kolonilerinin agaroz jel sonuçları şekil 15’ de görülmektedir. CFU-E kolonisi olan 1. örnek ve BFU-E kolonisi olan 2. örnek JAK2V617F mutasyonu bakımından biallelik olarak görülmektedir. JAK2V617F mutasyonun CFU-E, BFU-E gibi kolonilerde görülmesi transfectasyonun başarısının bir göstergesidir. Ancak transfectasyon başarılı olmasına rağmen bazı koloni gruplarında JAK2 WT- yabancı tip kolonilerde elde edildi (Şekil 4-12).

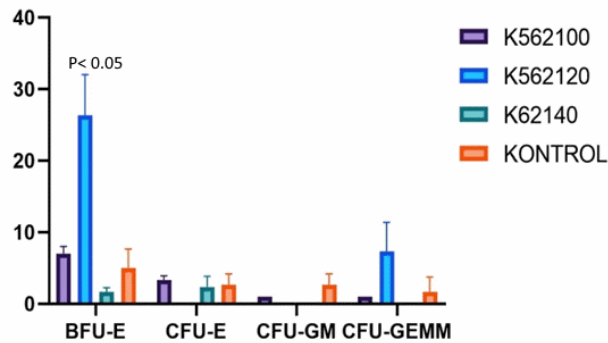


Şekil 4-12: 48 saat boyunca HEL serumu ile muamele yapılan MNC koloni sonuçları

1-120 µl CFU-E	2-120 µl CFU-GM	3-120 µl BFU-E	4-120 µl BFU-E	5-120 µl GEMM
6-120 µl BFU-E	7-120 µl CFU-GM	8-120 µl BFU-E	9-HEL kontrol	10-HUVEC kontrol
11- Negatif 1 kontrol	12- Negatif 2 kontrol			

Sonuç olarak, sağlıklı kordon kanından elden edilen CD34⁺ hücrelerin HEL serumu ile transfekte edilerek megakaryositik soy dahil tüm miyeloid soylarında JAK2 V617F varlığı gösterildi. Buradan yola çıkarak MPN'nin biyolojik heterojeniteye sahip olduğu söylenebilir.

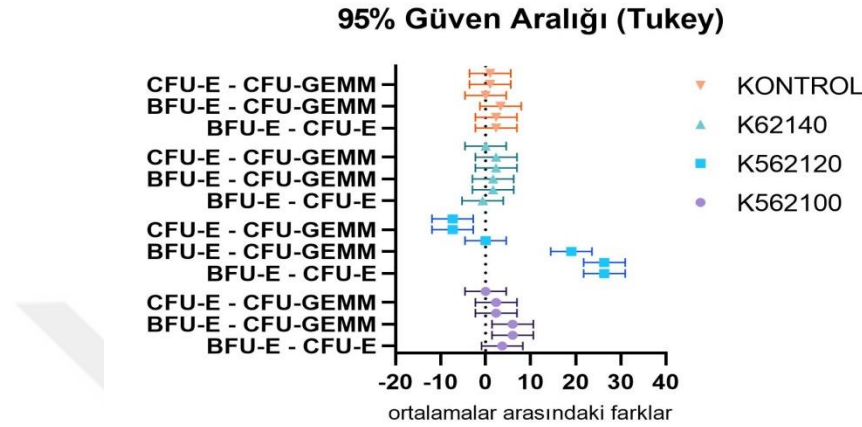
K562 besiyeri ile transfekte olan CD34⁺ hücre grupları içinde koloni deneyleri yapıldı. Koloni sayımı yapılarak koloniler toplandı. Kolonilerden DNA izolasyonu yapıldı ve BCR- ABL1 pozitifliği PZR yapılarak araştırıldı. Agaroz jelde görüntü elde edilemedi. Bunun nedeni kolonilerin DNA konsantrasyonlarının yeterli miktarda elde edilememesi olabilir. Sadece BFU-E kolonisinde BCR-ABL1 pozitifliğini agaroz jelde bir kere görüldü. Diğer tekrarlar da ise DNA konsantrasyonlarından kaynaklı olarak sonuç alınamadı. Koloni sayımı yapıldı. Ardından ortalamaları ve standart sapmaları istatistiksel analiz yöntemi olan Anova testi ($p < 0,0001$) ile hesaplanarak şekil 4-13'deki grafik elde edildi.



Şekil 4-13: K562 serum ile Transfekte olan CD34⁺ hücreleri kullanılarak yapılan metilselüloz progenitor deneyinde elde edilen koloni sayıları

Transfekte edilen gruplar karşılaştırılarak koloniler arasındaki farklar araştırıldı (Şekil 4-14). K562-120 ile transfekte olan örneklerin CFU-E koloninin CFU-GM ($p > 0,9999$) arasında anlamlı bir fark yoktur. K562 120'nin diğer tüm koloni

karşılaştırmalarında anlamlı fark olduğu görülmektedir. K562 -100 ile transfekte edilen örneklerde ise BFU-E'nin CFU-GM ($p < 0,005$) ve CFU-GEMM ($p < 0,005$) karşılaştırmalarında anlamlı bir farklılık olduğu görülmektedir.

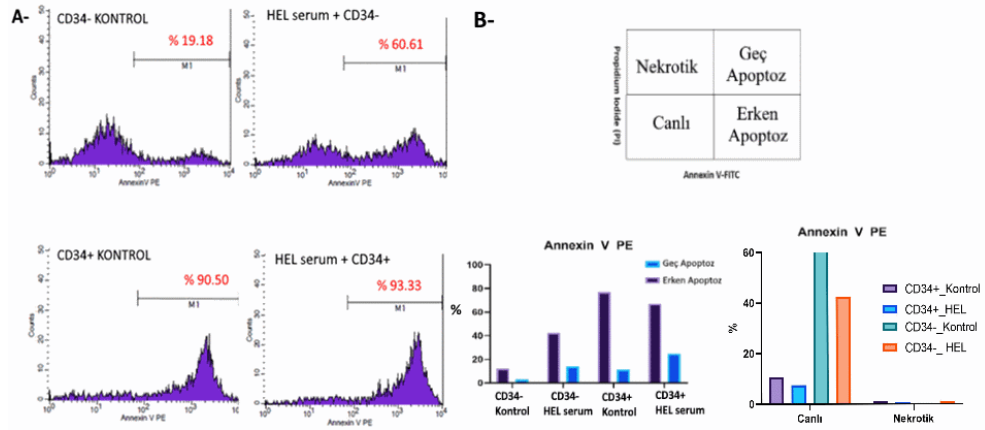


Şekil 4-14: Koloni verilerini Tukey testi kullanılarak ikili karşılaştırmalarının grafiksel gösterimi.

0 içermeyen güven aralıkları gruplarda bir fark olduğuna dair kanıt sağlar.

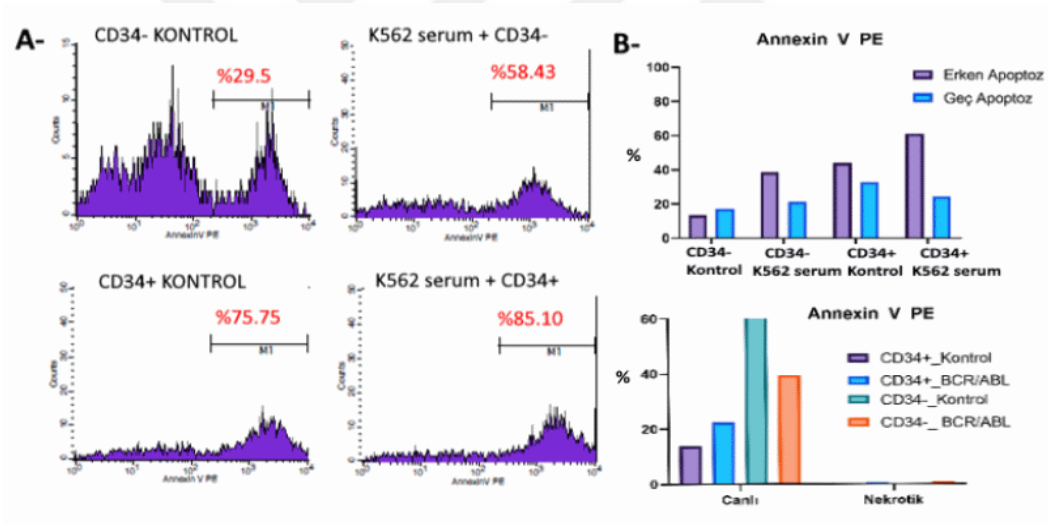
4.4. Apoptoz Analizi

Transfeksiyon sonrası JAK2V617F ve BCR-ABL-1 pozitif olan CD34⁺ hücre kompartmanlarında apoptoz analizi için ‘PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I’ kullanıldı. Apoptoz yüzdeleri belirlemek için JAK2V617F mutasyonu ve BCR-ABL-1 pozitif olan CD34⁺ hücreler akış sitometresi kullanılarak analiz edildi. Şekil 4-15’de gösterilen ‘Annexin V’ ile boyanması sonucu elde edilen apoptoz yüzdeliklerine göre HEL serumu ile transfekte edilen CD34⁺ hücreleri (%93.33) ile kontrol CD34⁺ hücreleri (%90.50) arasında anlamlı bir fark yoktur. CD34⁻ kontrol (%19.18) ve HEL serum ile transfekte olan CD34⁻ hücreler (60.18) arasında fark görülmektedir. Şekil 4-16’da gösterilen K562 serumu ile transfekte edilen CD34⁺ hücreleri (%85.10) ile kontrol CD34⁺ hücreleri (%75.75) arasında anlamlı bir fark görülmemektedir. CD34⁻ kontrol (%29.5) ile K562 serumu enfekte CD34⁻ hücre (%58.43) olarak belirlenmiştir



Şekil 4-15: HEL serumu ile transfekte olan CD34⁺/− hücrelerin akış sitometre ile elde edilen apoptoz sonuçları

- A- Akış sitometre ile analiz edilen CD34⁺/− hücrelerin apoptoz yüzdeleri
 B- CD34⁺/− hücrelerin canlı ve nekrotik, erken ve geç apoptoz yüzde grafikleri



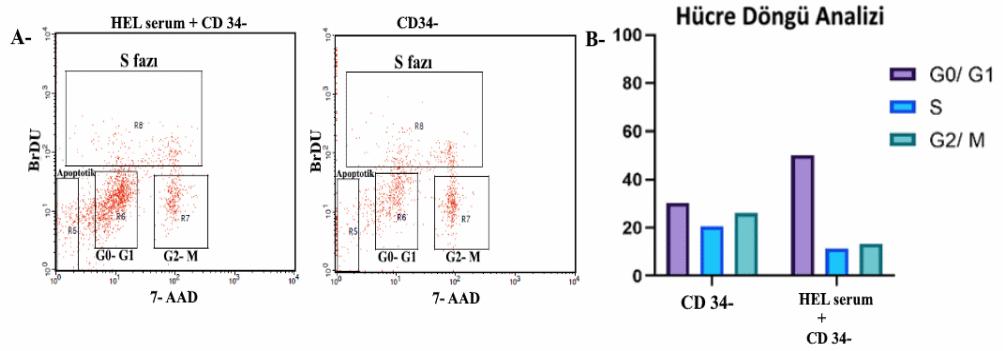
Şekil 4-16: K562 serumu ile transfekte olan CD34⁺/− hücrelerin akış sitometre ile elde edilen apoptoz sonuçları

- A- Akış sitometre ile analiz edilen CD34⁺/− hücrelerin apoptoz yüzdeleri
 B- CD34⁺/− hücrelerin erken ve geç apoptoz yüzdelerinin grafiği

4.5. Hücre Proliferasyon Analizi

HEL serumu ile transfekte edilen CD34⁺ hücre kompartmanlarında BrdU analizi ile hücrelerin proliferasyonları incelendi. CD34⁺ kontrol grubu ve HEL serum ile transfekte edilen CD34⁺ hücre grupları arasında GO/G1 fazı bir farklılık görülmektedir. GO/G1 fazında kontrol CD34⁺ hücreleri %30.29 transfekte olan CD34⁺ hücre grubu

%50.18 olarak belirlendi. S ve G2/M fazları arasında bir fark görülmemektedir(Şekil 4-17).



