

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**İNSAN ADİPOZ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KAYNAKLI
EKSOZOMLARIN KOLON KANSERİ HÜCRESİ ÜZERİNDEKİ
TRANSKRİPTOMİK VE HÜCRESEL ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

BURCU EFE DAŞKAN

DOKTORA TEZİ

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Hatice YILDIRIM (Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Eş Danışman)
Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ
Prof. Dr. Aylin ER
Doç.Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU
Dr. Öğr. Üyesi Nurcan DEDEOĞLU

BALIKESİR, OCAK - 2025

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**İnsan Adipoz Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozomların Kolon Kanseri Hücreleri Üzerindeki Transkriptomik ve Hücresel Etkilerinin Belirlenmesi**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

BURCU EFE DAŞKAN

Bu tez çalışması TÜBİTAK (121Z689) nolu 1002 projesi ve Balıkesir Üniversitesi (2023/159) nolu BAP projesi ile desteklenmiştir.

ÖZET

**İNSAN ADİPOZ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KAYNAKLI EKSOZOMLARIN
KOLON KANSERİ HÜCRESİ ÜZERİNDEKİ TRANSKRİPTOMİK VE
HÜCRESEL ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ
DOKTORA TEZİ
BURCU EFE DAŞKAN
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF.DR. HATİCE YILDIRIM)
(EŞ DANIŞMAN: PROF.DR. FERAY KÖÇKAR)
BALIKESİR, OCAK-2025**

Hücre dışı veziküllerden biri olan ekzosomlar çeşitli proteinler, lipitler, mRNA, metabolik enzimler ve miRNA gibi çok sayıda esansiyel molekülü içererek hücreler arasındaki moleküler bilgiyi ve hücreler arası iletişimi sağlamaktadır. Ekzosomlar kanserde hücreler arası iletişimin önemli araçları olarak ortaya çıkmış olup yerel ve sistemik çevreyi değiştirerek kanserin büyümesi ve yayılmasını programlayabilmektedir. Ekzosomların kanser progresyonundaki çok yönlü etkileri literatürde yapılan çalışmada sınırlı olduğu ve ekzosomların kanser hücreleri üzerinde etkileri göz önüne alınarak çalışmamızda ekzosomların izolasyonu yapılarak TEM, Western blot ve immünofloresan analizi ile karakterize edilmiştir. Ardından SW-480 hücrelerinde proliferasyon/sitotoksosite, koloni formasyon ve hücre migrasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu analizlere ek olarak ekzosomların SW-480 kolon kanseri hücrelerindeki etkisinin belirlenmesi için transkriptomik analizler yapılmıştır. Gerçekleştirilen biyoinformatik analizlerle tüm RNA transkripti araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı değişikliğe uğrayan genler belirlenerek RT-PZR çalışmaları yapılarak doğrulanmıştır. Bu genlerden up regüle olan ATOH 8'in sh RNA çalışmaları için lentiviral tabanlı pLKO.1-TRC vektörüne başarıyla klonlanması gerçekleştirilmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Ekzosomlar, kolon kanseri, RNA sekans, sh RNA

Bilim Kod / Kodları: 20326, 20603, 20606, 20610

Sayfa Sayısı: 138

ABSTRACT

DETERMINATION OF TRANSCRIPTOMIC AND CELLULAR EFFECTS OF HUMAN ADIPOSE MESENCHYMAL STEM CELL-DERIVED EXOSOMES ON COLON CANCER CELLS

PH. D THESIS

BURCU EFE DASKAN

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF.DR. HATİCE YILDIRIM)

(CO-SUPERVISOR: PROF.DR. FERAY KOÇKAR)

BALIKESİR, JANUARY - 2025

Exosomes, one of the extracellular vesicles, provide molecular information and intercellular communication between cells by containing many essential molecules such as various proteins, lipids, mRNA, metabolic enzymes and miRNA. Exosomes have emerged as important mediators of intercellular communication in cancer and can program the growth and spread of cancer by changing the local and systemic environment. Considering the limited number of studies in the literature on the multifaceted effects of exosomes on cancer progression and the effects of exosomes on cancer cells, in our study, exosomes were isolated and characterized by TEM, Western blot and immunofluorescence analysis. Then, proliferation/cytotoxicity, colony formation and cell migration studies were performed in SW-480 cells. In addition to these analyses, transcriptomic analyses were performed to determine the effect of exosomes on SW-480 colon cancer cells. All RNA transcripts were investigated with the bioinformatic analyses performed. Statistically significant genes were determined in the obtained results and confirmed by RT-PCR studies. Among these genes, up-regulated ATOH 8 was successfully cloned into the lentiviral-based pLKO.1-TRC vector for sh RNA studies.

KEYWORDS: Exosomes, colon cancer, RNA- sequence, sh RNA

Science Code / Codes: 20326, 20603, 20606, 20610

Page Number: 138

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Kanser	1
1.1.1 Kolon Kanseri	2
1.2 Kök Hücreler	5
1.2.1 İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler	6
1.3 Eksozomlar, Biyogenez ve Salınma	9
1.3.1 Eksozomlar ve Hücreler Arası İletişim	16
1.3.2 Tümör Mikroçevresi ve Eksozomlar	17
1.3.3 Eksozomların Kanser Progresyonunda Çok Yönlü Rolü	20
1.4 Transkripsiyonel Regülasyon	22
1.5 Yeni Nesil Dizileme ve İnsan Genom Projesi	23
1.6 RNA Sekanslama.....	25
1.7 Gen Susturma	31
2. TEZİN AMACI VE KAPSAMI	33
3. MATERYAL VE METOD	35
3.1 Materyal.....	35
3.1.1 Çalışmada Kullanılacak Hücre Soyları	35
3.2 Yöntemler	35
3.2.1 Çalışmada Kullanılan Malzemelerin, Ortamın Temizliği ve Sterilizasyonu.....	35
3.2.2 Hücre Tabanlı Teknikler.....	35
3.2.2.1 Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlanması	35
3.2.2.1.1 Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması	35
3.2.2.1.2 FBS İnaktivasyonu ve Hazırlanması	35
3.2.2.1.3 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	35
3.2.3 Hücre Tabanlı Teknikler.....	36
3.2.3.1 İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Büyütülmesi.....	36
3.2.3.2 Donmuş Hücrelerden Kültür Yapılması	36
3.2.3.3 Hücrelerin Pasajlanması	36
3.2.3.4 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) ve Hücre Sayımı	37
3.2.3.5. İnsan Adipoz Kök Hücrelerden Eksozom İzolasyonu.....	37
3.2.4 Bradford Analizi	38
3.2.5 TEM Analizi	39
3.2.6. Western Blot	39
3.2.7 İmmünofloresan Analizi	41
3.2.8 iAMKH Kaynaklı Eksozomların Kolon Kanseri Hücreleri Üzerinde Canlılık Seviyelerinin Belirlenmesi	42
3.2.9 Klonojenik Analiz	43

3.2.10 Hücre Migrasyon Yöntemi (Scratch Testi)	43
3.2.11 RNA İzolasyonu	43
3.2.12 RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi.....	44
3.2.13 RNA Jel Elektroforezi	44
3.2.14 RNA Sekans Analizi.....	45
3.2.15 Primer Tasarımı	47
3.2.16 cDNA SENTEZİ	47
3.2.17 İnsan Beta Mikroglobulin Primerleri ile cDNA'nın PZR ile Kontrol Edilmesi.....	48
3.2.18 Agaroz Jel Elektroforezi	49
3.2.19 Gerçek Zamanlı PZR Analizi	50
3.2.20 Kompetent Hücre Hazırlanması ve Etkinliğinin Belirlenmesi.....	53
3.2.21 Transformasyon	54
3.2.22 Gen İfadesi Susturma	54
3.2.23 shRNA Primerlerinin Tasarlanması	55
3.2.24 shRNA Primerlerin Bağlanması	56
3.2.25 pLKO.1-TRC Vektörünün Kesilmesi.....	57
3.2.26 pLKO.1-TRC Vektörün ve shRNA Oligolarının Ligasyonu	57
3.2.27 Rekombinant pLKO.1-TRC Vektörünün Belirlenmesi.....	58
3.2.28 İstatiksel Analiz	59
4. BULGULAR	60
4.1 iAMKH'lerin Kültürü.....	60
4.2 SW-480 hücrelerin Kültürü	60
4.3 Hücrelerin Serumsuz Medyuma Alınması	60
4.4 Ultrasantrifüj Metodu ile Eksozom İzolasyonu.....	61
4.5 Total Eksozom İzolasyon Kit ile Eksozom İzolasyonu.....	61
4.6 Bradford Analizi	62
4.7 TEM Analizi	62
4.8 Western Blot.....	65
4.9 İmmüno Floresan Analizi	68
4.10 iAMKH Kaynaklı Eksozomların Kolon Kanseri Hücreleri Üzerinde Canlılık Seviyelerinin Belirlenmesi	70
4.11 Klonojenik Analiz	74
4.12 Hücre Migrasyon Analizi (Scratch Testi).....	75
4.13 RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi.....	77
4.14 RNA Jel Elektroforezi	78
4.15 RNA Sekans Analizi.....	79
4.18.1 Örnek Grupları.....	80
4.18.2 Filtreleme ve Normalizasyon.....	80
4.18.3 Kümeleme.....	81
4.18.4 Diferansiyel Ekspresyon Analizi	84
4.18.5 Volcano Plot Analizi	86
4.18.6 Gen Ontoloji Analizi	87
4.18.7 Yolak Analizi.....	88
4.19 Galaxy RNA Sekans Biyoinformatik Analizi	90
4.20 cDNA Sentezi	99
4.20 Biyoinformatik Analizler ile belirlenen genlerin ekspresyon seviyesinin SW480 hücrelerinde tespiti.....	100
4.21 Gerçek Zamanlı PZR Analizi	100
4.22 Gen İfadesi Susturma.....	102
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	108

6. KAYNAKLAR	122
ÖZGEÇMİŞ	136

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Kanser progresyonunun teşvik edilmesinde, stromal hücreler ve dönüşmüş epitel hücreler arası çapraz konuşma modeli (Peddareddigari, vd. 2010).....	5
Şekil 1.2: Eksozom biyogenezi ve hücre içi sekresyon mekanizması (Van Giau ve An, 2016).....	10
Şekil 1.3: HSP70'in faaliyetleri (Rosenzweig vd. 2019).....	11
Şekil 1.4: Birincil tümör mikro ortamı. (Lin vd. 2019).	19
Şekil 1.5: Eksozomların kanserdeki fonksiyonel önemi (Kahlert vd. 2013).	21
Şekil 1.6: RNA sekanslama deneyi (Wang vd. 2009).....	26
Şekil 1.7: RNA sekans veri analizi (Qian vd. 2014).....	29
Şekil 1.8: shRNA aracılı RNA interferans yolunun şeması (Rao vd. 2009).....	32
Şekil 3.1: MTT reaksiyonu (Wang vd. 2012).	42
Şekil 3.2: pLKO.1-TRC vektörünün şematik gösterimi	55
Şekil 4.1: iAMKH'lerin faz kontrast mikroskopik görüntüsü (A) X4, (B) X10.....	60
Şekil 4.2: SW-480'lerin faz kontrast mikroskopik görüntüsü (C) X10, (D) X20.....	60
Şekil 4.3: Ultrasantrifüj yöntemi ile eksozom izolasyonu	61
Şekil 4.4: Total eksozom izolasyon kit prosedürü	62
Şekil 4.5: Bradford analizi için standart BSA grafiği	62
Şekil 4.6: iAMKH'lerden izole edilmiş eksozomların TEM görüntüsü (150000 X,100 KV)	63
Şekil 4.7: iAMKH'lerden izole edilmiş eksozomların TEM görüntüsü ve çap uzunlukları (150000 X,100 KV).....	64
Şekil 4.8: iAMKH'lerden izole edilmiş eksozomların TEM görüntüsü (50000 X,100 KV)	64
Şekil 4.9: iAMKH'lerden izole edilmiş eksozomların TEM görüntüsü ve çap uzunlukları (50000 X,100 KV).....	65
Şekil 4.10: HSP70 proteininin Western Blot analizi.....	66
Şekil 4.11: CD 63 proteininin Western Blot analizi	66
Şekil 4.12: CD 81 proteininin Western Blot analizi	67
Şekil 4.13: CD 9 proteininin Western Blot analizi	67
Şekil 4.14: SW-480 hücre hattında DAPI ve CD 81 immüofloresan boyaması	69
Şekil 4.15: SW-480 hücre hattında DAPI ve CD 63 immüofloresan boyaması	69
Şekil 4.16: iAMKH kaynaklı eksozomların SW-480 hücre hattı üzerindeki 24. saat MTT testi.....	71
Şekil 4.17: iAMKH kaynaklı eksozomların SW-480 hücre hattı üzerindeki 48. saat MTT testi.....	71
Şekil 4.18: iAMKH kaynaklı eksozomların SW-480 hücre hattı üzerindeki 72. saat MTT testi.....	72
Şekil 4.19: iAMKH kaynaklı eksozomların SW-480 hücre hattı üzerindeki 48. saat MTT testi.....	72
Şekil 4.20: iAMKH kaynaklı eksozomların SW-480 hücre hattı üzerindeki 48. saat MTT testi.....	73
Şekil 4.21: iAMKH kaynaklı eksozomların SW-480 hücre hattı üzerindeki 72. saat MTT testi.....	73
Şekil 4.22: SW-480 hücre hattına koloni formasyon testi sonucu.....	74

Şekil 4.23: SW-480 hücre hattına koloni formasyon analizi sonucu grafiği. 26,70 ng/µl konsantrasyonunda eksozom uygulaması ve 10. günde hücre koloni formasyonuna etkilerinin belirlenmesi	75
Şekil 4.24: SW-480 hücre hattında scratch analiz sonucu. 26,70 ng/µl konsantrasyonunda eksozom uygulaması ve 0. Saat, 4. Saat, 24. Saat ve 48.saatte hücre migrasyonunun belirlenmesi.....	76
Şekil 4.25: SW-480 hücre hattında scratch analiz sonucu % olarak kapanan alanların grafiği.	77
Şekil 4.26: RNA jel elektroforezi.....	79
Şekil 4.27: Transkriptom filtreleme ve normalizasyon grafiği	81
Şekil 4.28: Kontrol ve eksozom grupları için kümeleme grafiği.....	82
Şekil 4.29: Kümeleştirme analizi	84
Şekil 4.30: Diferansiyel ekspresyon grafiği.....	85
Şekil 4.31: Volcano plot analizi	86
Şekil 4.32: Kontrol ve eksozom grupları arasında normalize edilmiş okuma değerleri	87
Şekil 4.33: GO analizi	88
Şekil 4.34: İstatiksel olarak anlamlı olan ve ekspresyonu artan/azalan yolların analiz sonuçları.....	90
Şekil 4.35: Galaxy RNA sekans algoritması.....	91
Şekil 4.36: FastQ analizi	92
Şekil 4.37: Trimmomatic analiz.....	93
Şekil 4.38: FastQC analizi	94
Şekil 4.39: HISAT2 analizi	95
Şekil 4.40: Annotation analizi.....	96
Şekil 4.41: StringTie analizi.....	97
Şekil 4.42: DESeq Analizi	97
Şekil 4.43: DESeq plot analizi sonucu.....	98
Şekil 4.44: Galaxy programı ile belirlenen genler	99
Şekil 4.45: Agaroz jel görüntüsü.....	100
Şekil 4.46: RT-PCR analizi up regüle genler.....	101
Şekil 4.47: :RT-PCR analizi down regüle genler.....	102
Şekil 4.48: sh ATOH8 dizisinin, pLKO.1-TRC vektörüne klonlanma basamaklarının şematik gösterimi	103
Şekil 4. 49: pLKO.1-TRC vektörünün EcoRI ve AgeI enzimleri kullanılarak yapılan kesimin jel elektroforez görüntüsü.....	104
Şekil 4.50: Jelden geri kazanım sonucu pLKO.1-TRC vektörünün agaroz jel elektroforez görüntüsü	104
Şekil 4.51: Transformasyon sonucu sh ATOH 8 koloni oluşumu	106
Şekil 4.52: Rekombinant sh ATOH 8 kolonisinin EcoRI ve NcoI kullanılarak yapılan kontrol kesim sonucunun agaroz jel görüntüsü siyah kesik çizgilere işaretli ATOH 8 koloni. En son kuyucuk kesimi yapılmayan koloni.....	107

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1: Bradford analizi için gerekli bileşenler	38
Tablo 3.2: RİPA solüsyonu için gerekli bileşenler	38
Tablo 3.3: Western Blot için kullanılan solüsyonlar	40
Tablo 3.4: Western Blot için kullanılan solüsyonlar	40
Tablo 3.5: RNA elektroforezi solüsyonları	45
Tablo 3.6: cDNA sentezi için gerekli bileşenler.....	48
Tablo 3.7: İnsan Beta Mikroglubulin PZR bileşenleri.....	49
Tablo 3.8: İnsan Beta Mikroglubulin PZR şartları	49
Tablo 3.9: Agaroz jel elektroforezi solüsyonları	50
Tablo 3.10: RT-PZR ekspresyon primerleri	51
Tablo 3.11: RT-PZR için gerekli kimyasal solüsyonları	53
Tablo 3.12: RT-PZR koşulları	53
Tablo 3.13: shRNA bağlama reaksiyonu.....	56
Tablo 3.14: pLKO.1-TRC vektörünün kesim reaksiyonu	57
Tablo 3.15: pLKO.1-TRC Vektörün shRNA oligolarla ligasyonu	58
Tablo 3.16: Rekombinant koloni tespiti için kesim reaksiyonu şartları	58
Tablo 4.1: Örnek grupları transkriptom dizilemesi	80
Tablo 4.2: Kontrol ve eksozom gruplarında ısı haritası	83
Tablo 4.3: Genlerin kontrol ve eksozom grupları arasındaki katlık değişimi	85
Tablo 4.4: Ekspresyonu artan genlerin ağırlıklı olarak kullandıkları yollar	89

SEMBOL LİSTESİ

DAG	: Diaçilgliserol
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium
ECM	: Hücre dışı matriks
EMT	: Epitelyal mezenkimal geçiş
ESCRT	: Endozomal sıralama kompleksler
EV	: Hücre dışı veziküller
FBS	: Fetal Sığır Serum
HSP70	: Isı şoku proteini 70
IL-6	: İnterlökin 6
IL-8	: İnterlökin 8
iAMKH	: İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler
İGP	: İnsan genomu projesi
KİMKH	: Kemik iliği kök hücreleri
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
miRNA'lar	: mikroRNA'ların
MKH	: Mezenkimal kök hücrelerin
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MVB	: Multiveziküler cisimcik
NGS	: Yeni nesil dizileme
RISC	: RNA kaynaklı susturma kompleksi
RT-PZR	: Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S1P	: Sfingozin 1 fosfat
shRNA	: Küçük saç tokası RNA
siRNA	: Küçük interferan RNA'ların
TNFα	: Tümör faktör faktörü α
WTSS	: Tam transkriptom shotgun dizilimi

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması TÜBİTAK 121Z689 nolu 1002 projesi ve Balıkesir Üniversitesi BAP (2023/159) ile desteklenmiş ve tüm deneysel çalışmalar Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK ve BAP'a teşekkür ederim. Doktora tez çalışmamı YÖK 100/2000 Öncelikli Alanlar Doktora Programı (Alt Alan: Moleküler Onkoloji) ve TÜBİTAK (BİDEB 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı (Alan: Biyoteknolojik İlaç Teknolojileri) bursiyeri olarak tamamlamış bulunmaktayım. Doktora eğitimim boyunca beni destekleyen YÖK 100/2000 Öncelikli Alanlar Doktora Programına ve TÜBİTAK BİDEB 2211/C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programına desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimimin tüm aşamalarında bilgilerimi, tecrübelerini ve değerli zamanlarımı esirgemeyerek bana her fırsatta yardımcı olan, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki meslek hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağım değerli hocam Prof. Dr. Hatice YILDIRIM'a en derin teşekkürlerimi sunmak isterim. Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyip engin fikirleriyle yol gösterip, yetişmeme katkıda bulunan değerli hocam Prof.Dr. Feray KÖÇKAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitesinde yer alarak değerli bilgi ve görüşlerini benimle paylaşan, tez çalışmama sundukları eşsiz katkı ve desteklerinden dolayı Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ, Prof. Dr. Aylin ER, Doç.Dr. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKÖĞLU, Dr Öğr.Üyesi. Nurcan DEDEOĞLU ve Prof.Dr. Sezai TÜRKEL hocalarıma teşekkür ederim. Deneysel çalışmalarımı gerçekleştirdiğim laboratuvar sürecinde beraber çalıştığımız tüm ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim.

“Aile herşeydir!” mottosunu sonuna kadar yaşatan ve hissettiren EFE, KIZILCIK ve DAŞKAN ailelerimin her bir ferdine teşekkür ederim. Yaşamım boyunca her zaman yanımda olup, her anıma eşlik edip en büyük destekçilerimden olan sevgili kardeşim Arş.Gör.Dr. Burak EFE'ye ve değerli eşi, canım kardeşim Arş.Gör.Dr. Zeynep PASİN EFE'ye teşekkür ederim. Beni bu günlere getiren, hayatım boyunca maddi manevi her açıdan arkamda olan, aldığım her kararda koşulsuz sevgilerini ve desteklerini daima hissettiren canım annem Nurhan EFE'ye ve canım babam Mustafa EFE'ye üzerimdeki bütün emekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Lisans yıllarımdan bu zamana kadar sevgisi ve desteğiyle bana güç veren, sarıp sarmalayan, cesaretlendiren, yaşadığım sıkıntı ve zorluklarda elimi hep sımsıkı tutan kıymetli eşim Kerim DAŞKAN'a en derin duygularıyla teşekkür ederim.

Doktora tezimi, varlığını öğrendiğim ilk günden bu yana hayatımı sevgi ve kahkahayla doldururup en büyük motivasyon kaynağım olan beni anne yapan canım kızım Almira DAŞKAN'a ithaf ediyor ve kızıma en derin duygularıyla teşekkür ediyorum.

Balıkesir, 2025

Burcu EFE DAŞKAN

1. GİRİŞ

1.1 Kanser

Kanser, dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur ve ABD’de ikinci önde gelen ölüm nedenidir. Dünya Sağlık Örgütü 2015 yılı verilerine göre kanser, 172 ülkenin 91’inde 70 yaş öncesi insanlarda birinci veya ikinci ölüm nedeni iken 22 ülkenin daha eklenmesiyle üçüncü veya dördüncü sırada yer almaktadır. Amerikan Kanser Topluluğu verilerine göre kalp hastalıkları dışında ikinci ölüm nedeni olarak belirlenen kanserin, 2018 yılında yaklaşık 1,7 milyon yeni kanser vakası olduğunu rapor etmişlerdir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından yürütülen çalışmada GLOBOCAN 2018 verilerine göre 2018 yılında dünya genelinde 18,1 milyon yeni vaka ve 9,6 milyon kanser ölümü olacağını tahmin edilmiştir. Bu verilere göre her gün 609.640 Amerikalıdan 1670’i kanser nedeniyle ölümü gerçekleştirmektedir. Küresel nüfusun yaklaşık %60’nın Asya kıtasında olması, dünyadaki kanser ölümlerinin yaklaşık yarısından fazlasının Asya’da gerçekleşeceğini öngörmektedir. Avrupa toplam kanser vakalarının %23,4’ünü ve kanser ölümlerinin %20,3’ünü oluştururken, küresel popülasyondaki ölüm oranının %9’unu oluşturmakta, bu durum Amerika’da görülme sıklığının % 21 olduğu ve dünya çapında ölüm oranının ise %14,4’ünü oluşturduğu belirlenmiştir. Asya’da bu durum %57,3, Afrika’da %7,3 iken küresel popülasyondaki ölüm oranı; kanser türlerinin farklı dağılımları ve bu bölgelerde daha yüksek ölüm oranları nedeniyle insidans payları sırasıyla %48,4 ve %5,8 olarak bulunmuştur (Bray vd. 2018).

2019’da koronavirüs pandemisi nedeniyle 2020 yılında kanserin teşhis ve tedavisinde gecikmeler meydana gelmiştir. Kısa süreli kanser vakalarında düşüş meydana gelmiş olsa da ardından ileri evre hastalıklarda ve mortalitede artışa neden olmuştur (Siegel vd. 2021). 2020’de ABD’de yaklaşık olarak 1,8 milyon kanser teşhisi konulmuş ve 600.000’den fazla ölüm gerçekleşmiştir. Malign neoplazmalar, 45 ila 64 yaş arasındaki bireylerde önde gelen ölüm nedenidir ve sağlık harcamalarının önemli bir kısmı kansere atfedilmektedir (Rahib vd. 2021).

Kanser hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde yaşlanan ve artan nüfusla birlikte erken ölümlerin başlıca nedeni olup birçok ülkede yaşam beklentisini azaltmaktadır. Bununla birlikte kanser tanı modellerinde insani gelişim indeksi yüksek olan ülkelerde farklı tip kanser profili görülmektedir. Örneğin, kolorektal ve prostat kanserleri insani gelişim

indeksinin yüksek olduğu bölgelerdeki erkeklerde yaygın iken, düşük insani gelişim indeksine sahip bölgelerde bulunan kadınlarda serviks kanserinin daha sık görüldüğü tespit edilmiştir (Cao vd. 2021).

Dünya Sağlık Örgütü sınıflamasına göre 4. aşama beyin tümörü olan Glioblastoma multiforme, santral sinir sistemi primer beyin tümörünün en yaygın şeklidir. Agresif yapısı ve mevcut tedavilerden kaçması onu en ölümcül kanserlerden biri yapmaktadır. Glioblastoma multiforme hücrelerinin heterojen doğası ve sınırlı onarım mekanizmaları ve anatomik karmaşıklıkları, santral sinir sistemide herhangi bir kanseri tedavi etmedeki doğal sorunlar, ilaca dirençlilik gibi nedenler glioblastoma multiforme'un tedavisini zor bir amaç haline getirmektedir. Glioblastoma multiforme, programlanmış hücre ölüm şekli olan apoptoza karşı direnç göstermesiyle ilgili moleküler mekanizmaların sadece bir kısmı anlaşılabilmiştir. Tümör yeniden nüksü, radyoterapi ve kemoterapiye ek olarak, glioblastomun tedavisi için geliştirilen dendrimerler, miseller ve polimer bazlı- ilaç nano-taşıyıcılarının glioblastoma hücrelerini hedeflemedeki zorluklar ve kan beyin bariyerini geçememesi problemi devam etmektedir. Hücreler ve çevresinde meydana gelen anormallikler tümör oluşumu ve ilerlemesi ile ilgili olan süreçler işaret etmektedir. Bu nedenle, hücresel ve moleküler mekanizmaların tam olarak aydınlatılması glioblastomaların tedavisi için önemli bir hedef haline gelmiştir (Raucher, 2019, Haar vd. 2012).

1.1.1 Kolon Kanseri

Dünya çapında kolon kanseri gibi birçok kanseri önleme, teşhis ve tedavi çalışmalarını iyileştirmek için erken teşhis stratejileri ve halk sağlığı girişimleri gün geçtikçe önemi giderek artan bir konu olarak ele alınmaktadır. Buna karşılık, kolon kanseri küresel olarak en yaygın kanserler arasındadır ve görülme oranları bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Tarama çalışmaları, kolon kanserinin erken evrelerde tespit edilmesinde ve hayatta kalma oranını arttırmada etkili olsa da diyet, fiziksel aktivite ve genetik yatkınlıklar gibi faktörler kanserin ele alınmasındaki zorlukları devam ettirmektedir (Patharia vd. 2024). Kolon kanserinin, Lieberkühn kriptlerinin tabanında bulunan ve bağırsak epitel zarının günlük değişiminden sorumlu olan LGR5+ kript tabanı kolumnar hücreleri olarak adlandırılan yerleşik kök hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durum ilk olarak, Apc tümör baskılayıcı kaybıyla geçici çoğalan progenitörlerde değil, LGR5+ kript tabanı kolumnar kök hücreleri hedeflendiğinde tümör oluşumunu tetiklediği fare modellerinde gösterilmiştir. Kolon kanserinin 'aşağıdan yukarıya' modeline ek olarak, inflamasyon

bağlamında tümör oluşumunu başlatabilen kript-villus ekseni boyunca daha yüksek pozisyonlarda bulunan post-mitotik, tamamen işlenmiş hücre soylarının bulunduğu ‘yukarıdan aşağıya’ modeller de önerilmiştir. 2024 yılında yapılan bir çalışmada, inflamatuvar bağırsak hastalığı olan bireylerde kolon kanserlerinin çoğunun kök hücre olmayan soylardan kaynaklanabileceği gösterilmiştir (Verhagen ve Fodde, 2024). Gerçekleştirilen çalışmalarda evre I kolon kanseri için 5 yıllık sağkalım oranı %91 iken lokal olarak ilerlemiş hastalıklarda bu oran %72’ye ve evre IV için ise %14 sağkalıma düşmektedir. (Tonini ve Zanni, 2024).

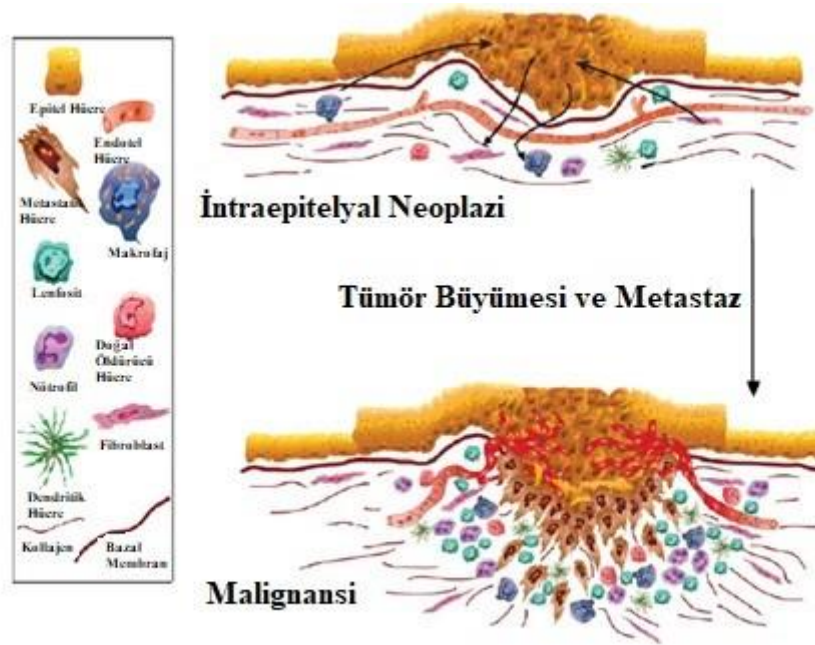
Hem erkekleri hem de kadınları etkileyen kolon kanseri, dünya çapında kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. Bunun nedenleri arasında çok fazla et ve alkol tüketimi ile yeterli fiziksel egzersiz yapılmamasının yanı sıra mevcut gıda alışkanlığı ve yaşam tarzı nedeniyle dünya çapında artmaktadır. Dünya nüfusunun önemli bir bölümünü etkileyen kolon kanseri, hasta bakımını ve sağkalımını iyileştiren son atılımlara rağmen kemoterapi sınırlılığı, hastada oluşan yan etkiler ve direnç sebebiyle halen yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Bunun için daha az zararlı farmakolojik tedavilere her zamankinden daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır (Islam vd. 2022).

Kolorektal kanser dünya çapında ikinci önde gelen ve en yaygın kanserlerden biridir. Yeni tanı alan hastaların yaklaşık %25’i zaten metastaz geliştirmiş ve tüm kolorektal kanser hastalarının %50’sinde hastalık ilerledikçe zaman içinde metastaz gelişmektedir (Kirstein vd. 2014). Kolorektal kanser dünyada en sık teşhis edilen üçüncü malignite ve dördüncü önde gelen kanser ölüm nedenlerinden olup 2012’de yaklaşık 1,4 milyon yeni vaka ve yaklaşık 700.000 ölümlle sonuçlanmıştır (Arnold vd. 2017). Normal kolonun epiteli, düzenli aralıklarla ayrılmış, dallanmamış kriptalara sahiptir. kolorektal kanserin kriptaları, dallanma kriptaları, düzensiz ayrılması ve büyük miktarlarda desmoplastik stroma ile karakterize olan düzensiz bir yapı sergilemektedir. İleri dereceli adenokarsinomlar, sıkı bir şekilde paketlenmiş tümör hücrelerine sahiptir ve bezler, tümör hacminin %50’sinden azını içermektedir (Munro vd. 2018). Kolorektal kanserde sitotoksik tedavi ve hedeflenen her yol için farklı kazanılmış direnç mekanizmaları bulunabilmekte, ancak çoğu zaman bir ilaca karşı kazanılmış direnç, çoklu ilaç direnci olarak adlandırılan bir kavram olan, farklı etki mekanizmalarıyla çalışabilen diğer ilaçlara karşı direnç sağlamaktadır (Hammond vd. 2016).

Hematojen yoldan aracılık eden uzak metastaz, kolorektal kanser hastalarında doğrudan kötü prognoza katkıda bulunur. Birçok çalışmada, hastaların prognozunu iyileştirmek amacıyla kolorektal kanserdeki potansiyel nüksün biyolojik belirteçleri incelenmiştir. Kanser gelişimi ile ilişkili küçük kodlayıcı olmayan RNA'lar olan mikroRNA'ların (miRNA'lar) çeşitli kanser türlerinde potansiyel biyolojik belirleyiciler olduğu gösterilmiştir (Matsumura vd. 2015).

Kolorektal kanser, normal kolonik epitelyumun “polip kanseri ilerleme sekansı” olarak adlandırılan kolon adenokarsinomuna dönüşmesine yol açan genetik ve epigenetik değişikliklerin ilerlemesi sonucunda meydana gelmektedir. Gen mutasyonlarının ve epigenetik değişikliklerin ardışık ilerlemesi, iyi huylu adenomların yerine malign adenokarsinomların oluşmasına neden olmakla beraber ilerlemesini de yönlendirdiği düşünülmektedir. Çünkü bu mutasyonlar, kanserin ayırt edici davranışlarını düzenleyen sinyal yollarını etkilemektedir. Böylece mutasyonlar giderek daha fazla malign hücrelerin büyümesine yol açarak klonal bir büyüme avantajı yaratır. Sonucunda ise kendini invaziv adenokarsinom olarak göstermektedir (Grady vd. 2008).

Genetik ve aile öyküsü kanserin başlangıcını açıklamak için yeterli değildir. Bununla beraber kalıtsal kolorektal kanser vakalarında, neoplastik ilerlemenin altında yatan başka faktörlerin de açıklanmasına ihtiyaç vardır. Son zamanlarda gerçekleştirilen çeşitli kolorektal kanser çalışmaları, malignite gelişimi ve ilerlemesinde sitolojik gelişime ve bilinen mutajenik mekanizmalara ek olarak inflamasyon, bağırsak mikrobiyota bileşimi, beslenme, epigenetik modifikasyonlar ve tümörün geliştiği mikroçevre mimarisi ile sıkı bir ilişki olduğunu vurgulamaktadır (Garagnani vd. 2013). Kolorektal kanserde normal kolonik epitelyumdan adenomatöz bir polip ve en sonunda invaziv kolon karsinomuna kadar çok aşamalı süreç, tümör mikroçevresiyle ilişkilendirilmektedir. Tümör mikroçevresi esasen tümörle sızan hücreler, damar düzeni, hücre dışı matriks (ECM) ve diğer matrisle ilişkili molekülleri içermektedir. Dönüşmüş olan epitel hücreleri, büyümelerini, hayatta kalmalarını, invazyon ve metastazı kolaylaştırmak amacıyla stromal hücrelerin işlevlerini modüle etmektedir. Epitelyal tümörlerin başlamasını takiben, transforme edilmiş epitelyal ve stromal hücreler arasındaki karşılıklı etkileşimler, bir mikro ortamın normalden tümör büyümesini ve yayılmasını destekleyen bir hücreye geçişinde anahtar bir rol oynamaktadır (Şekil 1.1). Kanser hücrelerinin stromal bileşenlerle olan bu bağlantısı potansiyel yeni terapötik ajanların geliştirilmesi için yeni yollar açmaktadır (Peddareddigari, vd. 2010).



Şekil 1.1: Kanser progresyonunun teşvik edilmesinde, stromal hücreler ve dönüşmüş epitel hücreler arası çapraz konuşma modeli (Peddareddigari, vd. 2010).