Şekil 4-17: CD34⁺ hücre kompartmanları BrdU ile etiketlenerek akış sitometrede hücre döngü analizleri sonucu elde edilen grafik.

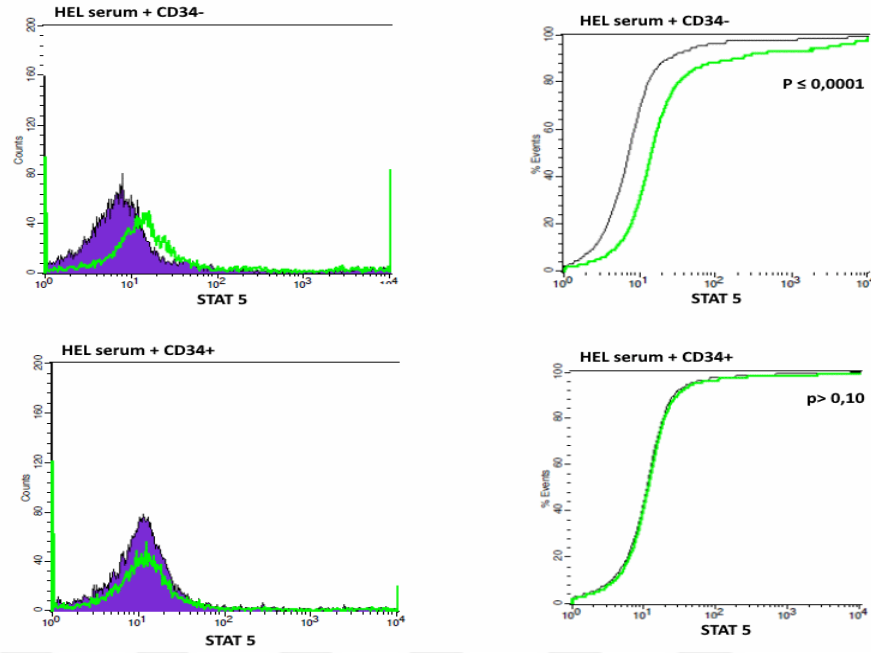
- A- HEL serum transfekte CD34⁺ ve CD34⁻ hücrelerin akım ölçer analizi
 B- HEL serum transfekte CD34⁺ ve CD34⁻ hücrelerin hücre döngülerinin yüzde grafiği

4.6. Hücre içi antikor Boyama

HEL serumu ile transfekte edilen CD34^{+/+} hücreler hücre içi sitoplazmik boyama olan pSTAT 5 antikoruna ile muamele edilerek akım ölçer cihazında analiz edildi. K562 serumu ile transfekte edilen CD34^{+/+} hücreler ise immünofenotipleme yapılarak akım ölçerinde analiz edildi.

4.6.1. STAT 5 intrasitoplazmik boyama

JAK2 aktivasyonu sonucu neoplastik hücrelerde akış aşağı sinyal molekülleri ve yolları aktive olur. STAT 5 da akış aşağı sinyal moleküllerinden biridir. Poliklonal anti-pSTAT5 antikoruna kullanılarak HEL serum ile transfekte edilen CD34⁺ ve CD34⁻ hücre grupları boyanarak akış sitometrede analiz edildi. (Şekil 4-18). Hücre JAK2V617F mutasyonu taşıdığı zaman JAK2 sinyal yolağı sürekli aktif halde olacağı için sitoplazmada pSTAT5'lerde artış beklenilmektedir. HEL serumu ile transfekte CD34⁻ hücre grubunda $p \leq 0.001$ olarak belirlendi. Bu durum istatistiksel olarak anlamlı olup pSTAT5'ı sitoplazmasında aktif olarak taşıdığını göstermektedir. CD34⁺ grup için ise $p > 0.10$ anlamlı denilebilir. Ancak deneyin tekrarlanması gereklidir.

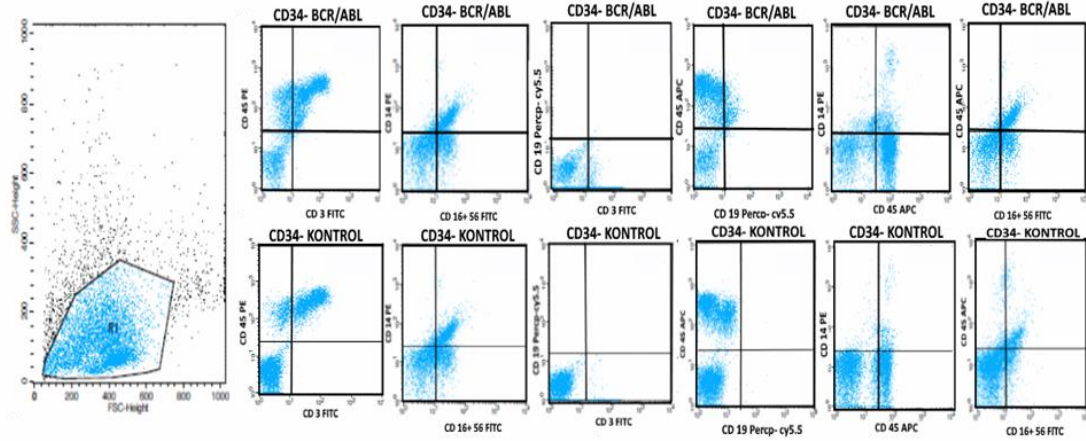


Şekil 4-18: pSTAT5'in akış sitometre analiz sonuçları

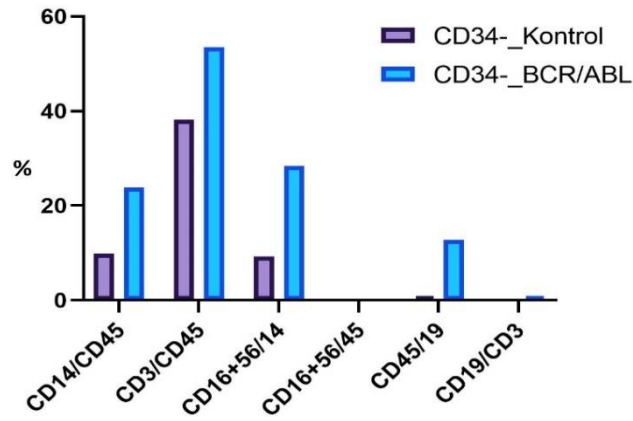
Kolmogorov Smirnov istatistik testi kullanılarak JAK2V617F pozitif olan CD34⁺ kök hücre için $p > 0.10$ CD34⁻ hücre için $p \leq 0.0001$ olarak belirlendi.

4.6.2. İmmünofenotipleme

K562 serumu ile transfeke edilen CD34^{+/-} hücre kompartmanlarında immünofenotipik değişiklikler akış sitometre ile analiz edildi. İmmünofenotip analizi doğal öldürücü hücreler (CD16⁺+56⁺), T Lenfositler (CD3⁺, CD4⁺,CD8⁺) , B Lenfositler (CD19⁺) ve monositler (CD14⁺) , gruplarında yapıldı. BCR/ABL pozitif CD34⁻ hücre kompartmanlarını kontrol ile kıyasladığımız zaman beklenildiği gibi beyaz kan hücre gruplarında artış görülmektedir(Şekil 4-19, Şekil 4-20). CD34⁺ hücre kompartmanlarında ise beyaz kan hücrelerinde artış görülemedi. Bunun nedeni CD34⁺ hücre transfeksiyonumuzun başarısız olması ya da deneysel olarak yapılan hatalardan kaynaklı olabilir (Şekil 4-21, Şekil 4-22). CD34^{+/-} hücre kompartmanlarının tüm sonuçları tablo 4-1'de gösterilmiştir.

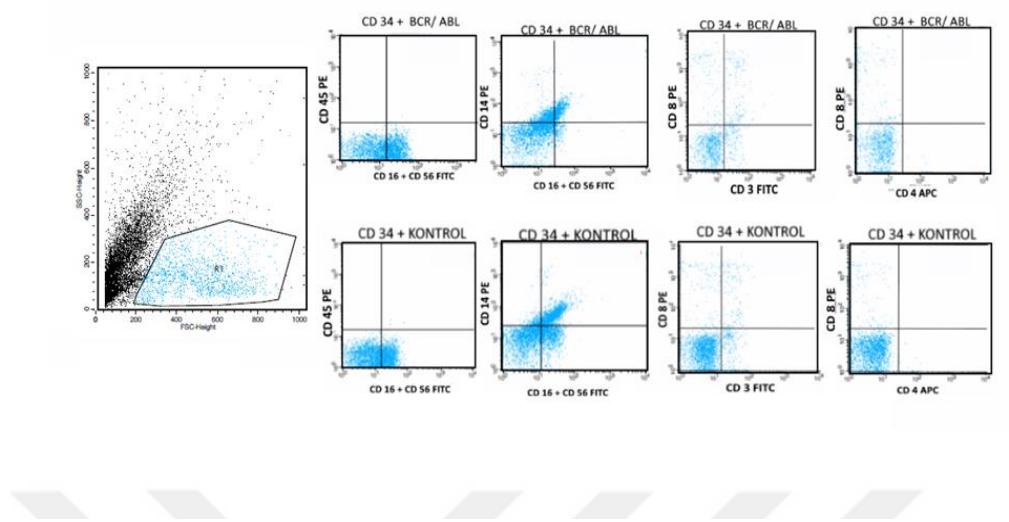


Şekil 4-19: Kontrol ve BCR/ABL pozitif CD34⁺ hücrelerin immünofenotiplerinin akış sitometre ile analizi