1.2 Kök Hücreler

Kök hücreler kendini yenileyen, sınırsız çoğalma kapasitesine sahip olan ve belirli bir dokudaki olgun hücreleri oluşturma yeteneğine sahip olan hücreler olarak tanımlanır (Reya vd. 2001). Kök hücreler özel hücre tiplerine farklılaşan pluripotent kök hücreler (embriyonik kök hücreler), her üç embriyonik soyun hücrelerine farklılaşan indüklenmiş pluripotent kök hücreler ve hematopoetik kök hücreler gibi multipotent özellikte olup spesifik bir dokuda çoklu özel hücrelere dönüşebilmektedir. Kök hücrelerin başarılı klinik uygulamalarına birçok örnek bulunmaktadır. Dünya genelinde milyondan fazla hasta, lösemi, anemi veya immün yetmezliklerin tedavisi için yapılan kemik iliği transplantasyonlarından yararlanmaktadır. Ciltte bulunan cilt kök hücreleri ciddi yanıkları iyileştirmek için kullanılırken, limbal kök hücreler hasarlı korneayı yenileyebilme yeteneğine sahiptir (Dulak vd. 2015). Kök hücrelerin başarılı klinik uygulamalarına birçok örnek bulunmaktadır. Dünya genelinde milyondan fazla hasta, lösemi, anemi veya immün yetmezliklerin tedavisi için yapılan kemik iliği transplantasyonlarından yararlanmaktadır. Ciltte bulunan cilt kök hücreleri ciddi yanıkları iyileştirmek için kullanılırken, limbal kök hücreler hasarlı korneayı yenileyebilme yeteneğine sahiptir. Yamanaka vd. 2006 somatik hücreye gen aktarak embriyonik kök hücre özelliği kazandırma ile ilgili önemli bir çalışma gerçekleştirmişler.

Çalışmada “yeniden programlama” stratejisinin tümörle ilişkili gen ürünü olan c-Myc, Klf4, Oct-3/4 ve Sox-2’nin somatik hücreleri embriyonik kök hücre benzeri hücrelere doğru yönlendirdiğini kanıtlamışlardır. Pluripotent kök hücrelerin özellikle hastaya özel indüklenmiş pluripotent kök hücre transplantasyonunun muazzam bir terapötik potansiyele sahip olduğu ancak klinik uygulamalarındaki dezavantaj nedeniyle, multipotent veya unipotent olan yetişkin kök hücrelerin kullanımı, şu anda daha ulaşılabilir bir strateji olmaktadır (Takahashi ve Yamanaka, 2006, Liu, 2008, Dulak vd. 2015).

Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) yara iyileşme modelinde yapılan çalışma sonucunda yara iyileşmesi aşamasında görev aldığı ve yaranın iltihaplanma aşamasının ötesine geçme, kronik bir yara durumuna gerileme yeteneğini de etkilediği belirlenmiştir. Bununla birlikte proinflatuar sitokinler olan TNF ve interferon salgılanmasını azalttığını, öte yandan anti-enflatuar sitokinler olan interlökin-10 ve interlökin üretimini arttırdığı bildirilmiştir. Kronik bir enflatuar duruma geçen yarayı iyileştirmenin bir sonraki aşamasına ilerleterek yaraları iyileştirmede de görev almaktadır. Sonuç olarak MKH’ler, çoklu farklılaşma kapasitesine ek olarak, bağışıklık tepkisini ve iltihabını düzenlerler ve farklı hastalıkların tedavisi için cazip olmasını sağlayan koruyucu ve onarıcı mekanizmalara sahiptirler (Singer ve Caplan, 2011, Newman vd. 2009, Maxson vd. 2012).

1.2.1 İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

İnsan yağ dokusundan yağ alımı (liposuction) ile toplanan, *in vitro* ortamda adipojenik, osteojenik, kondrojenik ve miyojenik farklılaşmaya uğrayabilen hücrelere insan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iAMKH’ler) olarak sınıflandırılmaktadır. Multipotent hücrelerden olan iAMKH ‘ler *in vitro*’da normal diploid karyotip sergileyerek oldukça geniş kapsamlı kendini yenileme kapasitesine sahip olup çok potansiyelli özelliğini kaybetmeden dondurma/çözme prosedürüne dayanabilmektedir (Rodriguez vd. 2004).

iAMKH ‘ler, terapötik yaklaşımlar için potansiyelleri nedeniyle büyük ilgi çekmektedir. Beyaz yağ dokusu kavramı, son on yılda önemli ölçüde değişmiştir. Önceki yıllarda adipoz doku birçok farklı alanda kullanılmaktaydı. Özellikle mastektomi ve diğer tümör rezeksiyonlarında, travma sonrası kusur rekonstrüksiyonunda (özellikle yanıklar), konjenital anormalliklerin tedavisinde ve meme, yanak, çene büyütme işlemlerinden sonra doku rekonstrüksiyonunda kullanılmaktadır. Beyaz yağ dokusunda stabil mezenkimal kök / stromal hücrelerin belirlenmesi ile beyaz yağ dokusu pasif bir enerji deposundan umut verici

bir kök hücre kaynağına dönüşmüştür (Gojanovich vd. 2018, Korurer vd. 2014). Adipoz kaynaklı kök hücreler, farklılaşma potansiyeli diğer MKH'lerinkine benzer multipotent özellikteki hücrelerdir. Kültür plastiğine yapışması, *in vitro*'da büyüyerek çokluk derecesini koruyabilme ve kendini yenileme kapasitesi gibi kök hücre olma özellikleri sergilemektedir. AMKH 'ler özellikle rejeneratif tıp alanında kullanımı açısından umut verici bir kök hücre kaynağı olmanın yanı sıra minimum miktarda donör bölgesi morbiditesi ve kolay elde edilebilmeleri ile oldukça önem taşımaktadırlar (Raposio ve Bertozzi, 2017).

Mezenkimal stromal / kök hücreler olarak adlandırılan fibroblastik hücre tipi, rejeneratif sekretomları ve çoklu mezenkimal soylara farklılaşma kapasiteleri ile doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları için ümit vaat etmektedir. MKH 'lerin, terapötik yönü ve şimdiye kadar umut verici klinik sonuçların fazla olması, rejeneratif terapilerde kişiye özgü ve hücre bazlı tedavilere odaklanmanın gün geçtikçe önemini arttırdığı ve bununla beraber önemli bir hücre kaynağı olma yolunda ilerlediği görülmektedir (Fitzsimmons vd. 2018).

Allojenik kök hücre kullanımı, AMKH 'leri parakrin etkilerinden yararlanan ve immünomodülatör tedaviler/terapilerde oldukça fazla ilgi duyulan bir alan haline getirmiştir. AMKH'ler hali hazırda klinik uygulamalarda, örneğin Crohn hastalığı gibi otoimmün hastalıkların tedavisi ve kafa ve yüz cerrahisinde kemik defektleri için rejeneratif bir tedavi olarak kullanılmaktadır (Patrikoski vd. 2019).

Kök hücre temelli rejeneratif tedaviler, kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarının tedavisi için terapötik bir potansiyel sergilemektedir. Kök hücreler kanser tedavisi için yararlı bir aracı olarak kabul edilmekte ve uzun süredir radyasyon veya kemoterapiyle tedavi edilen hastalarda bağışıklık sistemini yenilemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu hücreler sahip oldukları doğal tümör tropik özelliği sayesinde kanser hücrelerini hedefleme ve tümör bölgelerini hedef alan terapötik reaktifleri taşıma sistemi olarak da kullanılmaktadır (Lin vd. 2019, Nguyen ve Van Pham, 2015).

Tümör yapısı içinde parankimi, damarları ve bağ dokusunu içeren stroma bulunmaktadır. Stroma, tümör hücrelerinin beslenmesinde büyük öneme sahiptir. Stroma parankimal hücrelerle etkileşime girerek bir tümörün büyüme ve yayılmasını düzenlenmektedir. Bununla beraber tümör ile ilişkili olan miyofibroblastlar; stromal faktör-1 aracılığıyla anjiyogenez ve hücre dışı matrisin yeniden şekillendirilmesine yardımcı olmakta ve metaloproteazların salgılanması ile metastazda rolü bulunmaktadır. Ayrıca potansiyel bir

stromal hücre kaynağı olan multipotent mezenkimal kök hücreler de çoklu farklılaşma ve kendini yenileme özelliklerinin yanı sıra tümör hücrelerine doğru göç tropizmini göstermektedir. Bu durum her ne kadar tedavi için bir avantaj olsa da parakrin uyarıcılarının bir sonucu olarak tümör fenotipini güçlendirme olasılığını arttırmaktadır (Miana ve González, 2018).

AMKH 'lerin güvenli bir şekilde elde edilmesi, geniş kaynaklara sahip olması, güçlü üreme kabiliyeti ve etik konularla ilişkili olmaması önemli avantajlarından. Son yıllarda, araştırmacılar AMKH 'lerin bir parakrin mekanizmasına sahip olabileceğini göstermiştir. AMKH 'ler, miyokard nekrozu gibi alanlarına nakledildiğinde iskemiye iyileştirmek için büyük miktarlarda vasküler endotel büyüme faktörü, transformasyon büyüme faktörü - β , hepatosit büyüme faktörü ve diğer aktif faktörler salgılayarak anjiyogenezi teşvik etmektedirler (Wang vd. 2016).

İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin meme kanseri hücrelerinin mikro çevresi üzerindeki etkisi ve altındaki yatan mekanizmaları belirlemek için bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada iAMKH'ler ve kanser hücreleri arasındaki ilişkinin anlaşılması ve özellikle meme kanseri tedavisinde kök hücrelerin klinik uygulamaları araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu iAMKH'ler, epitelyal marker E-cadherin ekspresyonunu azaltıp *in vitro* olarak interstisyel marker N-cadherin ve epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunun arttırarak MCF7 hücre göçünü ve istilasını arttırıcı yönde etki ettiği bulunmuştur. Elde edilen verilerden sonuç olarak iAMKH'lerin tümör hücreleri üzerinde de parakrin etkisi olduğu gösterilmiştir (Wu vd. 2019).

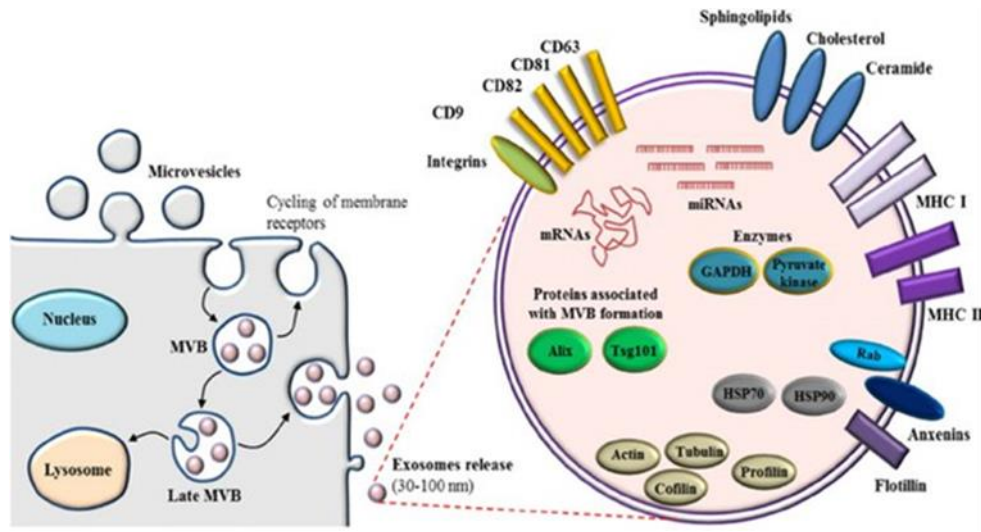
Chen vd. 2019 yapmış oldukları bir çalışmada adipoz türevli mezenkimal kök hücrelerin meme kanserinin büyümesine ve yeniden tekrar edebileceği konusundaki belirsizliği aydınlatmaya çalışmışlardır. Buna göre AMKH'ler ve MCF-7 meme kanseri hücreleri arasındaki etkileşimler bir Matrigel ortak kültür sisteminde ve *in vivo* nude fare modelinde değerlendirilmiştir. Sonucunda MCF-7 hücrelerinin AMKH'ler üzerinde tümör tropizm etkisi gösterdiği ve bu makrofaj enflamatuar proteini - 1δ ve makrofaj enflamatuar proteini - 3α gibi kemokinler tarafından düzenlenebildiği görülmüştür. Ek olarak, AMKH'ler *in vitro* tümör küre oluşumunu önemli ölçüde indüklemiş ve *in vivo* olarak tümör oluşumunu teşvik etmiştir. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) analizi de MCF-7 hücreleri

tarafından tümör alanı oluşumunun, epitelyal mezenkimal geçişin aracılık ettiği kök benzeri özelliklerin indüksiyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Chen vd. 2019).

1.3 Eksozomlar, Biyogenez ve Salınma

Eksozomlar, normal ve pato-fizyolojik koşullar altında tüm hücre tipleri tarafından salınan, boyutları 30-150 nm arasında değişen endositik kökenli küçük membran vezikülleridir. Tümör hücreleri ve trombositlerden salınan membranla kapatılmış hücre dışı veziküllerin (EV 'lerin), dokular veya vücut sıvıları içinde olduğu 40 yıldan daha uzun bir süre önce belirlenmiştir. Bu EV 'lerin kökeninin doğrudan plazma zarından tomurcuklandığı düşünülmekteydi. Ancak 1980 'lerde retikülosit olgunlaşmasını inceleyen iki grup, daha karmaşık bir EV salgılama şekli tanımladı. Küçük veziküllerin, hücre içi bir endozom içinde içe tomurcuklanma yoluyla oluştuğunu gösterdiler; bu, daha sonra plazma zarı ile kaynaşık iç veziküllerinin dışına salınabilen multiveziküler cisimcik (MVB) oluşumuna yol açtığı görülmüştür (Şekil 1.2). 1987 'de, endozomal kökenli bu EV'ler "eksozom" olarak adlandırılmıştır. Eksozomlar, proteinler, nükleik asitler (mikroRNA, uzun kodlayıcı olmayan RNA, bozulmamış ve mutasyona uğramış mRNA ve DNA fragmanları), lipitler ve diğer bazı metabolitler (amino asitler, şekerler, vb.) gibi çok sayıda temel molekül içerirler ve kompozisyonları farklı çevresel faktörlerden ve sağlık durumundan etkilenmektedir (Trédan vd. 2007) (Kowal vd. 2014). Eksozomların içerisinde bulunan biyomoleküllerin çoğu köken aldığı hücre tipine göre çeşitlilik gösterir. Hücrelerden salınan eksozomlar, kan, anne sütü, amniyotik sıvı, tükürük, idrar, safra, pankreas suyu, beyin omurilik ve periton sıvıları gibi çoğu vücut sıvısına geçebilir (Deng ve Miller, 2019).

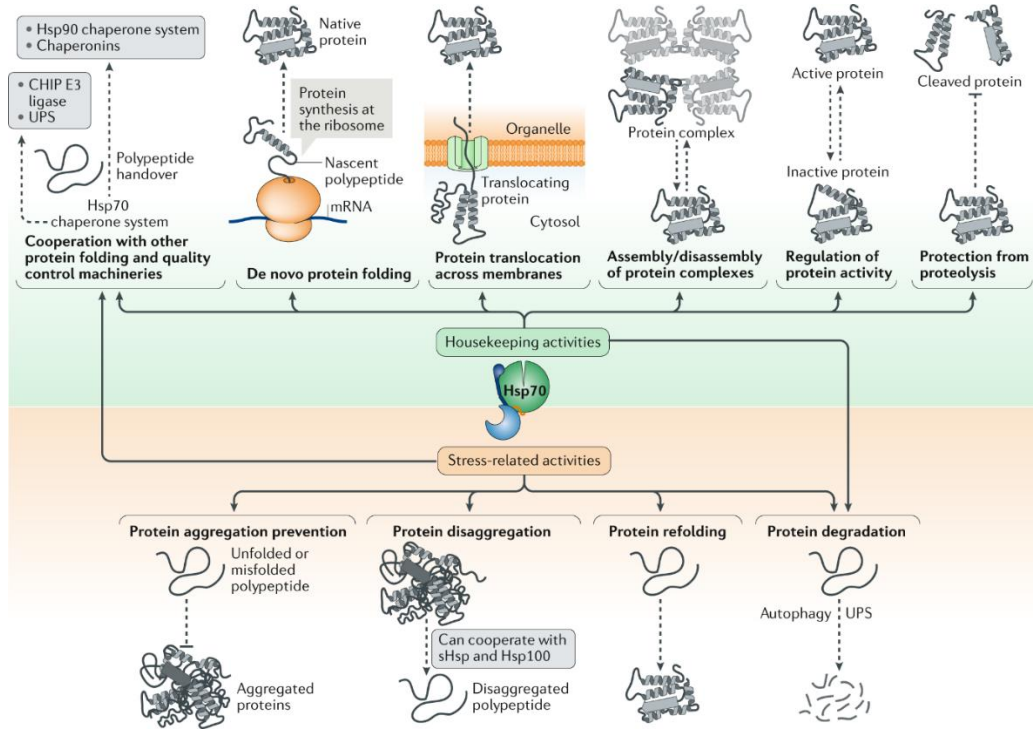
Eksozomlar, şaperonlar (Hsc70 ve Hsp90), trimerik G proteinlerinin alt birimleri, hücre iskeletini oluşturan proteinler (aktin, tubulin ve moesin), ESCRT proteinleri (Tsg 101 ve Alix), taşıma ve füzyona katılan proteinler (Rab2; Rab7, Rab11 ve Annexines), tetraspanin proteinleri (CD9, CD63, CD81 ve CD82) ve bazı hücrelere özgü proteinler gibi birçok protein ailesini içerirler (Şekil 1.2). Antijen sunan hücrelerin (APC) eksozomları, yüzeylerinde MHC I ve MHC II reseptörlerini bulundururken, üriner eksozomları, aquaporin-2'yi, intestinal epitelyal hücre kaynaklı eksozomlar, A33 antijenini ve T hücrelerindeki eksozomlar, CD3 antijenini bulduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, CD63, MHC II ve CD81 içeren eksozomların, toplam eksozomların sırasıyla % 47, % 32 ve % 21'ini oluşturduğu kanıtlanmıştır. İçerdikleri DNA, RNA ve protein gibi hücre içi bileşenleri sunarak hücre-hücre iletişimde önemli rol oynayan bileşenlerdendir (Van Giau ve An, 2016).



Şekil 1.2: Ekzozom biyogenezi ve hücre içi sekresyon mekanizması (Van Giau ve An, 2016).

Isı şoku proteini 70 (HSP70) veya DnaK; ısı şok proteinleri ailesi, protein homeostazında kritik süreçlerde rol oynayan, yaklaşık 70 kDa'nın moleküler şaperonlarından oluşmaktadır. Benzer yapıya sahip proteinler hemen hemen tüm canlı organizmalarda bulunur. Bunlar adenosin trifosfatları, yanlış katlanmış veya denatüre proteinleri ortaya çıkarırlar ve bu proteinleri açılmamış, katlanır ve yetkili bir durumda tutabilmektedir. (Murphy, 2013). Moleküler şaperon proteinleri yeni sentezlenmiş proteinlerin doğal yapılarına katlanmalarında onlara yardımcı olur. HSP70 de bu proteinlerden bir tanesidir. HSP70 proteinleri regülatör proteinlerin aktivitesinin kontrolünden, organel ve salgı proteinlerinin membran translokasyonundan da sorumludur (Maraba, 2015).

HSP70, 45 kDa N-uç ATPaz domain ve 25 kDa C-terminal substrat bağlanma domaini içeren 70 kDa'lık bir proteindir. ATPaz domain ve substrat bağlama domaininin arasında bir bağlaç sekansı bulunur. Bu bağlaç allosterik iletişimde görev almaktadır. HSP70'de ATP hidrolizi iki ana hali içeren bir döngü şeklindedir. ATP bağlı olduğu durumda substrat afinitesi düşüktür. Bağlı ATP hidrolizlenip ADP ve Pi oluştuğunda ise substrata olan afinite artış göstermektedir. Ek olarak, zara bağlı HSP70'ler kanser tedavileri için potansiyel bir hedef olarak tanımlanmıştır. Bunların hücre dışı olarak lokalize, hem zara bağlı hem de zarsız yapılara sahip oldukları tespit edilmiştir (Şekil 1.3) (Rosenzweig vd. 2019).



Şekil 1.3: HSP70'in faaliyetleri (Rosenzweig vd. 2019).

CD 63 tetraspanin ailesi olarak da bilinen transmembran 4 süper ailesinin bir üyesidir. Bu üyelerin çoğu, dört hidrofobik alanın varlığı ile karakterize edilen hücre yüzeyi proteinleridir. Proteinler, hücre gelişimi, aktivasyonu, büyümesi ve hareketliliğinin düzenlenmesinde rol oynayan sinyal iletim olaylarına aracılık etmektedir (Mihov vd. 2015). Çoğu hücrede CD63 geç endozomlarda MVB'lerde ve lizozomda bulunmasıyla lizozomal membran proteini olarak adlandırılmaktadır. CD63; trans golgi network ya hücre yüzeyinden ya da doğrudan hücre içi yol aracılığıyla endozomlara taşınır. Hücre yüzeyinden CD 63, AP2 ve klatrin kaplı membran oyuklarından endositozlanır. Buna ek olarak başka bir yol ise kalveola aracılı endositozdur. Ardından CD63 ya hücre yüzeyine geri dönebilir ya da geç endozom ve lizozomlara doğru endozomal yolu izleyebilir. Lizozomal hedefleme; intralüminal veziküllerin içe doğru dahil etme yoluyla meydana gelmektedir. Belirli durumlarda geç endozomlarda/MVB'lerde CD63 endozomların yüzey ile füzyonu yoluyla hücre dışı boşluğa salınabilen ILV'lerce zenginleştirilmiştir. IL'ler daha sonra eksozom olarak adlandırılır (Pols ve Klumperman, 2009, Mihov vd. 2015).

Eksozomlar içerisinde bulunan kargo moleküllerini tesadüfi bir seçimle almaktan ziyade kendine özgü tanımlanmış mekanizma ile almaktadır. Eksozomlara spesifik olan biyoaktif moleküller taşıma için özel mekanizmalar kullanılarak endozomal sıralama kompleksleri

(ESCRT) bağımlı ya da ESCRT-bağımsız (dahil tetraspaninler ve lipitler) olmak üzere iki farklı etki gösterebilmektedir. Bunlardan ESCRT bağımlı yolda ESCRT 0, ESCRT 1, ESCRT 2 ve Vsp 4 gibi protein ailesi görev almaktadır. ESCRT ailesi, multiveziküler cisimler ve intralüminal veziküllerin biyogenezinde rol oynar. Bu süreç en iyi mayalarda keşfedilmiştir. ESCRT ailesi multiveziküllerin üretilmesi için endozomun tomurcuklanmasını başlatarak sitoplazmadan uzaklaşır ve olgun MVB veziküllerinin lizozom lümenine salınması için membranın kesilme işlemini gerçekleştirmektedir (Villarroya-Beltri vd. 2014). ESCRT-0, -I ve -II kompleksleri endozomal zardaki ubiquitin proteinleri tanır, ESCRT-III kompleksi ise membran tomurcuklanmasından ve vezikül kesilmesinden sorumlu olmaktadır. Multivezikül cisimlerinin taşınmasını ESCRT proteinleri ile beraber yardımcı proteinler olarak bilinen ve köken aldıkları hücre türünden bağımsız şekilde bulunan Alix, TSG101, HSP70 ve HSP90 β gerçekleştirmektedir (Doyle ve Wang, 2019). Bu nedenle, bu protein grubuna genellikle "eksozomal marker proteinleri" de denilmektedir. Son zamanlarda ESCRT-bağımlı eksozom syntenin ve syndecans içerdiği gösterilmiştir. Syndecans, transmembran proteinlerden olup hücre zarındaki heparan sülfatın ana kaynağını temsil etmektedir. Syndecans, syntenin (sırayla LYPX (n) L motifleri ile CD63 ve Alix) ile etkileşime girer. Syntenin veya syndecan susturulması, salınan eksozom sayısını azaltır. Bununla birlikte Alix, HSP70 ve CD63'ün eksozomal birikimi düşer ancak flotilin pozitif EV'ler üzerinde herhangi bir etkisi bulunmamaktadır. MVB oluşumu ve eksozom sekresyonu için ESCRT bağımsız yollar da bulunmaktadır (Doyle ve Wang, 2019, Villarroya-Beltri vd. 2014, Hannafon ve Ding, 2013).

ESCRT bağımsız olan yolda ise tetraspaninler ve diğer transmembran proteinlerin eksozom biyogenezinde kilit rol oynadığı belirlenmiştir. Bu proteinler membran lipitleri ile etkileşime girerek eksozomları belli bir membran bölgesine toplayıp, sitoplazmada bulunan biyomolekülleri spesifik bir seçimle vezikül içine almaktadır (Zhang vd. 2019). Bununla beraber tetraspanin ailesine ait mikro domainler, plazma zarındaki reseptörlerin ve sinyal proteinlerinin bölümlere ayrılmasında önemli görevlere sahiptir. Ayrıca seramidler de endozomal membranın kendiliğinden içeriye çökmesine sebep olurken, diaçilgliserol (DAG), Sfingozin 1 fosfat (S1P) eksozom biyogenezinde rol almaktadır (Zhang vd. 2019). Bunun dışında RNA moleküllerinin alımı özellikle miRNA miktarının ve içeriğinin köken aldıkları hücreye göre farklı olmasına bağlı olmaktadır. Örneğin T hücrelerinden salınan eksozomlarda bir grup miRNA'nın özel bir motif taşıdığı (GGAG) ve bu motifin A2B1 ribonükleoprotein tarafından tanındığının tespit edildiği görülmüş ve bununda miRNA'ların

eksozomlar içine seçilerek alındığını fikrini doğrulamıştır. Eksozomlar hücre dışına salındıktan sonra hedef hücrelere farklı yollardan alınabilmektedir. Örneğin; reseptöre ligand şeklinde bağlanarak, adezyon molekülleri aracılığı ile hedef hücre membranına füzyon yaparak etki ederken, bazı durumlarda ise hedef hücre tarafından fagosite edilebilir veya hedef hücre endositoz ile hücre içine alınabilmektedir (Bozkurt, 2018, Zhang vd. 2019).

CD81, dört transmembran ve iki hücre dışı alanından oluşan tetraspaninler olarak bilinen protein süper ailesinin 26 kDa'lık bir yüzey proteindir. Tetraspaninlerin hücre yapışmasını ve göçünü etkilediği, hücre morfolojisini değiştirdiği ve bir hücrenin aktivasyon durumunu etkilediği gösterilmiştir (Levy vd. 1998).

EV belirteci CD9, kolorektal, meme, endometriyal ve prostat kanserinde yüksek oranda eksprese edilir ve geçmişte sıklıkla eksozomların ortak bir belirteci olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte, mevcut bilgiler, CD9'un küçük EV'nin bir alt kümesinde bulunabilecek daha spesifik bir EV belirteci olduğunu göstermektedir. CD9, tetraspanin protein ailesinin bir üyesidir ve çeşitli hücre tiplerinde hücre sel göç, çoğalma ve yapışmada yer alır; hücre yüzeyinde çeşitli integrinleri ve tübülini oligomerize edebilir ve bağlayabilir. CD 9; T hücrelerinin sitomilasyon kapasitesinde önemli bir rol oynamaktadır. CD9, yumurta-sperm füzyonu, difteri toksin bağlanması, monosit ve miyoblast füzyonu, tümör büyümesinin baskılanması ve hücre yapışması ve göçünün modülasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Kemik iliğinde bulunan CD9, kök hücre farklılaşmasına, hareketliliğine ve hedef aramasına katkıda bulunmaktadır (Soekmadji vd. 2017, Mazurov vd. 2012).

Eksozomların sekresyonu birçok farklı mekanik, kimyasal ve biyolojik uyarılarla başlatılabilir. Örneğin, Yu vd. 2006 yapmış oldukları bir çalışmada H460 hücre hattında γ ışınına bağlı meydana gelen DNA hasarı sonrası p53'e bağımlı bir şekilde hücreler tarafından salgılanan proteinleri tanımlamak için bir proteomik analiz yapılmıştır (Yu vd. 2006). P53'ün bilinen transkripsiyonel hedeflerine ek olarak transkripsiyonel hedefi olmayan genler tarafından kodlanan bir dizi proteinin, P53 aktivasyonundan sonra kültür ortamında arttığı bulunmuştur. Bu proteinlerin eksozom ve eksozom ürünü olarak adlandırılan küçük hücrelerden salındığı ve bu hücreler tarafından P53 yanıtının düzenlendiği bulunmuştur. P53 ile düzenlenmiş bir gen ürünü olan TSAP6'nın, strese karşı P53 yanıtı veren hücrelerde eksozom üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Böylece, p53 yolu, ortamdaki eksozomların üretimini düzenleyerek vezikülleriyle beraber komşu hücrelerle ve

hatta bağımsızlık sistemi hücreleriyle iletişim kurabilmektedir (Yu vd. 2006, Hannafon ve Ding, 2013).

King vd. 2012 eksozom-aracılı sinyallemede hipoksik koşulların, eksozom salınımı yoluyla tümör ilerlemesini destekleyip desteklemediğini araştırmak amacıyla bir çalışma yapılmıştır (King vd. 2012). Çalışmada MCF7, SKBR3 ve MDAMB 231 meme kanseri hücre hatları kullanılmıştır. Hücre kültüründe büyütülen hücrelerin normoksi ve hipoksik şartlarda salınan eksozomlarını belirlemek amacıyla kit ve ultrasantrifüj kullanılarak izole edilmiştir. İzolasyon sonucunda kit protokolünün daha yüksek verimde eksozom elde ettiğini belirlemişlerdir. Hipoksik koşullar azot tarafından sağlanan denge ile %1 ve %0,1 O₂'de, %5 CO₂ ve 37 °C'da gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda hipoksiye maruz kalan meme kanseri hücrelerinin normoksi altındaki hücrelere göre daha fazla sayıda eksozom salgıladığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu kanser hücre hatlarında HIF-1 a'nın siRNA ile susturulması eksozomların sekresyonundaki değişimi tespit edilmiştir. Elde edilen verilerde eksozom sekresyonunun önlendiği görülmüştür. Sonuç olarak hipoksik koşullarda tümör kaynaklı eksozomların sayısının fazlalığının, tümör büyümesini artırıp invaziv sinyaller ile tümörü daha agresif hale getirdiği bulunmuştur (King vd. 2012, Hannafon ve Ding, 2013).

Sundararajan vd. 2018 çalışmasında EGFR VIII taşıyan eksozomların glioma hücrelerinde Akt ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yollarını aktive ederek hücrelerin büyümesini teşvik etmiştir. EGFR VIII içeren eksozomların vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunu artırarak anjiyogenezi teşvik ettiğini ve anti-apoptotik protein olan Bcl-xL'nin ekspresyonunu da arttırdığını ancak bir siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olan p27'nde ekspresyonunun aşağı regüle olduğunu ifade edilmiştir (Sundararajan vd. 2018, Hannafon ve Ding, 2013).

Daha önce hücrelerin metabolik ürünleri olarak düşünülen eksozomların içerisinde buldukları çeşitli kargo molekülleri olan mikroRNA'lar ve proteinler ile hücreler arası iletişim için temel bir ortam oluşturmaktadır (Reza vd. 2016). Yapılan çalışmalarda kök hücrelerden elde edilen eksozomların yüksek stabilite, bağımsızlık hücreleri tarafından red olmaması, dozaj ve konsantrasyonun kolay bir şekilde kontrolü gibi avantajlara sahip olduğu ortaya konmuştur. Kök hücrelerden elde edilen eksozomlarla ilgili yapılan araştırmalarda, miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı, karaciğer fibrozu ve akut böbrek hastalığının oluşturduğu hasarı etkili bir şekilde onarabildiği bildirilmiştir. Bununla beraber iAMKH

kaynaklı eksozomların (iAMKH-ekso) meme kanserinin patogeneğinde ve ilerleğinde, Wnt sinyal yolu aracılığıyla kanser hücresi göçünü etkilediği ve yine iAMKH-ekso'ların Alzheimer tedavisi için yararlı olan yüksek düzeyde enkefalinaz içerdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Hu vd. 2016). Bunlara ek olarak iAMKH-ekso'ların A2780 insan yumurtalık kanseri hücrelerinde hücre döngüsünü bloke ederken mitokondri aracılı apoptoz sinyalini aktive ettiği, ayrıca A2780 ve SKOV-3 kanser hücrelerinin çoğalmasını, yara onarımını ve koloni oluşturma yeteneğini kısıtlayabileceğini gösterilmiştir (Reza vd. 2016).

Eksozomların pleiotropik etkilerinin birçoğu, genomik ve proteomik materyallerin hedef alıcı hücrelere iletilmesiyle hücre iletişimde ve hücre biyolojisinin modülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Kanser hücresi ile ilişkili eksozomların da tümör mikroçevresine dahil olmasıyla tümör büyümesi, metastaz ve tümör tropik MSCs hücrelerinin neoplastik hücrelere dönüşümündeki potansiyel rolleri halen açıklığa kavuşturulmamıştır (Elmageed vd. 2014).

Son yıllarda yapılan çalışmalar yağ dokusunun kanser oluşumunda ve ilerleğinde oynadığı rol, yüksek plastisite ve inflamasyon içeriği ile desteklendiğini ortaya koymaktadır. Obezite durumunda yağ dokusu, uzak bölgeye ulaşım sağlamada sistemik bir yapıya sahip olan proinflamatuvar adipokinlerin bir rezervuarı olarak hizmet ederek parakrin bir şekilde işlevsellik göstermektedir (Moraes vd. 2021). Bununla beraber tümör faktör faktörü α (TNF α), interlökin (IL) 6, IL-8 ve kemokin C-C motifi ligand 2 dahil olmak üzere çeşitli adipokinler tümör ilerlemesiyle ilişkilendirilmiştir. Bu durumun obez hastalarda hem visseral hem de subkutan yağ dokusu depolarının hacmiyle doğrudan ilişkili olduğu göz önüne alındığında, adipositlerin tümör mikroçevresine girdikten sonra delipidasyona uğrayabileceği ve meme kanseri gibi hücrelerini besleyerek matriks metalloproteinaz (MMP) 11'in aşırı ekspresyonuna sebep olabileceği düşünülmektedir. Böylece obezitenin kanser hücrelerinin invazyonunu desteklediği bildirilmiştir (Moraes vd. 2021).

MKH türevli eksozomların yara iyileşmesindeki rolünü belirlemek için Shabbir vd. 2015 bir araştırma yapmışlardır. Bunun için normal ve kronik yaradan türetilmiş dermal fibroblast ve endotel hücreler kullanılmıştır (Shabbir vd. 2015). Bu hücre hatları üzerinde, MKH'den salınan eksozomların etkilerini incelemişler ve bu etkilerin altında yatan mekanizmaları aydınlatmaya çalışmışlardır. MKH kaynaklı eksozomların doza bağlı artışının normal ve

kronik yaradan türetilmiş dermal fibroblast hücreleri üzerinde proliferasyon ve migrasyon kapasitesini arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Aynı durumun endotel hücreleri tarafından doza bağlı artışlar ile tüp oluşumunda artış meydana getirdiği belirlenmiştir. Bununla beraber, MKH türevli eksozomların yara iyileşmesinde Akt, ERK ve STAT3 gibi birçok sinyal yolunu aktive ettiğini ve HGF, IGF, NGF ve SDF1 gibi birçok büyüme faktörünün gen ekspresyonunu da indüklediği kanıtlanmıştır (Shabbir vd. 2015).

Meme kanseri hücreleri hipoksik koşullar altında kültürlendiğinde (%1 ila %0,1-2), eksozom sekresyonlarında önemli ölçüde artış gözlenirken, hipoksiyaya maruz kalmadan önce HIF-1 a'nın siRNA ile susturulması eksozom sekresyonunda bu artışı önlediği gösterilmiştir (Hannafon ve Ding, 2013).

1.3.1 Eksozomlar ve Hücreler Arası İletişim

Hücreden hücreye iletişim, sitokinler, biyoaktif proteinler ve nükleotitler gibi salgılanan çözünür araçlar vasıtasıyla gerçekleşmektedir (Shelke vd. 2019). Sinyal hücreden salındıktan sonra, hücresel fonksiyonu modüle etmek için otokrin veya parakrin bir şekilde hareket ederek daha uzun yarı ömür elde etmek için ya salgılanan araçlar ile ya da pro-proteine bağlanarak inaktif bir konformasyonda bulunmaktadır. Bununla beraber sinyal iletimi biyolojik bir sinyal iletilmeden önce aktivasyon gerektiren hücre dışı matris proteinleriyle etkileşime girebilmektedir. Aktivasyon, ya matriks degradasyonu ya da matriksin veya pro-proteinin proteolitik bölünmesiyle TGFb-1 gibi biyoaktif moleküllerin serbest bırakılmasıyla meydana gelmektedir. Eksozomlar gibi hücre dışı veziküller, ya hücre-hücre etkileşim yoluyla ya da biyoaktif moleküllerin alıcı hücrenin sitoplazmasına gönderilmesi yoluyla hücreler arasında biyolojik mesajların iletiminde görevlidir (Shelke vd. 2019).