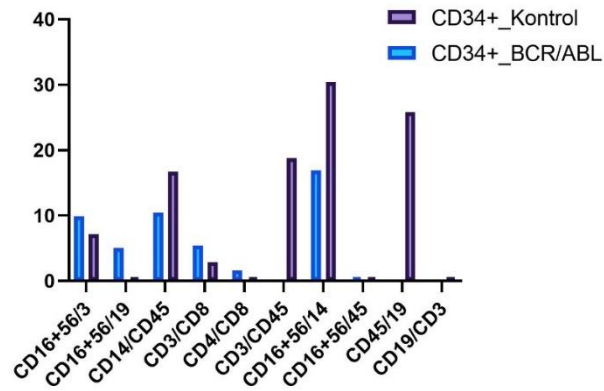


Şekil 4-20: CD34⁺ hücrelerin immünofenotip sonuçlarının t-test istatistik sonucu

t- test istatistik sonucuna göre $p < 0.005$ olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 4-21: Kontrol ve BCR/ABL pozitif CD34⁺ hücrelerin immünofenotiplemesinin akış sitometre analizi



Şekil 4-22: CD34⁺ hücrelerin immünofenotip sonuçlarının t-test istatistik sonucu

Kontrol ve BCR/ ABL pozitif CD34⁺ hücrelerin p değeri $p > 0,05$ olarak belirlendi ve istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Tablo 4-1: K562 serumu ile transfekte CD34^{+/+} ve Kontrol CD34^{+/+} hücrelerin immünfenotip sonuçları

İmmünfenotip yapılan hücre grupları	CD34-		CD34+	
	Kontrol	K562 serum	Kontrol	K562 serum
Doğal öldürücü hücre (CD16++56)	%5.76	%11.82*	%23.52	%16.9
T Lenfosit (CD3+)	%23.96	%23.51	%8.43	%8.63
B Lenfosit (CD 19+)	%0.03	%0.08*	%1.23	%0.77
Monositler (CD14+)	%2.5	%5.87*	%18.12	%22.35*
Pan lökosit (CD45+)	%24.67	%44.7*	%15.53	%5.76
T Lenfosit (CD8 +)			%0.72	%12.36*
T Lenfosit (CD 4+)			%0.22	%0.49*

5. TARTIŞMA

Hematopoietik kök hücre (HKH)'lerin fonksiyonları, kendini yenileme, çoğalma, farklılaşma, göç ve diğer biyolojik fonksiyonları konumlandıkları niş içerisindeki mikro çevre ile belirlenir. Kemik iliği nişi, birçok farklı destekleyici hücre, bu hücrelerden aktarılan sinyaller, hücre-hücre etkileşimleri, hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimleri, büyüme faktörleri ve sitokin etkileşimlerini içeren karmaşık bir niştir. Niş içerisinde yer alan tek bir HKH'nin MPN'yi başlatan sürücü bir mutasyonu kazanmasıyla MPN fenotipi gelişir. MPN kök hücreleri sağlıklı HKH'lere göre seçici bir avantaj kazanır ve klonal olarak genişlemeleriyle sonuçlanır.

Dolaşım sisteminde serbest halde bulunan hücre dışı genomik materyal (hdGM)'lerin kaynakları ve dolaşıma salınımları çeşitli mekanizmalarla gerçekleşmektedir. hdGM salınımına katkıda bulunan hücreler canlı veya ölü olabilir. Bu durum hücresel bozulma mekanizmalarından (apoptoz, nekroz, piroptoz, otofaji ve mitotik katastrof) salınan hdGM ile aktif hdGM salınımı arasındaki tek temel farkı oluşturur. hdGM'ler dolaşım sisteminde fizyolojik olarak mevcuttur. Ancak otoimmün, enflamatuvar ve çeşitli kanser hastalıklarında dolaşım sistemlerinde anlamlı derecede hdGM konsantrasyonunun da artış görülmektedir. İleri evre kanser hastalarında görülen hdGM artışları tümörlerdeki nekrotik ölüm seviyelerinin artması ile açıklanmaktadır ve ayrıca tümör agresifliği ile de ilişkilidir. hdGM'lerin bir konakçı genomuna lateral transferi ve anormal entegrasyonu kodlama bölgelerini bozabilir, sinyaller ekleyebilir ve onkogenleri aktive edebilir. Hücre içerisine alınimleri cGAS–STING yolağı aracılı ya da TLR reseptörleri ile olabilir.

TLR'ler mikrobiyal, viral ve hdGM gibi bileşenleri tanıyarak, doğal bağışıklık tepkilerinin oluşmasında rol oynayan reseptör ailesidir. TLR'ler, çeşitli bağışıklık ve stromal hücre tiplerinin yanı sıra hematopoietik kök ve progenitor hücreler üzerinde eksprese edilir. Bu reseptörlerin sinyallenmesi aracılığıyla, akut bir enfeksiyon veya yaralanma gibi durumlarda bağışıklık tepkimeleri oluşur. TLR sinyali normal bağışıklık tepkisi için önemli olmasının yanı sıra artmış veya anormal TLR ekspresyonu bozulmuş hematopoez ve hematopoietik malignite ile ilişkilidir.

Bu çalışmadaki hipotezimiz, “kanserli hücre süpernatantlarında mutasyonu taşıyan hdGM mevcuttur ve bu hdGM 'ler sağlıklı hematopoietik kök hücrelere entegre olarak hastalık prognozuna destek olur” şeklindedir. Bu doğrultuda, HEL serumunda

JAK2-V617F mutasyonu ve K562 serumundan BCR/ABL1 füzyon geni tespit edildi. Mutasyon taşıyan bu süpernatantlar kullanılarak sağlıklı CD34⁺ ve CD34⁻ hücre grupları transfekte edildi. Transfeksiyon sonrasında hücrelerden DNA izolasyonu yapıldı ve her bir grupta JAK2-V617F mutasyonu ve BCR/ABL1 gen analizleri gösterildi.

HEL hücre hattı biallelik olarak JAK2-V617F mutasyonu taşıdığı bilinmektedir. Transfeksiyon sonucunda çoğunlukla CD34⁺ ve CD34⁻ hücre grupları biallelik ve monoallelik olarak tespit edildi. HKH'lerde farklı iki tip genotip özellik görülmesinin nedeni miyeloid malignitelerde yaygın olarak görülen edinilmiş uniparental dizomi ile kromozomal bölgelerde oluşan heterozigosite kaybı (LOH) ile ilgili olabilir. LOH, normal allel kaybına ve genlerde onkogenik mutasyonların eşzamanlı çoğalmasına neden olur [195]. 9pLOH, yabanıl tip JAK2 (JAK2 WT) allel kaybına ve mitotik rekombinasyon yoluyla JAK2-V617F mutant allelinin eşzamanlı kopyalanmasına neden olur. 9pLOH, primer miyelofibroz ve PV' de esansiyel trombositemiden daha yaygın olarak görülür [196]. Edinilmiş kopya nötr LOH (CN-LOH), miyeloid malignitelerde ortak bir moleküler mekanizmayı temsil eder [197]. Bu durum MPN'lerde heterozigot durumdan homozigot bir duruma ilerlemesi ile sonuçlanır [198]. PV ve ET hastalarında yapılan bir başka çalışmada JAK2-V617F homozigotluğunun tekrarlayan kazanımının CN-LOH sonucu olduğu gösterildi. MPN hastalarında 9p kromozomunda edinilmiş CN-LOH MPN'nin çoklu alt tiplerine yol açar. Baskın bir homozigot alt klonda ek genetik veya epigenetik değişiklikler kazanımı sonucu zamanla ikincil miyelofibroz gelişir [199].

Transfeksiyon sonrası 24 saat inkübe edilen HKH'ler JAK2-V617F mutasyonunu monoallelik olarak taşımaktadır. Ancak inkübasyon süresi 48 saatte çıkarılınca biallelik olarak görülmektedir. Bu durum zaman içerisinde LOH gelişebileceğini düşündürmektedir. Bir başka düşüncede serum içerisinde bulunan hdGM'lerin taşıdıkları allel yükleri ve hücreyi transfekte edebilme yetenekleri ile ilgili olabilir.

İnflamatuar sinyaller hematopoietik sistemdeki transformasyon dahil olmak üzere genotoksik stresi artırarak tümör oluşumuna katkıda bulunan yaygın bir mekanizmadır. MPN hasta grubunda da oluşan bu inflamatuvar sinyal sonucu dolaşımdaki hdGM sayısı artmaktadır [200]. Bu doğrultuda değerlendirildiğinde elde edilen sonuçlar 24 saat transfekte edilen HKH'ler biallelik olarak görülmekte bu durumda serum içerisinde JAK2-V617F mutasyonunu taşıyan hdGM konsantrasyonu,

hücre içerisine girme kendilerini genoma entegre edebilme yetenekleri ile ilgilidir. Transfekte olan HKH'ler kullanılarak gerçekleştirilen metilselüloz hematopoietik koloni deneylerinde HKH'lerin alt popülasyonlarından elde edilen örneklerde JAK2-V617F mutasyonu varlığı görülmesi hücrelerin progenitörlerinin de transfekte olduğunun bir göstergesidir. Sadece CFU-E kolonisinin bir örneğinde HKH'ler JAK2-V617F mutasyonu taşımasına rağmen CFU-E koloni grubu JAK2 yabanil tip olarak bulunmuştur. Farklılaşma sırasında mutant alleli kaybettiğini ve JAK2 yabanil allel kazancı olduğunu düşünülmektedir. Bir başka sonuç transfeksiyon sırasında progenitör hücrelerin transfekte olmadığıdır. Çünkü kordon kanından elde edilen total HKH'ler homojen olarak CD34⁺ olarak belirlenemedi. Bu durumda ortamda HKH dışında da hücrelerin transfeksiyonu söz konusu olabilir. Bu yüzden de alt kolonilerde mutasyon varlığı görülmemiş olabilir.

HKH'lerdeki somatik bir mutasyon HKH'lerin klonal genişlemesine veya hayatta kalma avantajına katkıda bulunabilir ya da aynı hücrede tesadüfen ortaya çıkan bir yolcu mutasyonu temsil edebilir. Hücrelerde görülen bu heterojenite her hücrenin genetik, morfolojik, fenotipik, klinik ve hücre yüzeyi belirteç heterojenliğinin aynı olmamasından kaynaklanabilir. Bu durumu açıklayabilmek için ortaya atılan iki tane teori vardır. Birincisi, “stokastik model”, klonal hiyerarşideki tüm hücrelerin malign transformasyona eşit derecede duyarlı olduğunu gösterir [201]. İkincisi, “hiyerarşik model”, tümörjenik mutasyonların sadece ilkel hücrelerde meydana geldiği ve anormal bir farklılaşma kaskadıyla maligniteye neden olduğunu düşünülmektedir [202]. Kök hücreler, kısa ömürlü olgun hücrelere kıyasla mutasyonların birikmesi için daha uygun bir ortam sağlar ve kendini yenilemeyi sürdürmek için daha az mutasyon gereklidir [203]. Bazı klonlar sadece KKH'sine benzer hiyerarşik düzende olabilir. Bazı klonlarda bulunan hücreler ise kendi-kendini yenileme özelliklerini koruyarak, tümörün hiyerarşik düzenini değiştirebilir [204].