Eksozomlar, immün hücreler ve tümör hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından serbest bırakılmaktadır. İçerdikleri DNA, RNA ve protein gibi hücre içi bileşenleri sunarak hücre-hücre iletişimde önemli rol oynamaktadırlar. Salgılanan eksozomların herhangi bir biyolojik fonksiyon gösterebilmesi için, içeriğini bir alıcı hedef hücreye gönderip alınması gerekmektedir (Hannafon ve Ding, 2013). Eksozomların spesifik olarak hücrelere hedeflenmesinde, normal fizyolojide veya hastalıklı durumlarda nasıl ortaya çıktığı halen iyi anlaşılamamıştır (Wang vd. 2019). Bu sürecin spesifik adezyon moleküllerine, integrinlere ve eksozom üzerinde ifade edilen antijenik faktörlere ve ayrıca

hedef hücrelerin yüzeyinde bulunan reseptörlere ve diğer moleküllere bağlı olabileceği düşünülmektedir. Bununla beraber endositoz veya fagositoz yapabilen herhangi bir hücrenin, eksozom alımına katılabildiği eksozom ve hedef hücre etkileşimleri tanımlamıştır. Örneğin T-, B- ve dendritik bağışıklık hücrelerinin eksozom içeriklerini aktararak ve alıcı hücrede gen ekspresyonunu modüle ederek antijen sunan hücrelerle iletişim kurduğu gösterilmiştir (Wang vd. 2019, Hannafon ve Ding, 2013).

Eksozomal sinyaller hücreler arası iletişimde aracı ve tamamlayıcı yolu temsil etmektedir. Örneğin yapılan araştırmalar ile altı hafta gibi erken bir hamilelik sırasında maternal dolaşımın içine plesentadan eksozomların serbest bırakıldığı tespit edilmiştir. Salomon vd. 2014 hamile ve hamile olmayan kadınlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada hamile kadınların plazmasındaki eksozomların konsantrasyonu hamile olmayan kadınlara göre 50 kat daha fazla olduğunu belirlemişlerdir (Salomon vd. 2014). Sonrasında hamile kadınlar arasında 3 grup oluşturulmuştur. İlk grup 6-12. haftada olan hamile kadınları, ikinci grup 22-24. haftadaki kadınları ve üçüncü grup ise 32-38. haftada bulunan hamile kadınları temsil etmektedir. Bu üç grup arasında hamilelik süresine bağlı eksozom konsantrasyonundaki değişim belirlenmiştir. Sonucunda bu üç gruptan hem total eksozom hem de plesental alkalın fosfataz türevli eksozomların maternal plazmada konsantrasyonu gestasyon sırasında aşamalı olarak arttığı bulunmuştur (Salomon vd. 2014, Mitchell vd. 2015).

Bir başka örnek ise yumurtalık kanseri hücrelerinden salgılanan eksozomların NK hücreleri tarafından bir alım sinyali olarak fosfatidilserin yüzey ekspresyonunu gerektirdiği gösterilmiştir. Bu çalışmalar ile eksozom ve hedef hücre etkileşimlerine aracılık eden belirgin sinyaller olduğunu göstermiştir ve bu süreçleri kontrol eden farklı mekanizmaları tam olarak anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda tümör hücrelerinin normal hücrelerden daha fazla eksozom salgıladığı görülmüştür. Salgılanan eksozomlar yakındaki veya uzaktaki hücreler tarafından alınmaktadır. Eksozomlar ile ilgili araştırmalar son on yılda ilgi odağı haline gelmiştir. Tümör hücrelerinden salınan eksozomların tümör genez ve tümör ilerlemede önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir (Hannafon ve Ding 2013, Wang vd. 2019).

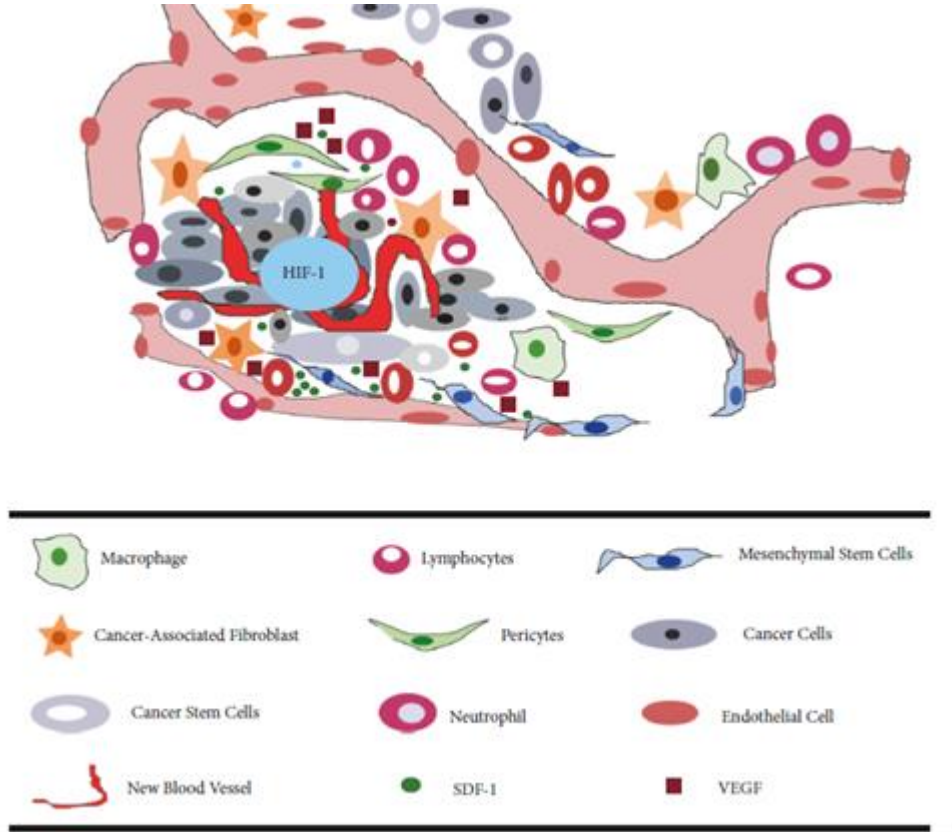
1.3.2 Tümör Mikroçevresi ve Eksozomlar

Tümörler malign kanserin ortaya çıkan karmaşık yapılarıdır. Kanser hücrelerinin bu kompleks yapıları damar içine gömülü, fibroblastlar ve miyeloid hücreleri gibi çeşitli malign olmayan hücrelerden oluşan dinamik bir tümör stroma ile çevrilidir (Şekil 1.4.)

(Kessenbrock vd. 2010). Tümör mikroçevre ortamı iyileşen bir yaradaki inflamasyon cevabına benzeyen ECM dönüşümü ve tümör hücresi hareketliliği açısından anjiyojenezi teşvik eden bir karakter sergilemektedir. Malign kanser hücreleri ve çevresindeki malign olmayan stroma arasındaki karmaşık etkileşimin moleküler mekanizmalarını anlamak, kanser araştırmalarındaki en büyük zorluklardan birini temsil etmektedir (Kessenbrock vd. 2010). Kanser hücreleri arasındaki etkileşimler çeşitli sitokinler, hormonlar, büyüme faktörleri ve hücre dışı matris gibi faktörler kanser hücrelerinin apoptoza duyarlılığını ve kemoterapiye yanıtını etkileyebilir (Trédan vd. 2007). Örneğin, insülin benzeri büyüme faktörü I' in fare kolon kanseri hücrelerini çeşitli sitotoksik maddelere karşı koruduğu gözlenmiştir. İntegrinlerin kemoterapiye bağlı DNA hasarında küçük hücreli akciğer kanserinin apoptotik tepkisini engellediği bildirilmiştir. Her ne kadar hücre yapışma fenotipinin aracılık ettiği ilaç direnci karmaşık ve bir tümörden diğerine oldukça değişken olsa da, hücre yapışmasını değiştiren ajanlar kemoterapinin etkilerini artırabilmektedir (Trédan vd. 2007).

Kanser kaynaklı eksozomlar tümör mikroçevre oluşumunda önemlidir. Çünkü eksozomların içeriği köken aldıkları hücrene benzerdir. Bu sayede tümör hücrelerinin immünolojik sistemden kaçışını sağlamada, enflamatuar yanıtın başlatılmasına yardımcı olmada, fibroblastların ve mezenkimal hücrelerin miyofibroblastlara farklılaşmasında, anjiyojenik süreci tetiklemede, tümörün metastatik evriminin arttırılmasında ve tümör nişinin yeni anatomik yerinin hazırlanmasında görev almaktadır. Bu özellikleri ile kanser teşhisi için uygun biyobelirteçler olarak kabul edilmektedir. Eksozomların kanserdeki önemli rolü, hedeflenmiş ilaç dağılımı için vektör sistemlerinin kullanılması gibi yeni terapötik yollar açabilir (Roma-Rodrigues vd. 2014).

Ayrıca onkolojik bir senaryoda, tümör büyümesini ve proliferasyonunu etkileyerek, tümör ve tümörle ilişkili hücreler arasındaki etkileşimlere aracılık edip, hem konakçı bağışıklık tepkisini hem de tümör mikroçevresini şekillendirmede çok önemli bir rol oynamaktadır (Maia vd. 2018). Eksozomlar; tümörlü doku ve konak hücre arasında ortaya çıkan bileşenlerle beraber hücrenin büyüme, istila ve immün gözetim gibi tümör ilerlemesinin temel adımlarını modüle etmektedirler. Lokal tümör mikro-ortamlarındaki etkilerine ek olarak, tümörlerden salınan eksozomların, metastatik yayılımı destekleyen pro-tümörijenik mikro-ortamların kurulmasıyla uzak hücre-hücre iletişim süreçlerine aracılık ettiği gösterilmiştir (Maia vd. 2018).



Şekil 1.4: Birincil tümör mikro ortamı. (Lin vd. 2019).

Tümör mikroçevresindeki iletişimde yer alan mekanizmalardan biri de EV'dir. Tümör mikroçevresindeki hücre popülasyonlarından biri olan MKH'ler, tümör gelişimini etkileyebilecek büyük miktarda EV üretir. MKH'lere benzer şekilde, MKH kaynaklı EV'ler hem anti hem de protümörjenik etkiler gösterebilmektedir. MKH kaynaklı EV'ler ilgili literatürde tümör büyümesi, anjiyogenez ve metastazın mekanizmaları ile ilişkisi ve kanserin ilerlemesinde MKH'in rolü ile ilgili çalışmalar halen yapılmaktadır. Shojaei vd. 2018 tarafından gerçekleştirilen çalışmada MKH kaynaklı EV'in antitümör ajanlar olarak tümör mikroçevresine iletilmesi için güvenli araçlar olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Shojaei vd. 2018).

Kanser tedavilerinde cerrahi ve kemoterapinin yetersizliği ve tümör hücrelerinin yüksek invazyon potansiyeli nedeniyle, kolon ve kolorektal kanserler dahil olmak üzere çeşitli malignite durumlarını tedavi etmek için MKH tedavisine yeni tıp yaklaşımları uygulanmaktadır. Bu multipotent MKH'ler bağışıklık sisteminin önemli düzenleyicileri olup uzun süreli kendini yenileme kapasitesine ve çok yönlü farklılaşma özelliklerine sahiptirler. Bununla ilgili olarak literatürde Mansourabadi vd. 2022 AMKH'lerin salgıladığı

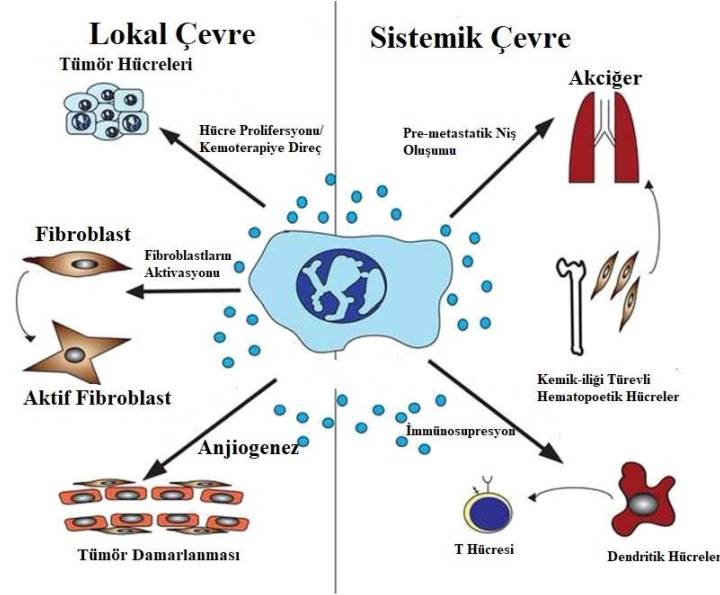
eksozomların kolorektal hücre hattında aquaporin 5 ve EGFR gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Buna göre MSC-exo'ların kolorektal hücreleri üzerinde aquaporin 5 ve EGFR genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde azaltabildiğini gösterilmiştir. Sonuçların, eksozomların EGFR ekspresyonlu tümörleri hedeflemek için terapötik olarak kullanılabileceğini gösterse de eksozomların içeriklerinin araştırılması ile ilgili daha detaylı çalışmalar yapılması gerektiği belirtilmiştir (Mansourabadi vd. 2022).

1.3.3 Eksozomların Kanser Progresyonunda Çok Yönlü Rolü

Tümör hücreleri, mikro damarları aktive etmek için gerekli olan anjiyojenik büyüme faktörleri olarak adlandırılan anjiyojenik sinyaller gönderir. Yeni kan damarları, tümörün büyümesini kolaylaştırmak ve kanserli hücrelerin orijinal kanser bölgesini terk etmelerini ve uzaktaki organlara yayılmasını sağlamak için tümörleri gerekli besinler ve oksijenle beslemektedir (Kahlert ve Kalluri, 2013). Böylece kanserin ilerlemesi vücutta yeni kılcal damarların büyümesiyle beraber anjiyogenezin de eşzamanlı olarak gerçekleştiğine dayanmaktadır. Ancak kanserin ilerlemesinde sadece anjiyojenik faktörler değil aynı zamanda hücre kaynaklı eksozomlar da etkilidirler. Tümör hücreleri, tümörlerin proliferasyonunu, göçünü ve anjiyogenezini teşvik etmek için eksozomları aktif olarak üretir, salar ve kullanmaktadır (Wolfers vd. 2001). Eksozomlar, endotelial hücreler tarafından yakalanabilen anjiyogenik proteinler taşıyarak veya eksozomal miRNA'lar ile endotelial hücrelerin anjiyogenik fonksiyonunu modüle ederek, tümör anjiyogenezinde kritik bir rol oynamaktadır. Eksozomların kanserde iki durumlu role sahip olduğu belirtilmiştir. Yerel ve sistemik çevreyi değiştirerek kanser büyümesine ve yayılmasına yardımcı olurken bağışıklık sistemini de bir anti-tümör yanıt ortaya çıkarmak için programlayabilmektedir (Aslan vd. 2019). Eksozomlar tümör hücrelerinden antijen sunan dendritik hücrelere antijen taşıyarak immün yanıtı düzenlemektedir. Bunu da MHC-I molekülleri aracılığıyla dendritik hücrelerin sitotoksik T lenfositlerini uyandırarak *in vivo* ortamda tümör büyümesini baskılayarak gerçekleştirdiği belirlenmiştir (Wolfers vd. 2001).

Eksozomlar kanserde fonksiyonel bir öneme sahiptir (Şekil 1.5.). Tümör hücrelerinden salınan eksozomlar, yerel ve sistemik mikroçevreyi değiştirmektedir. Onkojenik proteinleri ve çoklu ilaç taşıyıcılarını transfer ederek, kanser hücresinin çoğalmasını ve kemoterapi direncini kolaylaştırabilirler. Sistemik ortamda, eksozom aracılı sinyalleşme, uzak organlarda bir pre-metastatik niş oluşturmak için kemik iliğinden türetilmiş hematopoetik hücrelerin toplanmasıyla sonuçlanmaktadır. Ayrıca tümör kaynaklı eksozomlar, miyeloid

türevi hücrelerle etkileşime girerek anti-tümör bağışıklık tepkisini bastırmaktadır (Şekil 1.5) (Kahlert vd. 2013).



Şekil 1.5: Eksozomların kanserdeki fonksiyonel önemi (Kahlert vd. 2013).

Eksozomlar kanserde hücreler arası iletişimin önemli araçları olarak ortaya çıkmış ve özellikle mikroRNA'ların, mRNA'ların ve proteinlerin transferi ile meme kanseri gibi tümörle ilişkili ana yolları etkilemektedirler. Bununla ilgili Donnarumma vd. 2017 meme kanseri hücrelerinden salgılanan eksozomlarla ilgili bir çalışma gerçekleştirmiştir (Donnarumma vd. 2017). Yapılan çalışmada meme kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar ile tedavi edilen meme kanseri hücreleri miR-21, -378 ve -143'ü içeren kansere bağlı fibroblastlarda, kök hücre belirteçlerinin (Oct3/4, Nanog, Sox2) ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) düzenleyicilerin Snail ve Zeb ifadesinin düzenlenmesiyle eş zamanlı olarak artan ankraj bağımsız büyüme ve mammosphere oluşturma yetenekleri sergilediği sonucu bulunmuştur (Donnarumma vd. 2017, Sundararajan vd. 2018).

Tümör türevli eksozomlar genel olarak pro-tümörijenik olarak kabul edilir. Bununla birlikte, bazı anti-tümörijenik yetenekler de tarif edilmiştir. Örneğin, pankreas kanseri hücrelerinden izole edilen eksozom benzeri nanopartiküllerin, tümör hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Diğer çalışmalar, eksozom bazlı immünoterapilerin geliştirilmesinde tümör antijenlerinin kaynağı olarak TD-eksozomlarının kullanımına odaklanmıştır. TD-eksozomları üzerine yapılan ilk çalışmaların çoğu, bağışıklık sistemi ile etkileşimlerine

odaklanırken, TD-eksozomlarının tümör mikro çevresi üzerindeki etkileri daha az karakterize edilmiştir. Tümör mikro çevresinde bulunan birçok pro-tümörijenik genetik mutasyon barındıran kanserli hücreler, tümör gelişiminin ana itici gücü iken, fibroblastlar, endotel ve sızma immün hücreleri içeren stromal hücreler destekleyici ve kolaylaştırıcı bir rol oynamaktadır (Hannafon ve Ding, 2013).

1.4 Transkripsiyonel Regülasyon

Transkripsiyonel kontrolün anahtar kavramları, bakteri sistemlerinde yarım yüzyıl önce ortaya konmuştur. Bu ve sonraki çalışmalarda DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörlerinin (trans-faktörler olarak da bilinir) kontrol elemanları (cis-elemanları) spesifik DNA dizilerini işgal ederek transkripsiyon aparatını çalıştırdığı ve düzenlediği tespit edilmiştir. Ökaryotik sistemlerde, spesifik transkripsiyon faktörleri ve bunların kofaktörleri, genel transkripsiyon aparatı ve seçici gen kontrolü için günümüz konsensüs modeline yol açan çeşitli kromatin düzenleyiciler hakkında kapsamlı bir çalışmalar yapılmıştır (Lee ve Young, 2013). Transkripsiyonel kontrol; tanımlanmış gen gruplarının hedeflendiği hücre çekirdeğine, spesifik sinyallerin iletilmesini kapsayan süreçleri içermektedir. Bunlardan birincisi transkripsiyonel aktivitenin yukarısındaki olayları (up stream) kapsayan ilgili sinyalleri ve bunların çekirdeğe olan yollarını tanımlarken, ikincisi transkripsiyon faktörlerinin çalıştığı moleküler mekanizmalar ve üçüncüsü de transkripsiyonel aktivitenin aşağı akışındaki (down stream) olaylar olup hedeflenen gen gruplarına ve homeostazın dinamik dengesine ulaşmak için daha fazla sinyalin nasıl üretildiğine bağlıdır (Desvergne vd 2006, Lee ve Young, 2013). Belirli bir gelişim aşamasında çok hücreli bir organizmada her hücre tipi veya dokusu, kısmen transkripsiyon faktörlerinin spesifik kombinasyonu sayesinde kendine ait karakteristik gen ekspresyon profiline sahiptir (Matys vd. 2003).

Gen ekspresyonu ve regülasyonu ile ilgili deneysel çalışmaların artmasıyla birlikte, elde edilen verileri tanımlamak ve bunları kendi bağlamlarıyla ilişkilendirmek için nicel modeller oluşturulmuştur. Gen regülasyonu için karmaşık, gelişimsel ağlara ek olarak basit genetik devreler kapsamlı bir şekilde tartışılmıştır. Bir genetik devrenin fonksiyonel özellikleri genellikle kritik olarak moleküler bileşenler arasındaki etkileşimlere bağlı olduğu sonucuna varılmıştır. Gen regülasyonunda bu düzenleyiciler cis düzenleyici bölgenin yapısı, transkripsiyonel baskılama veya aktivasyon, çeşitli transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz kompleksi olarak aracılık etmektedir (Bintu vd. 2005).

1.5 Yeni Nesil Dizileme ve İnsan Genom Projesi

Nükleik asit dizilimi, çok geniş uygulama alanı ile biyolojik araştırmaların en önemli araçlarından biridir. Frederick Sanger tarafından 1977'de yayınlanan bir dönüm noktası makalesi, önümüzdeki 30 yıl için altın standart olacak bir DNA dizileme tekniğini sunmuştur. Sanger DNA dizileme yöntemi deoksinükleotidler, Taq DNA polimeraz enzimi, kalıp DNA ve dideoksi sonlandırıcı nükleotidler kullanılarak kapiller elektroforez sisteminde floresan boyaların yansıttığı ışığa bağlı olarak dizileme analizi gerçekleştirilir. 30 yılı aşkın bir sürede İnsan Genom Projesi gibi birçok çalışmada Sanger sekanslama yöntemi hakim olmuştur (Gut, 2013). Otomatik Sanger yöntemi, "birinci nesil" bir teknoloji olarak kabul edilir ve daha yeni yöntemler, yeni nesil dizileme (NGS) olarak adlandırılmaktadır. Bu yeni teknolojiler, şablon hazırlama, sıralama ve görüntüleme ile genom hizalama ve birleştirme yöntemlerinin bir kombinasyonuna dayanan çeşitli stratejileri oluşturmaktadır (Metzker, 2010).

İnsan Genomu Projesi (İGP), temel model organizmaların tüm dizileriyle birlikte bir referans insan genom dizisini deşifre etmek için entegre olan "büyük bilim" yaklaşımıyla biyoloji biliminin dönüm noktalarından biri haline gelmiştir. İGP, karmaşık ana hedeflere sahip mühendislerin, bilgisayar bilimcilerinin ve matematikçilerin uzmanlığını biyologlarla bir araya getiren disiplinler arası çalışmaların gücünü, gerekliliğini ve başarısını örneklemektedir (Collins ve McKusick, 2001)

Veri paylaşımına ve açık kaynaklı yazılımlara açık bir yaklaşım oluşturdu. Böylece veriler herkes tarafından erişilebilir hale getirilmiştir. Mikropların, bitkilerin ve hayvanların genom dizileri, mikrobiyoloji, viroloji, bulaşıcı hastalık ve bitki biyolojisi dahil olmak üzere birçok bilim alanında devrim yaratmıştır. Dahası, insan dizisi varyasyonu hakkında daha derin bilgi, tıp pratiğini değiştirmeye başlayıp Uluslararası HapMap Projesi, 1000 Genom ve Kanser Genom Atlası gibi sonraki büyük ölçekli veri toplama girişimlerinin yanı sıra yakın zamanda açıklanan İnsan Beyni Projesi ve ortaya çıkan İnsan Proteom Projesi'ne de ilham vermiştir. (Hood, ve Rowen, 2013)

İGP biyolojiyi derinden değiştirmiş ve tıbbın dönüşümünü hızla katalize etmiştir. İGP fikri ilk olarak Renato Dulbecco tarafından 1984'te yayınlanan ve insan genom dizisini bilmenin kanserin anlaşılmasını kolaylaştıracakını savunduğu bir makalede kamuoyu önünde sunulmuştur. Mayıs 1985'te, Kaliforniya Üniversitesi Şansölyesi Robert Sinsheimer, Santa

Cruz (UCSC) ile bu potansiyel projenin esasını tartışmak için 12 uzmanın bir araya gelmesiyle tamamen İGP'ye odaklanan bir toplantı düzenlenmiştir (Green ve Guyer, 2011, Dulbecco, 1984).

3 milyar dolarlık, 15 yıllık program, genomik teknolojiler geliştikçe önemli ölçüde gelişmiştir. Başlangıçta İGP bir insanın genetik haritasını, ardından insan genomunun fiziksel bir haritasını ve son olarak dizi haritasını belirlemek için yola çıkılmıştır. Bu arada, biyoteknoloji şirketlerinin çalışmaları sonucunda İGP süresi boyunca birinci nesil otomatik floresan tabanlı sıralama stratejilerinin maliyeti, verim, hızı ve doğruluğunda art arda artan iyileştirmeler gerçekleştirilmiştir. Craig Venter'ın Uluslararası Konsorsiyum tarafından kullanılan bakteriyel yapay kromozom vektörlerini kullanarak parça parça klon klon yaklaşımı yerine diziyi deşifre etmek için bütün genomlu bir av tüfeği yaklaşımı geliştirilmiştir (Collins vd. 1993).

İnsan, fare ve diğer önemli modeller için bütünüyle gen yapılarını belirlemeye yönelik projelerin tamamlanması yıllar almıştır. Yeni dizileme teknolojileri, klonlamaya gerek kalmadan cDNA fragmanlarının doğrudan dizilenmesine izin vermektedir (Haas ve Zody, 2010). Hibridizasyon veya dizi bazlı yaklaşımlar dahil olmak üzere transkriptomu belirlemek ve ölçmek için çeşitli teknolojiler geliştirilmiştir. Hibridizasyona dayalı yaklaşımlar tipik olarak floresanla etiketlenmiş cDNA'nın özel tasarlanmış mikrodizilerle inkübe edilmesini veya ticari olarak yüksek yoğunluklu oligo mikrodizileri içermektedir. Özel olarak tasarlanmış mikrodizilere örnek olarak ekson bağlantılarını kapsayan problemlara sahip diziler verilebilir. Bunlar farklı eklenmiş izoformları tespit etmek ve ölçmek için kullanılmaktadır. Yüksek yoğunlukta genomu temsil eden genomik döşeme mikrodizileri oluşturulmuştur (Wang vd. 2009). Bu diziler kopyalanmış bölgelerin birkaç baz çiftinden 100 bp'ye kadar çok yüksek bir çözünürlüğe haritalanmasına izin vermektedir. Hibridizasyona dayalı yaklaşımlarda büyük genomlar ve yüksek çözünürlüklü döşeme dizileri haricinde yüksek verim ve nispeten ucuz olması ile ön plana çıkmaktadır. Ancak bu yöntemlerin genom dizisi hakkında mevcut bilgilere güvenmek; çapraz hibridizasyon nedeniyle yüksek arka plan seviyeleri ve sinyallerin hem arka planı hem de doyunluğu nedeniyle sınırlı bir dinamik algılama aralığı gibi sınırlamaları bulunmaktadır. Ayrıca farklı deneyler arasında ifade düzeylerini karşılaştırmak genellikle zordur ve karmaşık normalleştirme yöntemleri gerektirebilmektedir (Wang vd. 2009).

1.6 RNA Sekanslama

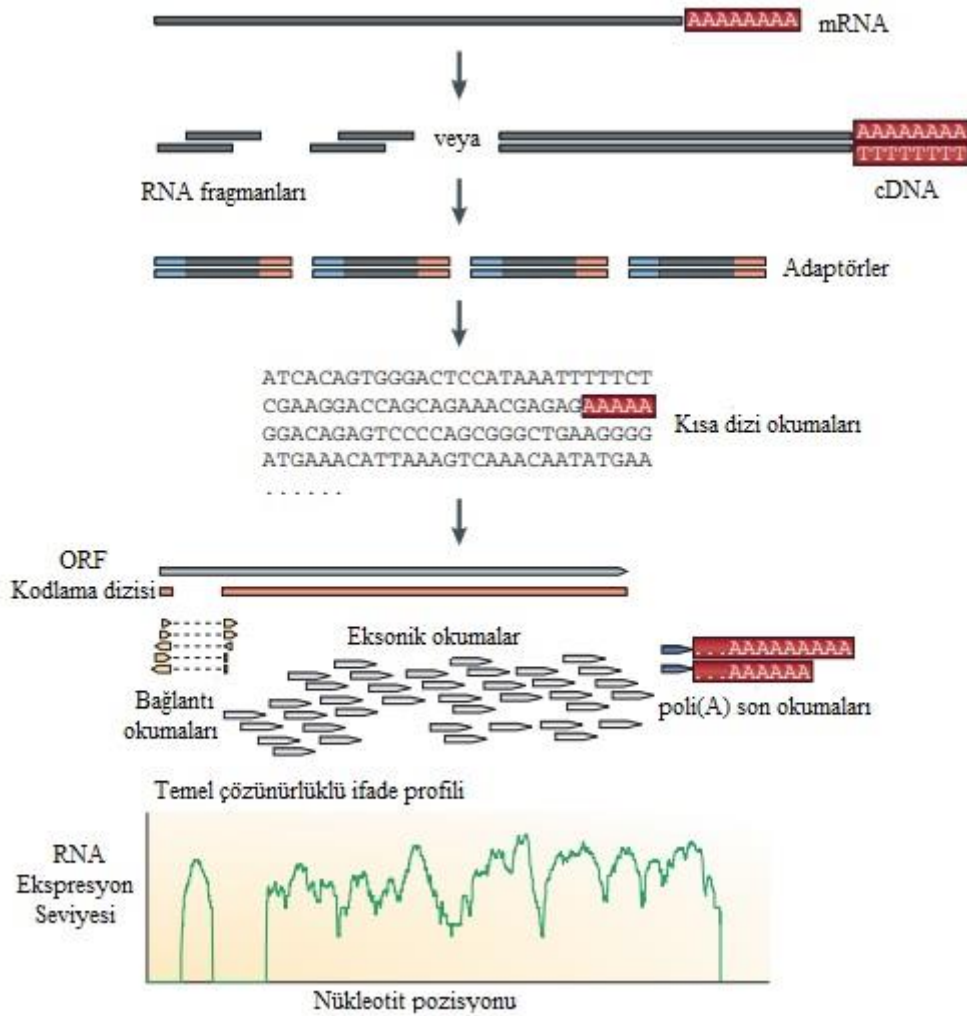
Yeni nesil dizileme teknolojileri sadece statik genomları analiz etmek için değil, aynı zamanda RNA-seq olarak adlandırılan bir yaklaşımda dinamik transkriptomları da analiz etmek için kullanılmaktadır. Bu güçlü ve hızla gelişen teknolojilerin kökeni yakın zamana dayanmasına rağmen, genom ifadesi ve düzenlemesini anlamamıza önemli bir katkıda bulunmaktadır (Marguerat ve Bähler, 2010). RNA'nın genom ve proteom arasındaki anahtar rolünün keşfinden beri gen ekspresyonunun miktarı ve transkript tanımlanması moleküler biyolojinin temel faaliyetlerini oluşturmuştur. Her RNA-seq deneysel senaryosu, transkript kantifikasyonu, normalleştirme ve nihai olarak diferansiyel ifade analizi için potansiyel olarak farklı optimal yöntemlere sahip olabilmektedir (Conesa vd. 2016).

Mikrodizi yöntemlerinin aksine, diziyeye dayalı yaklaşımlar doğrudan cDNA dizisini belirlemektedir. Başlangıçta, cDNA veya ekspres edilmiş dizi etiketi kitaplıklarının Sanger dizilimi kullanılmıştır. Ancak bu yaklaşım nispeten düşük verimlilikte, pahalı ve genellikle nicel verilere dayanmamaktadır (Wang vd. 2009). Etiket tabanlı sıralama yaklaşımları kesin sonuç ve verimliliğinin yüksek olması ile beraber 'dijital' gen ekspresyon seviyeleri sağlayabilmektedir. Sanger dizileme teknolojilerinin çoğu pahalı ve kısa etiketlerinin önemli bir kısmı referans genomla bire bir eşleştirememektedir. Ayrıca transkriptin bir kısmı analiz edilip izoformlar yeterince ayırt edilememektedir. Bu dezavantajlar transkriptomların yapısını açıklamada geleneksel sıralama teknolojisinin kullanımını sınırlamaktadır (Wang vd. 2009).

Son zamanlarda, RNA-seq yöntemlerindeki gelişmeler RNA transkriptlerinin daha da eksiksiz bir karakterizasyonunu sağlamıştır. Bu gelişmeler, transkripsiyon başlangıç bölgesi haritalamasında, diziyeye özgü ölçümlerde, gen füzyonu saptamasında, küçük RNA karakterizasyonunda ve alternatif birleştirme olaylarının saptanmasında iyileştirmeleri içermektedir (Ozsolak ve Milos, 2010). RNA-Seq, yakın zamanda geliştirilen derin dizileme teknolojilerini kullanmaktadır. Genel olarak, bir RNA popülasyonu (toplam veya fraksiyonlanmış, örneğin poli(A)+), bir veya iki uca bağlanan adaptörler ile bir cDNA fragmanları kitaplığına dönüştürülür (Wang vd. 2009).

Amplifikasyonlu veya amplifikasyonsuz her molekül daha sonra bir uçtan kısa diziler elde etmek (tek uçlu sıralama veya her iki uca çift uçlu sıralama) için yüksek verimli bir şekilde dizilenir. Kullanılan DNA dizileme teknolojisine bağlı olarak, okumalar tipik olarak 30-400 bp'dir. Prensipte olarak, RNA-Seq için herhangi bir yüksek verimli sıralama teknolojisi

Illumina IG, Applied Biosystems SOLiD ve Roche 454 Life Science sistemleri kullanılmaktadır (Kukurba ve Montgomery, 2015). Sıralama bağdaştırıcıları (mavi) daha sonra her cDNA parçasına eklenir ve yüksek verimli dizileme teknolojisi kullanılarak her cDNA'dan kısa bir dizi elde edilmektedir. Elde edilen dizi okumaları, referans genom veya transkriptom ile hizalanır ve üç tip olarak eksonik okumalar, bağlantı okumaları ve poli(A) son okumaları şeklinde sınıflandırılır. Bu tür oluşturmada her gen için bir baz çözünürlüklü ifade profili kullanılmaktadır (Şekil 1.6.) (Wang vd. 2009, Kukurba ve Montgomery, 2015)



Şekil 1.6: RNA sekanslama deneyi (Wang vd. 2009).

RNA-seq, transkriptom analizi için standart yöntem haline gelmiştir. Ancak teknoloji ve araçlar gelişmeye devam etmesine rağmen farklı araçlardan elde edilen sonuçlar arasındaki uyumun hala yetersiz olduğu ve sonuçların özellikle düşük seviyelerde ifade edilen genler için parametre ayarlarından etkilendiği belirtilmelidir. Mevcut RNA-seq uygulamasındaki

iki önemli nokta, küçük miktarlardaki başlangıç malzemelerinden transkriptomların oluşturulması ve daha uzun okumalardan daha iyi transkript tanımlaması gerekmesidir (Conesa vd. 2016).

RNA-Seq şimdi gen ekspresyonunu incelemek ve yeni RNA türlerini tanımlamak için tercih edilen yöntemdir. DNA mikrodizi tabanlı yöntemlerle karşılaştırıldığında RNA-Seq, daha az arka plan gürültüsü ve algılama için daha büyük bir dinamik aralık sunmaktadır. En önemlisi RNA-Seq, bilinmeyen genlerin ve yeni transkript izoformlarının analizi için çok önemli olan dizi kimliğini doğrudan ortaya çıkarmaktadır. RNA-Seq için birkaç farklı teknoloji geliştirilmiştir (Hrdlickova vd. 2017). Tam transkriptom shotgun dizilimi (WTSS) olarak da bilinen RNA sekanslama, cDNA'yı doğrudan ilgilenilen bir RNA örneğinden dizilemek için NGS teknolojilerini kullanmaktadır. RNA sekanslama ile transkriptom analizi, kütüphane oluşturma, belirli bir NGS platformunda sıralama ve biyoinformatik analiz dahil olmak üzere üç aşamalı bir yöntemdir (Şekil 1.7) (Qian vd. 2014).