Transfeksiyonun başarısı hdGM ve immün hücreler arasındaki etkileşimler ile ilgili olabilir. hdGM ve immün hücreler etkileşimleri dolaşımda yer alan kanser genetik materyallerinin yok edilmesini neden olabilir veya bağışıklık sistemi bu onko faktörlere karşı tolerans geliştirebilir [205]. Eğer ortamda tolerans sağlanırsa hdGM'ler hücrelere nüfuz edebilir. Bu durumda bağışıklık hücreleri tarafından genomlara entegre olan hdGM'ler tespit edilemez. Kanser hücrelerinden salınan onkogen taşıyan hdGM'ler hücrelere entegre olarak hücrenin malign dönüşümünü belirler: ifade edilebilir veya

sessiz kalabilir ve daha sonra aktive olabilir [206][207]. Onkogenler ve bağışıklık sistemi arasındaki etkileşimler sonunda neoplastik sürecin sonucunu belirlenebilir.

HKH'ler farklı konsantrasyonlarda ve farklı inkübasyon sürelerinde transfekte edildi. Transfeksiyon için en uygun koşul olan 120 µl HEL serumu kullanılarak HKH'lerin 48 saat inkübe edilmesine karar verildi. Farklı konsantrasyonlar da serum ile transfekte olan HKH'lerin kolonilerinde istatistiksel olarak analiz edildi. HEL serumunun tüm konsantrasyonlarında beklenildiği gibi kontrole kıyasla eritroid kolonilerinde (BFU-E ve CFU-E) bir artış görüldü. Bu durum JAK2-V617F mutasyonunun genoma entegre olabildiğinin bir kanıtı olarak görülebilir. HEL 120 µl konsantrasyonun ise istatistiksel olarak en anlamlı verilerin olduğu grup olarak belirlendi. Bu yüzden devam eden diğer deney gruplarında transfeksiyon için 120 µl konsantrasyon kullanılarak yapıldı. CD34⁺ hücrelerde transfeksiyon başarılı olunca tüm hücre gruplarının serum kullanılarak transfeksiyon becerisi araştırıldı. CD34⁻ ve MNC hücre gruplarında HEL serumu ile transfekte edilerek hücrelerde JAK2-V617F mutasyon varlığı gösterildi.

JAK2-V617F mutasyonu 279 bp'lik kısa bir parçadır. BCR/ABL geni ise 418 bp'lik bir parça uzunluğuna sahiptir. BCR/ABL geni kullanmamızın nedeni daha uzun parça uzunluğuna sahip olan hdGM'lerin serum aracılığı ile hücreyi transfekte edip edemeyeceğini araştırdık. K562 serumu kullanılarak farklı konsantrasyonlarda ve farklı inkübasyon süreleri denenerek HKH'ler transfekte edildi. Sonuç olarak HKH'ler 120 µl konsantrasyonda ve 48 saat inkübe edilerek, HKH'ler de BCR/ABL geni pozitif olarak görüldü. BCR/ABL pozitif olan hücrelerde koloni deneyleri yapıldı. KML'ler de miyeloid soyun (özellikle granülositler) aşırı çoğalması karakterize edilen bir hematolojik malignitedir. İstatistik analizlerine göre kontrole kıyasla K562 serumu 120 µl transfekte HKH'ler kullanılarak yapılan koloni deneyleri sonucu BFU-E, CFU-GEMM, CFU-E, CFU-GM kolonileri arasında farklılıklar görüldü. Sadece CFU-E kolonisinin CFU-GM ile karşılaştırması sonucu anlamlı fark görülmedi.

Literatüre göre KML grubunun CFU-GEMM sayısı önemli ölçüde az olduğu bilinmektedir[208]. Ancak sonuçlarımızda K562 120 µl olan grup kontrole kıyasla CFU-GEMM koloni sayısında artış görülmektedir. Bu durumun nedeni bilinmemektedir. K562 serumunun tüm konsantrasyonların da düşük sayıda CFU-GM koloni varlığı görülmektedir. Bu durum KML hastalarında önemli ölçüde baskılanmış normal hematopoietik progenitörlerin bir işareti olarak görülebilir. Kolonilerden örnekler toplanılarak DNA izolasyonu yapılarak, PZR'da BCR/ABL1 gen varlığı

araştırıldı. Sadece BFU-E kolonisinde BCR/ABL pozitifliğini görüldü. Diğer alt kolonilerden elde edilen DNA'ların konsantrasyonları yeterli miktarda olmadığı için PZR'da sonuç alınamadı.

Ana hücrelerden kaynaklanan çok sayıda protein, lipid ve nükleik asit hdGM'ler tarafından kargo olarak taşındığı ve hücreler arasında lateral olarak transfer edildiği yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır. Bu çalışmada, hem BCR/ABL1 içeren K562 serumu hem de JAK2-V617F mutasyonu içeren HEL serumu içerisinde yer alan hdGM'lerin lateral olarak transfer edilerek BCR/ABL1 ve JAK2-V617F HKH'lere entegre edilebileceğini gösterdik. Bu transfer genomastaz için varsayılan bir mekanizmadır. Sonuç olarak hücrelerden salınan farklı uzunluktaki hdGM'ler çeşitli mekanizmalar ile taşıdıkları onkogenleri hücrelerin genomlarına entegre edebilir. Transfeksiyonda başarı sağladıktan sonra HKH'lerin bu onkogen kazanımlarından sonra hücresel fonksiyonlarındaki değişiklikler araştırıldı.

Yapılan çalışmalarda pSTAT5'in neoplastik hücrelerin sitoplazmasında saptandığı ve STAT5'in bu miyeloid neoplazmalarda pro-onkogenik bir sürücü olarak hareket ettiği gösterilmektedir [209]. Bu tez çalışmasında HEL serumu ile transfekte olan CD34⁺ ve CD34⁻ hücreler immünohistokimyasal boya olan pSTAT5 ile boyanarak akış sitometrede analiz edildi. Her iki hücre grubunda da pSTAT5 anlatımı görüldü. MPN hasta grubunda pSTAT5 anlatımı yüksek seviyelerde olduğu bilinmektedir. Bulduğumuz sonuçlar beklenildiği gibiydi. Çünkü MPN ile ilişkili olan HEL hücre hattından elde edilen serum kullanılarak sağlıklı HKH'ler transfekte edildi. STAT5'in hem sitoplazmik hem de nükleer parçaları MPN hastalarında lökomogeneze kritik katkıda bulunduğu düşünülmektedir. JAK2-V617F'nin hücre döngüsü regülasyonunu aktif olarak etkilediğini ve böylece hücre proliferasyonunu teşvik ettiğini gösterir.

JAK2-V617F ve BCR/ABL taşıyan CD34⁺ ve CD34⁻ hücrelerde Annexin V ile boyanarak apoptoz deneyleri yapıldı. Her iki onkogeni taşıyan HKH gruplarında apoptozun inhibe edilmesi ve klonal genişlemenin sağlanması beklenilmektedir. Akış sitometre sonuçlarına göre JAK2-V617F transfekte CD34⁺ hücreleri ile kontrol CD34⁺ hücrelerinin apoptoz oranları aynıdır. JAK2-V617F ile transfekte olan CD34⁻ hücreler kontrole kıyasla apoptoz seviyesi artmıştır. BCR/ABL ile transfekte edilen CD34⁺ ve CD34⁻ hücre gruplarında kontrole aynı apoptoz seviyeleri göstermektedir. hdGM ile HKH'lerin transfekte edilmesinin hücrelerin apoptoz seviyeleri üzerinde bir etkisi olmadığının göstergesidir. Ancak JAK2-V617F mutant CD34⁻ hücre grubundaki

apoptozdaki artış anlamlı değildir. Deneysel bir hata olabilir daha sağlıklı sonuç elde edebilmek adına deney tekrarlanmalıdır. JAK2-V617F mutasyonu taşıyan CD34⁺ hücrelerde BrdU boyama yöntemi kullanılarak HKH'lerin proliferasyonları incelendi. JAK2-V617F mutasyonu HKH'ler proliferasyonu artırır ve klonal genişlemeyi sağlar. Kontrol ile JAK2-V617F mutasyonu taşıyan hücreleri kıyasladığımız zaman S fazında mutant hücrelerde azalma vardır. Ancak G0 /G1 fazında ise artış görülmektedir. Bu durumun nedeni kullanılan sitokin konsantrasyonları, ile ilgili olabilir. Çünkü bu mutasyonun tek başına varlığı yeterli değildir. Ortamdaki intrinsik ve ekstrinsik faktörlerinde hücre döngüsü üzerinde etkisi vardır.

BCR/ABL pozitif olan KML'ler miyeloid kompartmandaki artış ile karakterize edilir. KML üç kısımdan oluşur: Kronik faz, hızlandırılmış faz ve blast krizi aşamasıdır. KML'ler de oluşan ikincil genetik ve moleküler anormallikler mutasyonların birikmesine ve genomik dengesizliğe neden olur. Bu durumun sonucunda blast krizine ve kötü hasta prognozuna ilerlemeye neden olur. CD45, CD14, CD19, CD16+CD56, CD3 antijenleri kullanılarak yapılan immünofenotipleme sonuçlarımıza göre BCR/ABL transfekte olan CD34⁺ hücre kompartmanlarında kontrol hücrelerine kıyasla artış görülmektedir. Ancak kullandığımız antijenler lenfoid hücre serileri için uygundur. Lenfosit belirteci olan CD45 antijeni çeşitli soylar ve farklılaşma aşamalarında farklı şekilde eksprese edildiğinden, ana alt popülasyonlar hakkında ek bilgi verir. CD45 ekspresyonu lenfositler ve monositler üzerinde yüksektir. Granülositler, prekürsör B hücreleri, prekürsör granülositik hücreler ve pro eritroblastlar da CD45 pozitifdir ancak daha düşük seviyelerdedir. Buna karşılık, olgun eritroid hücreler genellikle CD45 negatiftir. Sonuçlarımızda CD45, CD16+56, CD14 ekspresyonları görülmektedir. Ancak CD3 ve CD9 antijenlerinin anlatımı görülmemektedir. Yapılan çalışmalarda oluşan blast krizlerin lenfosit hücre kaynaklı olabileceği görülmektedir. Sonuçlarımızdaki lenfosit artışlarının HKH hücrelerinin hdGM'le transfekte edilmesinin bir etkisi söz konusu olabilir. Lösemik kök hücrelerden salınan hdGM'ler Ph kromozomuna ek olarak farklı sitogenetik anomalilikleri taşıyabilir. Bu durumda blast hücreleri Ph kromozomuna ek olarak, yeni kombine sitogenetik anormallikler sergileyerek blast krizlerine neden olabilir. BCR/ABL transfekte olan CD34⁺ hücre kompartmanlarında CD45, CD14, CD19, CD16+CD56, CD3 antijenlerine ek olarak CD4, CD8 antijenleri kullanılarak immünofenotipleme yapıldı. Ancak kontrole kıyasla anlamlı bir sonuç elde edilemedi. Bunun nedeni

HKH'ler transfekte edildikten 2 gün sonra analiz edildi. İmmüfenotipleme için hücrelerin *in vitro* kültür süreleri uzatılmalıdır. Deney tekrarında bu duruma dikkat edilerek daha sağlıklı sonuçlar elde edilebilir.