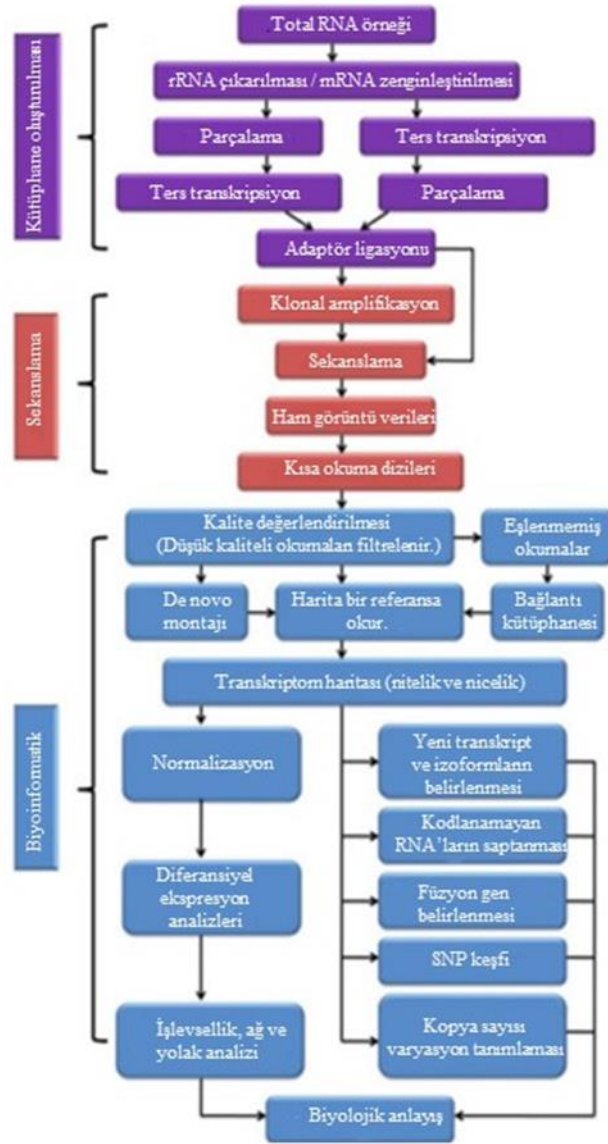
Kütüphane hazırlığı, RNA-seq için önemli bir adımdır. Çünkü büyük ölçüde nihai sıralama verilerinin orijinal transkriptomu ne kadar doğru yansıttığını belirlemektedir. İlk aşamada, analiz edilecek uygun örnekler toplamaktadır. Burada dikkat edilecek nokta dokuların değişmez şekilde heterojen doğasıdır. Bunun nedeni, dokuların tipik olarak onlarca veya yüzlerce benzersiz hücre tipi içermesidir. Bu nedenle, bir dokunun transkriptomik analizi, onu oluşturan hücre tiplerinin gerçek transkriptomik profillerini karıştırmaktadır (Shapiro vd. 2013). Çözüm olarak hücre popülasyonları yerine tek hücreleri analiz etmek gerekmektedir. Aslında, çeşitli tek hücreli izolasyon yöntemleri geliştirilmiş ve pratikte RNA-seq teknolojisi ile birleştirilmiştir. Bu tek hücreli RNA dizisi, hem temel hem de klinik araştırmalarda daha önce imkansız olan birçok uygulamalardan örnek olarak embriyogenezdeki ilk farklılaşma olaylarının karakterizasyonu, tümör heterojenitesinin araştırılması, nadir/geçici olarak var olan yetişkin kök hücrelerin transkriptomik analizi süreçlerinin mümkün olmasını sağlamaktadır (Tang vd. 2009, Lister vd. 2011). Örnek toplamanın ardından, toplam RNA genellikle organik ekstraksiyon ve/veya spin kolonların silika membranları üzerine absorpsiyon yoluyla hazırlanmaktadır. Daha sonra RNA, cDNA fragmanlarından oluşan bir kitaplığa dönüştürülür. Toplam RNA doğrudan kullanılabilirse de, çoğu durumda toplam RNA'nın parçalara ayrılması gerekir. Bunun nedeni, toplam hücresel RNA'nın %80'inden fazlasını oluşturan rRNA'nın (Lindberg ve Lundeberg, 2010) genellikle araştırmalarda odak olmamasıdır. Ayrıca rRNA varlığının sonraki adımlarda

yararlı transkript kapsamını büyük ölçüde azaltmaktadır. Toplam RNA örnekleri bu nedenle ya doğrudan poli(A) RNA seçimi ile ya da rRNA'nın seçici olarak çıkarılması (ribotükenmesi) ile işlenmektedir (Costa vd. 2010). Ökaryotlarda yaygın olarak kullanılan Oligo(dT) tabanlı mRNA saflaştırma prosedürü, ökaryotik mRNA'nın 3' ucundada bir poli(A) kuyruğunun varlığından yararlanır. Ancak ökaryotlarda ribozomal olmayan RNA'ların (hem kodlayan hem de kodlamayan) büyük bir kısmı poli(A) kuyruğundan yoksundur ve bu nedenle gözden kaçırılır (Jacquier, 2009). Poli(A) RNA seçimi ile karşılaştırıldığında, poli(A) mRNA, önceden işlenmiş RNA, tRNA ve bilinen veya bilinmeyen fonksiyonlara sahip diğer ncRNA'lar dahil olmak üzere tüm ribozomal olmayan RNA türlerini zenginleştirdiği için ribo-tüketme yöntemi tercih edilir (Lindberg ve Lundeberg, 2010). Birçok farklı rRNA azaltma yöntemi olmasına rağmen en popüler olanlardan birincisi; biotin etiketli anti-rRNA problemleri tarafından rRNA'nın hibridizasyon yakalanması, ardından streptavidin kaplı manyetik boncuklar ile çıkarılması, ikincisi; bir 5' fosfat ile rRNA'yı spesifik olarak tanıyan bir 5'-3' eksonükleaz tarafından rRNA'nın seçici bozunması geliştirilmiştir (Wilhelm ve Landry, 2009, He vd. 2010).

RNA fragmentasyonu (RNA hidrolizi) veya ters transkripsiyon gerçekleştirilerek çift sarmallı bir cDNA elde edilmektedir. Ardından cDNA'lar DNaz I ve sonikasyon muamele edilip parçalanmış cDNA kütüphanesi hazırlanmaktadır. Parçalanmanın amacı NGS teknolojileri için istenilen uzunluğa ulaşmaktır. Parçalanmış cDNA'nın üretilmesinden sonra, dizileme adaptörleri parçaların her iki ucuna bağlanır ve böylece sekanslamaya hazır hale gelmektedir. (Metzker, 2009).

Spesifik olarak, hem 454 hem de SOLiD sistemleri yenilikçi bir emülsiyon PZR kullanılmaktadır. Emülsiyon PZR'de, bir kitaplıktan alınan cDNA fragmanları boncuklara eklenir ve ardından bir yağ içinde su emülsiyonunun sulu damlacıklarında bölümlere ayrılmaktadır. Öyle ki her damlacık tek bir DNA molekülü içerir; ayrılan şablon fragmanlar daha sonra emülsiyonun küçük sulu damlacıklarında amplifiye edilmektedir (Dressman vd. 2003; Fedurco vd. 2006). Klonal amplifikasyon, her biri özdeş şablonlardan oluşan bir popülasyonla sonuçlanmaktadır. PZR artefaktları nedeniyle klonal amplifikasyon, RNA sekanslama sonuçlarında da sapma oluşturabilir. PZR artefaktlarını ayırt etmenin bir yolu, farklı kopyalar oluşturarak aynı kısa okumaların farklı kopyalarda aynı anda bulunup bulunmadığını teyit edilerek bulunabilmektedir (Wang vd. 2009). 454 ve SOLiD sistemlerinden farklı olarak, Illumina Genome Analyzer, adaptör bağlantılı, tek iplikli

cDNA fragmanlarının önce bir cam slayt üzerinde bir köprüleme yoluyla oligonükleotit hibridizasyonu ve ardından klonal olarak immobilize edildiği köprü PZR amplifikasyonu gerçekleştirir (Adessi vd. 2000).



Şekil 1.7: RNA sekans veri analizi (Qian vd. 2014).

Bir Illumina HiSeq, NovaSeq, NextSeq veya MiSeq cihazı üzerinde gerçekleştirilen dizilenmiş bir memeli modelinde temel bir RNA sekanslama analizi için, önerilen okuma sayısı numune başına en az 10 milyon olup, numune başına en ideal 20 ila 30 milyon olmaktadır. Daha düşük sıralama derinlikleri, transkript başına istatistiksel olarak yetersiz sayıda okuma sağlamak ve istatistiksel analizleri yüksek oranda eksprese edilen genlerin

etkisini sınırlamaktadır (Ji ve Sadreyev, 2018). RNA sekanslamada bir diğer önemli konu da amacın bireysel lokuslardaki ekspresyon seviyelerini ölçmek mi yoksa daha derine inip genler üzerindeki ekleme kalıplarını karşılaştırmak mı olduğuyla ilgilidir. Eşleştirilmiş uçlu (PE) Illumina dizilimi, ekleme olaylarını yakalamak için single-end (SE) sıralamasından daha uygun bulunmuştur (Okonechnikov vd. 2016). Ancak daha maliyetlidir. 50 bp Illumina okumaları tipik olarak bir memeli RNA'sının genoma benzersiz bir şekilde eşlenmesi için yeterlidir. Avantajı uzun okumalar yapması ve okumalar içindeki ek bölgelerini doğrudan yakalama olasılığını artırmasıdır. Bu sayede potansiyel alternatif ekleme formlarının analizini iyileştirmektedir. Ham RNA-seq verileri tipik olarak FASTQ dosyaları olarak biçimlendirilmektedir. FASTQ, okumaların dizilerini ve sıralama kalitesini depolayan metin tabanlı bir formattır. Dosya, aşağıda gösterildiği gibi okuma başına dört satırlık gruplar halinde düzenlenmiştir (Ji ve Sadreyev, 2018).

```
@NB500929:247:HL2TYBGX3:1:11101:25163:1060
GATTTGGGGTTCAAAGCAGTATCGATCAAATAGTAAATCCATTTGTTCAACTCA
C
AGTTT
+
!“(***+)%%%++)(%%%)1***-+*)**55CCF>>>>>>CCC
CCCC65
```

İlk satır @ ile başlar ve ardından cihaz kimliğini (NB500929), çalışma numarasını (247) ve akış hücresi kimliğini (HL2TYBGX3) içeren benzersiz bir dizi tanımlayıcısı ile devam etmektedir. Sonrasında DNA parçasının akış hücresindeki yerini belirten sayılar gelmektedir. Eşleştirilmiş uç dizilimi durumunda, belirli bir DNA parçasının okuma 1 ve okuma 2 için iki FASTQ dosyası aynı dizi tanımlayıcılarını ve okuma sayısını (1 veya 2) içermektedir. İkinci satır, okuma sırasını içermektedir. Üçüncü satır bir "+" karakteriyle başlar ve isteğe bağlı olarak aynı sıra tanımlayıcısı ve herhangi bir ek açıklama takip edebilir. Dördüncü satır, bir kodlama şemasına göre ayrı semboller olarak kodlanan her taban için sıralama kalitesi puanlarını kodlamaktadır (Ji ve Sadreyev, 2018).

Hizalama, örneğin ENSEMBL projesi tarafından üretilen genlerin ve diğer genomik elementlerin spesifik bir açıklamasını kullanarak her okumanın dizisini bir referans genomuna haritalamanın hesaplama sürecidir (Zerbino vd. 2017). Tüm genom dizilimi ve diğer uygulamalarda gerçekleştirilen hizalama ile karşılaştırıldığında, kısa okunan RNA sekanslama verilerinin haritalanması, genomik koordinatlar boyunca ökaryotik transkriptlerin bitişik olmayan yapısından kaynaklanan ek bir zorluğu içermektedir. Bu, bir okuma dizisinin 5' ve 3' bölümlerinin iki farklı ekzona karşılık geldiği veya aynı kitaplık parçasının iki ucundan okunanların referans transkriptinde bitişik olmayan ekzonlarla eşlendiği durumların özel algoritmik değerlendirmesi gerektirmektedir. STAR hizalama aracı yüksek hizalama hızı, daha düşük haritalama hata oranlarına sahiptir (Dobin vd. 2013).

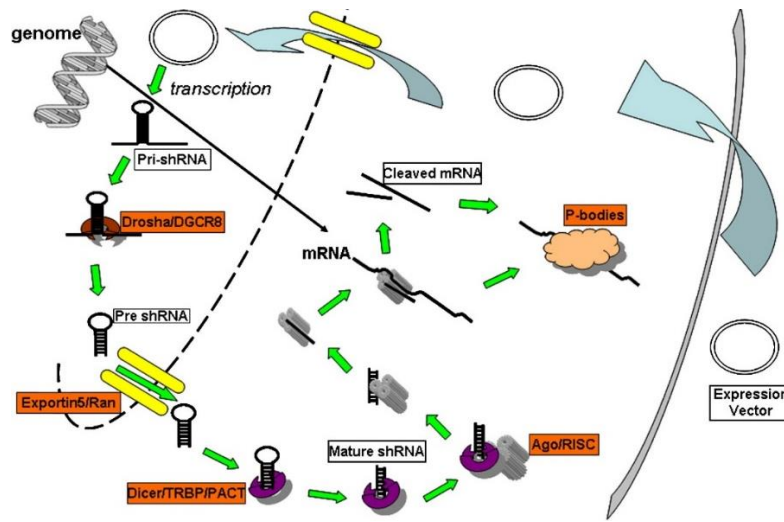
Okumaları genoma eşledikten sonra, RNA-seq verilerinin kalitesini daha derinlemesine incelemede önemlidir. Bu, Picard (<https://broadinstitute.github.io/picard>), Qualimap2 (Okonechnikov vd. 2016), RNASeQC (Deluca vd. 2012) veya SAMTools (Li vd. 2009) gibi standartlarında elde edilebilmektedir. Burada açıklanan iş akışı, belirli bir örnekte eşlenen okumaların çeşitli "küme" ölçümlerini oluşturan Picard'ı kullanmaktadır. Bunlar, diğerlerinin yanı sıra açıklamalı eksonlara, intronlara, çevrilmemiş bölgelere, intergenik bölgelere, mRNA bölgelerine hizalanmış bazlara ve okuma duplikasyon oranına (aynı genomik koordinatlara eşleme gereksiz okuma fraksiyonu) eşlenen okumalardaki toplam nükleotit bazlarının fraksiyonlarını içermektedir. Bu adım, sıralama kitaplıklarının kalitesini değerlendirmek ve RNA ekstraksiyonu, kütüphane yapımı veya dizileme ile ilgili olası sorunları teşhis etmek için gereklidir. İş akışı; potansiyel kalite sorunlarının çözülmesinde, düşük kaliteli örneklerin çıkarılmasından sonra bireysel transkriptlerle eşlenmiş okumaların nicelleştirilmesine ve farklı şekilde ifade edilen genlerin tanımlanmasına ilerlemektedir (Ji ve Sadreyev, 2018)

1.7 Gen Susturma

RNA interferans kimyasal olarak sentezlenmiş küçük girişimci RNA (siRNA) veya kısa saç tokası RNA (shRNA) olarak ifade edilenler plazmid kullanılarak elde edilebilmektedir (Golzio vd. 2012). Önceki çalışmalar, kimyasal olarak sentezlenmiş siRNA'nın iletimi *in vitro* ve *in vivo* gen ifadesinin güçlü ve diziye özgü inhibisyonuyla sonuçlandığını göstermiştir. Ancak, kimyasal olarak sentezlenen siRNA'ların pahalı maliyetlerinin yanı sıra, *in vivo*'da kısa ömürlü stabiliteleri nedeniyle geçici gen ifadesi susturulması gibi

sınırlamaların üstesinden gelmek için, shRNA'ların kullanımı daha uygun bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır (Golzio vd. 2012).

Küçük saç tokası RNA (shRNA'lar), küçük girişimci RNA'ların (siRNA'ların) aksine, hücre çekirdeğinde sentezlenir, işlenir ve sitoplazmaya taşınmaktadır. Daha sonra aktive olabilmeleri için RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) dahil edilmektedir (Cullen, 2005). Transfekte edilmiş hücrelerin içindeki shRNA'nın yaşam döngüsü Şekil 1.8'de şematik olarak gösterilmiştir. shRNA ekspresyon vektörünün sitoplazmaya iletilmesinden sonra, vektörün transkripsiyon için çekirdeğe taşınması gerekmektedir. Birincil transkriptler (pre-shRNA), mikroRNA'nın birincil transkriptleri için keşfedilenle benzer bir rotayı izlemektedir. Birincil transkriptler Drosha/DGCR8 kompleksi tarafından işlenir ve pre-shRNA'ları oluşturmaktadır. Pre-shRNA'lar, olgun shRNA'ya daha fazla işlenmek üzere Dicer/TRBP/PACT kompleksine yüklenmek üzere exportin 5 yoluyla sitoplazmaya taşınır. Dicer/TRBP/PACT kompleksindeki olgun shRNA, RISC içeren Argonaute proteiniyle ilişkilidir ve mRNA kesilmesi ve bozunması veya p-cisimcikleri yoluyla translasyonel baskılama yoluyla RNA interferans işlevini sağlamaktadır (Rao vd. 2009). shRNA'ların hücre içinde etkisi için hücresel döngünün özelliklerine göre belirlenen bu aşamaları takip etmektedir. Bu aşamalar mikroRNA olgunlaşma yollarına benzer şekilde işlenmektedir. Bu nedenle, miRNA'ların sentezi ve olgunlaşması üzerine yapılan çalışmalar, özellikle miR-30 tabanlı shRNA'lar olmak üzere shRNA sentezi için temel oluşturmuştur (Silva vd. 2005, Rao vd. 2009).



Şekil 1.8: shRNA aracılı RNA interferans yolunun şeması (Rao vd. 2009).

2. TEZİN AMACI VE KAPSAMI

Son yıllarda yapılan kanser çalışmalarında eksozomların fonksiyonel olarak oldukça önemli olduğu belirtilmiştir. Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler rejeneratif tıp uygulama alanındaki başarıları ile beraber yapılan çalışmalarda endojen tamir ve rejeneratif mekanizmaları artıran çözümler veya “parakrin” faktörlerini salgılamalarıyla hasarlı bölgede farklılaşmak yerine terapötik etki gösterdiği kanıtlanmıştır. Bununla beraber eksozomların hücreler arası haberleşmede, hücelere spesifik olarak hedeflenmede, normal fizyolojide veya hastalıklı durumlarda nasıl ortaya çıktığı henüz tam olarak belirlenmemiştir. Eksozomların lokal ve sistemik mikroçevreleri değiştirebilme özellikleri göz önüne alındığında adipoz kaynaklı kök hücrelerden salınan eksozomların tümörejenik etkisi ile ilgili literatürde sınırlı çalışma bulunmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında insan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden salınan eksozomların hücre kültürü medyasından iki farklı izolasyon protokolü uygulanarak eksozom izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

İzolasyonu yapılan eksozomların karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilerek TEM, Western blot ve immünofloresan analizleri gerçekleştirilmiştir.

Eksozomların SW-480 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi için farklı doz ve zaman aralıklarında MTT analizleri yapılmıştır.

Sitotoksik olmayan doz aralığı seçilerek SW-480 hücrelerinin migrasyon ve koloni oluşturma kapasitesinin belirlenmesi için Scratch ve koloni formasyon testleri yapılmıştır.

İzole edilmiş eksozomların SW-480 hücrelerinde transkriptomik düzeyde gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için RNA sekanslama çalışmaları yapılmıştır. Bunun için eksozom uygulaması yapılmış örneklerden RNA izolasyon tekniği kullanılarak RNA izole edilmiştir. RNA saflığı ve kalitesi kontrol edilen gruplara RNA dizilemesi yapılmıştır. Ardından gerçekleştirilen biyoinformatik analizlerle tüm RNAtranskriptlerin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.

Gerçekleştirilen biyoinformatik analizler sonucunda istatistiksel olarak anlamlı değişikliğe uğrayan genler, ifadesi artanlar (up regüle) ve ifadesi azalanlar (down regüle) olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Belirlenen genlerin ifadesinin deneysel olarak tespit edilmesi için ilk olarak primer tasarımı yapılmış ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PCR) ile genlerin ekspresyonları belirlenmiştir.

Gerçek zamanlı PZR sonucunda up regüle olduğu belirlenen genlerden ATOH8, EPS8L3 ve GMDS için sh-oligolar tasarlanmıştır.

ATOH8, pLKO.1-TRC lentiviral tabanlı vektöre klonlanarak shATOH8, SW-480 hücrelerinde susturulma çalışmaları için hazır hale getirilmiştir.

Tezimiz kapsamında gerçekleştirilen tüm çalışmalarımız eksozomların hücre içermeyen eksozom bazlı tedavilere bir örnek sağlayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden salınan eksozomların kanserdeki terapötik potansiyelinin değerlendirilmesiyle bu alanda yapılacak çalışmalara alternatif sağlaması ve eksozomların tümör hücreleri üzerindeki tümörejenik etkilerinin aydınlatılması ile ilgili literatürdeki sınırlı sayıda bulunan çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada Kullanılacak Hücre Soyları

Tez kapsamında iAMKH'ler ve SW-480 kolon kanseri hücreleri kullanılmıştır.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Çalışmada Kullanılan Malzemelerin, Ortamın Temizliği ve Sterilizasyonu

Deneyisel çalışmalarımızda kullanılacak ısıya dayanıklı malzemeler otoklavda 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak, ısıya dayanıklı olmayan solüsyonlar vb. ise 0,22 µm'lik filtre kullanılarak sterilizasyonu sağlanmıştır.

Hücre kültürü laboratuvarı çalışmaya başlanmadan yarım saat önce UV lamba ile steril edilmiştir.

3.2.2 Hücre Tabanlı Teknikler

3.2.2.1 Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlanması

3.2.2.1.1 Hücre Kültürü Medyumunun Hazırlanması

Hücre kültürü deneylerinde ticari olarak temin edilen Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) kullanılmıştır. Glutamin içeren bu medyuma son konsantrasyonu %10 olacak şekilde Fetal Sığır Serum (FBS) ilave edilmiştir.

3.2.2.1.2 FBS İnaktivasyonu ve Hazırlanması

Ticari olarak satın alınan Fetal sığır serumu 56 °C'da 30 dk ısı ile inaktive edilmiştir. Ardından alikotlanarak -20 °C da saklanmıştır.

3.2.2.1.3 Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Hücrelerin büyütülmesi ve pasajlanması işlemleri sırasında aşağıdaki çözeltiler kullanılmıştır.

Sodyum klorür içeren fosfat tamponu (PBS) Tamponunun Hazırlanması; Tablet şeklinde temin edilen PBS (Phosphate-Buffered Salin), her tableti 100 mL dH₂O ile hazırlanıp otoklavlanmış ve steril edilmiş olup ve 2-8 °C'de saklanmıştır.

Tripsin-EDTA çözeltilisinin Hazırlanması; %0,05 Tripsin ve 0,5 mM EDTA, steril PBS (1X) içerisinde hazırlanmış ardından 0,22 µm²luk filtreden geçirilerek -20 °C’da saklanmıştır.

3.2.3 Hücre Tabanlı Teknikler

Hücre kültürü çalışmaları TELSTAR Class II A-2 laminar akışlı kabinde yapılmıştır.

3.2.3.1 İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Büyütülmesi

İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (Merck, ABD, katalog numarası: SCC038) ticari olarak satın alınmıştır. İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin büyütülmesi için %10 FBS (ECS0182L, Euroclone) içeren Human Mesenchymal-LS Expansion Medium (SCM023, Merck) kullanılmıştır.

3.2.3.2 Donmuş Hücrelerden Kültür Yapılması

-80°C buzdolabında saklanan hücreler alınarak, 37 °C’deki su banyosuna konulmuş ve hücre çözme işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücrelere %10 FBS içeren medyum ilave edilerek 300xg’de 5 dakika boyunca santrifüj işleminden sonra çöken hücre pelleti 3 mL kök hücre vasatı ile pipetlenip 3 adet T 75 doku kültürü kaplarına ekilerek %5 CO₂, 37 °C sıcaklık ve %80-90 bağıl nem sağlayan bir inkübatöre alınmıştır.

3.2.3.3 Hücrelerin Pasajlanması

Yeterli bolluğa (%80-90) ulaşan hücrelerin medyumunu uzaklaştırılmış ve ardından PBS ile yıkanmıştır. PBS (pH: 7,4) içerisinde hazırlanmış %0,05 Tripsin ve 0,5 mM EDTA çözeltilisi ile muamele edilerek doku kültürü plastiğine yapışan hücrelerin besi yerine geçmesi sağlanmıştır (Tripsinizasyon). Hücrelere 3 mL tripsin-EDTA eklenerek ve 37 °C %5 CO₂ içeren inkübatörde 5 dk bekletilmiştir. Tripsinizasyon işleminden sonra tripsinin reaksiyonunu sonlandırmak amacıyla tripsin-EDTA oranının 2 katı olacak şekilde 6 mL DMEM-%10 FBS, besiyeri eklenmiştir. Flaskın içinde 9 mL olan hücre süspansiyonu 15ml hacmindeki falkona alınmış, hücreler ile besiyeri ve tripsin- EDTA karışımını ayırmak içinde 300xg’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant atılıp, geriye kalan pelet 4ml besiyerinde pipetaj ile çözdürülmüştür.

Çözdürülen hücrelerin 1ml si alınarak 1/4, seyreltme olacak şekilde içinde 14 mL besiyeri bulunan 75 cm²'lik flasklara alınmıştır. Hazırlanan kültürler %5 CO₂'li 37 °C'da inkübatörde büyütülmüştür.

3.2.3.4 Canlı Hücrelerin Belirlenmesi (Trypan Blue Exclusion) ve Hücre Sayımı

Hücre canlılığının belirlenmesinde hemositometre ile birlikte tripan mavisi boya kullanılmıştır. Bu yöntemde hazırlanan hücre süspansiyonuna tripan mavisi eklenerek ışık mikroskobu altında hücrelerin canlılığı incelenebilmektedir. Deneylerde kullanılacak yeterli miktardaki hücreyi alabilmek için tripan mavisi ve hemositometre lamı ile hücre sayımı yapılmıştır. Bu işlem için flasklardan kaldırılan hücreler 300xg'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra 10 mL medyumda homojen halde çözülmüştür. Canlı ve ölü hücreleri ayırt etmek için 10 µL hücre süspansiyonu eşit hacimde tripan mavisi (1:1 seyreltme oranında) ile 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu işlem sonunda ölü hücreler mavi renge boyanırken canlı hücreler boyanmaz ve bu boyanmayan hücreler sayılarak mL'deki canlı hücre sayısı hesaplanmıştır (Toplam canlı hücre sayısı / mL = Hemositometre sayım sonucu x 2 x 10⁴)

3.2.3.5. İnsan Adipoz Kök Hücrelerden Eksozom İzolasyonu

iAMKH'lerin 3. pasaj sonunda hücreler alınıp PBS ile yıkanması sonrasında serum içermeyen DMEM besiyeri içerisinde 72 saat bekletilmiştir. Hücrelerin mikroskopik kontrolleri yapıldıktan sonra kültür besiyeri toplanmıştır. Ultrasantrifüj metoduyla eksozom izolasyonu için öncelikle hücre kültürü besiyeri 300 xg'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Ardından 15000 xg'de 20 dk santrifüj yapılarak hücre kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatant 0.22 µm'lik steriltreden geçirilmiştir. Bu işlemin ardından 100000 xG'de 70 dk santrifüj yapılmıştır. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet PBS ile yıkanmıştır. Son olarak 100000 xg'de 70 dk santrifüj yapıp süpernatant PBS ile çözülerek eksozomlar elde edilmiştir. Ayrıca ticari olarak satın alınan Total Exosome Isolation Reagent (Katalog numarası: 4478359, Thermo Fisher Scientific) eksozom izolasyon kiti ile izolasyon için kit protokolleri uygulanmıştır. Kısaca 1 ml hücre kültürü medyumuna karşılık 500µl Total eksozom izolasyon solüsyonu eklenmiştir. Bir gece 4 °C'da inkübe edilen karışım ertesi gün 10000 xg'de bir saat santrifüj yapılmıştır. Ardından süpernatant uzaklaştırılıp pellet PBS ile çözülerek eksozomlar elde edilmiştir. Elde edilen eksozomlar 2 ila 8 °C arasında bir hafta, daha uzun süre saklanması için ise -20 °C'dan daha düşük ortamda saklanmıştır.

3.2.4 Bradford Analizi

Bradford deneyi, Coomassie Blue G250 boyasının arginin gibi bazik ve aromatik aminoasitlere bağlanarak oluşturduğu renk protein şiddetiyle orantılıdır (Kruger,2009). Bradford reaktifi için gerekli bileşenler Tablo 3.1’de belirtilmiştir.

Tablo 3.1: Bradford analizi için gerekli bileşenler

Kimyasal Madde	Miktar
Coomassie brilliant blue G-250	0,1g
Etanol	50mL
%95’lik fosforik asit	100mL
dH ₂ O	1L’ye tamamlanır
Serum Albumin	0,01g
dH ₂ O	10mL’ye tamamlanır

Bradford analizi için örneklerimizden öncelikle protein ekstraktı hazırlanması gerekmektedir. Bunun için RİPA solüsyonu hazırlanması gerekmektedir. RİPA solüsyonu Tablo 3.2’de belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 3.2: RİPA solüsyonu için gerekli bileşenler

Final Konsantrasyon
10 mM Tris Cl ph:8
% 1 Triton x100
%0,1 SDS
%0,1 Sodium deoxycholate
1mM EDTA
1mM EGTA
140mM NaCl
+ proteaz inhibitörü (25ml için 1 tablet)

Hazırlanan RİPA solüsyonundan 50 ve 100 µl alınarak iki ayrı tüpte 100 µl eksozom bulunan örnekler ilave edilir. Örnekler pipetaj yapıp iyice RIPA solüsyonu ile çözülür. Ardından buz üzerinde 45 dk bekletilir. Sonrasında 4 °C’da 13500 rpm’de 10 dk santrifüj yapılır. Süpernatant soğutulmuş ependorfa alınır. Elde edilen örnek Bradford tayini için kullanılır.

Bradford analizi için 1mg/ml sığır albumin çözeltisinden tüplere 0,10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µl alınarak toplam 1mL’ye tamamlanır. Bu karışıma 5ml Bradford reaktifi eklenerek 2 dakika vorteksleme ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Süre sonunda örneklerin absorbansı 595 nm’ de okunmuştur. Kör olarak sadece 1mL su ve 5ml Bradford reagent içeren tüp kullanılır. Aynı işlem örnek için uygulanır. 595 nm’deki absorbansa karşı protein miktarını içeren grafik BSA sonuçlarına göre excel de hazırlanır ve daha sonra örnek için elde edilen absorbansa karşılık gelen protein miktarı grafikten elde edilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.5 TEM Analizi

İzolasyonu yapılan insan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden salınan eksozomlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı- ARUM merkezi tarafından HR-TEM mikroskopunda incelenmiştir. TEM analizi için gerçekleştirilen adımlar kısaca verilmiştir. Öncelikle biyolojik örnek/dokulardan TEM için numune hazırlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından ultramikrotomda tam ince kesit alma adımı takip edilerek devam edilmiştir. Daha sonra kesit alınan örneklerde tam ince kesit boyama (uranil asetat / kurşun sitrat ile) aşaması geçilmiştir. En son adımda ise inceleme ve görüntü alma (HR-TEM) olarak tamamlanmıştır.

3.2.6 Western Blot

Western blot çalışmaları için izolasyonu yapılan eksozomlar örnek hacminin X2 oranında Ripa buffer eklenerek iyice pipetaj yapılmıştır. Daha sonra 2 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Ardından buz üzerinde 45 dk bekletilmiştir. 45 dk sonunda 13.500 rpm’de 4 °C ‘da 10 dk santrifüj yapılmıştır. Süpernatant soğuk eppendorfa aktarılarak proteinler hazırlanmıştır. Ardından ayırma jeli hazırlanarak hemen üzerine %90 izopropanol ilave edilerek jelin hava almaması ve düzgün polimerleşmesi engellenmiştir. 30-40 dakika jelin polimerizasyonu için beklenmiş ardından jel polimerize olduktan sonra izopropanol uzaklaştırılarak ultra saf su ile yıkama yapılmıştır. Whatman 3MM kâğıdı ile yıkama yapılan yüzey kurutulmuştur. Ardından yığma jeli dökülerek yükleme yapılacak kuyucukların

oluşması için tarak yerleştirilmiştir. Yığıma jelinin polimerizasyonundan sonra, tarak çıkarılmış daha sonra hazırlanan jel tank içine yerleştirilmiştir. Daha sonra örnekler örnekler yükleme boyası ile karıştırılmış ve oluşturulan kuyucuklara yüklenerek 90 V ve 400 mA 'de 2-2,5 saat yürütülmüştür. Western Blot için kullanılan solüsyonlar aşağıdaki Tablo 3.3 ve 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3.3: Western Blot için kullanılan solüsyonlar

JEL İÇERİĞİ	%10 AYIRMA JELİ	%5 YIĞMA JELİ
Upper Buffer	-	2.5 ml
Lower Buffer	2.5 ml	-
Acrilamid:Bisakrilamid(37.5:1)	2.5 ml	1.25 ml
ddH ₂ O	5 ml	6.25 ml
%10 (w/v)APS	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Tablo 3.4: Western Blot için kullanılan solüsyonlar

SOLUSYON	İÇERİĞİ
Laemli Buffer	0.125 M Tris-HCl(pH:6.8), %4 (w/v) SDS, %10 (v/v) Gliserol, %10 (v/v) β-2-Mercaptoetanol
Bromophenol Blue Solüsyonu	%0.05 (w/v) bromophenol blue distile su içinde
SDS PAGE Lower Jel	1.5 M Tris-HCl (pH:8.8), %10 (w/v) SDS
SDS PAGE Upper Jel	1 M Tris-HCl (pH:6.8), %10 (w/v) SDS
SDS PAGE (Running Buffer)Yürütme Çözeltisi	25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0.1 (w/v) SDS
Western Blot Transfer Çözeltisi	25 mM Tris, 192 mM Glisin, % 20 (v/v) Metanol
10X Tris Buffered Saline (10X TBS otoklavlanmış)	10 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH: 7.4

Proteinlerin transferi için PVDF (Millipore) membranlar kullanılmıştır. Transfer için jel, Whatman 3MM kağıdı ve PVDF membranlar kullanılarak sandviç hazırlanmıştır. Burada elektrik akımının geleceği yöne göre transfer kasedi arasına sünger, Whatman kağıdı, jel, membran, Whatman kağıdı, sünger olacak şekilde konulmuştur. Hazırlanan kaset, soğuk transfer buffer tankında bir gece 4 °C'da transfer işlemine bırakılmıştır.

Transfer işleminin ardından PVDF membrana transfer olan proteinler ilk olarak %0.1 (v/v) Tween20 içeren 1X TBS 5 dk yıkama yapılmıştır. Ardından membranlar 20 ml bloklama çözeltisinde 1 saat çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süre sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırılıp 5 dakikalık sürelerle 3 kez yıkama yapılarak membran yıkanmış,

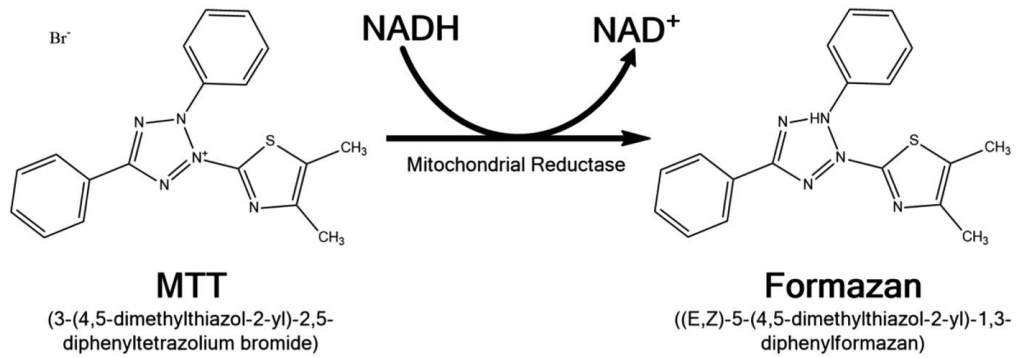
bunun için %0.1 (v/v) Tween20 içeren 1X TBS kullanılmıştır. Bu işlemin ardından membran primer antikor ile 1-2 saat oda sıcaklığında 4 °C’da horizontal çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Westen blot için antikorlar HSP70 (ab2787, Abcam), CD63 (Abcam, ab59479), CD81 (Abcam, ab59477) ve CD9 (Abcam, ab92726) kullanılmıştır. Primer antikorlar (HSP70 1:1000), (CD 63 1:1000), (CD 81 1:1000) ve (CD 9 1:500) %5 (w/v) BSA ve %0.1(v/v) Tween20 içeren 1X TBS içinde hazırlanmıştır. Süre sonunda primer antikor çözeltisi uzaklaştırılarak 5 dakikalık sürelerle 3 kez yıkama yapılan %0.1(v/v) Tween20 içeren 1X TBS solüsyonu kullanılmıştır. Daha sonra uygun sekonder antikor kullanılarak [horseradish peroxidase-conjugated, anti-rabbitIgG, anti-mouseIgG ya da anti-goatIgG, (1:2000-1:10,000) oranında sulandırılmış, %5 (w/v) BSA ve %0.1(v/v) Tween20 içeren 1X TBS] 1 saat oda sıcaklığında horizontal çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Son basamakta yıkama adımı tekrarlanmıştır. Ardından ECL (Enhanced Chemi-Luminescent) kit kullanılarak protein bantları görüntülenmiştir

3.2.7 İmmüno Floresan Analizi

24 kuyucuklu plakalara chamber slide yerleştirildikten sonra her kuyuya hücreler 250.000 olacak şekilde ekildi. Bir gece 37°C’da inkübe edildikten sonra eksozom ve PBS uygulamaları yapıldı. İnkübasyondan 48 saat sonra sonuçlar alınmıştır. Öncelikle besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 3 kere PBS ile yıkandı ve 4X paraformaldehit ile hücreler 10 dk fikse edildi. Ardından %0,1 Twen-20 %1 BSA içeren PBS ile spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için 60 dakika bloklama işlemi gerçekleştirildi. Ardından bloklama solüsyonu uzaklaştırılıp 3 defa 5’er dk PBS yıkama işlemi yapıldıktan sonra CD 81 ve CD63 için primer antikor (5 µg/ml) ile hücreler nem çemberi (humidity chamber) içerisinde 4°C’da bir gece inkübe edildi. Ertesi gün primer antikor uzaklaştırıldı ve 3 defa 5’er dk PBS ile yıkandı. Daha sonra sekonder antikor uygulaması (2 µg/ml) Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568 (Thermo, Catalog: A-11004) bir saat karanlık odada oda sıcaklığında sekonder antikor ile muamele edildi. Süre sonunda 3 defa 5’er dk PBS ile yıkama işleminden sonra yuvarlak lameller lamlar üzerine damlatılmış olan 4’,6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI) (Catalog number: D1306, Invitrogen) (1/10.000) ve anti fade mounting medyum (Catalog number: P36930, Invitrogen) üzerine hücreler arada kalacak şekilde kapatıldı. Görüntüler floresan mikroskobu (Nikon, Japan) kullanılarak elde edildi (X40 büyütme).