Yapılan bir çalışmada MPN hasta grubundan elde edilen serumların içerisinde hematopoietik kök ve progenitor hücreleri etkileyen çözünür faktörlerin olup olmadığı araştırıldı [210]. MPN'li hasta serumları kullanılarak *in vitro* HKH' ler transfekte edildi ve koloni deneyleri yapıldı. Çalışma sonucunda MPN' li hastalardan elde edilen serumun, hematopoetik progenitor hücreleri uyaran sinyalleri etkinleştirdiği ve bu uyarıcı sinyallerin hastalığın gelişimini hızlandıran viskozite ile sonuçlandığı gösterildi. Serum içerisinde hdGM'lerin varlığı bilinmektedir. Ancak bu zamana kadar yapılan çalışmalarda MPN'lerin serumlarının içerisinde bulunan hdGM'lerin varlığı ve işlevleri gösterilmemiştir. Bu tez çalışmasında MPN hastaların serumları içerisinde ait oldukları MPN alt gruplarına özgü mutasyonları taşıyan hdGM'lerin olduğu ve transfeksiyonda rol aldıkları gösterilmeye çalışıldı. Transfeksiyon sonrası HKH'lerin biyolojilerindeki değişimler incelendi.

Bu tez çalışması sonucunda, literatürde ilk defa MPN hastalarının perifer dolaşımında yer alan hdGM'lerin biyolojik işlevleri, fonksiyonları araştırılmıştır. hdGM analizleri için preanalitik iş akışlarının optimizasyonu, standardizasyonu ve geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Bu çalışmanın temel amacı, hdGM'lerin, hücreler arası iletişimin olası bir aracısı olduğudur. hdGM' lerin lateral transferi sonucu onkogeneizde ve metastaz gelişiminde rol aldığı ve hücrelerde fonksiyonel değişimlere neden olduğudur şeklindedir.

Bu bilgiler doğrultusunda MPN hastalarında dolaşımda yer alan hdGM'ler tespit edilerek hastalık takibi ve terapötik yaklaşımlar geliştirilebilir. hdGM'ler onkolojide çok yönlü bir biyobelirteç olarak büyük bir potansiyel sağlar. MPN'li hastaların dolaşımda hdGM tespit edilmesi, MPN hastalığının moleküler evrimini daha iyi anlaşılmasına ve invaziv olmayan yöntemler kullanılarak klinik testlerin ve moleküler yöntemlerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.



KAYNAKLAR

- [1] P. E. Boulais and P. S. Frenette, "Making sense of hematopoietic stem cell niches," *Blood*, 2015.
- [2] Y. H. Ho and S. Méndez-Ferrer, "Microenvironmental contributions to hematopoietic stem cell aging," *Haematologica*. 2020.
- [3] S. H. Cheshier, S. J. Morrison, X. Liao, and I. L. Weissman, "In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999.
- [4] A. Mendelson and P. S. Frenette, "Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration," *Nature Medicine*. 2014.
- [5] L. Li and W. B. Neaves, "Normal stem cells and cancer stem cells: The niche matters," *Cancer Research*. 2006.
- [6] H. Greim *et al.*, "The bone marrow niche, stem cells, and leukemia: Impact of drugs, chemicals, and the environment," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2014.
- [7] R. Baghban *et al.*, "Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance," *Cell Communication and Signaling*. 2020.
- [8] I. Laurenzana *et al.*, "Extracellular Vesicles: A New Prospective in Crosstalk between Microenvironment and Stem Cells in Hematological Malignancies," *Stem Cells International*. 2018.
- [9] A. Larochelle and C. E. Dunbar, "Hematopoietic stem cell gene therapy: Assessing the relevance of preclinical models," *Semin. Hematol.*, 2013.
- [10] E. Y. Rykova *et al.*, "Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content," *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2012.
- [11] O. Pös, O. Biró, T. Szemes, and B. Nagy, "Circulating cell-free nucleic acids: Characteristics and applications," *European Journal of Human Genetics*. 2018.
- [12] M. Fleischhacker and B. Schmidt, "Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer-A survey," *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. 2007.
- [13] A. J. Bronkhorst, J. F. Wentzel, J. Aucamp, E. van Dyk, L. du Plessis, and P. J. Pretorius, "Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 2016.
- [14] P. Anker, M. Stroun, and P. A. Maurice, "Spontaneous Release of DNA by

- Human Blood Lymphocytes as Shown in an in Vitro System,” *Cancer Res.*, 1975.
- [15] J. Aucamp, A. J. Bronkhorst, C. P. S. Badenhorst, and P. J. Pretorius, “The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature,” *Biol. Rev.*, 2018.
 - [16] S. Jahr *et al.*, “DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells,” *Cancer Res.*, 2001.
 - [17] S. K. Jorch and P. Kubes, “An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease,” *Nature Medicine*. 2017.
 - [18] R. Zhang, K. Nakahira, X. Guo, A. M. K. Choi, and Z. Gu, “Very Short Mitochondrial DNA Fragments and Heteroplasmy in Human Plasma,” *Sci. Rep.*, 2016.
 - [19] F. Mouliere *et al.*, “Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis,” *Sci. Transl. Med.*, 2018.
 - [20] S. Khier and L. Lohan, “Kinetics of circulating cell-free DNA for biomedical applications: Critical appraisal of the literature,” *Futur. Sci. OA*, 2018.
 - [21] P. Jiang *et al.*, “Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2015.
 - [22] Y. W. L. Zheng *et al.*, “Nonhematopoietically derived DNA is shorter than hematopoietically derived DNA in plasma: A transplantation model,” *Clin. Chem.*, 2012.
 - [23] D. Chandrananda, N. P. Thorne, and M. Bahlo, “High-resolution characterization of sequence signatures due to non-random cleavage of cell-free DNA,” *BMC Med. Genomics*, 2015.
 - [24] F. Mouliere *et al.*, “Selecting Short DNA Fragments In Plasma Improves Detection Of Circulating Tumour DNA,” *bioRxiv*, 2017.
 - [25] Y. M. D. Lo *et al.*, “Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus,” *Sci. Transl. Med.*, 2010.
 - [26] P. Burnham *et al.*, “Single-stranded DNA library preparation uncovers the origin and diversity of ultrashort cell-free DNA in plasma,” *Sci. Rep.*, 2016.
 - [27] P. Burnham, K. Khush, and I. De Vlaminc, “Myriad applications of circulating cell-free DNA in precision organ transplant monitoring,” *Annals of the American*

Thoracic Society. 2017.

- [28] M. Aljurf *et al.*, “Chimerism Analysis of Cell-Free DNA in Patients Treated with Hematopoietic Stem Cell Transplantation May Predict Early Relapse in Patients with Hematologic Malignancies,” *Biotechnol. Res. Int.*, 2016.
- [29] J. Shi, R. Zhang, J. Li, and R. Zhang, “Size profile of cell-free DNA: A beacon guiding the practice and innovation of clinical testing,” *Theranostics*. 2020.
- [30] T. Hahn, K. S. Drese, and C. K. O’Sullivan, “Microsystem for isolation of fetal DNA from maternal plasma by preparative size separation,” *Clin. Chem.*, 2009.
- [31] W. Kubicki and R. Walczaka, “Preliminary studies on cell-free fetal dna separation and extraction in glass lab-on-a-chip for capillary gel electrophoresis,” in *Procedia Engineering*, 2012.
- [32] R. W. K. Chiu *et al.*, “Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: Large scale validity study,” *BMJ*, 2011.
- [33] S. Fulda, A. M. Gorman, O. Hori, and A. Samali, “Cellular stress responses: Cell survival and cell death,” *International Journal of Cell Biology*. 2010.
- [34] O. Sokolowska and D. Nowis, “STING Signaling in Cancer Cells: Important or Not?,” *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2018.
- [35] T. Li and Z. J. Chen, “The cGAS-cGAMP-STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer,” *Journal of Experimental Medicine*. 2018.
- [36] A. Ablasser *et al.*, “CGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING,” *Nature*, 2013.
- [37] Q. Chen, L. Sun, and Z. J. Chen, “Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing,” *Nature Immunology*. 2016.
- [38] B. Temizoz *et al.*, “TLR9 and STING agonists synergistically induce innate and adaptive type-II IFN,” *Eur. J. Immunol.*, 2015.
- [39] H. Wagner, “The immunobiology of the TLR9 subfamily,” *Trends in Immunology*. 2004.
- [40] G. Marsman, S. Zeerleder, and B. M. Luken, “Extracellular histones, cell-free DNA, or nucleosomes: Differences in immunostimulation,” *Cell Death and Disease*. 2016.
- [41] W. Wang *et al.*, “Characterization of the release and biological significance of

- cell-free DNA from breast cancer cell lines,” *Oncotarget*, 2017.
- [42] H. Schwarzenbach, D. S. B. Hoon, and K. Pantel, “Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients,” *Nature Reviews Cancer*. 2011.
 - [43] G. C. O’Connell *et al.*, “Circulating extracellular DNA levels are acutely elevated in ischaemic stroke and associated with innate immune system activation,” *Brain Inj.*, 2017.
 - [44] F. Mouliere *et al.*, “High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA,” *PLoS One*, 2011.
 - [45] A. R. Thierry, S. El Messaoudi, P. B. Gahan, P. Anker, and M. Stroun, “Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology,” *Cancer Metastasis Rev.*, 2016.
 - [46] Y. M. D. Lo and W. K. J. Lam, “Tracing the tissue of origin of plasma DNA—feasibility and implications,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2016.
 - [47] B. György *et al.*, “Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles,” *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011.
 - [48] D. L. Peters and P. J. Pretorius, “Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA - A new paradigm in genetic behaviour,” *Clinica Chimica Acta*. 2011.
 - [49] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, “Chromosomal DNA and Its Packaging in the Chromatin Fiber,” *Mol. Biol. cell*, 4th Ed., 2002.
 - [50] H. J. Szerlong and J. C. Hansen, “Nucleosome distribution and linker DNA: Connecting nuclear function to dynamic chromatin structure,” *Biochemistry and Cell Biology*. 2011.
 - [51] M. W. Snyder, M. Kircher, A. J. Hill, R. M. Daza, and J. Shendure, “Cell-free DNA Comprises an in Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin,” *Cell*, 2016.
 - [52] G. T. Ho, R. K. Boyapati, A. Tamborska, and D. A. Dorward, “Advances in the understanding of mitochondrial DNA as a pathogenic factor in inflammatory diseases,” *F1000Research*. 2017.
 - [53] R. W. Taylor and D. M. Turnbull, “Mitochondrial DNA mutations in human disease,” *Nature Reviews Genetics*. 2005.
 - [54] J. Ellinger *et al.*, “Circulating mitochondrial DNA in serum: A universal

- diagnostic biomarker for patients with urological malignancies,” *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, 2012.
- [55] H. R. Underhill *et al.*, “Fragment Length of Circulating Tumor DNA,” *PLoS Genet.*, 2016.
- [56] N. Muhanna *et al.*, “Cell-Free DNA Kinetics in a Pre-Clinical Model of Head and Neck Cancer,” *Sci. Rep.*, 2017.
- [57] E. S. Morozkin, V. N. Sil’nikov, E. Y. Rykova, V. V. Vlassov, and P. P. Laktionov, “Extracellular DNA in culture of primary and transformed cells, infected and not infected with mycoplasma,” *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2009.
- [58] O. G. de Jong, B. W. M. van Balkom, R. M. Schiffelers, C. V. C. Bouten, and M. C. Verhaar, “Extracellular vesicles: Potential roles in regenerative medicine,” *Frontiers in Immunology*. 2014.
- [59] A. Takahashi *et al.*, “Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells,” *Nat. Commun.*, 2017.
- [60] B. K. Thakur *et al.*, “Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection,” *Cell Res.*, 2014.
- [61] M. Mineo *et al.*, “Exosomes released by K562 chronic myeloid leukemia cells promote angiogenesis in a src-dependent fashion,” *Angiogenesis*, 2012.
- [62] J. R. Chevillet *et al.*, “Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2014.
- [63] A. lie Ståhl, K. Johansson, M. Mossberg, R. Kahn, and D. Karpman, “Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases,” *Pediatric Nephrology*. 2019.
- [64] S. Kikuchi, Y. Yoshioka, M. Prieto-Vila, and T. Ochiya, “Involvement of extracellular vesicles in vascular-related functions in cancer progression and metastasis,” *International Journal of Molecular Sciences*. 2019.
- [65] C. Tetta, E. Ghigo, L. Silengo, M. C. Deregibus, and G. Camussi, “Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication,” *Endocrine*. 2013.
- [66] D. H. ADAMS and P. B. GAHAN, “Stimulated and Non-stimulated Rat Spleen Cells Release Different DNA-Complexes,” *Differentiation*, 1982.
- [67] P. B. Gahan and M. Stroun, “The virtosome-a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger,” *Cell Biochemistry and Function*. 2010.

- [68] P. Anker, D. Jachertz, M. Stroun, R. Brögger, C. Lederrey, and P. A. Maurice, "Transfer of genetic information from T to B human lymphocytes during an immune response to herpes simplex virus," *Comptes rendus des seances l'Academie des Sci. Ser. D, Sci. Nat.*, 1979.
- [69] M. Demers *et al.*, "Priming of neutrophils toward NETosis promotes tumor growth," *Oncoimmunology*, 2016.
- [70] A. W. Lambert, D. R. Pattabiraman, and R. A. Weinberg, "Emerging Biological Principles of Metastasis," *Cell*. 2017.
- [71] A. García-Casas, D. C. García-Olmo, and D. García-Olmo, "Further the liquid biopsy: Gathering pieces of the puzzle of genomestasis theory," *World Journal of Clinical Oncology*. 2017.
- [72] J. Aucamp, A. J. Bronkhorst, and P. J. Pretorius, "A historical and evolutionary perspective on circulating nucleic acids and extracellular vesicles: Circulating nucleic acids as homeostatic genetic entities," *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016.
- [73] I. Furi *et al.*, "Cell free DNA of tumor origin induces a 'metastatic' expression profile in HT-29 cancer cell line," *PLoS One*, 2015.
- [74] A. J. Bronkhorst *et al.*, "Sequence analysis of cell-free DNA derived from cultured human bone osteosarcoma (143B) cells," *Tumor Biol.*, 2018.
- [75] I. Mittra *et al.*, "Cell-free chromatin from dying cancer cells integrate into genomes of bystander healthy cells to induce DNA damage and inflammation," *Cell Death Discov.*, 2017.
- [76] C. C. Kocana, S. F. Toprak, B. Yasa, H. Hekimoglu, and S. S. Tokdemir, "Cell Free DNA and Genomestasis," *Experimed*, 2019.
- [77] S. Gravina, J. M. Sedivy, and J. Vijg, "The dark side of circulating nucleic acids," *Aging Cell*. 2016.
- [78] M. Dvořáková *et al.*, "DNA released by leukemic cells contributes to the disruption of the bone marrow microenvironment," *Oncogene*, 2013.
- [79] Y. S. Ju *et al.*, "Frequent somatic transfer of mitochondrial DNA into the nuclear genome of human cancer cells," *Genome Res.*, 2015.
- [80] E. Heitzer, P. Ulz, and J. B. Geigl, "Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer," *Clinical Chemistry*. 2015.
- [81] F. Castro-Giner and N. Aceto, "Tracking cancer progression: From circulating

- tumor cells to metastasis,” *Genome Medicine*. 2020.
- [82] B. Muz, P. de la Puente, F. Azab, and A. K. Azab, “The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy,” *Hypoxia*, 2015.
 - [83] A. V. Ermakov, M. S. Konkova, S. V. Kostyuk, V. L. Izevskaya, A. Baranova, and N. N. Veiko, “Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013.
 - [84] S. V. Kostyuk *et al.*, “Role of extracellular DNA oxidative modification in radiation induced bystander effects in human endothelialocytes,” *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, 2012.
 - [85] J. Huang and L. Wang, “Cell-free DNA methylation profiling Analysis—Technologies and bioinformatics,” *Cancers*. 2019.
 - [86] R. E. Board *et al.*, “DNA Methylation in Circulating Tumour DNA as a Biomarker for Cancer,” *Biomark. Insights*, 2007.
 - [87] M. Jagannathan-Bogdan and L. I. Zon, “Hematopoiesis,” *Dev.*, 2013.
 - [88] H. Ema, H. Takano, K. Sudo, and H. Nakauchi, “In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells,” *J. Exp. Med.*, 2000.
 - [89] S. Kumar and H. Geiger, “HSC Niche Biology and HSC Expansion Ex Vivo,” *Trends in Molecular Medicine*. 2017.
 - [90] A. Yagui-Beltrán, B. He, and D. M. Jablons, “Wnt Signaling in Cancer: From Embryogenesis to Stem Cell Self-Renewal,” in *Stem Cells and Cancer*, 2009.
 - [91] K. Ohishi, N. Katayama, H. Shiku, B. Varnum-Finney, and I. D. Bernstein, “Notch signalling in hematopoiesis,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2003.
 - [92] H. Vaziri, W. Dragowska, R. C. Allsopp, T. E. Thomas, C. B. Harley, and P. M. Lansdorf, “Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1994.
 - [93] A. J. Becker, E. A. McCulloch, and J. E. Till, “Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells,” *Nature*, 1963.
 - [94] M. H, M. J, and Y. K, “Human Peripheral Blood Derived Hematopoietic Stem Cell: History, the Isolation Methods and Investigation of Different Parameters Effects on Their Differentiation to the Body Cells,” *Int. J. Stem Cell Res. Transplant.*, 2014.
 - [95] A. Barcena, M. O. Muench, M. Kapidzic, and S. J. Fisher, “A new role for the

- human placenta as a hematopoietic site throughout gestation,” in *Reproductive Sciences*, 2009.
- [96] M. O. Muench *et al.*, “The human chorion contains definitive hematopoietic stem cells from the fifteenth week of gestation,” *Dev.*, 2017.
 - [97] A. Medvinsky, S. Rybtsov, and S. Taoudi, “Embryonic origin of the adult hematopoietic system: Advances and questions,” *Development*. 2011.
 - [98] B. M. Zeigler, D. Sugiyama, M. Chen, Y. Guo, K. M. Downs, and N. A. Speck, “The allantois and chorion, when isolated before circulation or chorio-allantoic fusion, have hematopoietic potential,” *Development*, 2006.
 - [99] A. D. Lander *et al.*, “What does the concept of the stem cell niche really mean today?,” *BMC Biol.*, 2012.
 - [100] R. S. Taichman, “Blood and bone: Two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche,” *Blood*. 2005.
 - [101] A. Rizo, E. Vellenga, G. de Haan, and J. J. Schuringa, “Signaling pathways in self-renewing hematopoietic and leukemic stem cells: Do all stem cells need a niche?,” *Human Molecular Genetics*. 2006.
 - [102] F. Di Rosa, “Two Niches in the Bone Marrow: A Hypothesis on Life-long T Cell Memory,” *Trends in Immunology*. 2016.
 - [103] T. Nagasawa, Y. Omatsu, and T. Sugiyama, “Control of hematopoietic stem cells by the bone marrow stromal niche: The role of reticular cells,” *Trends in Immunology*. 2011.
 - [104] P. Gupta, G. U. Gurudutta, D. Saluja, and R. P. Tripathi, “PU.1 and partners: Regulation of haematopoietic stem cell fate in normal and malignant haematopoiesis,” *J. Cell. Mol. Med.*, 2009.
 - [105] S. G. Emerson, “Thrombopoietin, HSCs, and the Osteoblast Niche: Holding On Loosely, but Not Letting GO,” *Cell Stem Cell*. 2007.
 - [106] K. Chotinantakul and W. Leeanansaksiri, “Hematopoietic Stem Cell Development, Niches, and Signaling Pathways,” *Bone Marrow Res.*, 2012.
 - [107] K. Akashi, D. Traver, T. Miyamoto, and I. L. Weissman, “A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages,” *Nature*, 2000.
 - [108] T. N. Nakorn, D. Traver, I. L. Weissman, and K. Akashi, “Myeloerythroid-restricted progenitors are sufficient to confer radioprotection and provide the majority of day 8 CFU-S,” *J. Clin. Invest.*, 2002.

- [109] D. Traver *et al.*, “Development of CD8 α -positive dendritic cells from a common myeloid progenitor,” *Science* (80-.), 2000.
- [110] M. A. Blasco, “Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond,” *Nature Reviews Genetics*. 2005.
- [111] S. Kanji and V. J. Pompili, “Plasticity and Maintenance of Hematopoietic Stem Cells During Development,” *Recent Pat. Biotechnol.*, 2012.
- [112] F. Notta, S. Doulatov, E. Laurenti, A. Poepl, I. Jurisica, and J. E. Dick, “Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment,” *Science* (80-.), 2011.
- [113] P. Tajer, K. Pike-Overzet, S. Arias, M. Havenga, and F. Staal, “Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Stem Cells for Therapeutic Purposes: Lessons from Development and the Niche,” *Cells*, 2019.
- [114] A. B. Satterthwaite, T. C. Burn, M. M. Le Beau, and D. G. Tenen, “Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen,” *Genomics*, 1992.
- [115] E. Drew, J. S. Merzaban, W. Seo, H. J. Ziltener, and K. M. McNagny, “CD34 and CD43 inhibit mast cell adhesion and are required for optimal mast cell reconstitution,” *Immunity*, 2005.
- [116] K. S. Götze *et al.*, “CD133-enriched CD34- (CD33/CD38/CD71)- cord blood cells acquire CD34 prior to cell division and hematopoietic activity is exclusively associated with CD34 expression,” *Exp. Hematol.*, 2007.
- [117] T. Abe, Y. Matsuoka, Y. Nagao, Y. Sonoda, and Y. Hanazono, “CD34-negative hematopoietic stem cells show distinct expression profiles of homing molecules that limit engraftment in mice and sheep,” *Int. J. Hematol.*, 2017.
- [118] R. Manfredini *et al.*, “The Kinetic Status of Hematopoietic Stem Cell Subpopulations Underlies a Differential Expression of Genes Involved in Self-Renewal, Commitment, and Engraftment,” *Stem Cells*, 2005.
- [119] F. Firkin, J. Dunlop, and I. Bertoncello, “Expansion of hemopoietic activity in long-term culture of human bone marrow by c-kit ligand (stem cell factor),” *Growth Factors*, 1993.
- [120] K. Ikuta and I. L. Weissman, “Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1992.