3.2.8 iAMKH Kaynaklı Eksozomların Kolon Kanseri Hücreleri Üzerinde Canlılık Seviyelerinin Belirlenmesi

MTT testi, hücre canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksitenin bir göstergesi olarak hücrel metabolik aktiviteyi ölçmek için kullanılır. Bu kolorimetrik test, sarı bir tetrazolyum tuzunun (3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür veya MTT) metabolik olarak aktif hücreler tarafından mor formazan kristallerine indirgenmesine dayanmaktadır (Şekil 3.1). Canlı hücreler, MTT'yi formazana indirgeyen NAD (P) H'ye bağımlı oksidoredüktaz enzimlerini içerir. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT reaktifi koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücrelerde boyanmamaktadır (Wang vd. 2012). İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden izole edilen eksozomların kolon kanseri SW480 hücreleri üzerinde canlılık seviyesine etkisinin belirlenmesi için ilk olarak eksozom izolasyonu yapıldı ve eksozom miktarı belirlendi. MTT için eksozomal protein konsantrasyonu hesaplanarak ve PBS kullanılarak 476,92, 238,46, 105,30, 33,69, 24,12, 6, 3, 1,5, 0,75, 0,375 ve 0,187 µg/ml olacak şekilde seyreltme işlemleri yapıp stoklar hazırlandı. Seyreltme işlemi yapılan eksozom örnekleri SW-480 hücre hattına 24,48 ve 72 saat sürelerde uygulanmıştır. SW-480 hücreleri 10.000 hücre/well olacak şekilde 96'lık doku kültürü plastiğine ekimi gerçekleştirilmiştir. Bir gece inkübasyona (%5 CO₂, %95 hava ve %90 bağıl nem içeren 37 °C sıcaklığa ayarlı) bırakılan hücrelerin tutunması sağlanmıştır. Ertesi gün kontrol, PBS ve seyreltilen eksozom gruplarına 1µl uygulama yapılmıştır. Uygulama sonrası 24,48 ve 72. saatlerde MTT testi yapılmıştır. MTT test sonuçları grafiklerde Bölüm 4.10'da gösterilmiştir



Şekil 3. 1: MTT reaksiyonu (Wang vd. 2012).

3.2.9 Klonojenik Analiz

SW-480 hücreleri DMEM-HG %10 FBS içeren besiyeri içerisinde büyütüldü. Tam doluluğa ulaşan (%80-90) oranına gelen hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılmıştır. Thoma lamı ile sayılan hücreler 6 kuyucuklu plakalara 1.2×10^3 olacak şekilde ekilmiş ve bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün eksozom ve PBS uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Eksozom konsantrasyonu 26,70 ng/μl olacak şekilde her bir kuyucuğa uygulamalar yapılmıştır. PBS içinde 50 μl PBS uygulanmıştır. Uygulama sonrasında hücrelerin büyümesi mikroskop ile gözlemlenmiştir. 10. günün sonunda deney sonucu belirlenmiştir. Koloniler kristal viyole ile 5 dk boyandıktan sonra 3 kez 5 dk yıkanmıştır. Koloniler HP 600 dpi'da fotoğraf makinası ile görüntülenmiştir. Kolonilerin sayımı Image J programı ile yapılmıştır. Her bir kuyucuk için tüm alan seçilerek sayım işlemi gerçekleştirilmiştir (kuyucukların %100 alanı sayıldı). Seçilen alandaki koloni sayılarına göre grafikler oluşturulmuştur.

3.2.10 Hücre Migrasyon Yöntemi (Scratch Testi)

Hücreler 6 kuyucuklu doku kültürü plastiklerine her kuyuya 600.000 hücre/ kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Ardından bir gece hücrelerin tüm yüzeye tutunması için beklenmiştir. Tam doluluğa ulaşan hücrelere eksozom ve PBS uygulamaları yapılmıştır. Eksozom konsantrasyonu 26,70 ng/μl olarak uygulanmıştır. Bu işlemin hemen ardından standart olacak şekilde 10 μl beyaz pipet ucu yardımıyla kuyucuğun ortasına artı şeklinde çizik atılmıştır ve 0. saatte hücreler fotoğraflanmıştır. Kuyucuklar 4. saat, 24. saat ve 48. saatlerde yeniden fotoğraflanmıştır. Çizik arasının ne kadar hızlı kapandığı yani hücre göçü iyi bir şekilde fotoğraflanıp takip edilmiştir. Fotoğraflar Image J programı ile analiz edilmiştir (MRI Wound HealingTool). Kontrol grupları ile eksozom uygulanmış gruplar karşılaştırılarak hücrelerin % göç etmeleri aşağıdaki formüle (3.1)'e göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Alan Kapanma Oranı} = \left[\frac{0.\text{Saat Hasar Alanı} - 24.\text{Saat Hasar Alanı}}{0.\text{Saat Hasar Alanı}} \right] \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.11 RNA İzolasyonu

Kontrol grubu, PBS uygulanan grup ve 26,70 ng/μl eksozom uygulaması yapılmış olan gruplardan RNA izolasyonları yapıldı. Kısaca bölüm 3.2.3.3'de anlatılan protokolde tripsinizasyon yapılmış ve ardından besiyeri eklenerek 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp çöktürülen hücre pelletinden RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu için GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, Catalog number:

K0732) kullanılarak protokole uygun şekilde kontrol, PBS ve eksozom gruplarında RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Öncelikle elde edilen pelletler 500 µl PBS ile hafifçe pipetaj yapılarak yıkanmış, 5000 rpm’de 5 dk santrifüj yapılmıştır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 600 µl Lizis solüsyonu eklenmiş, 10 sn vorteks yapılmıştır. Ardından %96’lık 360 µl soğuk etanol eklenmiştir. Oluşan karışım kit protokolünde tarif edilen kolon sistemine aktarılarak 13.500 rpm’de 1 dk santrifüj yapılmış süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bu işlemin sonunda 700 µl Yıkama solüsyonu 1 eklenmiştir. 13.500 rpm’de 1 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Devamında Yıkama solüsyonu 2’den 250 µl eklenerek 13.500 rpm’de 1 dk santrifüj yapılmış ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kolon temiz bir ependorfa alınarak 13.500 rpm’de 2 dk santrifüj yapılmış ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Son aşamada kolon temiz bir ependorfa alınarak 40 µl DNaz RNaz olmayan su içerisinde 5 dk bekletilmiştir. Süre sonunda 13.500 rpm’de 1 dk santrifüj yapıp süpernatant elde edilerek 1. Elüsyon RNA elde edilmiştir. Aynı kolona 35 µl DNaz RNaz olmayan su içerisinde 5 dk bekletilmiş 13.500 rpm’de 1 dk santrifüj yapıp süpernatant elde edilerek 2. Elüsyon RNA elde edilmiştir. İzolasyon sonrası elde edilen tüm RNA’lar -80°C’da saklanmıştır.

3.2.12 RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi

RNA İzole edildikten sonra miktarının ve saflığının belirlenmesi için Thermo µDrop™ and µDrop Duo Plates (Thermo Scientific Catalog number: N12391) spektrofotometresi ile ölçüm alındı. 260 nm ve 280 nm dalga boyunda ölçümleri alınarak ortalama RNA konsantrasyonu ve saflığı aşağıdaki formüle (3.2)’deki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$RNA\ Konsantrasyonu\ (ng/\mu l) = [(OD\ 260\ (Örnek) - OD\ 260\ (Kör)) \times 40 \times 20,408] \quad (3.2)$$

3.2.13 RNA Jel Elektroforezi

Elektroforez tank sistemi ve aparatlar RNaz enzimlerinin olmadığı ortama göre hazırlanması gerekmektedir. Bunun için jel dökülmeden önce elektroforez tank sistemi ve aparatlar % 0,5’lik SDS ile yıkandıktan sonra DEPC’li sudan geçirilip en son etanol ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakılmıştır.

RNA jel elektroforezi için gerekli olan kimyasal ve solüsyonlar Tablo 3.5’de gösterilmiştir. Bunun için 0,5 gr agaroz, 5 ml 10X FA jel tampon ve 45 ml DEPC’li su mikrodalgada çözülmüştür. Ardından soğumaya bırakılan karışımın sıcaklığı ılık bir kıvama gelince 900 µl % 37’lik formaldehit ve 1 µl etidyum bromür eklenerek jel kasetine kasete dökülmüştür. Bu işlem sonrasında donan jelden tarak çıkartılarak 1X FA jel tamponu ile doldurulan tanka yerleştirilmiştir. 1:1 oranda hazırlanan RNA örneği ve 2X RNA Loading Dye (Catalog Number R0641) 70°C’da 10 dk bekletilip ardından 10dk buzda soğutulduktan sonra kuyulara yüklenmiştir. Güç kaynağı 80 volt 400 mA 40 dk yürütülmüş ve UV ışık altında RNA görüntülenmiştir.

Tablo 3.5: RNA elektroforezi solüsyonları

Çözelti	Hazırlanışı
DEPC Solüsyonu	1 ml DEPC stoğu 1000 ml ultra saf su tamamlanır. 37 °C’ da 1gece bekletilmiştir.
10X FA Tamponu	0.08 M Sodyum asetat, 0.2M MOPS, 0.01 M EDTA ph:7.00
1X FA Tamponu	100 ml 10X FA tamponu, 20 ml %37’lik (12.3 M) formaldehit, 880 ml DEPC’ li su ile 1 litreye tamamlanmıştır.

3.2.14 RNA Sekans Analizi

Tez çalışması kapsamında 3 tekrarlı olacak şekilde kontrol grupları ve 3 tekrarlı olacak şekilde eksozom uygulanan gruplar olmak üzere toplam altı RNA numunesinin tüm transkriptom profilinin çıkarılması hedeflenmiştir. Başarılı RNA-seq analizi için deneysel tasarıma dikkat etmek esastır. Buradaki önemli noktalardan biri grup başına en az üç biyolojik kopya eklemek gerekmektedir. Bu durum diferansiyel gen ekspresyonunun analizinde istatistiksel anlamlılığın sağlam tahminleri için çok önemlidir (Ji ve Sadreyev, 2018). Bu amaçla yeni nesil dizileme uygulaması Refgen Biyoteknoloji firmasından hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir. Okuma işlemi sonrasında, elde edilen verilerin kalite kontrolü amacıyla FASTQC aracı (Babraham Bioinformatics, USA, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk>) kullanılmıştır. Dizileme sürecinde, ham okuma verilerindeki düşük kalitedeki baz okumaları ve olası adaptör-indeks kontaminasyonlarının sonraki analiz basamaklarında sapmalara neden olmaması için, okumalardan kırılmıştır. Kalite değerlerine göre kırma işlemleri için Trimmomatic aracı (Bolger vd. 2014, <http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) kullanılmıştır. Kırma sonrası hizalama

işleminde HISAT2 aracından (<https://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>) yararlanılmıştır. Bu uygulamada referans genom olarak homo sapiens referans genomu M25 (GRCm38.p6) kullanılmıştır. Hizalama sonrası anotasyonunda gen, ekzon ve transkript bilgileri için Ensembl veriseti kullanılmıştır. Hizalama sonrasında her bir transkript üzerindeki okuma sayıları hesaplanmış ve ardından toplam okuma sayısına göre normalize edilmiştir. Transkriptom elemanlarına yönelik okuma sayılarının belirlenmesinde Subread aracı (<http://subread.sourceforge.net>) kullanılmıştır. Gen başı okuma sayılarının normalizasyonu ve filtrelenmesi için R:edgeR (Robinson, McCarthy, ve Smyth 2010) aracı; gruplar arası anlatımı değişen genleri (Differentially Expressed Genes) belirlemek için R::limma aracı (Ritchie vd. 2015) kullanılmıştır. Grup içi ve gruplar arası istatistiksel karşılaştırma çalışmaları, veri görselleştirme uygulamalarında R betikleri kullanılmıştır.

Galaxy programı, erişilebilir, tekrarlanabilir ve şeffaf hesaplamalı biyomedikal araştırmalar için açık kaynaklı, web tabanlı bir platformdur. Galaxy, bir point-and-click arayüzü aracılığıyla araçları ve iş akışlarını çalıştırmak için parametreleri etkileşimli olarak belirlemelerini sağlayarak biyoinformatik analizlerini programlama bilgisi olmayan kullanıcılar için erişilebilir hale getirmektedir (Giardine vd. 2005). Her hesaplama analizi, herhangi bir kullanıcının tüm analizi tekrarlayabilmesi ve anlayabilmesi için takım parametrelerini ve diğer bilgileri otomatik olarak yakalayıp tekrarlanabilir forma dönüştürmektedir. Şeffaflık özelliği ile kullanıcıların analizleri web üzerinden paylaşmalarına, yayınlamalarına ve eksiksiz bir analizi tanımlayan sayfaların, etkileşimsel, web tabanlı belgeler oluşturmalarına da basit erişim sağlayarak korunmaktadır (Goecks vd. 2010). Galaxy'nin herkese açık ücretsiz bir örneği <http://usegalaxy.org> adresinde mevcuttur. Yerel bir Galaxy örneği, <http://getgalaxy.org> adresindeki talimatları izleyerek yüklenebilir veya <http://usegalaxy.org/cloudlaunch> adresine erişerek bulutta çalıştırılabilir. Yeni araçlar, Galaxy'nin ToolShed olarak bilinen uygulama mağazasından <http://usegalaxy.org/toolshed> adresinde bulunan bir Galaxy örneğine kolayca yüklenebilmektedir. Ek olarak, Galaxy'ye aşina olmayan kullanıcılar <http://usegalaxy.org/galaxy101> adresinde bulunan öğreticiyi takip etmeye ve <http://galaxy-project.org> ve <https://vimeo.com/galaxyproject> adresindeki kaynakları keşfetmeye yönlendirilmektedir (Blankenberg vd. 2010). Galaxy arayüzünü kullanma gereksinimi için etkileşimli JavaScript ve HTML5'i destekleyen modern bir web tarayıcısına sahip bir bilgisayar gereklidir. Firefox, Chrome, Safari ve Opera gibi mevcut internet tarayıcılarının çoğu desteklenir. JavaScript etkinleştirilmeli ve kullanıcının JavaScript'i engelleyen yüklediği eklentiler devre dışı

bırakılmalıdır. Yeni nesil sıralama verilerini ve RNA-Seq analiz etmek için JavaScript ve HTML5'i destekleyen modern bir web tarayıcısına sahip bir bilgisayar gerekmektedir. İnternete erişim ve genel Galaxy sunucusunda (<http://usegalaxy.org>) veya yerel bir Galaxy kurulumunda veya Galaxy bulut örneğinde bir kullanıcı hesabına erişim gereklidir. FASTQ formatında RNA dizileme verilerine ihtiyaç vardır. Böylece kendi veri kümeleriniz oluşturulur ve yöntemlerin başında listelenen örnek verilerde kullanılabilir (Blankenberg vd. 2014).

Bizim biyoinformatik olarak işlenmiş RNA sekans ham verilerimiz usegalaxy.org programı ile de analiz edilmiştir. Ham data RNA-Seq verilerini kullanarak işlenmemiş numuneler için galaxy.rnaseq.eu veri tabanındaki RNA-Seq kitaplıkları kullanılmıştır. Bu kitaplıklar, her örnek için RNA-Seq okumaları elde etmek üzere dizilenmiş olup işlenmiş numuneler için RNA-Seq verilerinin gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması sağlamak istenmiştir. Programlamada FastQ, Trimmomatic, FastQC, Hisat2, Feature counts, Limma analizleri sırasıyla yapılmıştır.

3.2.15 Primer Tasarımı

Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda belirlenen genler için spesifik primerler Primer 3 programı ile tasarlanmıştır. OligoAnalyzer™ Tool programı ile tasarlanan primerler analiz edilmiş ve saç tokası yapısı oluşturmamasına, Tm sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına ve nükleotitlerin dağılımının mümkün olduğunca eşit olmasına dikkat edilmiştir. Ayrıca tasarlanan primerler databanklarda (GenBank + EMBL + DDBJ + PDB sequences) bulunan DNA sekansları ile NCBI BLAST yapılarak kontrol edilmiştir (Tablo 3.10).

3.2.16 cDNA SENTEZİ

Olgun bir mRNA'dan sentezlenen ve ters transkriptaz enzimiyle katalizlenen bir reaksiyonda şablon olarak kullanılan DNA parçasına tamamlayıcı DNA denilmektedir. Aşağıdaki Tablo 3.6'de kimyasal bileşenler ve oranlar kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir (ProtoScript® M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit). PZR şartları 25°C 'da 5 dk, 42°C'da 1 saat 65 °C'da 5 dk (35X döngü) programı ayarlanmıştır. Elde edilen cDNA'lar -20°C 'da saklanmıştır.

Tablo 3.6: cDNA sentezi için gerekli bileşenler

İçerik	Hacim
RNA (1000 ng/μl)	1 μl
d(T)23VN (50 μM) veya Random Primer Mix (60 μM)	2 μl
10X M-MuLV tampon	2 μl
M-MuLV RT (200 U/μl)	1 μl
10 mM dNTP	1 μl
RNase inhibitör (40 U/μl)	0,2 μl
Nükleaz içermeyen su (H ₂ O)	Toplam hacim 20 μl

3.2.17 İnsan Beta Mikroglobulin Primerleri ile cDNA'nın PZR ile Kontrol Edilmesi

Elde edilen cDNA kalıp olarak kullanılarak cDNA'ların kontrolü ve miktarının optimizasyonu yapılmıştır. cDNA kalitesi insan-β-2-mikroglobulin spesifik PZR yapılarak kontrol edilmiştir. PZR içerikleri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir. PZR reaksiyonunda kullanılacak reaktifler ve PZR şartları aşağıdaki Tablo 3.7 ve Tablo 3.8'de gösterilmiştir.

Tablo 3.7: İnsan Beta Mikroglubulin PZR bileşenleri

Kimyasallar	Hacim
Taq Buffer (100 mM Tris-HCl ve 100 mM KCl pH 8.8 at 25°C)	5µl
MgCl ₂	2µl
dNTP	1µl
HB-2 Forward Primer	1µl
HB-2 Reverse Primer	1µl
cDNA	2 µl
Taq DNA polimeraz	0,5µl
Nükleaz İçermeyen su (dH ₂ O)	Toplam Hacim 50 µl

Tablo 3.8: İnsan Beta Mikroglübülin

Sıcaklık	Süre	Döngü
95°C	2 dk	1
95°C	1 dk	35
55°C	45 sn	35
72°C	1 dk	35
72°C	10 dk	1

3.2.18 Agaroz Jel Elektrofözezi

İnsan beta mikroglübülin primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonunda elde edilen cDNA'ların kalitesinin belirlenmesinde ve restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimleri yapılan plazmitlerin/insert doğrulanmasında agaroz jel elektrofözezinden faydalanılmıştır. Buna göre gerekli olan kimyasallar ve solüsyonlar Tablo 3.9'da verilmiştir. Bu analizler

için %1 ve %0,8'lik jeller kullanılmıştır. Öncelikle %1 ve 0,8'lik jel için 1 gr ve 0,8 gr tartılan agaroz 0.5X TBE tamponunda mikrodalgada çözülerek homojen bir karışım oluşturulmuştur. Oda sıcaklığında soğumaya bırakılan karışım ılık bir kıvama geldiğinde (37°C-40°C) konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklenerek karıştırılmıştır. Ardından tarak eklenmiş jel kasedine dökülen karışım oda sıcaklığında polimerizasyona tabi tutulmuştur. Polimerize olan jel yürütme tankına alınarak tarak çıkarılmış ve kuyucuklar oluşturulmuştur. Ardından örnekler 6X DNA Loading Dye (Catalog Number R0611, Thermo Scientific) ile (10:2,5) oranında kullanılarak karıştırılıp kuyucuklara yüklenmiştir. Marker olarak 1 kb DNA Ladder (Catalog Number 10787018, Thermo Scientific) kullanılmıştır. Marker ve örnekler kuyucuklara yüklendikten sonra 90 V, 400 mA'de 40 dk yürütülmüştür. Süre sonunda jel UV ışık altında görüntülenerek analiz edilip sonuçlar kaydedilmiştir.

Tablo 3.9: Agaroz jel elektroforezi solüsyonları

Çözelti	Hazırlanışı
5X TBE Tamponu	0.44 M Tris base, 0.44 M Borik asit, 0.01 M EDTA ph:8.0
0.5X TBE Tamponu	100 ml 5X TBE tamponu 1000 ml ultra saf suyla tamamlanmıştır.
Etidyum bromür	Son konsantrasyon 10 mg/ml olacak şekilde ultra saf su ile hazırlanmıştır. 4°C'da karanlıkta saklanmaktadır.

3.2.19 Gerçek Zamanlı PZR Analizi

Gerçek zamanlı PZR (RT-PZR) analizi için Roche Light Cycler 480 cihazı kullanılmıştır. Elde edilen cDNA'lar tasarlanmış spesifik primerler Tablo 3.10'da gibi kullanılarak syber green (RealQ Plus 2x Master Mix Green, Ampliqon, Cat. No. A325499) ile uygun program ile analiz gerçekleştirilmiştir. RT-PZR analizlerinde normalizasyon için insan-β-2 mikroglobulin kullanılmıştır. RT-PZR için kullanılan kimyasal solüsyonlar Tablo 3.11'de verilmiştir. Sonuçlar Livak metoduna göre değerlendirilmiştir. RT-PZR koşulları ön inkübasyon, amplifikasyon, erime eğrisi ve soğutma aşamalarından oluşmaktadır. RT-PZR şartları amplifikasyon 95 °C 30 sn (artış

oranı 4.4), 55 °C 30 sn (artış oranı 2.2), 72 °C 30 sn (artış oranı 4.4). Erime eğrisi 95°C 5sn (artış oranı 4.4), 65°C 1 dk (artış oranı 2.2), 97°C 0saat 0dk 0 sn (artış oranı 0.11). Soğutma 40°C 30sn (artış oranı 2.2) olarak aşağıdaki Tabloda 3.12’de belirtilmiştir. Toplam 40 döngüden oluşup aşağıdaki denklem (3.3)’e göre hesaplamalar yapılmıştır.

Tablo 3.10: RT-PZR ekspresyon primerleri

Primer	İleri (Forward (F)) ve Geri (Reverse (R)) Primer Dizileri	Erişim Numarası Ürün Uzunluğu (bp) Bağlanma Sıcaklığı (°C)
ATOH8 F	5'- AAC TAC ATC CTG TCC CTG GCG AGC TCA CCT TGT CCT CAG G -3'	NM_032827.7 210 bp 63 °C
ATOH8 R	5'- CCT GAG GAC AAG GTG AGC TCG CCA GGG ACA GGA TGT AGT T -3'	
GMDS F	5'- GAG CGT TAC CAT TGC CTC TGT CAA TGT GAG CCT GGG GAT T -3'	NM_001253846.2 167 bp 61°C
GMDS R	5'- AAT CCC CAG GCT CAC ATT GAC AGA GGC AAT GGT AAC GCT C -3'	
EPS8L3 F	5'- GCC CAC CTG AGA GTA ACC TTA CTT GCA TTT TCA GGG CTG G -3'	NM_001319952.2 217 bp 61°C
EPS8L3 R	5'- CCA GCC CTG AAA ATG CAA GTA AGG TTA CTC TCA GGT GGG C -3'	
POLA2 F	5'- CCA TCA GCT ACT CTC ACC GTT GTA GCT CCC AGT TAG TGC C -3'	NM_002689.4 194 bp 62°C
POLA2 R	5'- GGC ACT AAC TGG GAG CTA CAA CGG TGA GAG TAG CTG ATG G -3'	
SDF4 F	5'- TGT GAA CAC TGA CCG GAA GAA GTT CCT CGT TGA GCC TGA T -3'	NM_016176.6 228 bp 60°C
SDF4 R	5'- ATC AGG CTC AAC GAG GAA CTT CTT CCG GTC AGT GTT CAC A -3'	
GLOD5 F	5'- TCA AGG CTT GTG ATG TCC CTT GCA GGA AGG AAA GGA GAG G -3'	NM_001080489.3 192 bp 65°C
GLOD5 R	5'- CCT CTC CTT TCC TTC CTG CAA GGG ACA TCA CAA GCC TTG A -3'	
ARAP2 F	5'- CCA AGA AAG CTG GGC AAA GTG CCT CCT TCC AAA ACA CAC C -3'	NM_015230.4 227 bp 62°C
ARAP2 R	5'- GGT GTG TTT TGG AAG GAG GCA CTT TGC CCA GCT TTC TTG G -3'	

Tablo 3.10 (devam)

ADAMTS17 F	5'- ATT CAA GTG ACC AAG CTT GTC CTT GTG TAC ACA GAA ATC T -3'	NM_139057.4
ADAMTS17 R	5'- AGA TTT CTG TGT ACA CAA GGA CAA GCT TGG TCA CTT GAA T -3'	255bp 60°C
MARCHF2 F	5'- CGG AGT TTG CAG TGG AGA AAA GAT GGT GAA GAG GGC GAT G -3'	NM_001005415.2
MARCHF2 R	5'- CAT CGC CCT CTT CAC CAT CTT TTC TCC ACT GCA AAC TCC G -3'	234 bp 63°C
MYOF F	5'- TTG AGG GCC GAC AGT TAA GTA ACC CGG ATG CTG ATG ATC T -3'	NM_013451.4
MYOF R	5'- AGA TCA TCA GCA TCC GGG TTA CTT AAC TGT CGG CCC TCA A -3'	179 bp 59°C
TOM1L1 F	5'- ACA TCT GTC CCT ACT GCA CCG ATC CTC TCC TGC ATC TCC C -3'	NM_001321173.2
TOM1L1 R	5'- GGG AGA TGC AGG AGA GGA TCG GTG CAG TAG GGA CAG ATG T -3'	234 bp 63°C
WDR76 F	5'- TAC AAC CCA AGA GAA CGG CAT CTT GCA GCA GAC TCA GAC A -3'	NM_001167941.2
WDR76 R	5'- TGT CTG AGT CTG CTG CAA GAT GCC GTT CTC TTG GGT TGT A -3'	197 bp 61°C
CA9 F	5'- TGC CCA GTG AAG AGG ATT CAT CCA TAG CGC CAA TGA CTC T -3'	NM_001216.3
CA9 R	5'- AGA GTC ATT GGC GCT ATG GAT GAA TCC TCT TCA CTG GGC A -3'	239 bp 63°C
Hβ2M F	5'- TTT CTG GCC TGG AGG CTA TCC ATG TCT CCA TCC CAC TTA ACT -3'	NG_012920.2
Hβ2M R	5'- AGT TAA GTG GGA TGG AGA CAT GGA TAG CCT CCA GGC CAG AAA -3'	375 bp 60°C

Tablo 3.11: RT-PZR için gerekli kimyasal solüsyonları

Reaksiyona Katılan Bileşenler	Miktar
Master Mix	6.25 µl
Primer Forward	0.5 µl
Primer Reverse	0.5 µl
cDNA	1 µl
dH ₂ O	4.25 µl
Son hacim	12.5 µl

Tablo 3.12: RT-PZR koşulları

Segment	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
Ön İnkübasyon	1	95°C	10 dk
Amplifikasyon	40	95°C 55°C 72°C	30 sn 30 sn 30 sn
Erime Eğrisi	1	95°C 65°C	5 sn 1 dk
Soğuma	1	40°C	30 sn

$$C_{\text{tinsan-}\beta\text{-2}} - C_{\text{törnek}} = \Delta C_{\text{t}} \quad \text{Hedef Ct değeri} = 2 - \Delta C_{\text{t}} \quad (3.3)$$

3.2.20 Kompetent Hücre Hazırlanması ve Etkinliğinin Belirlenmesi

Kompetent hücreleri hazırlamadan önce deney için gerekli solüsyon ve ekipmanlar steril edilmiştir. Kompetent hücre olarak *E. coli* suşlarından JM 109 kullanılmıştır. Öncelikle JM 109 gliserol stoktan antibiyotiksiz petriye tek koloni ekimi yapılarak 37°C’da bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün ekim yapılmış petriden tek koloni seçilerek 10 mL LB sıvı besiyerine ekim yapılmış bir gece 37°C’da çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra 1 Litrelik erlende 95 mL LB sıvı besiyeri ve ön kültürü yapılmış kolonilerdende 5 mL inoküle edilmiştir. Bu karışım 37°C’da çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılarak düzenli olarak absorbans ölçümleri (OD600) kontrol edilmeye başlanmıştır. Bakteri kültürünün absorbansı

OD600 0.5-0.6 arasına ulaştığında, kültür steril falkonlara paylaştırılarak 4°C’da 5.000 rpm’de 5 dk. santrifüj yapılmıştır. Ardından süpernatant uzaklaştırılarak pellet 25 mL 0.1 M CaCl₂ eklenmiş ve yavaşça pipetaj yapılmıştır. 45 dk. boyunca buz üzerinde bekletilen hücre süspansiyonu 4°C’da 5.000 rpm’de 5 dk. santrifüj yapılmış, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet 10 mL 0,1 M CaCl₂ çözeltisi ile tekrar yavaşça çözülmüş, ardından 2-4 saat arası buzda bekletilmiştir. Elde edilen bakteri süspansiyonu 10 mL %40’lık soğuk gliserol eklenerek karıştırılmış ve ardından karışım 200µl lik alikotlar halinde eppendorf tüplere aktararak -80°C’da saklanmıştır.

Kompetent hücrelerin etkinliğinin belirlenmesi için halkasal plazmitler kullanılmıştır. Buna göre 100 ng, 10 ng ve 0.1 ng konsantrasyonlarında transformasyon gerçekleştirilmiştir. Transformasyonun ardından seçici antibiyotik içeren petrielerde koloni sayımı yapılmıştır. Transformasyon etkinliği olarak 95-100 cfu/µg olan kompetent hücreler deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere tercih edilmiştir. Aşağıdaki formül (3.4) kullanılarak kompetent hücre etkinliği hesaplanmıştır.

$$\left[\frac{\text{Koloni sayısı (cfu)}}{\text{DNA konsantrasyonu}} \right] \times 1000 / \mu\text{g} \quad (3.4)$$

3.2.21 Transformasyon

Kalsiyum klorür yöntemiyle kompetent haline getirilmiş *E.coli* kompetent hücre kaynağı JM 109 hücreleri -80°C’den alınak buz üstünde 10 dk bekletilmiştir. Ardından ligasyon ürünü veya halkasal DNA kompetent hücreye 1-10 µl arasında eklenmiştir. 40 dk buz üstünde bekleyen karışım 42°C’deki su banyosunda 2 dk ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Daha sonra 2 dk daha buz üzerinde bekletilen karışıma 800 µl LB besiyeri eklenmiş ve 3 saat boyunca 37 °C’deki çalkalama etüvünde inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 5000 rpm’de 5 dk santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet 50 µl LB besiyeri ile çözülerek ampisilinli petriye ekim yapıp bir gece 37°C’deki inkübatöre konulmuştur. Ertesi gün tek koloniden LB besiyerine ekim yapılarak gliserol stok yapılmıştır. Ayrıca restriksiyon enzimleri kullanılarak rekombinant olup olmadığı kontrol edilmiştir.

3.2.22 Gen İfadesi Susturma

Gen ifadesini susturmada shRNA’nın viral vektörler aracılığıyla memeli hücrelerine aktarımı, shRNA’nın stabil entegrasyonuna ve hedeflenen genin uzun süreli baskılanmasına

tasarlanırken ATG'nin en az 25 baz çifti olmasına dikkat edilmiştir. Primer tasarımı yapılırken AAN19 paterni kullanılmış ve shRNA'nın GC içeriğinin %36-52 arasında olması gerekmektedir. shRNA primerleri intronları hedefleyerek 15 ve 19 pozisyonlarında en az bir adenin (A) nükleotidi olmasının yanı sıra timin (T) nükleotid tekrarlarından kaçınılmıştır. ATOH 8 için kullanılan sh oligo'ların detayları aşağıda verilmiştir.

SH1

Forward oligo: 5' CCGG— AGTTCCTACTCGTCAATTTTT—CTCGAG—
AAAAATTGACGAGTAGGAACT—TTTTTG 3'

Reverse oligo: 5' AATTCAAAAA— AGTTCCTACTCGTCAATTTTT—CTCGAG—
AAAAATTGACGAGTAGGAACT

SH2

Forward oligo: 5' CCGG— CGTCAATTCACACGTAATTT —CTCGAG—
AAATTACGTGTGAAATTGACG—TTTTTG 3'

Reverse oligo: 5' AATTCAAAAA—CGTCAATTCACACGTAATTT —CTCGAG—
AAATTACGTGTGAAATTGACG 3'

3.2.24 shRNA Primerlerin Bağlanması

shRNA tasarımı yapılmış oligoların ileri ve geri primerleri 95°C'da 4 dk, 75°C'da 4 dk inkübe edilerek, oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Bağlama reaksiyonu Tablo 3.13'de belirtilen koşullarda hazırlanmıştır.

Tablo 3.13: shRNA bağlama reaksiyonu

Reaksiyona Katılan Bileşenler	Miktar
shRNA ileri primer (20pmol)	5 µl
shRNA geri primer (20pmol)	5 µl
10X NEB Tampon 2	5 µl
dH ₂ O	20 µl
Son hacim	35 µl

3.2.25 pLKO.1-TRC Vektörünün Kesilmesi

Tasarlanan sh ileri ve geri primerleri birbirlerine bağlandıktan sonra, klonlama yapılacak olan pLKO.1-TRC vektör EcoRI ve AgeI enzimleriyle 37°C’de 2 saat kesilerek lineer hale getirilmiştir. Ardından kesim ürünleri %2’lik agaroz jelde yürütülmüştür. Jelde 7 kb ve 1.9 kb olan 2 bant görüntülenmiştir. Bu bantlardan büyük olan 7 kb’lik bant jelden geri kazanılmıştır. pLKO.1-TRC vektörünün kesim reaksiyonu Tablo 3.14’de verilmiştir.

Tablo 3.14: pLKO.1-TRC vektörünün kesim reaksiyonu

Reaksiyon Katılan Bileşenler	Miktar
pLKO.1 TRC vektörü	2 µg
10X CutSmart Tampon	5 µl
EcoRI Enzim	1 µl
AgeI Enzim	1 µl
dH ₂ O	40.5 µl
Son hacim	50 µl

3.2.26 pLKO.1-TRC Vektörün ve shRNA Oligolarının Ligasyonu

shRNA oligolarının bağlanma reaksiyonu gerçekleştikten sonra pLKO.1-TRC vektörünün EcoRI ve AgeI restriksiyon enzimleri kullanılarak gerçekleştirilen kesim reaksiyonundan sonra vektörün kesildiği kontrol edilmiştir. Ardından kesilerek lineer forma getirilmiş pLKO.1-TRC vektörü bağlanma reaksiyonu sonucunda elde edilen sh oligoları kullanılarak ligasyon aşamasına geçilmiştir. Ligasyon reaksiyonu Tablo 3.15’de aşağıdaki gibi kurulmuştur. Ligasyon reaksiyonunda kesimi yapılmış pLKO.1-TRC vektöründen 2 µg, sh bağlanmış oligolardan 2 µl, T4 DNA ligaz tamponundan 2 µl ve T4 DNA ligaz enziminde 1 µl eklenerek oluşturulan ligasyon reaksiyonu 16°C’de 16 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ligasyon ürünlerinin JM109 kompetent hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Kullanılan pLKO.1-TRC vektörü ampisiline dirençli olduğundan ampisilinli petriler kullanılmıştır.