- [121] M. B. Bowie, D. G. Kent, M. R. Copley, and C. J. Eaves, "Steel factor responsiveness regulates the high self-renewal phenotype of fetal hematopoietic stem cells," *Blood*, 2007.
- [122] V. C. Broudy, "Stem cell factor and hematopoiesis," *Blood*. 1997.
- [123] A. G. Leary, Hai Qun Zeng, S. C. Clark, and M. Ogawa, "Growth factor requirements for survival in G0 and entry into the cell cycle of primitive human hemopoietic progenitors," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1992.
- [124] C. C. Zhang and H. F. Lodish, "Cytokines regulating hematopoietic stem cell function," *Current Opinion in Hematology*. 2008.
- [125] H. T. Hassan and A. Zander, "Stem Cell Factor as a Survival and Growth Factor in Human Normal and Malignant Hematopoiesis," *Acta Haematol.*, 1996.
- [126] V. Gabutti *et al.*, "Expansion of cord blood progenitors and use for hemopoietic reconstitution," *Stem Cells*, 1993.
- [127] K. Shortman and S. H. Naik, "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development," *Nature Reviews Immunology*. 2007.
- [128] S. N. Savvides, T. Boone, and P. A. Karplus, "Flt3 ligand structure and unexpected commonalities of helical bundles and cystine knots," *Nat. Struct. Biol.*, 2000.
- [129] S. D. Lyman, K. Stocking, B. Davison, F. Fletcher, L. Johnson, and S. Escobar, "Structural analysis of human and murine flt3 ligand genomic loci," *Oncogene*, 1995.
- [130] S. D. Lyman, "Biology of flt3 ligand and receptor," *International Journal of Hematology*. 1995.
- [131] S. D. Lyman, K. Brasel, A. M. Rousseau, and D. E. Williams, "The flt3 ligand: A hematopoietic stem cell factor whose activities are distinct from Steel factor," *Stem Cells*, 1994.
- [132] Y. Sonoda *et al.*, "Human FLT3 ligand acts on myeloid as well as multipotential progenitors derived from purified CD34+ blood progenitors expressing different levels of c-kit protein," *Eur. J. Haematol.*, 2009.
- [133] H. J. McKenna *et al.*, "Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells," *Blood*, 2000.
- [134] C. A. De Graaf and D. Metcalf, "Thrombopoietin and hematopoietic stem cells,"

Cell Cycle. 2011.

- [135] N. Debili *et al.*, “The MpI receptor is expressed in the megakaryocytic lineage from late progenitors to platelets,” *Blood*, 1995.
- [136] H. Yoshihara *et al.*, “Thrombopoietin/MPL Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Interaction with the Osteoblastic Niche,” *Cell Stem Cell*, 2007.
- [137] J. N. Ihle, “Interleukin-3 and hematopoiesis,” *Chemical Immunology*. 1992.
- [138] T. B. Olofsson, “Growth regulation of hematopoietic cells :an overview,” *Acta Oncol. (Madr)*., 1991.
- [139] M. C. Cabrera, “Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy,” *World J. Stem Cells*, 2015.
- [140] J. E. Visvader and H. Clevers, “Tissue-specific designs of stem cell hierarchies,” *Nature Cell Biology*. 2016.
- [141] P. Bu, K.-Y. Chen, S. M. Lipkin, and X. Shen, “Asymmetric division: a marker for cancer stem cells in early stage tumors?,” *Oncotarget*, vol. 4, no. 7, pp. 950–951, Jul. 2013.
- [142] J. E. Visvader and G. J. Lindeman, “Cancer stem cells in solid tumours: Accumulating evidence and unresolved questions,” *Nature Reviews Cancer*. 2008.
- [143] J. Ye, D. Wu, P. Wu, Z. Chen, and J. Huang, “The cancer stemcell niche: Cross talk between cancer stemcells and their microenvironment,” *Tumor Biology*. 2014.
- [144] E. Cortez, P. Roswall, and K. Pietras, “Functional subsets of mesenchymal cell types in the tumor microenvironment,” *Seminars in Cancer Biology*. 2014.
- [145] T. Borovski, F. De Sousa E Melo, L. Vermeulen, and J. P. Medema, “Cancer stem cell niche: The place to be,” *Cancer Research*. 2011.
- [146] T. Oskarsson, E. Batlle, and J. Massagué, “Metastatic stem cells: Sources, niches, and vital pathways,” *Cell Stem Cell*. 2014.
- [147] W. H. Matsui, “Cancer stem cell signaling pathways,” *Medicine (United States)*. 2016.
- [148] L. B. Alexandrov *et al.*, “Signatures of mutational processes in human cancer,” *Nature*, 2013.
- [149] S. A. Mani *et al.*, “The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with

- Properties of Stem Cells,” *Cell*, 2008.
- [150] T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, and I. L. Weissman, “Stem cells, cancer, and cancer stem cells,” *Nature*. 2001.
- [151] S. Boumahdi *et al.*, “SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma,” *Nature*, 2014.
- [152] J. Chen *et al.*, “A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy,” *Nature*, 2012.
- [153] D. Nassar and C. Blanpain, “Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications,” *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 2016.
- [154] J. Nangalia and A. R. Green, “Myeloproliferative neoplasms: From origins to outcomes,” *Hematology*, 2017.
- [155] A. J. Mead and A. Mullally, “Myeloproliferative neoplasm stem cells,” *Blood*. 2017.
- [156] D. A. Arber *et al.*, “The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia,” *Blood*. 2016.
- [157] T. Barbui *et al.*, “The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion,” *Blood cancer journal*. 2018.
- [158] F. Passamonti and M. Maffioli, “Update from the latest WHO classification of MPNs: A user’s manual,” *Hematology*, 2016.
- [159] M. Houshmand *et al.*, “Chronic myeloid leukemia stem cells,” *Leukemia*. 2019.
- [160] H. Zhou and R. Xu, “Leukemia stem cells: the root of chronic myeloid leukemia,” *Protein Cell*, 2015.
- [161] J. L. Spivak, “Polycythemia Vera,” *Current Treatment Options in Oncology*. 2018.
- [162] J. P. Laubach, P. Fu, X. Jiang, K. H. Salter, A. Potti, and M. O. Arcasoy, “Polycythemia vera erythroid precursors exhibit increased proliferation and apoptosis resistance associated with abnormal RAS and PI3K pathway activation,” *Exp. Hematol.*, 2009.
- [163] M. Griesshammer, J. J. Kiladjian, and C. Besses, “Thromboembolic events in polycythemia vera,” *Annals of Hematology*. 2019.
- [164] C. James *et al.*, “A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera,” *Nature*, 2005.

- [165] S. Schnittger *et al.*, “Detection of JAK2 exon 12 mutations in 15 patients with JAK2V617F negative polycythemia vera,” *Haematologica*, 2009.
- [166] S. Cerquozzi and A. Tefferi, “Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: A literature review of incidence and risk factors,” *Blood Cancer Journal*. 2015.
- [167] R. Landolfi *et al.*, “Efficacy and Safety of Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera,” *N. Engl. J. Med.*, 2004.
- [168] M. Griesshammer, H. Gisslinger, and R. Mesa, “Current and future treatment options for polycythemia vera,” *Annals of Hematology*. 2015.
- [169] G. Finazzi *et al.*, “Acute leukemia in polycythemia vera: An analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study,” *Blood*, 2005.
- [170] P. J. Campbell and A. R. Green, “Essential thrombocythemia,” in *Chronic Myeloproliferative Disorders*, 2008.
- [171] C. N. Harrison and J. S. Lee, “Myeloproliferative neoplasms,” *Medicine (United Kingdom)*. 2017.
- [172] K. Takenaka, K. Shimoda, and K. Akashi, “Recent advances in the diagnosis and management of primary myelofibrosis,” *Korean Journal of Internal Medicine*. 2018.
- [173] E. Rumi *et al.*, “CALR exon 9 mutations are somatically acquired events in familial cases of essential thrombocythemia or primary myelofibrosis,” *Blood*, 2014.
- [174] E. Rumi *et al.*, “JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes,” *Blood*, 2014.
- [175] J. Staerk, C. Lacout, T. Sato, S. O. Smith, W. Vainchenker, and S. N. Constantinescu, “An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor,” *Blood*, 2006.
- [176] K. Kollmann *et al.*, “A novel signalling screen demonstrates that CALR mutations activate essential MAPK signalling and facilitate megakaryocyte differentiation,” *Leukemia*, 2017.
- [177] V. R. Deutsch and A. Tomer, “Megakaryocyte development and platelet production,” *British Journal of Haematology*. 2006.

- [178] Y. Pikman *et al.*, “MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia,” *PLoS Med.*, 2006.
- [179] J. E. Maxson *et al.*, “Oncogenic CSF3R mutations in chronic neutrophilic leukemia and atypical CML,” *N. Engl. J. Med.*, 2013.
- [180] A. Pardanani *et al.*, “CSF3R T618I is a highly prevalent and specific mutation in chronic neutrophilic leukemia,” *Leukemia*, 2013.
- [181] F. Pasquier, X. Cabagnols, L. Secardin, I. Plo, and W. Vainchenker, “Myeloproliferative neoplasms: JAK2 signaling pathway as a central target for therapy,” in *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 2014.
- [182] R. Rampal *et al.*, “Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2014.
- [183] F. Stegelmann *et al.*, “High-resolution single-nucleotide polymorphism array-profiling in myeloproliferative neoplasms identifies novel genomic aberrations,” *Haematologica*, 2010.
- [184] N. Shanmuganathan and S. Branford, “The Hidden Pathogenesis of CML: Is BCR-ABL1 the First Event?,” *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2019.
- [185] S. Varma, N. Varma, P. Malhotra, V. Narang, M. U. Sachdeva, and P. Bose, “Immunophenotyping in Chronic Myeloid Leukemia Blast Crisis: Looking beyond Morphology,” *J. Postgrad. Med. Educ. Res.*, 2016.
- [186] B. Calabretta and D. Perrotti, “The biology of CML blast crisis,” *Blood*. 2004.
- [187] S. Branford *et al.*, “Integrative genomic analysis reveals cancer-associated mutations at diagnosis of CML in patients with high-risk disease,” *Blood*, 2018.
- [188] A. Tefferi, “Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1,” *Leukemia*. 2010.
- [189] H. Neubauer, A. Cumano, M. Müller, H. Wu, U. Huffstadt, and K. Pfeffer, “Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis,” *Cell*, 1998.
- [190] F. Passamonti *et al.*, “A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: The impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications,” *Leukemia*, 2010.
- [191] R. T. Silver *et al.*, “JAK2V617F allele burden in polycythemia vera correlates with grade of myelofibrosis, but is not substantially affected by therapy,” *Leuk.*

Res., 2011.

- [192] L. M. Scott, M. A. Scott, P. J. Campbell, and A. R. Green, "Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia," *Blood*, 2006.
- [193] S. Jaiswal *et al.*, "Clonal Hematopoiesis and risk of atherosclerotic cardiovascular disease," *N. Engl. J. Med.*, 2017.
- [194] "GraphPad." [Online]. Available: <https://www.graphpad.com/support/prism-5-updates/>.
- [195] M. D. Bacolod, G. S. Schemmann, S. F. Giardina, P. Paty, D. A. Notterman, and F. Barany, "Emerging paradigms in cancer genetics: Some important findings from high-density single nucleotide polymorphism array studies," *Cancer Research*. 2009.
- [196] H. Akada, S. Akada, R. E. Hutchison, and G. Mohi, "Loss of wild-type Jak2 allele enhances myeloid cell expansion and accelerates myelofibrosis in Jak2V617F knock-in mice," *Leukemia*, 2014.
- [197] C. O'Keefe, M. A. McDevitt, and J. P. Maciejewski, "Copy neutral loss of heterozygosity: A novel chromosomal lesion in myeloid malignancies," *Blood*. 2010.
- [198] E. Rumi *et al.*, "Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms," *Blood*, 2013.
- [199] F. Passamonti *et al.*, "Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders," *Blood*, 2006.
- [200] B. Kumar, M. Garcia, J. L. Murakami, and C. C. Chen, "Exosome-mediated microenvironment dysregulation in leukemia," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2016.
- [201] I. Roeder, L. M. Kamminga, K. Braesel, B. Dontje, G. De Haan, and M. Loeffler, "Competitive clonal hematopoiesis in mouse chimeras explained by a stochastic model of stem cell organization," *Blood*, 2005.
- [202] J. Prick, G. de Haan, A. R. Green, and D. G. Kent, "Clonal heterogeneity as a driver of disease variability in the evolution of myeloproliferative neoplasms," *Experimental Hematology*. 2014.

- [203] P. D. Adams, H. Jasper, and K. L. Rudolph, "Aging-Induced Stem Cell Mutations as Drivers for Disease and Cancer," *Cell Stem Cell*. 2015.
- [204] "Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions," *Br. Dent. J.*, 2015.
- [205] F. Xie *et al.*, "Extracellular Vesicles in Cancer Immune Microenvironment and Cancer Immunotherapy," *Advanced Science*. 2019.
- [206] H. Gonzalez, C. Hagerling, and Z. Werb, "Roles of the immune system in cancer: From tumor initiation to metastatic progression," *Genes and Development*. 2018.
- [207] A. Becker, B. K. Thakur, J. M. Weiss, H. S. Kim, H. Peinado, and D. Lyden, "Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis," *Cancer Cell*. 2016.
- [208] T. Budak-Alpdoğan, Ö. Alpdoğan, and T. Akoğlu, "Morphological and functional characteristics of short-term and long-term bone marrow cultures in chronic myelogenous leukemia," *Am. J. Hematol.*, 1999.
- [209] J. Staerk and S. N. Constantinescu, "The JAK-STAT pathway and hematopoietic stem cells from the JAK2 V617F perspective," *JAK-STAT*, 2012.
- [210] R. K. Lubberich *et al.*, "Serum of myeloproliferative neoplasms stimulates hematopoietic stem and progenitor cells," *PLoS One*, 2018.

FORMLAR

"Hücre dışı genom materyallerinin hematopoetik kök hücreler üzerindeki etkisi"

başlıklı deneysel bir araştırma için sizin vereceğiniz damardan alınan kana ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu araştırma ile miyeloproliferatif neoplazi hastalığında rol oynayan mutasyonlar/varyasyonların etkileri araştırılacaktır.

Miyeloproliferatif neoplazi hastalığından biri olan Polistemia vera'nın tedavisinin bir parçası olan "Flebotomi-damardan kan verme" işleminde vermiş olduğunuz kan toplanarak laboratuvar ortamında işleme tabi tutulacak ve bu araştırmada değerlendirilecektir. Tedaviniz süresince vücut sağlığınız için vermiş olduğunuz bu kan normal şartlarda imha edilerek atılır. Ancak sizin vereceğiniz bu olurla damardan vereceğiniz bu kan değerlendirilerek bu hastalığın nasıl ve hangi olaylar neticesinde oluştuğu konusunu anlamakta araştırmacılara yardımcı olacaktır.

Bu araştırmaya katılmanın size hiçbir zorluğu veya ekstra vereceği ağrı, acı veya istenmeyen bir sonucu oluşturmayacaktır. Bu araştırma size uygulanıyor olan tedavinin bir parçası veya alternatifi değildir. Atılacak olan kanınız toplanarak laboratuvar ortamında araştırma için kullanılacaktır.

Belirtilen araştırma 1,5 yıllık bir süreçte gerçekleşecektir. En az 20 hastadan elde edilen kanlar toplanacak ve laboratuvar ortamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar için kullanılacaktır. Yapılacak bu deneysel araştırmalar ile hastalığınıza neden olan etkeni, nasıl ortaya çıktığını, hastalığı nasıl ilerlettiğini ve de tedavinizde nasıl rol oynadığını bulmaya çalışacağız.

Bu araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahipsiniz. Siz istediğiniz anda araştırmacıya haber vererek çalışmadan çekilebilir ya da araştırmacı tarafından gerek görüldüğünde araştırma dışı bırakılabilirsiniz.

Gönüllü olarak bu araştırmaya katılımınız kendi isteğinize bağlıdır ve kabul etmeme durumunda veya herhangi bir nedenle çalışma programından çıkarılmanız veya istediğiniz zaman çıkmanız halinde, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkınızı kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebileceğiniz veya araştırmadan çekilebileceğiniz, hastalığınız ile ilgili yapılan tedavinizde herhangi bir aksama olmayacağı güvencesi vermekteyiz.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmeyeceksiniz ayrıca size bu araştırmaya katıldığınız içinde bir ödeme yapılmayacaktır.

Sizden alınacak bu kan örnekleri sadece belirtilen araştırma için kullanılacaktır. İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Bakanlık ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin sizin orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimleri bulur, ancak bu bilgiler gizli tutulacak, yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla sizin veya yasal temsilcisinin söz konusu erişime izin vermiş olacaksınız.

İlgili mevzuat gereğince kimlik bilgilerinizi ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutulacak, hiçbir şekilde kamuoyuna açıklanamayacak; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi sizin kimliğinin gizli kalacaktır.

İkinci bölüm

Sayın Yard. Doç. Dr. Selçuk SÖZER TOKDEMİR tarafından İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine

inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

“Hücre dışı genom materyallerinin hematopoetik kök hücreler üzerindeki etkisi ” çalışması kapsamında alınan biyolojik örneklerimin (kan);

(Gönüllü tarafından uygun olan şık işaretlenmelidir)

- Sadece yukarıda bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.
- İleride yapılması planlanan tüm çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.”

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı/ İmzası/Tarih/ Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Araştırma Ekibinde Yer Alan ve Yetkin Bir Araştırmacının Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekiyorsa olur işleme tanık olan kişinin Adı-soyadı/ İmzası/Tarih/ Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Gerekiyorsa yasal temsilcisinin Adı-soyadı/ İmzası/Tarih/ Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

ETİK KURUL KARARI

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**



Sayı : 1529

Tarih : 12.11.2018

Konu: Dr. Öğr. Üyesi Selçuk Sözer TOKDEMİR hk.

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Selçuk Sözer TOKDEMİR
Genetik

İlgi : Genetik Anabilim Dalının 25/10/2017 gün ve 302813 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Selin Fulya TOPRAK' ın yürüteceği 2018/1497 dosya numaralı "Hücre Dışı Genom Materyallerinin Hematopoetik Kök Hücreler Üzerindeki Etkisi" başlıklı çalışma, kurulumuzun 09/11/2018 tarih ve 19 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

HÜCRE DIŞI GENOM MATERYALLERİNİN HEMATOPOETİK KÖK HÜCRELER ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

ORIJINALLIK RAPORU

% 6	% 3	% 1	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 2
2	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	<% 1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
4	www.scribd.com İnternet Kaynağı	<% 1
5	Singh, G.. "Evidence for the presence of R250G mutation at the ATPase domain of topoisomerase II in an arsenite-resistant Leishmania donovani exhibiting a differential drug inhibition profile", International Journal of Antimicrobial Agents, 200901 Yayın	<% 1
6	Submitted to Rose-Hulman Institute of Technology Öğrenci Ödevi	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Selin Fulya	Soyadı	Toprak
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	12.04.1993
Uyruğu	T.C	TC Kim No	33448766382
Email	tprkselinfulya@gmail.com	Tel	05332139757

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Kültür Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik	2016
Lise	Özel Kültür 2000 Anadolu Lisesi	2012

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	İyi	69	
Fransızca	Orta	Orta	İyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	72		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1. **Sertifika** : 13.Balkan Congress of Human Genetics (17-20 Nisan 2019)

2. **Sertifika:** 13. Balkan Congress of Human Genetics- Principles of Pharmacogenetics (17 -20 Nisan 2019)
3. **Sertifika:** Deney Hayvanları kullanım sertifikası –Sağlık Bilimleri Üniversitesi (25/03/2019- 03/04/2019)
4. **Sertifika:** République Française Ministère de l’éducation Nationale du Delf A1 (30/06/2008)
5. **Sertifika:** République Française Ministère de l’éducation Nationale du Delf A2 (18/06/2009)
6. **Sertifika:** République Française Ministère de l’éducation Nationale Delf B1 (07/09/2010)
8. Mobigen Oksidatif Stres DNA Hasarı DNA Onarımı ve Hastalıkla İlişkiler Kursu (16-18 Nisan 2013).
9. İKU Nanoteknoloji ve Doku Mühendisliği: Güncel Sorunlar ve Gelecek Öngörüler adlı ortak toplantı (20-21 Aralık 2013).
10. T.C.Haliç Üniversitesi 1. Tüp Bebek Paneli (14 aralık 2013)
11. İKU 2. Nanoteknoloji ve Doku Mühendisliği:Güncel Sorunlar ve Gelecek Öngörüler adlı sempozyum (19-20 Aralık 2014)
12. T.C.Haliç Üniversitesi 1.Kök Hücre Sempozyumu (18 Nisan 2015)
13. İstanbul Üniversitesi- XII IUGEN International Molecular Biology and Genetics Students Winter School (6-8 Mart 2015)
14. - İstanbul Üniversitesi- İÜKÖK- Kök Hücre ve Uygulamaları Sempozyumu (2-3 Nisan 2016)
15. The Virtual Edition of the 25th European Hematology Association- Abstract book içerisinde ‘Cord Blood CD34 positive Cells Acquire BCR/ABL1 Through Extracellular Genetic Material Transfer’ adlı çalışmam yayınlandı.(14.05.2020)
16. The European Human Genetics Virtual Conference- Abstract book içerisinde eposter ‘Cord Blood CD34 positive Cells Acquire BCR/ABL1 Through Extracellular Genetic Material Transfer’ adlı çalışmam yayınlandı.

Özel İlgi Alanları (Hobileri): String Art, pilates