Tablo 3.15: pLKO.1-TRC Vektörün shRNA oligolarla ligasyonu

Reaksiyon Katılan Bileşenler	Miktar
Lineer pLKO.1 TRC vektörü (EcoRI ve AgeI enzimi ile kesilmiş)	2 µg
sh Bağlanma ürünü	2 µl
T4 DNA Ligaz Tamponu	2 µl
T4 DNA Ligaz Enzimi	1 µl
dH ₂ O (Son hacime tamamlanır)	20 µl

3.2.27 Rekombinant pLKO.1-TRC Vektörünün Belirlenmesi

Transformasyon sonrasında petride üreyen koloniler LB Broth besiyerine ekim yapılarak bir gece çalkalayıcılı etüvede 37°C’da 110 rpm’de bekletilmiştir. Ardından plazmit DNA izolasyon kiti (Catalog Number:K0503, Thermo Scientific) kullanılarak plazmit DNA izole edilmiştir. Daha sonra rekombinant kolonilerin tespit etmek için EcoRI ve NcoI restiriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Buna göre kesim reaksiyonu Tablo 3.16’de belirtilen şekilde kurulmuştur. EcoRI ve NcoI restiriksiyon enzimlerinden 1 µl, 10X Cut smart tampondan 2 µl, ATOH 8 plazmit DNA’sından 1 µg alınarak reaksiyon oluşturulmuştur. Oluşan karışım 37°C’de 2 saat inkübe edilmiştir. Reaksiyon sonunda kesim ürünleri agaroz jelde görüntülenmiştir.

Tablo 3.16: Rekombinant koloni tespiti için kesim reaksiyonu şartları

Reaksiyona Katılan Bileşenler	Miktar
Koloni plazmit DNA’sı	1 µg
10X Cut Smart Tampon	2 µl
EcoRI Enzim	1 µl
NcoI Enzim	1 µl
Son hacim dH ₂ O tamamlanır	20 µl

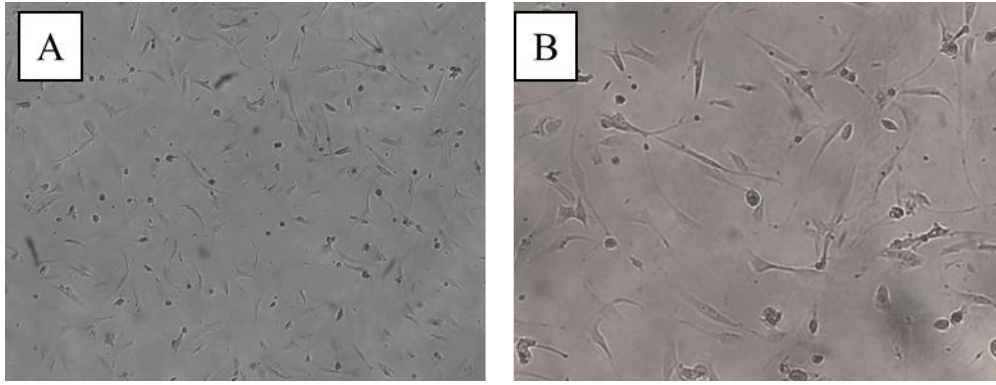
3.2.28 İstatiksel Analiz

İstatistiksel analizler Orijin Pro 8SR0 (v.0724, OriginLab Corporation, MA, USA) programı kullanılarak yapılmıştır. Tüm değişkenlerin \pm standart hatalarını belirlemek için Microsoft Office Professional Plus 2020 Excel programı kullanılmıştır. İstatistiksel farklılıklar ANOVA (one-way analysis of variance) Tukey test ile belirlenmiştir. $p \leq 0,05$ durumunda farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 iAMKH'lerin Kùltürü

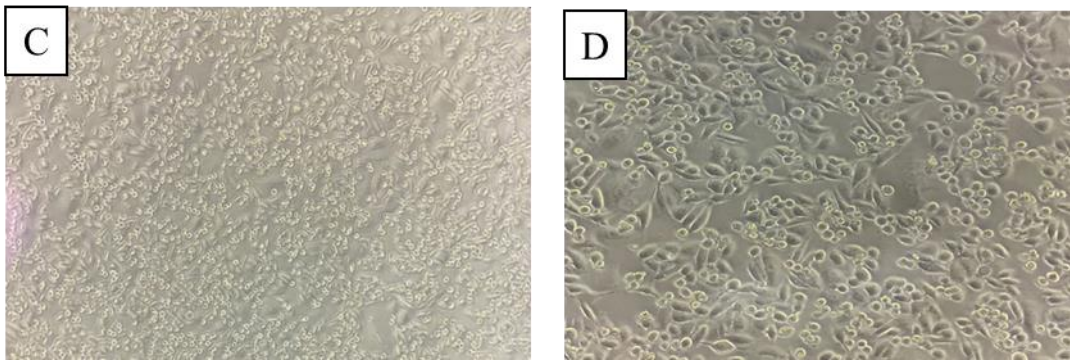
Ticari olarak satın alınan iAMKH'ler pasaj dörde kadar çoğaltılmıştır. Hücrelerin morfolojileri faz kontrast mikroskobu altında gözlemlenmiştir (Şekil 4.1). Hücreler yeterli bolluğa ulaştıktan sonra eksozom izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Yeterli sayıda elde edilen hücrelerin kalanı dondurulmuştur. Hücrelerin morfolojileri MKH karakterine uygun özellikte görülmüştür.



Şekil 4.1: iAMKH'lerin faz kontrast mikroskobik görüntüsü (A) X4, (B) X10

4.2 SW-480 hücrelerin Kùltürü

-80'den alınan SW-480 hücreleri pasaj altıya kadar çoğaltılmıştır. Hücrelerin morfolojileri faz kontrast mikroskobu altında gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: SW-480'lerin faz kontrast mikroskobik görüntüsü (C) X10, (D) X20

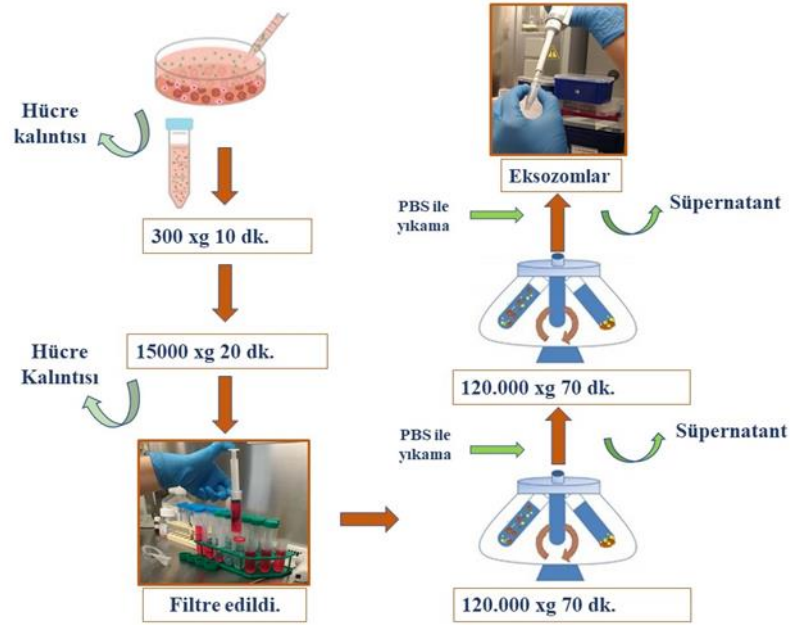
4.3 Hücrelerin Serumsuz Medyuma Alınması

Eksozom izolasyonu için büyütülen iAMKH'ler 72 saat serumsuz besiyerinde bekletilmiştir. Serumsuz besiyeri albümin, çeşitli proteinler ve metabolit kontaminasyonunu en aza

indirmek için kullanılır. Hücreler serumsuz besiyerinde 72 saat bekletildikten sonra mikroskop altında yoğunlukları ve canlılıklarının kontrol edilmiştir. Ardından hücre medyumları toplanmıştır.

4.4 Ultrasantrifüj Metodu ile Eksozom İzolasyonu

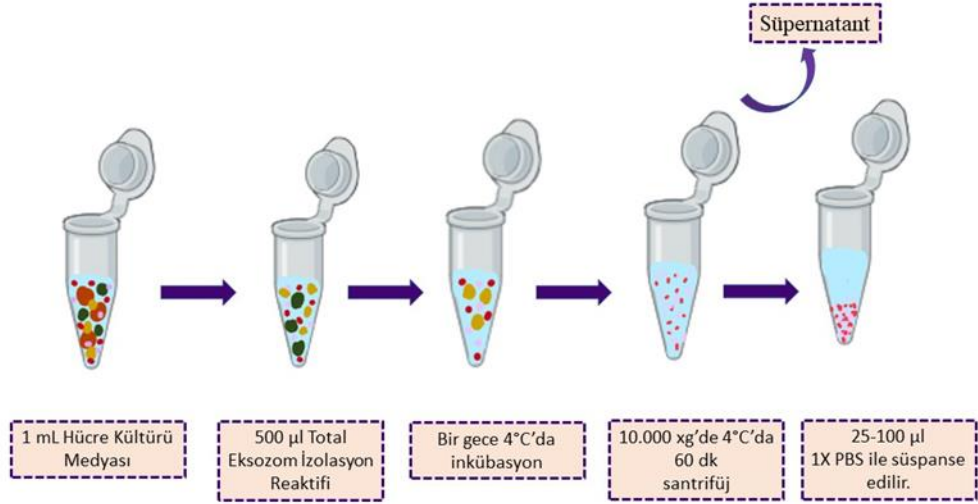
iAMKH'ler 72 saat serumsuz besiyerinde bekletilmiştir. Sonrasında toplanan besiyerlerinin miktarı ve toplam hücre sayısı belirlenmiştir. iAMKH'ler için 11 adet T75 doku kültür kabından 132 ml besiyeri toplanmış ve 8.500.000 hücre sayısı elde edilmiştir. Ultrasantrifüj yöntemiyle eksozom izolasyon basamakları aşağıdaki şekilde gösterilmektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Ultrasantrifüj yöntemi ile eksozom izolasyonu

4.5 Total Eksozom İzolasyon Kit ile Eksozom İzolasyonu

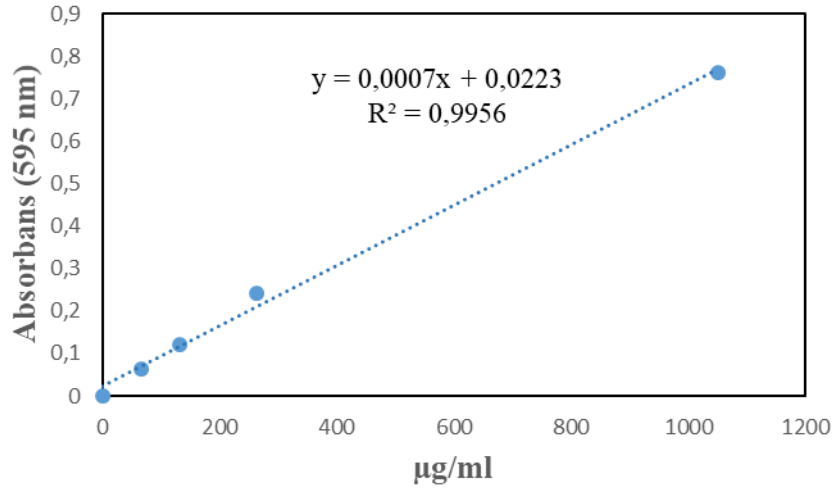
Satın alınan kit prosedürüne göre eksozom izolasyonu aşağıdaki Şekil 4.4'de gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.4: Total ekzozom izolasyon kit prosedürü

4.6 Bradford Analizi

Hazırlanan örnek ve standartlar 595 nm’de okutulduktan sonra standart grafikte bilinmeyen örneklerin miktarı tayin edilir (Şekil 4.5).

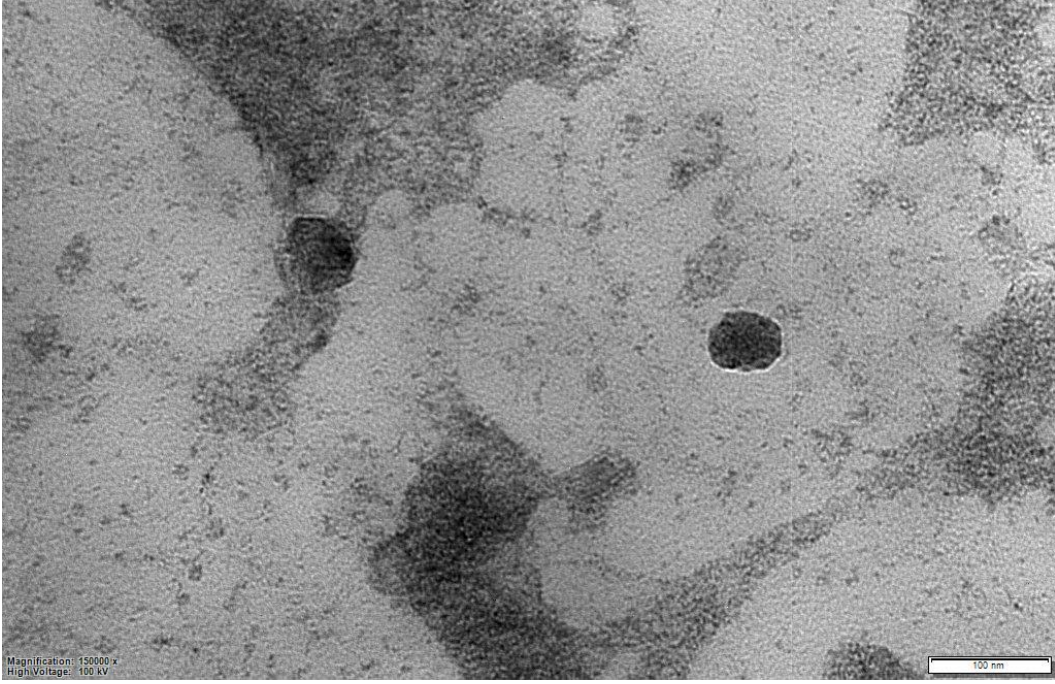


Şekil 4.5: Bradford analizi için standart BSA grafiği

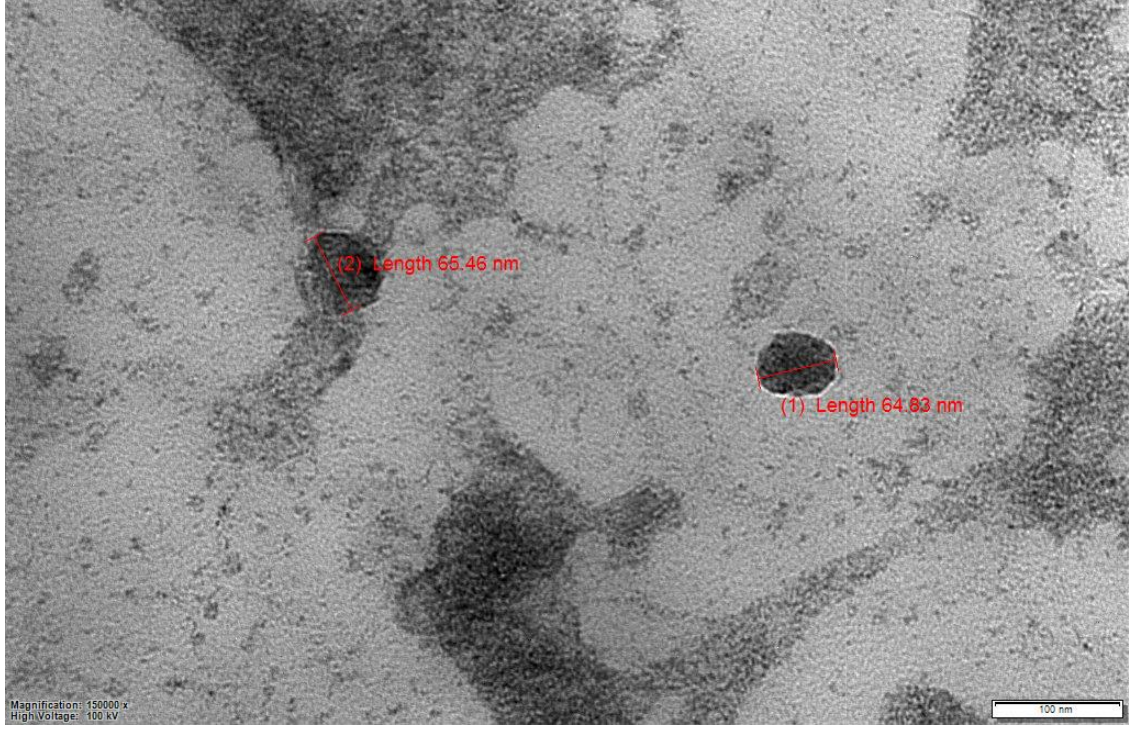
4.7 TEM Analizi

Kit yöntemi kullanılarak izolasyonları yapılan ekzozomların karakterizasyonu için TEM analizi gerçekleştirilmiştir. TEM analizi dört adımdan oluşmaktadır. Birinci adımda biyolojik örnek/dokulardan TEM için numune hazırlama çalışmaları yapılmıştır. İkinci adımda örneklerden ultramikrotomda tam ince kesit alma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

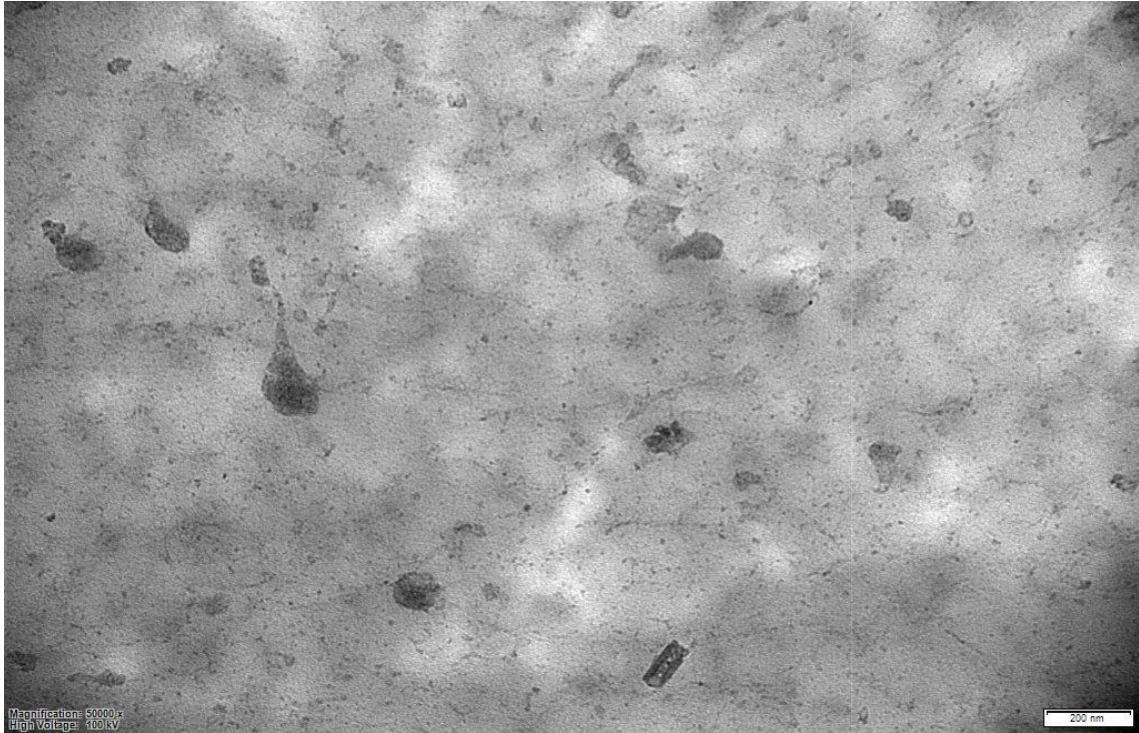
Üçüncü aşamada ultramikrotom kullanılarak yapılan kesit almadan sonra örneklere tam ince kesit boyama (uranil asetat / kurşun sitrat ile) yapılmıştır. Dördüncü adımda ise TEM mikroskopunda inceleme ve görüntü alma (HR-TEM) ile çalışmalar tamamlanmıştır. TEM analizi gerçekleştirilen çalışmada iAMKH-ekso'ların morfolojisinin ve vezikül çapının ölçülmesi sağlanmıştır. Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de iAMKH-ekso'ların 100 KV, 150000 kat büyütme oranı küre şeklinde yapılar gösterilmiş, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da iAMKH-ekso'ların 100 KV, 50000 kat büyütme oranı küre şeklinde yapılar gösterilmiştir.



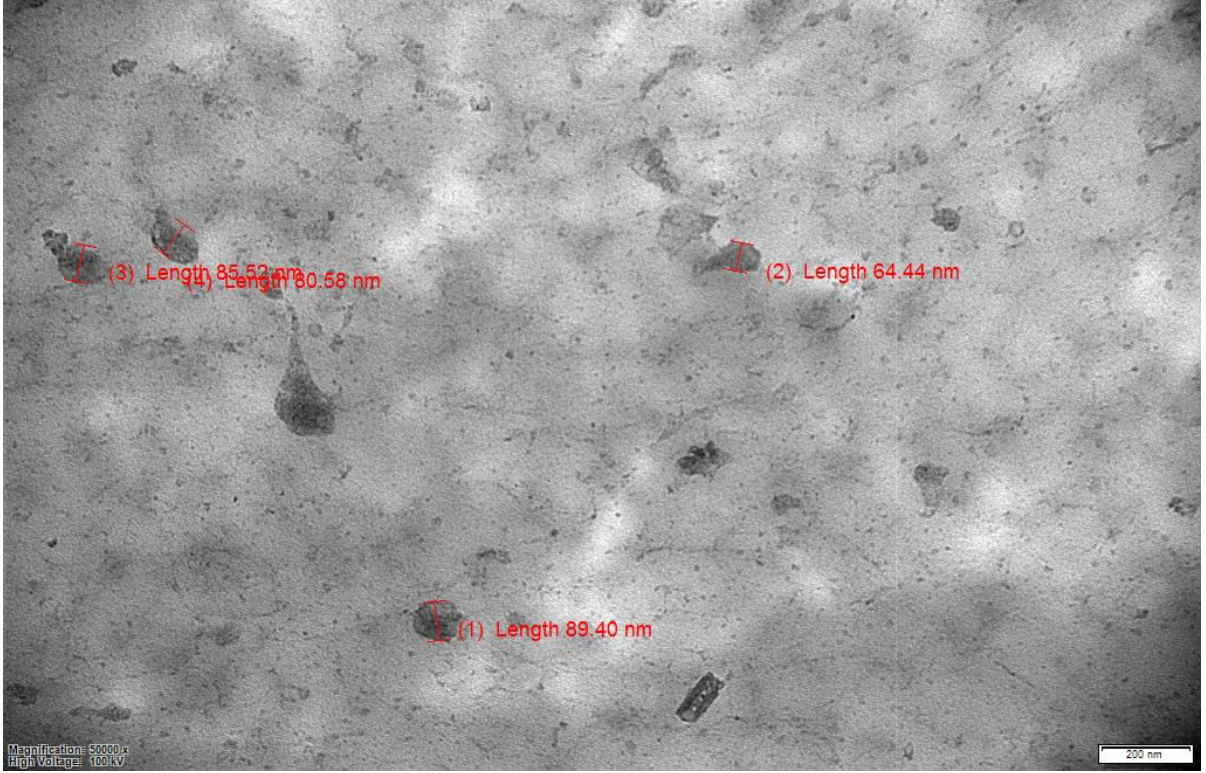
Şekil 4.6: iAMKH'lerden izole edilmiş eksozomların TEM görüntüsü (150000 X,100 KV)



Şekil 4.7: iAMKH'lerden izole edilmiş eksozomların TEM görüntüsü ve çap uzunlukları (150000 X,100 KV)



Şekil 4.8: iAMKH'lerden izole edilmiş eksozomların TEM görüntüsü (50000 X,100 KV)

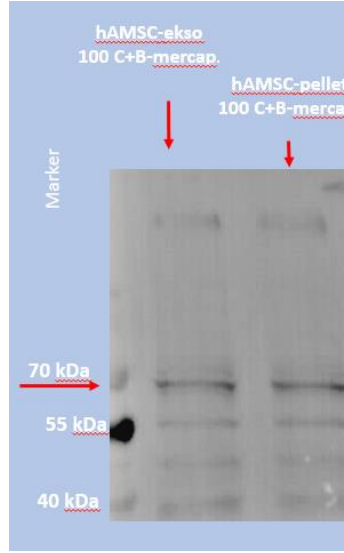


Şekil 4.9: iAMKH'lerden izole edilmiş eksozomların TEM görüntüsü ve çap uzunlukları (50000 X,100 KV)

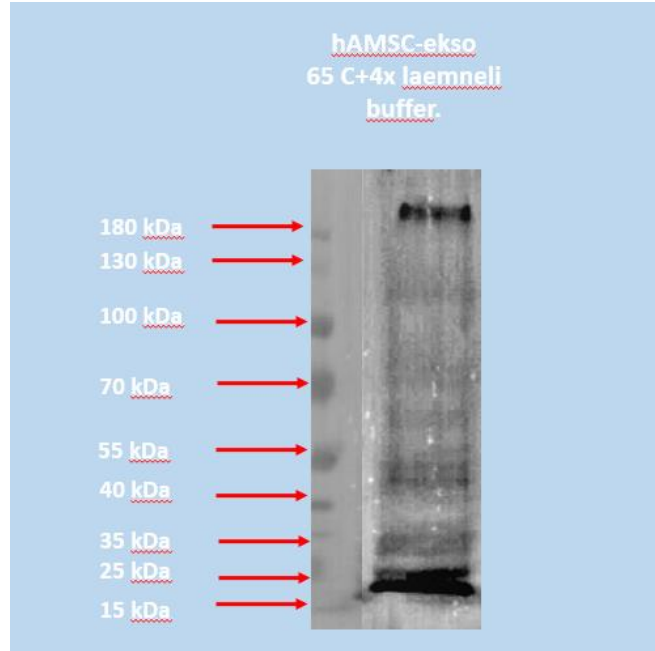
Kit metoduyla izole iAMKH-ekso'ların TEM analizi yapılarak elde edilen görüntülerde yuvarlak şekilli küre benzeri yapılar olarak görüntülenmiştir. Ayrıca çap uzunlukları 150000 büyütmede eksozomların 65.46 nm ve 64.83 nm olarak hesaplanmış; 50000 büyütmede eksozomların çap uzunlukları 89.40, 85.52, 80.58 ve 64.44 nm olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan çap uzunlukları eksozomlar için literatürde belirlenen boyut aralığında olduğu tespit edilmiştir.

4.8 Western Blot

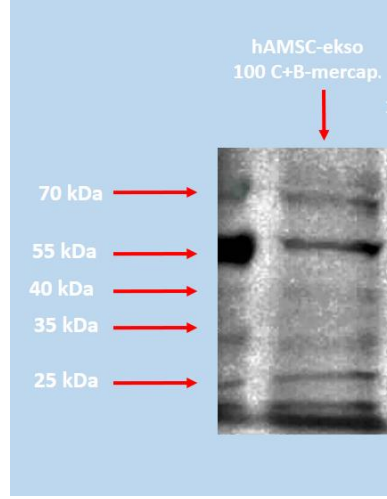
İnsan adipoz mezenkimal kök hücrelerden izole edilen eksozomlarda HSP70, CD63, CD81 ve CD9 proteinlerinin western blot analiz sonuçları Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13' de verilmiştir.



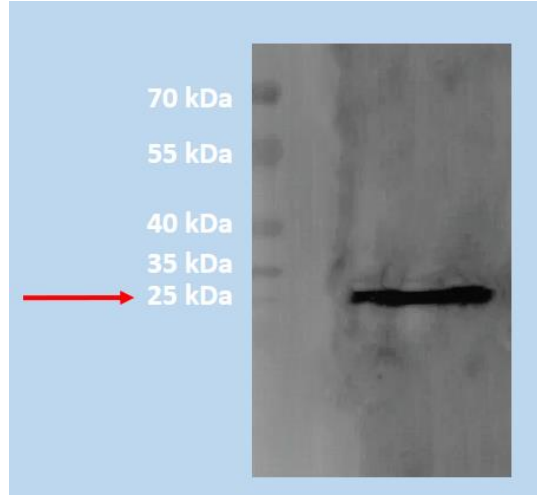
Şekil 4.10: HSP70 proteinin Western Blot analizi



Şekil 4.11: CD 63 proteinin Western Blot analizi



Şekil 4.12: CD 81 proteinin Western Blot analizi



Şekil 4.13: CD 9 proteinin Western Blot analizi

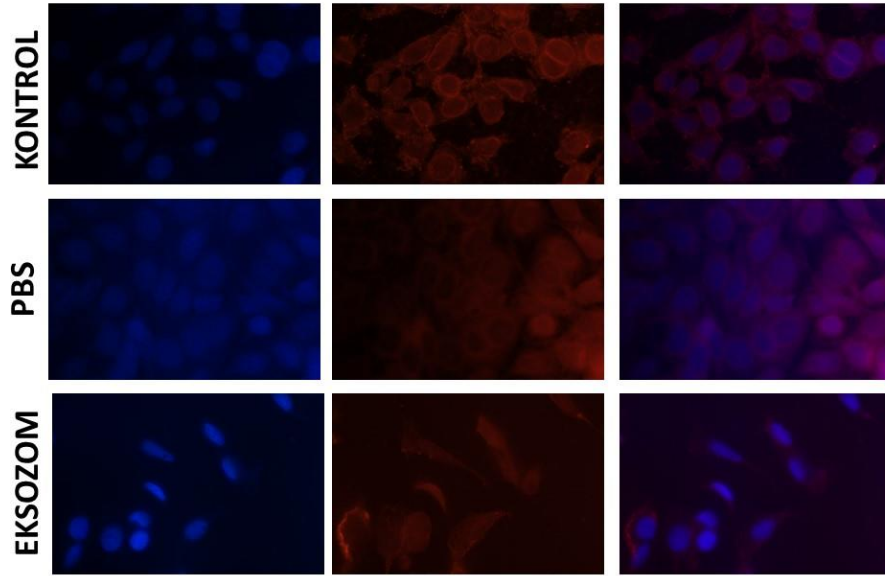
İnsan adipoz mezenkimal kök hücrelerden izole edilen eksozomlarda karakterizasyon için yapılan Western Blot analiz çalışmaları için öncelikle izole edilen eksozomların protein miktarının belirlenmesi için eksozomlar Ripa solüsyonunda çözülmüştür. Ardından protein miktarının belirlenmesi için Bradford analizi gerçekleştirilmiştir. Bradford analizi ile protein miktarları Bölüm 4.6’de anlatılan standart kalibrasyon grafiği kullanarak belirlenmiştir. Buna göre hesaplanan proteinler Western Blot için hazırlanan %10’luk SDS PAGE jelinde Bölüm 3.2.6’de belirtildiği gibi yapılmıştır. Ardından miktarı belirlenmiş olan proteinlerden en düşük konsantrasyon göz önüne alınarak 5-10 µg protein konsantrasyonu belirlenmiş her bir kuyucuğa örnekler eşit miktarda yüklenmiştir. 20 µl kuyucuk hacmi upper solüsyonu ile tamamlanmıştır. Örneklerin denatürasyonu için %10 β-merkaptotanol içeren 4X Laemlli solüsyonundan 5µl eklenmiş ve 95°C’de 5 dk inkübasyon yapılmıştır. Denatüre edilen örnekler kuyucuklara 20 µl yüklenmiştir. Protein marker olarak Thermo Scientific™

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Catalog No.PI26619, ThermoScientific) kullanılmış ve jel 90 V'da 3 saat yürütülmüştür. Süre sonunda PVDF membrana transfer aşamasına geçilmiştir. Transfer aşaması Bölüm 3.2.6'da gibi gerçekleştirilmiştir. Proteinler bir gece boyunca membrana transfer edildikten sonra antikorlama aşamasına geçilmiştir. Antikor aşamasından önce membranda spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla membran bloklama solüsyonu ile 2 saat çalkalamalı karıştırıcıda inkübe edilmiştir. Ardından immüno blotlama için primer antikor aşamasına geçilmiştir. Primer antikorlama işlemi Bölüm 3.2.6'da anlatılan antikor oranları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre 70 kDa bant veren HSP70 (1:1000), 30-60 kDa bant veren CD 63 (1:1000), 25 kDa bant veren (CD 81 1:1000) ve 25 kDa bant veren (CD 9 1:500) oranlarında %5 (w/v) BSA ve %0.1(v/v) Tween20 içeren 1X TBS içinde hazırlanmıştır. Ardından yıkamalar yapılmış, sekonder antikor horseradish peroxidase-conjugated, anti-rabbitIgG, anti-mouseIgG ya da anti-goatIgG, (1:2000-1:10,000) oranlarında kullanılarak gerçekleştirilmiştir. En son aşamada bantlar ECL solüsyonu ile görüntülenmiştir. Elde edilen görüntüler Şekil 4.10, 4.11,4.12, 4.13' de gösterilmiştir. Bantların yeri ticari olarak satın alınmış antikorlama protokolüne uygun yerlerde bant verdiği gösterilmiştir. İzolasyonu yapılan eksozomların TEM ve Western blot analizi ile karakterize edilmesine ek olarak immünofloresan analizi gerçekleştirilmiştir.

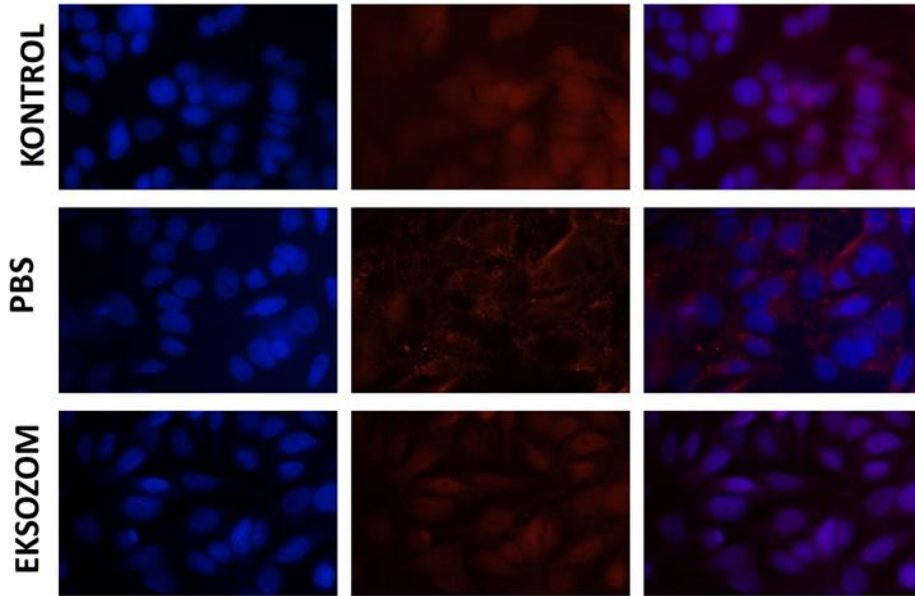
4.9 İmmünofloresan Analizi

İnsan adipoz mezenkimal kök hücrelerinden salınan eksozomların karakterizasyonu için yapılan TEM ve Western blot analizine ek olarak immünofloresan analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için Bölüm 3.2.7'de anlatılan protokol takip edilmiştir. 24 kuyucuklu plakalara yerleştirilen chamber slide üzerine her bir kuyucuğa 250.000 hücre olacak şekilde SW-480 hücreleri ekilmiştir. Hücreler bir gece inkübasyona bırakıldıktan sonra eksozom, PBS uygulaması yapılan grup ve kontrol grubu olarak uygulamalar yapılmıştır. 48 saat bekleme süresinin ardından Bölüm 3.2.7'de anlatılan hücre fiksasyonu aşamasına geçilmiştir. Ardından spesifik olmayan bağlantıları engellemek amacıyla %0,1 Twen-20 %1 BSA içeren PBS içinde bloklama aşaması gerçekleştirilmiştir. Daha sonra yıkama yapılan hücrelerde CD 81 ve CD63 için primer antikor (5 µg/ml) uygulaması yapılarakbir gece nem çemberi içerisinde inkübasyona alınmıştır. Ertesi gün PBS ile yıkamalar yapıp sekonder antikor (2 µg/ml) uygulanmıştır. Sekonder antikor uygulamasından sonra yıkamalar yapıp chamber slide DAPI (1/10.000) boyası ile muamele edilmiştir. Bu işlemin ardından anti fade mounting medyum ile hücreler arada kalacak şekilde kapatılıp görüntüler florasan

mikroskopunda alınmıştır. Kontrol, PBS ve eksozom gruplarına ait elde edilen görüntüler Şekil 4.14 ve Şekil 4.15’de gösterilerek eksozom uygulaması yapılmış olan grubun kontrol ve PBS grubuna göre daha yoğun floresan ışması yaptığı belirlenmiştir.



Şekil 4.14: SW-480 hücre hattında DAPI ve CD 81 immüofloresan boyaması



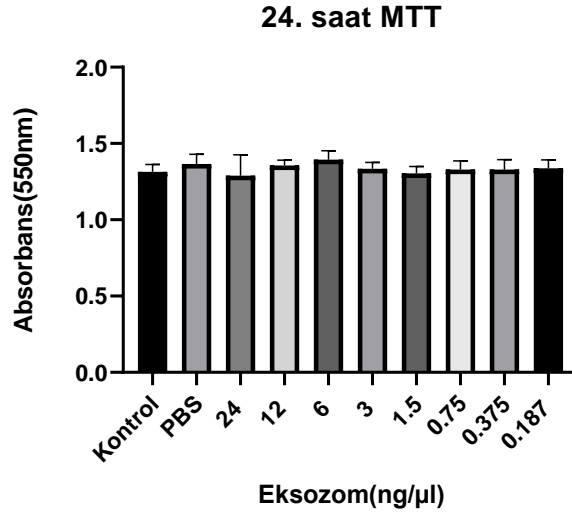
Şekil 4.15: SW-480 hücre hattında DAPI ve CD 63 immüofloresan boyaması

4.10 iAMKH Kaynaklı Eksozomların Kolon Kanseri Hücreleri Üzerinde Canlılık

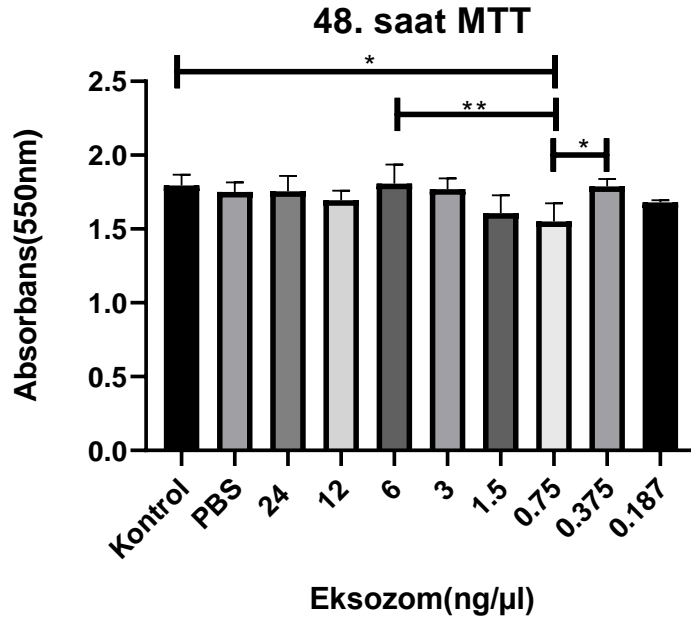
Seviyelerinin Belirlenmesi

iAMKH'ler yeterli bolluğa ulaştıktan sonra eksozom izolasyon aşamasına geçilmiştir. Eksozom izolasyonu için kit ve ultrasantrifüj yöntemleri kullanılmıştır. Hücre canlılığının belirlenmesi için gerçekleştirilecek MTT analizinde kullanılacak eksozomlar kit yöntemi tercih edilerek hücre kültürü medyumundan Bölüm 3.2.3.5'de ifade edilen kit izolasyon protokolü uygulanmıştır. Bu talimatlar takip edilerek yapılan izolasyon sonucunda elde edilen eksozomların protein miktarı Bradford metoduyla belirlenmiştir. İzolasyon sonrası gerçekleştirilen Bradford analizi, diğer deneysel çalışmalarda kullanılacak protein miktarı belirleme analizlerinde tercih edilmiştir. Bu bağlamda gerçekleştirilen Bölüm 3.2.4'de anlatılan Bradford analizi anlatıldığı gibi yapılmış olup, öncesinde eksozom örneklerimiz ripa solüsyonu ile muamele edilmiştir. Ardından gerçekleştirilen Bradford analizinde örneklerimizin protein miktarı standart kalibrasyon grafiği çizilmiş veriler kullanılarak hesaplanmıştır. Bradford tayini ile protein miktarı 24 µg/ml olarak hesaplanmıştır. SW-480 hücreleri 10.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96'lık doku kültürü plastiğine ekimi gerçekleştirilmiştir. Bir gece inkübasyona (%5 CO₂ ve %90 bağıl nem içeren 37 °C'da) bırakılan hücrelerin tutunması sağlanmıştır. Ertesi gün kontrol, PBS ve seyreltilen eksozom gruplarına 1µl uygulama yapılmıştır. Eksozom konsantrasyonu PBS kullanılarak 476.92, 238.46, 105.30, 33.69, 12, 6, 3, 1.5, 0.75, 0.375 ve 0.187 ng/µl olacak şekilde seyreltme işlemlerine tabi tutuldu. Seyreltme işlemi yapılan eksozom örnekleri SW-480 hücre hattına 24,48 ve 72 saat sürelerde uygulanmıştır. MTT test sonuçları 550 nm'de spektrofotometrik ölçüm alınarak değerlendirilmiştir. Aşağıdaki Şekil 4.16, 4.17, 4.18, 4.19, 4.20 ve 4.21'de MTT sonuçları gösterilmiştir. Elde edilen grafiklerde 12, 6, 3, 1.5, 0.75, 0.375 ve 0.187 ng/µl dozlar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada Şekil 4.16, 4.17 ve 4.18'de iAMKH-ekso'ların SW-480 hücrelerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Eksozomların hücreleri üzerindeki etkisi konsantrasyona ve süreye bağlı olarak korelasyon göstermiştir. Buna göre Şekil 4.19'de 48. saatte kontrol, PBS, 105.30 ng/µl ve 33.69 ng/µl eksozom uygulanmış deney grubunda sitotoksik etki gözlenmezken gruplar arası anlamlı bir fark bulunmamıştır. Şekil 4.20'de 48. Saatte kontrol, PBS ve 238.46 ng/µl eksozom uygulanmış gruplarda gerçekleştirilen MTT sonrası kontrol ve PBS grubunun birbiri arasında fark olmadığı ama eksozom uygulaması yapılan (238.46 ng/µl) grubun kontrol ve PBS grubuna göre anlamlı fark görüldüğü ve hücrelerin proliferasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Şekil 4.21'de MTT analizi 72. Saat sonucu gösterilmiştir. Buna göre eksozom uygulaması yapılmış 476.92 ng/µl grubun kontrol ve PBS grubuna göre oldukça sitotoksik etki

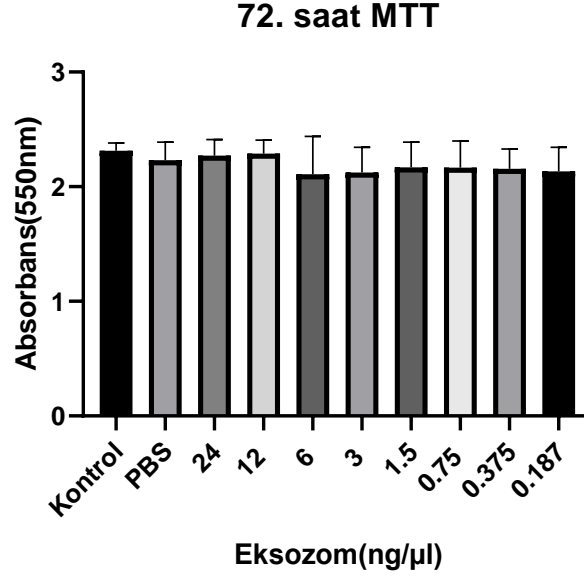
gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca eksozom uygulaması yapılan grubun kontrol ve PBS grubu ile arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur. Yapılan tüm MTT analizlerinde eksozom uygulamasının doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı farklılık göstermiştir.



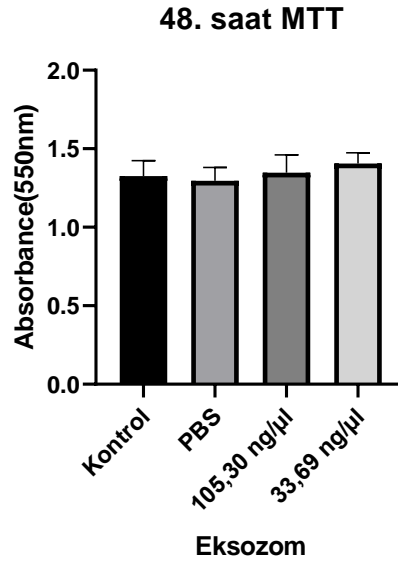
Şekil 4.16: iAMKH kaynaklı eksozomların SW-480 hücre hattı üzerindeki 24. saat MTT testi



Şekil 4.17: iAMKH kaynaklı eksozomların SW-480 hücre hattı üzerindeki 48. saat MTT testi

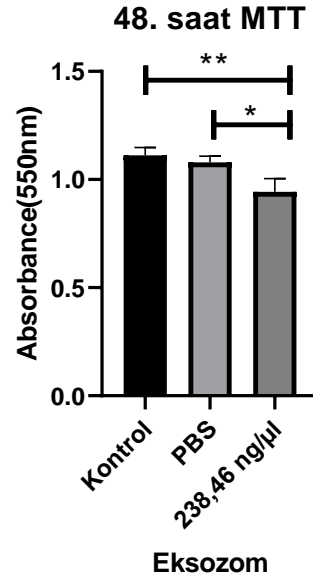


Şekil 4.18: iAMKH kaynaklı eksozomların SW-480 hücre hattı üzerindeki 72. saat MTT testi



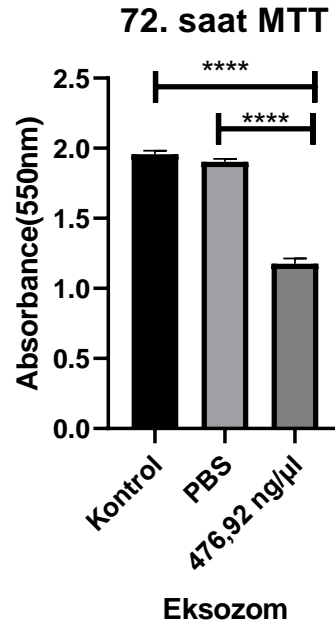
Şekil 4.19: iAMKH kaynaklı eksozomların SW-480 hücre hattı üzerindeki 48. saat MTT testi

48. Saat MTT sonuçlarında hücrelerin proliferasyonunda önemli bir değişim kontrol grubuna göre gözlenmemiştir. Eksozom konsantrasyonu 105,30 ng/μl ve konsantrasyon 33,69 ng/μl olarak uygulanmıştır.



Şekil 4.20: iAMKH kaynaklı eksozomların SW-480 hücre hattı üzerindeki 48. saat MTT testi

48. saat MTT sonuçlarında hücrelerin proliferasyonunda önemli bir değişim kontrol grubuna göre gözlenmiştir. Eksozom konsantrasyonu 238,46 ng/µl olarak uygulanmıştır.

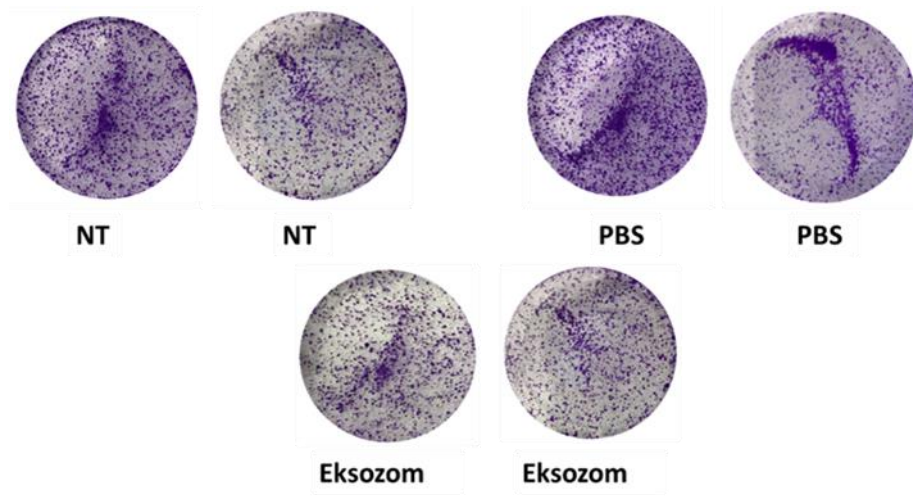


Şekil 4.21: iAMKH kaynaklı eksozomların SW-480 hücre hattı üzerindeki 72. saat MTT testi

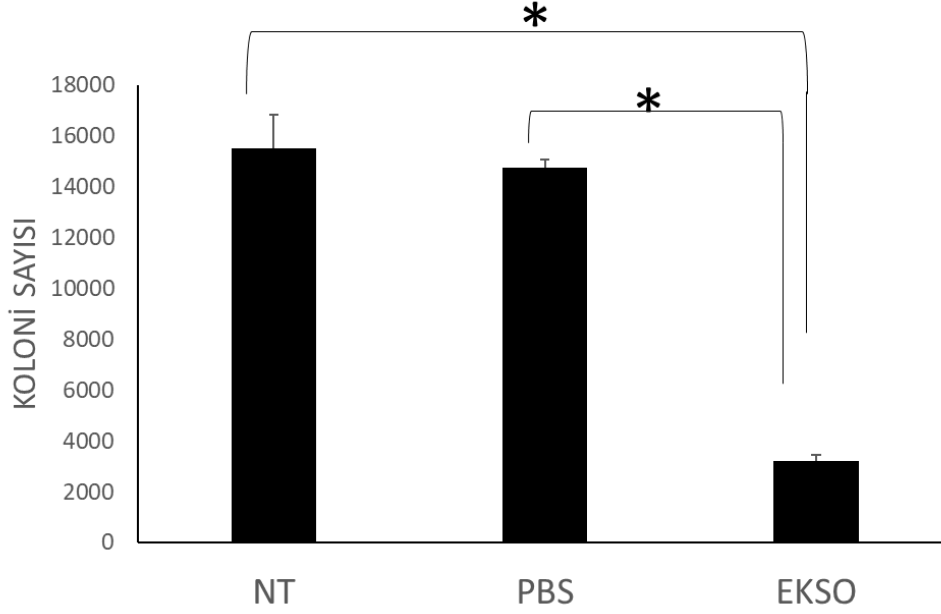
72. saat MTT sonuçlarında hücrelerin proliferasyonunda önemli bir değişim kontrol grubuna göre gözlenmiştir. Eksozom konsantrasyonu 476,92 ng/µl olarak uygulanmıştır.

4.11 Klonojenik Analiz

Eksozom karakterizasyonu yapıldıktan sonra SW-480 hücrelerinde eksozomların invazyon yeteneğinin belirlenmesi için koloni formasyon analizi Bölüm 3.2.9’da belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Koloni formasyon deneyinde kullanılan SW-480 hücreleri tripsin edta kullanılarak kaldırılmış ardından 1200 hücre 6 kuyucuklu doku kültürü flasklarına ekilmiştir. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmazken, PBS grubunda PBS uygulanmış ve eksozom grubunda da izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiş eksozomların uygulaması yapılmıştır. PBS ve eksozom uygulaması yapılan deney grupları ve kontrol grubu 10. gün sonunda kristal viyole ile boyanmıştır. Ardından koloniler fotoğraflanarak koloni sayımı gerçekleştirilmiştir. Koloni fotoğrafları Şekil 4.22’de kontrol, PBS ve eksozom uygulaması yapılan gruplar görüntülenmiştir. Koloni sayım analizi yapıldıktan sonra invazyon grafiği Şekil 4.23’de gösterilmiştir. Elde edilen grafikte eksozom uygulaması yapılan grubun PBS ve kontrol grubuna göre invazyon/koloni oluşturma kapasitesinin düşük olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.22: SW-480 hücre hattına koloni formasyon testi sonucu

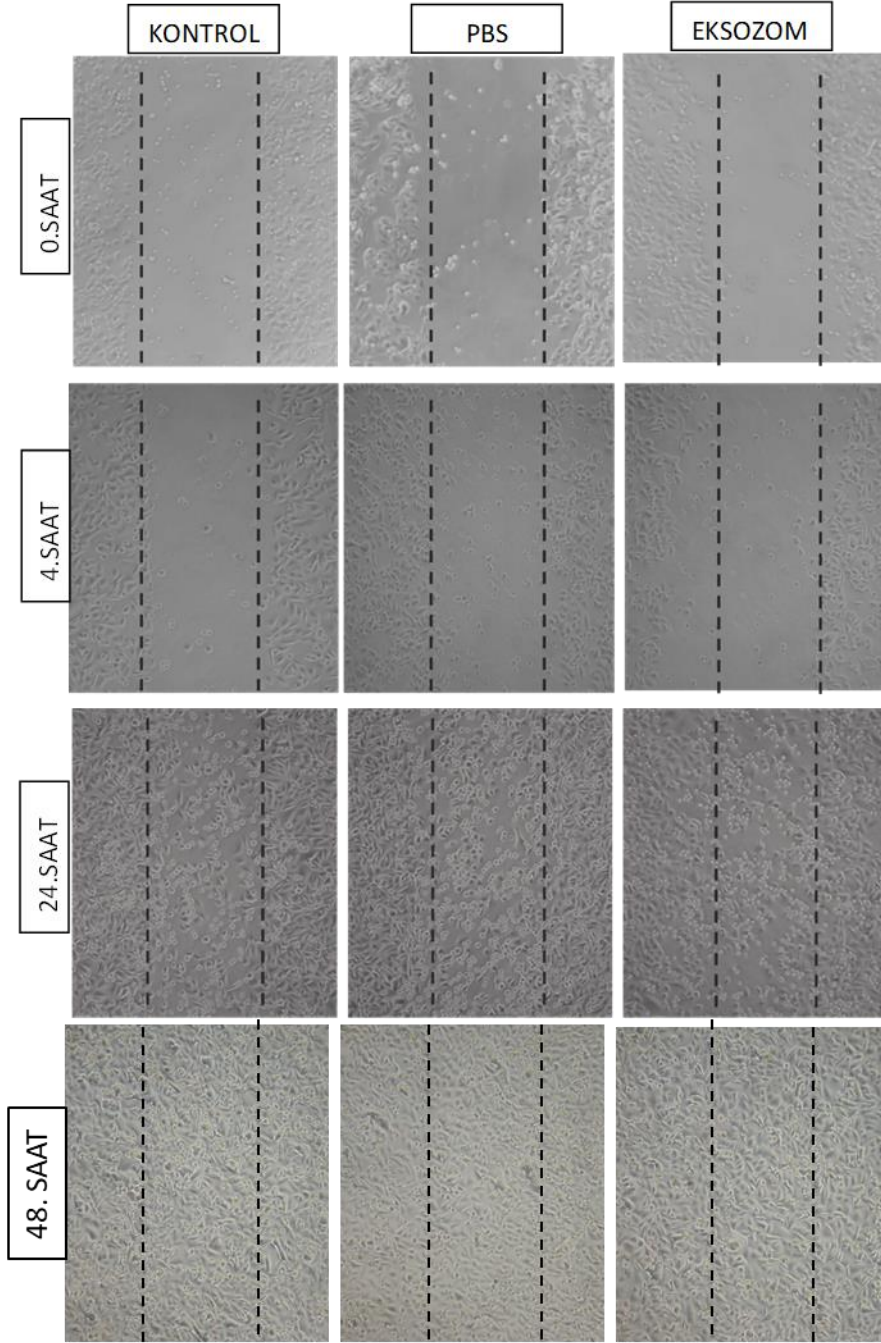


Şekil 4.23: SW-480 hücre hattına koloni formasyon analizi sonucu grafiği. 26,70 ng/μl konsantrasyonunda eksozom uygulaması ve 10. günde hücre koloni formasyonuna etkilerinin belirlenmesi

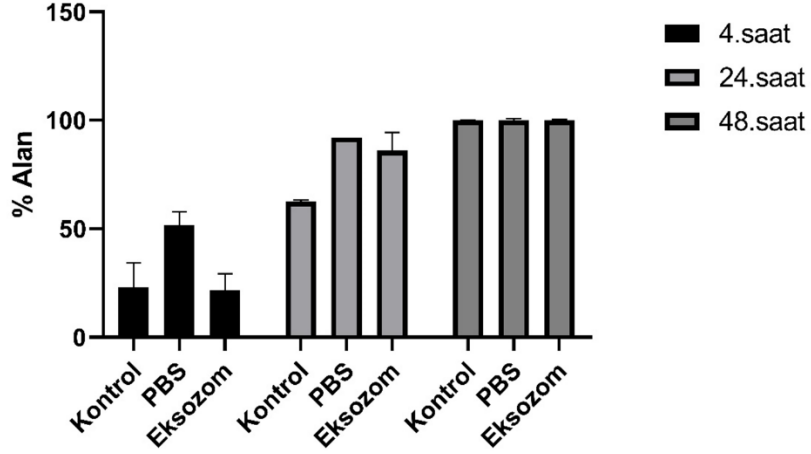
Koloni formasyon analizi tek bir hücrenin bir koloniye dönüşme yeteneğine dayanan bir *in vitro* hücre hayatta kalma testi olan koloni formasyon testi sonucunda eksozom uygulanan gruptaki koloni sayıları kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmuştur.

4.12 Hücre Migrasyon Analizi (Scratch Testi)

Eksozomların hücreler üzerinde koloni oluşturma kapasitesi değerlendirildikten sonra hücreler üzerindeki migrasyon kapasitesi de belirlenmiştir. Bu analizde SW-480 hücreleri sayılarak 6 kuyucuklu doku kültürü plastiğine her kuyucuğa 600.000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bu işlemin ardından hücrelerin tutunması için 37°C'da bir gece inkübatörde bekletilmiştir. Sürenin sonunda PBS ve eksozom uygulaması yapılmış ve hücrelerin bulunduğu doku kültürü plastiğine standart olacak şekilde artışeklinde çizik atılarak her bir deney grubu 0. saat olarak fotoğraflanmıştır. Ardından 4,24 ve 48. Saatlerde alınan görüntülerle hücrelerin migrasyon kapasitesi Şekil 4.24'de fotoğraflanmıştır. Ardından çizik arasının nasıl kapandığı Bölüm 3.2.10'da belirtilen formülle hesaplanarak hücrelerin migrasyon kapasitesi %göç olarak belirlenmiştir. Buna göre eksozom uygulaması yapılmış hücrelerde PBS ve kontrol gruplarına göre hücre migrasyonunun azaldığı Şekil 4.25'de tespit edilmiştir.



Şekil 4.24: SW-480 hücre hattında scratch analiz sonucu. 26,70 ng/µl konsantrasyonunda eksozom uygulaması ve 0. Saat, 4. Saat, 24. Saat ve 48.saatte hücre migrasyonunun belirlenmesi.



Şekil 4.25: SW-480 hücre hattında scratch analiz sonucu % olarak kapanan alanların grafiği.

iAMKH-ekso'ların SW-480 hücrelerinde hücre göçü ve hücre-hücre interaksiyonlarının belirlenmesinde kullanılan yara iyileşme (hücre migrasyon testi veya çizik testi) analizleri de gerçekleştirilmiştir. Eksozom uygulanan grup ile kontrol grupları ile karşılaştırıldığında 4, 24 ve 48 saat zaman aralığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişimler belirlenmiştir. Scratch analizinde 4. saatte kontrol grubu hücreleri %23 iken 24. saate %62'ye ulaşmıştır (**). 4. saatte PBS grubu hücreleri %53 iken 24. saate %90'ye ulaşmıştır (**). 4. saatte eksozom grubu hücreleri %25 iken 24. saate %85 'ye ulaşmıştır (****). Kontrolün 4. saati ile eksozom grubu 4. saati istatistiksel olarak anlamsız bulunurken kontrol 4. saat ve eksozom 24. saat istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur (****).

4.13 RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi

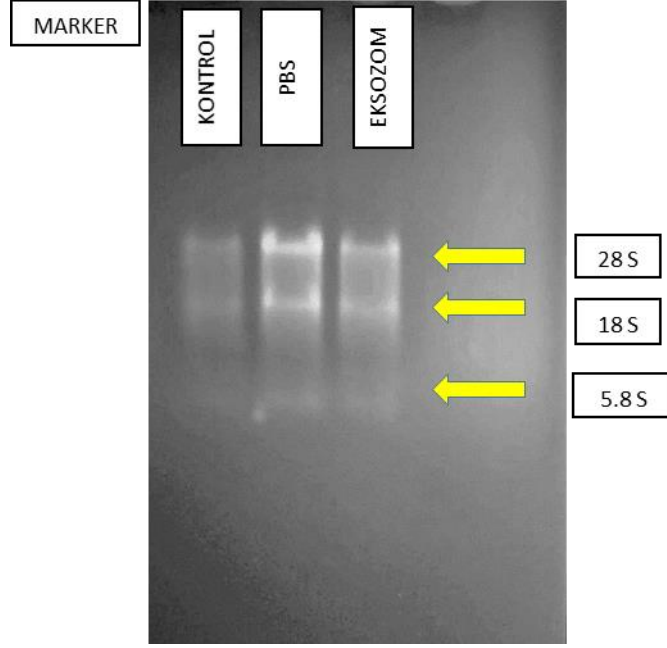
İnsan adipoz mezenkimal kök hücrelerden eksozom izolasyonu yapılmış, ardından protein miktarı belirlenerek Western blot, TEM ve immüno Floresan analizi gerçekleştirilerek karakterize edilmiştir. Ardından eksozomların SW-480 hücre hattı üzerinde hücre migrasyonu ve invazyon yeteneklerinin belirlenmesi için koloni formasyon ve scratch analizi yapılmıştır. Bunlara ek olarak eksozomların SW-480 hücrelerinde RNA sekans analizi yapılarak tüm transkriptomu oluşturan genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için SW-480 hücreleri tripsin-edta ile kaldırılıp 6 kuyucuklu plakalarda kuyucuk başına 600.000 hücre olacak şekilde sayılarak bir gece 37°C'da inkübe edilmiştir. Ardından kit yöntemiyle izolasyonu yapılmış eksozomların protein miktarının belirlenmesi için Ripa solüsyonu kullanılmış, Bölüm 3.2.4'de anlatılan

Bradford analizi takip edilerek protein miktarı belirlenmiştir. Daha sonra SW-480 hücrelerine eksozom (26,70 ng/μl) uygulaması yapılmıştır. Eksozom uygulaması yapılan gruba herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ve PBS uygulaması yapılmış PBS grubu da deneye dahil edilmiştir. Bu işlemin ardından hücreler 72 saat inkübatörde 37°C’da bekletilmiştir. Süre sonunda hücre kaldırma işlemi uygulanarak tripsin edta yardımıyla hücreler doku kültürü plastiğinden kaldırılarak RNA izolasyonuna hazır duruma getirilmiştir. RNA izolasyonu kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

SW-480 hücrelerinde gerçekleştirilen RNA izolasyonunda kontrol, PBS ve eksozom uygulaması yapılmış deney RNA miktarı mikropilaka okuyucusunda spektrofotometrik analiz ile belirlenmiştir. Elde edilen absorpsiyonlar Bölüm 3.2.12’de verilmiş olan formüle göre hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar kontrol grubu 386,11 ng/μl; PBS grubu 893,05 ng/μl ve eksozom uygulaması yapılmış deney grubu için 511 ng/μl olarak RNA miktarı belirlenmiştir.

4.14 RNA Jel Elektroforezi

İnsan adipoz mezenkimal kök hücrelerinden kit yöntemi kullanılarak izolasyonu yapılmış eksozomların SW-480 hücreleri üzerinde etkilerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen çalışmalarda SW-480 hücreleri kontrol, PBS ve eksozom deney grubu oluşturularak uygulamalar yapılmıştır. Buna göre kontrol grubuna uygulama yapılmazken, PBS grubuna PBS, eksozom grubuna 26,70 ng/μl eksozom uygulaması yapılarak 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 3.2.10’de verilen kit prosedürüne göre RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu sonucunda ölçülen absorpsiyon değerlerine göre RNA miktarı kantitatif olarak belirlenmiştir. Elde edilen RNA’ları denatüre edici bir jel üzerinde basitçe kontrol etmek ve büyüklüklerine göre ayırmak için RNA jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir. RNA jel görüntüsü Şekil 4.26’de gösterilmiştir. RNA kalitesi, saflığı ve alt birimleri olan 28 S, 18 S ve 5.8 S olan alt birimlere ayrıldığı gösterilmiştir. RNA kalitesi, saflığı ve alt birimleri belirlenen örnekler Bölüm 3.2.14’de anlatılan RNA sekans analizine gönderilmiştir.



Şekil 4.26: RNA jel elektroforezi

4.15 RNA Sekans Analizi

RNA sekans analizi için GEN ERA firmasından hizmet alımı yapılmıştır. Ayrıca elde edilen ham veri dataları usegalaxy.org programı kullanılarak biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla yeni nesil dizileme uygulaması Refgen Biyoteknoloji firmasından hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir. Okuma işlemi sonrasında, elde edilen verilerin kalite kontrolü amacıyla FASTQC aracı (Babraham Bioinformatics, USA, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk>) kullanılmıştır. Dizileme sürecinde, ham okuma verilerindeki düşük kalitedeki baz okumaları ve olası adaptör-indeks kontaminasyonlarının sonraki analiz basamaklarında sapmalara neden olmaması için, okumalardan kırılmıştır. Kalite değerlerine göre kırma işlemleri için Trimmomatic aracı (Bolger vd. 2014, <http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) kullanılmıştır. Kırma sonrası hizalama işleminde HISAT2 aracından (<https://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>) yararlanılmıştır. Bu uygulamada referans genom olarak homo sapiens referans genomu M25 (GRCm38.p6) kullanılmıştır. Hizalama sonrası anotasyonunda gen, ekzon ve transkript bilgileri için Ensembl veriseti kullanılmıştır. Hizalama sonrasında her bir transkript üzerindeki okuma sayıları hesaplanmış ve ardından toplam okuma sayısına göre normalize edilmiştir. Transkriptom elemanlarına yönelik okuma sayılarının belirlenmesinde Subread aracı (<http://subread.sourceforge.net>) kullanılmıştır. Gen başı okuma sayılarının

normalizasyonu ve filtrelenmesi için R:edgeR (Robinson, McCarthy, ve Smyth 2010) aracı; gruplar arası anlatımı değişen genleri (Differentially Expressed Genes) belirlemek için R::limma aracı (Ritchie vd. 2015) kullanılmıştır. Grup içi ve gruplar arası istatistiksel karşılaştırma çalışmaları, veri görselleştirme uygulamalarında R betikleri kullanılmıştır.

4.15.1 Örnek Grupları

Çalışma kapsamında 6 farklı numunenin transkriptom dizilemesi gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki Tablo 4.1’de, ilgili örneklerin adları, deney grupları, genom hizalama sonrası okuma sayıları paylaşılmıştır. Assigned genoma hizalanan ikili okumaların sayısını; Unassigned genoma hizalanmayan ikili okumaların sayısını; Multimapping birden fazla bölgeye hizalanan ikili okumaların sayısını, NoFeatures genom üzerinde transkriptom dışı elemanlara hizalanan ikili okumaların sayısını ve Ambiguity birden fazla transkriptom elemanına hizalanan ikili okumaların sayısını belirtmektedir.

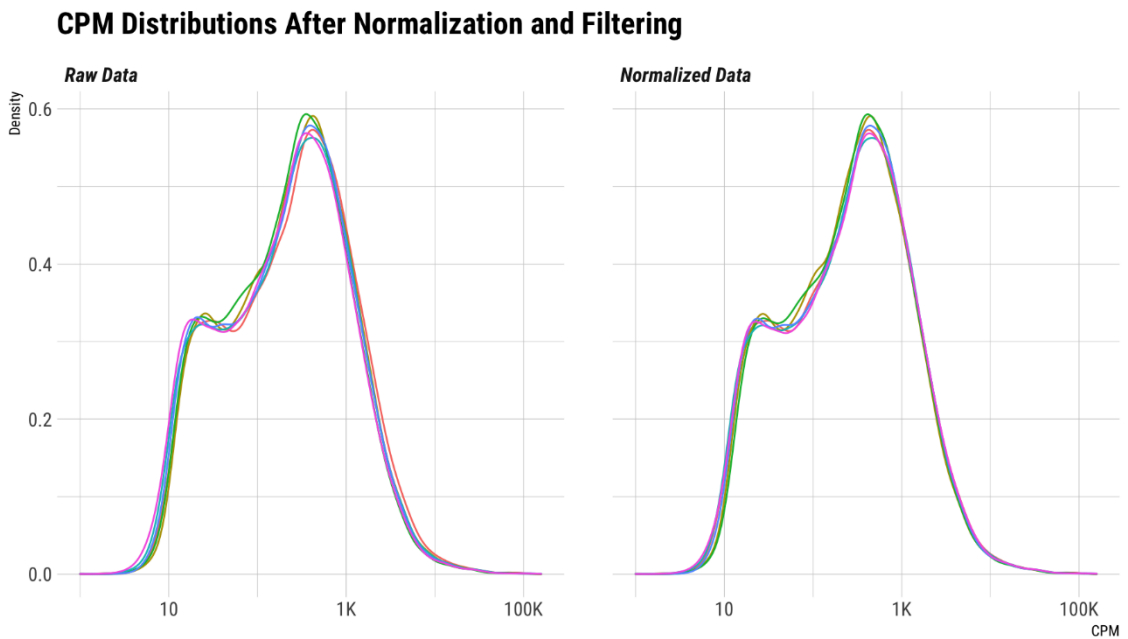
Tablo 4.1: Örnek grupları transkriptom dizilemesi

Sample	Assigned	Unassigned	MultiMapping	NoFeatures	Ambiguity
1kontrol	11466975	1003201	4359171	291274	2682426
2kontrol	10581480	1024956	4040447	294255	2564694
3kontrol	9529045	939529	3532223	274398	2327046
4exosome	10489639	966140	4139716	262565	2523604
5exosome	10202947	883639	3640074	275089	2309297
6exosome	9714664	748904	3409887	246493	2354645

4.15.2 Filtreleme ve Normalizasyon

Genom hizalama ve transkriptom elemanlarının belirlenmesi sonrasında, her bir transkriptom elemanına (feature) kaç adet okuma düştüğü hesaplanır (Şekil 4.27). Her bir gen ve eleman için okuma sayılarını içeren bu veri seti, ekspresyon gösteren ve göstermeyen genlerin bir karışımını içermektedir. Bu karışım içerisinde bazı genler, örneklerin büyük bir kısmında çok düşük oranda ekspresyona sahip olabilir veya hiç ekspresyon göstermeyebilir. İleri analizleri etkilememesi amacıyla bu veriler, veri setinden çıkarılmaktadır. Ayrıca, numune hazırlama veya dizileme işlemi sırasında, numune ile doğrudan biyolojik ilişkisi

olmayan dış faktörler, numunelerde tespit edilen ekspresyonun değerlerini etkileyebilir. Örneğin, bir deneyin ilk partisinde işlenen numuneler, ikinci bir partide işlenen numunelere kıyasla toplamda daha yüksek bir ekspresyona sahip olabilir. Analizlerde, tüm numunelerin benzer aralık ve ekspresyon değer dağılımına sahip olması gerektiği varsayılmaktadır. Bu sebeple, her numunenin ekspresyon dağılımlarının tüm deney boyunca benzer olmasını sağlamak için normalleştirme gerçekleştirilmektedir. Aşağıdaki figürde ham verilerde ve normalize edilmiş verilerdeki CPM (counts per million) dağılımları gösterilmiştir. Takip eden analizler, normalize veriler üzerinden gerçekleştirilmiştir.

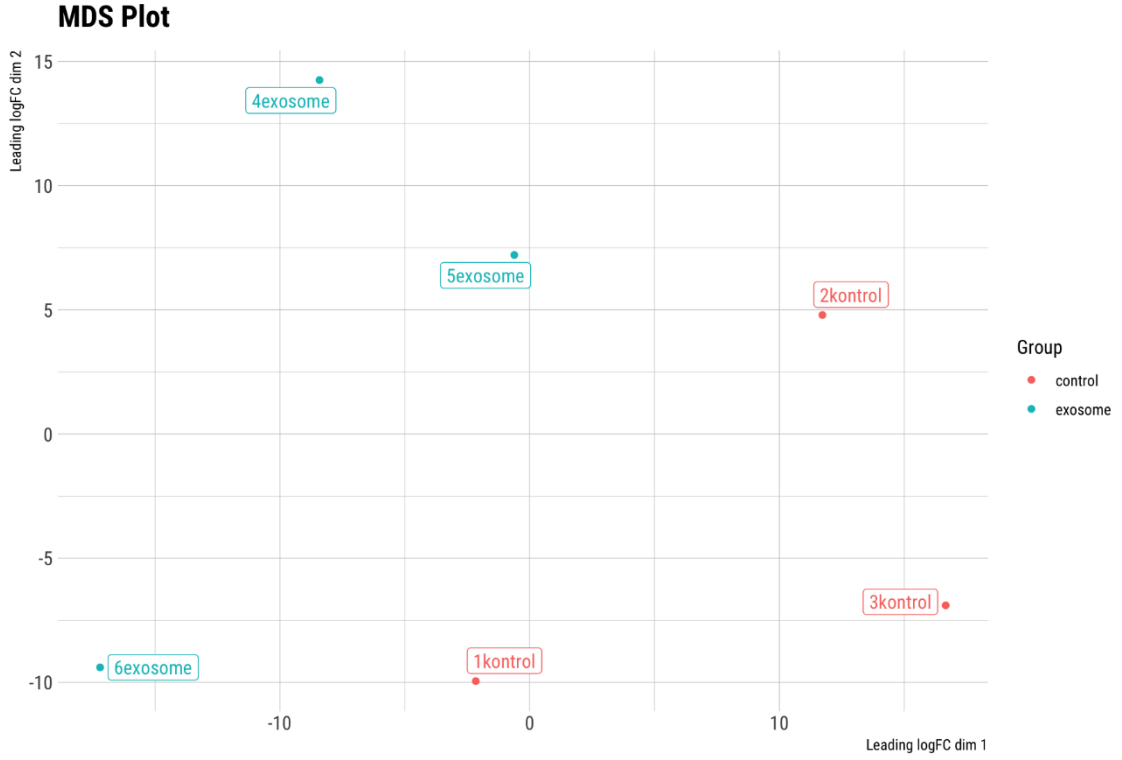


Şekil 4.27: Transkriptom filtreleme ve normalizasyon grafiği

4.15.3 Kümeleme

Numuneler arasında gen ekspresyon analizine yönelik profil benzerliklerin en iyi anlaşılmasını sağlayan yaklaşımlardan biri, çok boyutlu ölçekleme (Multidimensional scaling, MDS) veya Principal Component Analysis (PCA) grafiğidir (Şekil 4.28). Grafik, numuneler arasında önbilgi olmadan (unsupervised) benzerlikler ve farklılıkların görselleştirilmesini sağlar. Böylece ileri analizler gerçekleştirilmeden önce diferansiyel ekspresyonun ne ölçüde tespit edilebileceği hakkında fikir sahibi olabilir. İdeal olarak, numuneler ana gruplarına göre (kontrol ve deney grupları gibi) birlikte kümelenir ve gruplardan uzaklaşan herhangi bir numune (outlier) tanımlanabilir. Buna bağlı olarak hata

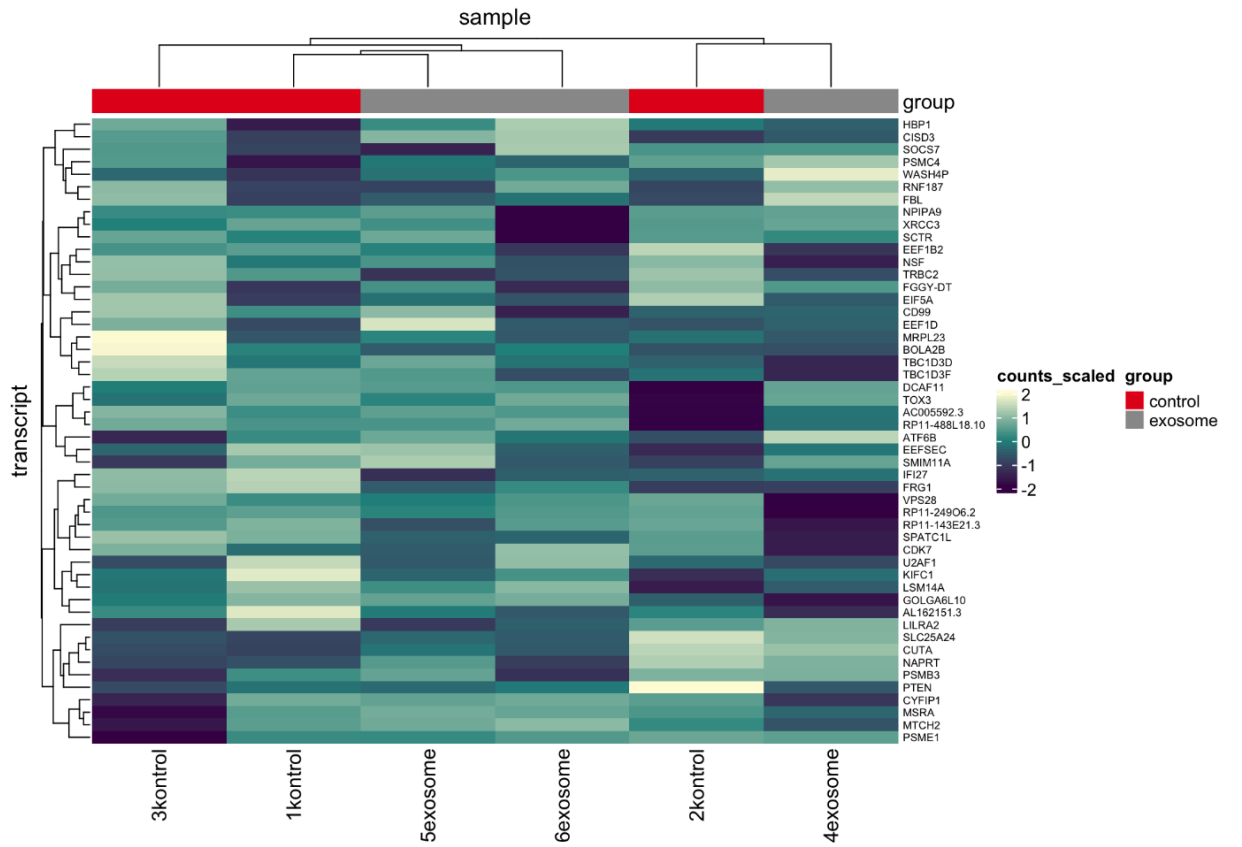
kaynakları veya ekstra varyasyon içeren numuneler tespit edilebilir. Varsa, teknik kopyalar birbirine çok yakın olmalıdır.



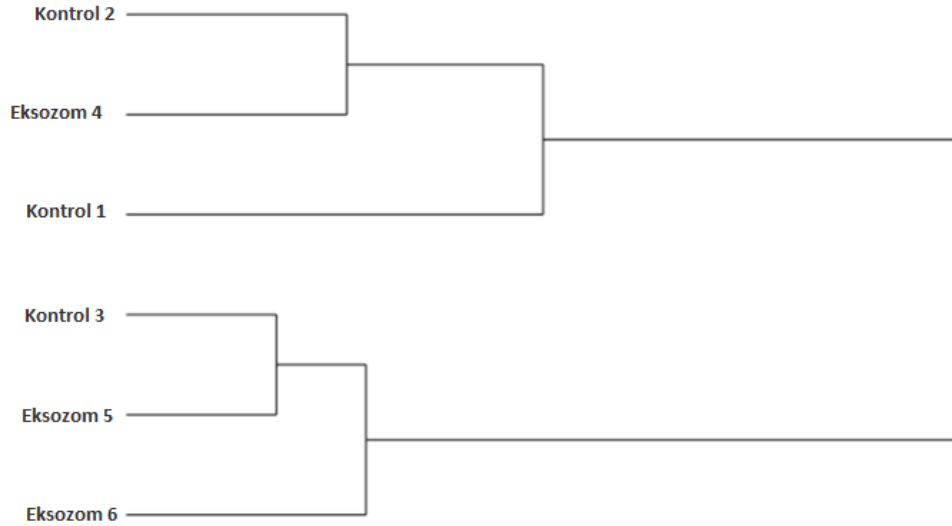
Şekil 4.28: Kontrol ve eksozom grupları için kümeleme grafiği

Aşağıdaki ısı grafiği, ekspresyon açısından en fazla farklılık gösteren 50 genin karşılaştırma yapılan gruplardaki ekspresyonlarını göstermektedir (Tablo 4.2). Grafikte yer alan genlerin tamamı istatistiksel açıdan anlamlı olmayabilir.

Tablo 4.2: Kontrol ve eksozom gruplarında ısı haritası



Aşağıdaki dendrogramda, örneklerin hiyerarşik kümelendirme analizleri görselleştirilmiştir. Normalize okumalar esas alınarak örnekler arası euclidean mesafe ölçülmüştür ve ardından ward.D2 metodu ile kümeleştirme gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29: Kümeleştirme analizi

4.15.4 Diferansiyel Ekspresyon Analizi

Diferansiyel ekspresyon analizi, normalleştirilmiş okuma sayısı verilerinin belirlenmesi ve deney grupları arasındaki ekspresyon seviyelerinde kantitatif değişiklikleri tespit edilmesi için kullanılır. Örneğin, belirli bir gen için okuma sayılarında gözlenen bir farkın önemli olup olmadığına, yani sadece doğal rastgele varyasyondan beklenenden daha büyük olup olmadığına karar vermek için Diferansiyel Ekspresyon Analizi kullanılır. Aşağıdaki başlıklarda, gerçekleştirilen karşılaştırma gruplarına göre ekspresyonu artış veya azalış gösteren genler listelenmiştir (Şekil 4.30). Seçilen gruplar arasında yapılan karşılaştırma sonrasında anlamlı ekspresyon artışı veya kaybı gösteren genlerin sayıları aşağıdaki görselde sunulmuştur.



Şekil 4.30: Diferansiyel ekspresyon grafiği

Aşağıdaki tablolarda, grup karşılaştırması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren genler FDR değerlerine göre listelenmiştir. Tabloda 4.3’de yer alan *logFC* değeri, genin birinci gruba kıyasla ikinci grupta kaç katlık bir değişim olduğunu; *PValue* gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonrası P değerini, *FDR* False Discovery Rate değerini ifade etmektedir. P ve FDR değerleri 5. basamağa kadar yuvarlatılmıştır.

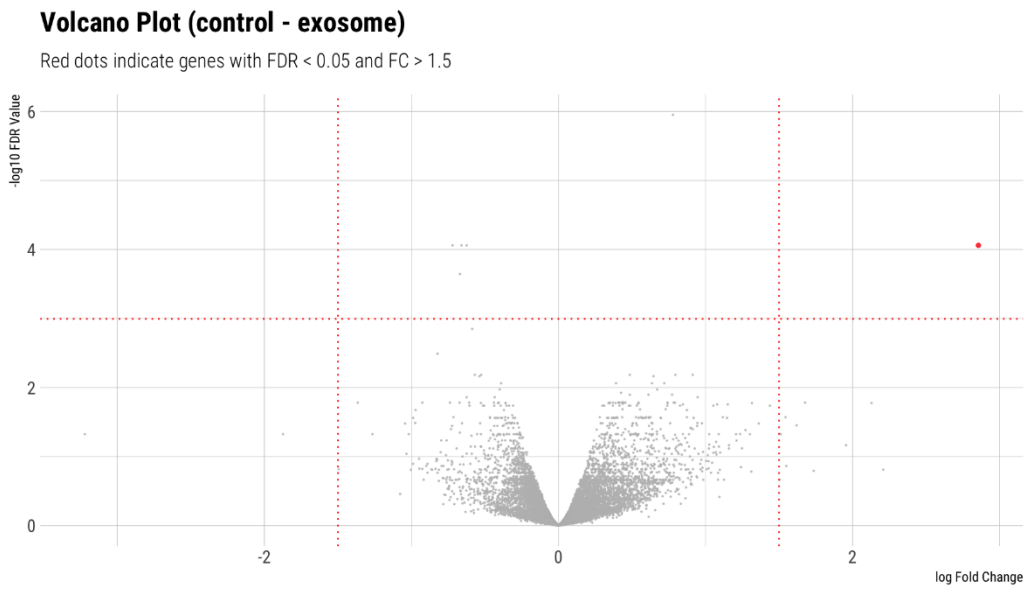
Tablo 4.3: Genlerin kontrol ve ekzozom grupları arasındaki katlık değişimi

Transcript	log FC	P Value	FDR
TRBC2	2.85563	0.00001	0.01726
WI2-933P11.2	0.7787	0	0.0026
MT-CO1	-0.62454	0.00001	0.01726
MT-ND4	-0.66039	0.00001	0.01726
MT-ND4L	-0.67021	0.00001	0.02614
MT-CO2	-0.72043	0	0.01726

Kontrol - eksozom grupları arasında yapılan analize göre 2 adet gende ekspresyon artışı; 4 adet gende ekspresyon düşüşü tespit edilmiştir. Diğer tüm genlerin log FC ve FDR sonuçları ekte sunulmuştur.

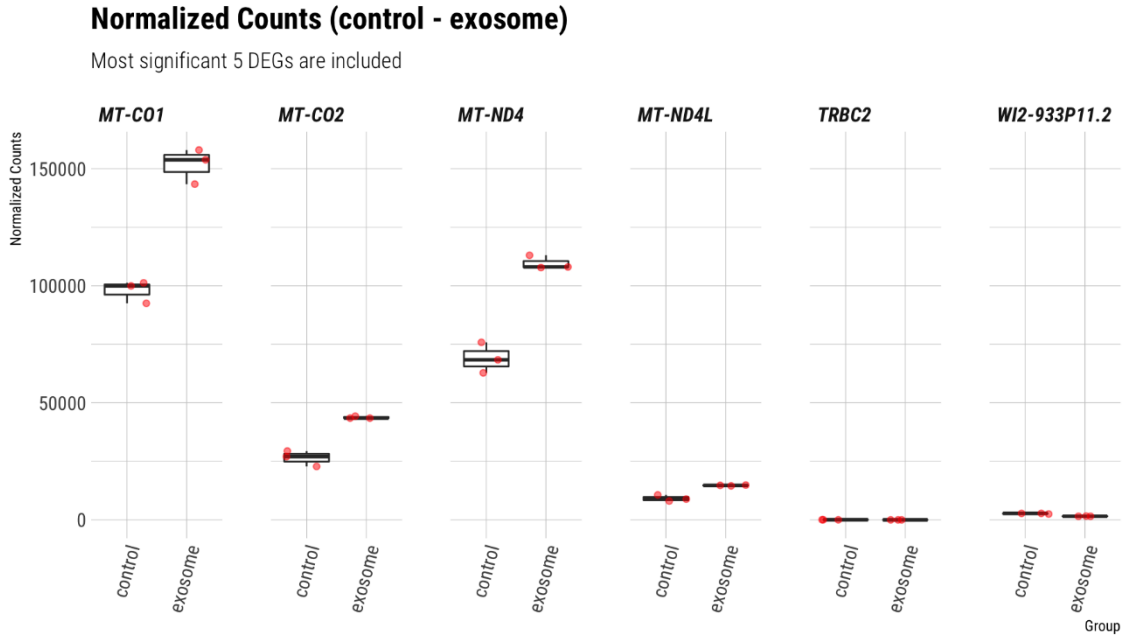
4.15.5 Volcano Plot Analizi

Aşağıdaki grafikte, tüm genlerin logFC ve FDR değerlerine göre dağılımları gösterilmektedir. Kırmızı ile gösterilen genler, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı genleri ifade etmektedir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31: Volcano plot analizi

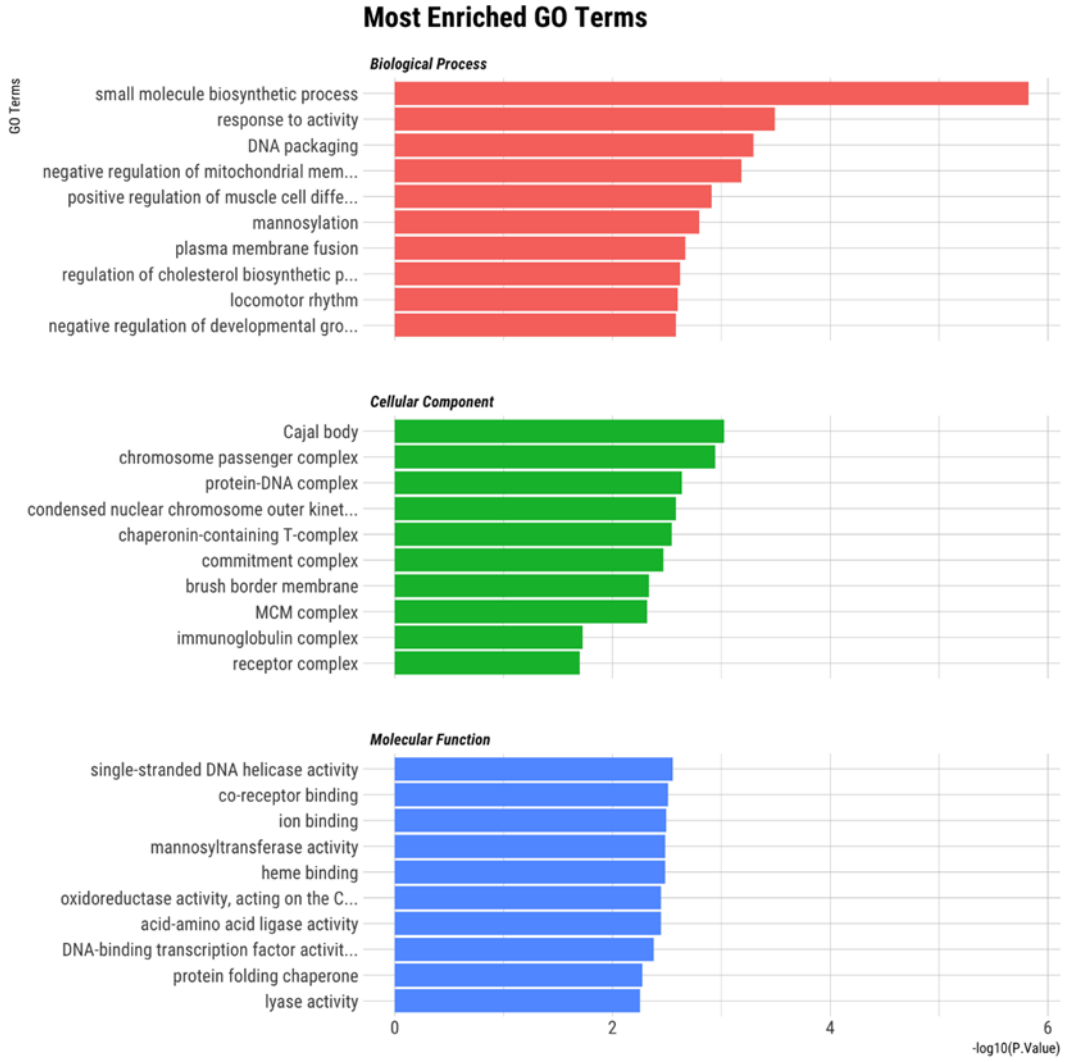
Aşağıdaki Şekil 4.32’de, en fazla anlamlı değişiklik gösteren (en düşük FDR) 5 genin normalize edilmiş okuma değerlerine göre dağılımları gösterilmektedir.



Şekil 4.32: Kontrol ve eksozom grupları arasında normalize edilmiş okuma değerleri

4.15.6 Gen Ontoloji Analizi

Gen Ontoloji (GO) analizi, genlerin fonksiyonel özelliklerine bağlı olarak önceden tanımlanmış terim veya gruplara atandığı ve Gen Ontolojisi sınıflandırma sistemini kullanan bir yorumlama yöntemidir. Bir deneyde, altta yatan biyolojik süreçleri daha iyi anlamak için genellikle bu gen gruplarının işlevsel bir profilini almak için kullanılır. Gen ontoloji verileri Şekil 4.33’de sunulmuştur.



Şekil 4.33: GO analizi

4.15.7 Yolak Analizi

Yolak analizi, bir moleküler yolak içinde yer alan proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunun, deney ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterip göstermediğinin testini sağlar. Buna bağlı olarak, bir yolaktaki gen ekspresyonundaki değişiklikleri inceleyerek biyolojik gruplar arasındaki fenotip farklılıklarının nedenleri araştırılabilir. Gerçekleştirilen analizde, bu amaçla KEGG PATHWAY yolak veritabanı (<https://www.kegg.jp>) kullanılmıştır.

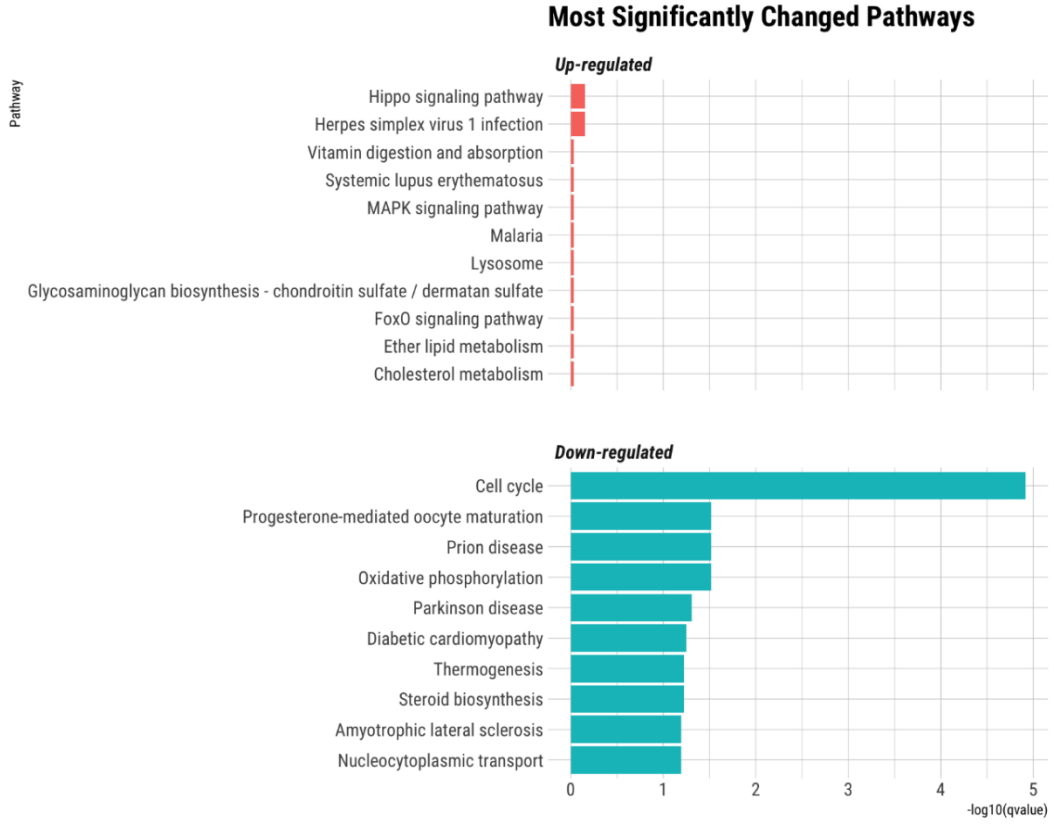
Aşağıdaki Tabloda 4.4’de, istatistiksel olarak anlamlı olabilecek yolakların tablosu paylaşılmıştır. Tablolardaki ID ve Description yolağın KEGG kodunu ve adını, GeneRatio

yolakta bulunan genlerden kaçının anlamlı derecede değişiklik gösterdiğini, p.val P değerlerini, q.val P değerinin Benjamini-Hochberg düzeltmesini ifade eder.

Tablo 4.4: Ekspresyonu artan genlerin ağırlıklı olarak kullandıkları yolaklar

ID	Description	GeneRatio	p Value	q Value
hsa04110	Cell cycle	17/222	0	0.00001
hsa00190	Oxidative phosphorylation	12/222	0.00029	0.03028
hsa04914	Progesterone-mediated oocyte maturation	10/222	0.00045	0.03028
hsa05020	Prion disease	18/222	0.00048	0.03028
hsa05012	Parkinson disease	17/222	0.00097	0.04929

Aşağıdaki grafikte, artış ve azalış profili gösteren ve en fazla değişikliğe sahip 10 yolak istatistiksel anlamlılık değerine göre Şekil 4.34’da görselleştirilmiştir.

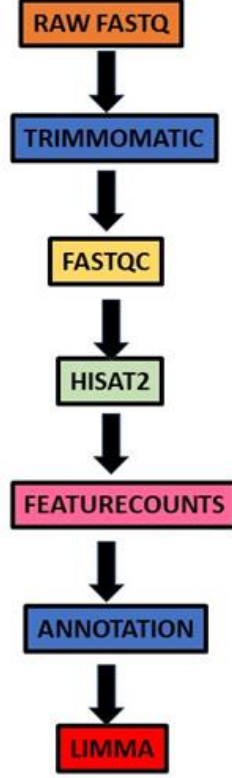


Şekil 4.34: İstatiksel olarak anlamlı olan ve ekspresyonu artan/azalan yolakların analiz sonuçları

4.16 Galaxy RNA Sekans Biyoinformatik Analizi

Galaxy RNA sekans analizi usegalaxy.org programı ile gerçekleştirilen analizdeki adımlar

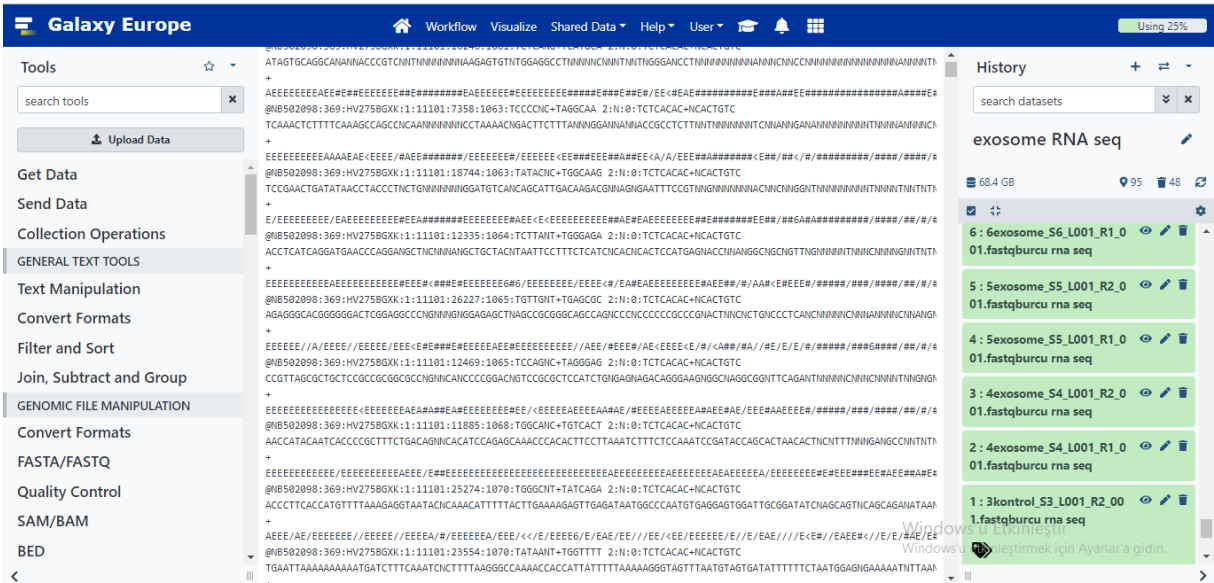
Şekil 4.35'deki gibi takip edilmiştir.



Şekil 4.35: Galaxy RNA sekans algoritması

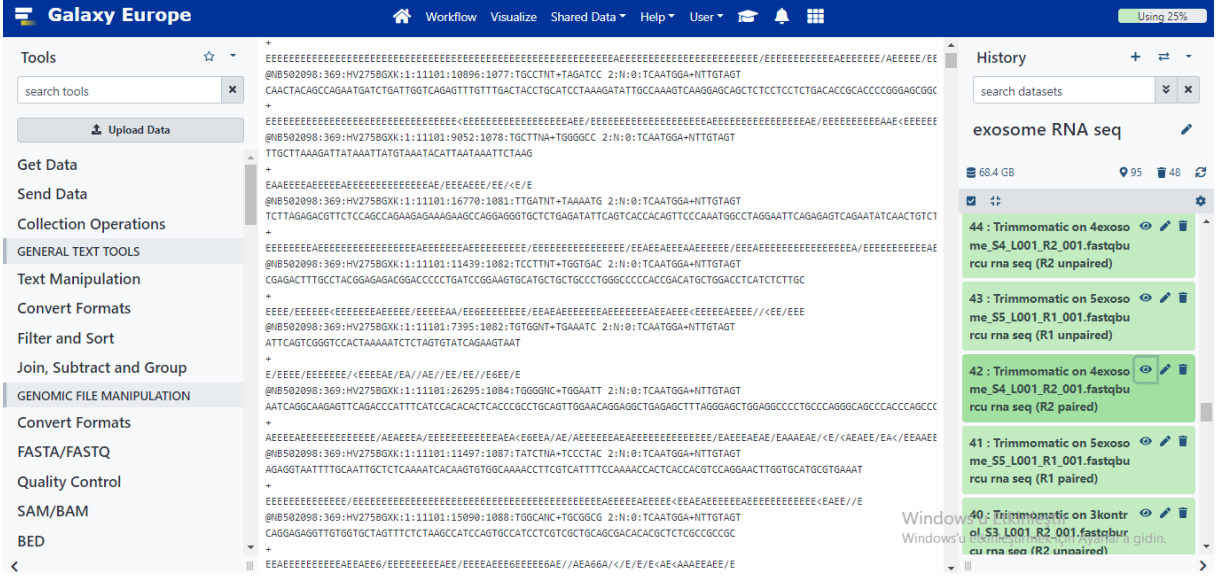
Alternatif biyoinformatik analiz programlarından biri olan usegalaxy.org programı ile elde edilen veriler aşağıda şekilde belirtilen algoritma takip edilerek gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.36).

FastQ, yaygın olarak bilinen tüm FastQ format varyantlarında çalışan ve bir sıralama makinesinden alınan yeni nesil sıralama verilerini kalite filtreleme adımlarıyla manipüle etmeyi sağlayan bir araç olarak kullanılmaktadır. Bazı sıralama teknolojileri diziler ve kalite puanları içeren ayrı dosyalar üretmektedir. Bu iki ayrı dosya, tek bir FastQ dosyası oluşturmak için Şekil 4.38’de bir araya getirilmiştir. Bu amaçla FASTA ve QUAL’i FastQ aracında birleştirmek üzere geliştirilmiştir (Blankenberg vd. 2010).



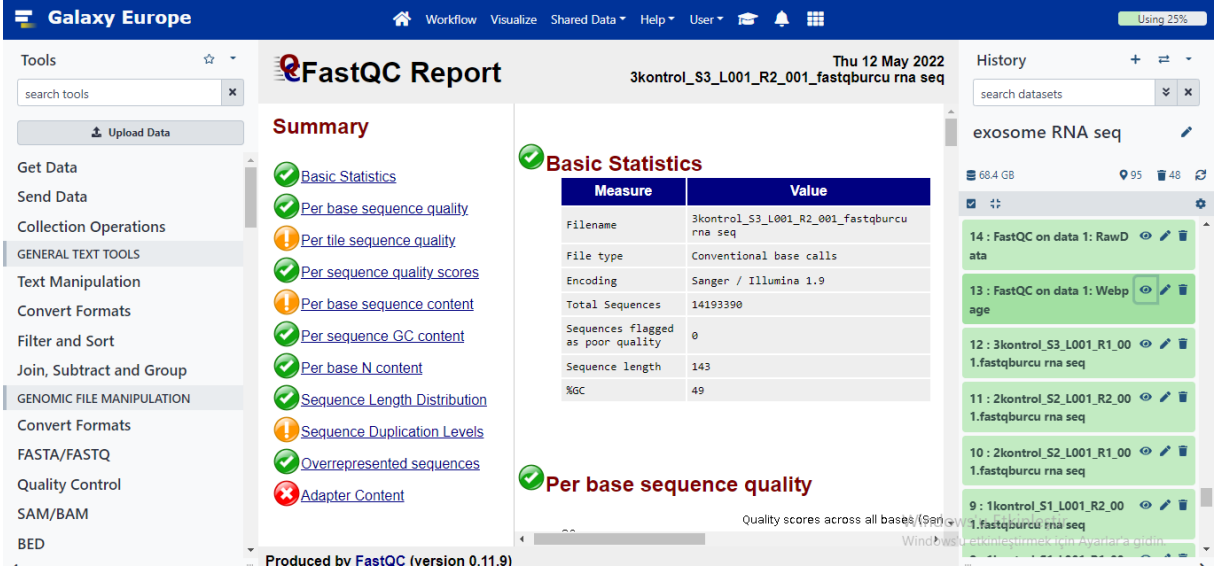
Şekil 4.36: FastQ analizi

Trimmomatic, okuma kırpma ve filtreleme için çeşitli işleme adımları içermektedir. Bunun yanı sıra ana algoritmik yenilikler adaptör dizilerinin tanımlanması ve kaliteli filtreleme ile ilgilidir. Trimmomatic, okumalar içindeki teknik dizileri tespit etmek için iki yaklaşım kullanır (Şekil 4.37). “Basit mod” olarak adlandırılan ilki, okuma ile kullanıcı tarafından sağlanan teknik sıra arasında yaklaşık bir eşleşme bularak çalışır. Bu mod, adaptörler, PZR veya bunların parçaları dahil olmak üzere tüm teknik diziler için çalışma avantajına sahiptir. Bu tür diziler, okumalar içindeki herhangi bir yerde veya yönde tespit edilebilir, ancak yanlış-pozitif bulguları önlemek için okuma ve teknik dizi arasında önemli bir minimum örtüşme gerektirmektedir. Bununla birlikte, genellikle okumaların uçlarında meydana gelen kısa kısmi adaptör dizileri, doğası gereği bu minimum örtüşme gereksinimini karşılayamaz ve bu nedenle tespit edilemez (Bolger vd. 2014).



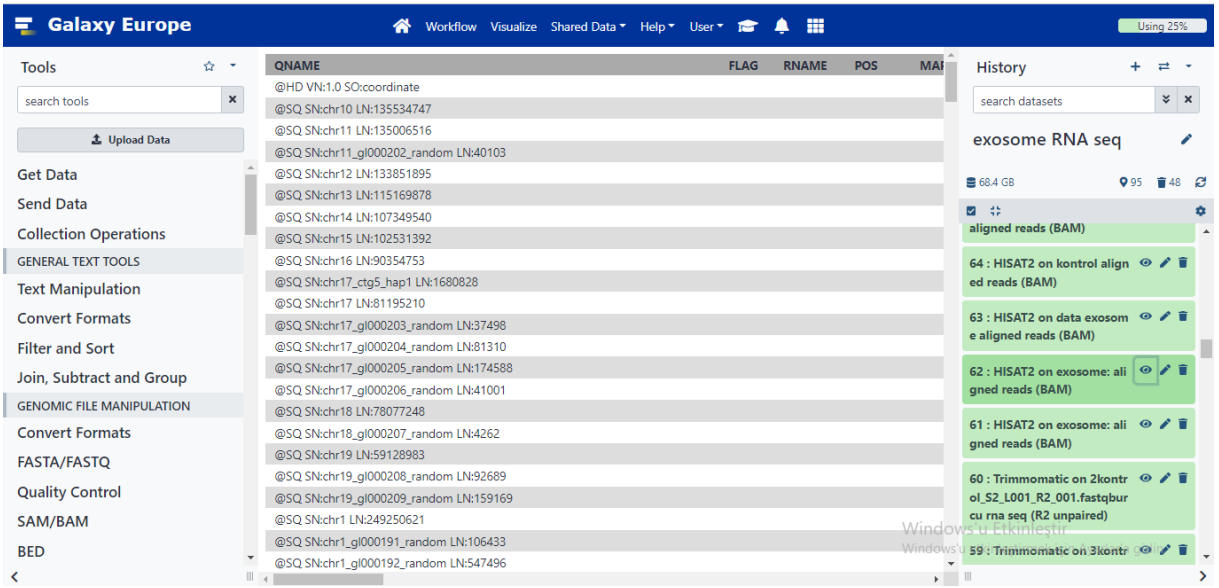
Şekil 4.37: Trimmomatic analiz

Bir FastQ dosyasında hangi bilgilerin depolandığını elde ettikten sonra, bir sonraki adım verilerimiz için kalite ölçümlerini incelemektir. Bunun için FastQC, yüksek verimli sıralama işlem hatlarından gelen ham dizi verileri üzerinde bazı kalite kontrol kontrolleri yapmak için basit bir yol sağlamaktadır. Verilerin daha fazla analiz yapmadan önce bilmesi gereken herhangi bir sorunu olup olmadığına dair hızlı bir izlenim vermek için kullanabilecek modüler bir analiz seti sağlamaktadır (Şekil 4.38). FastQC'nin ana işlevleri şunlardır: BAM, SAM veya FastQ dosyalarından (herhangi bir değişken) veri içe aktarmada sırasında hangi alanlarda sorun olabileceğini söylemek için hızlı bir genel bakış sağlamada, verilerin hızlı bir şekilde değerlendirilmesi için özet grafikler ve tablolara erişim sağlamasında ve sonuçların HTML tabanlı kalıcı bir rapora aktarılmasına erişim sağlayan bir araç olmaktadır (Brandine ve Smith, 2019).



Şekil 4.38: FastQC analizi

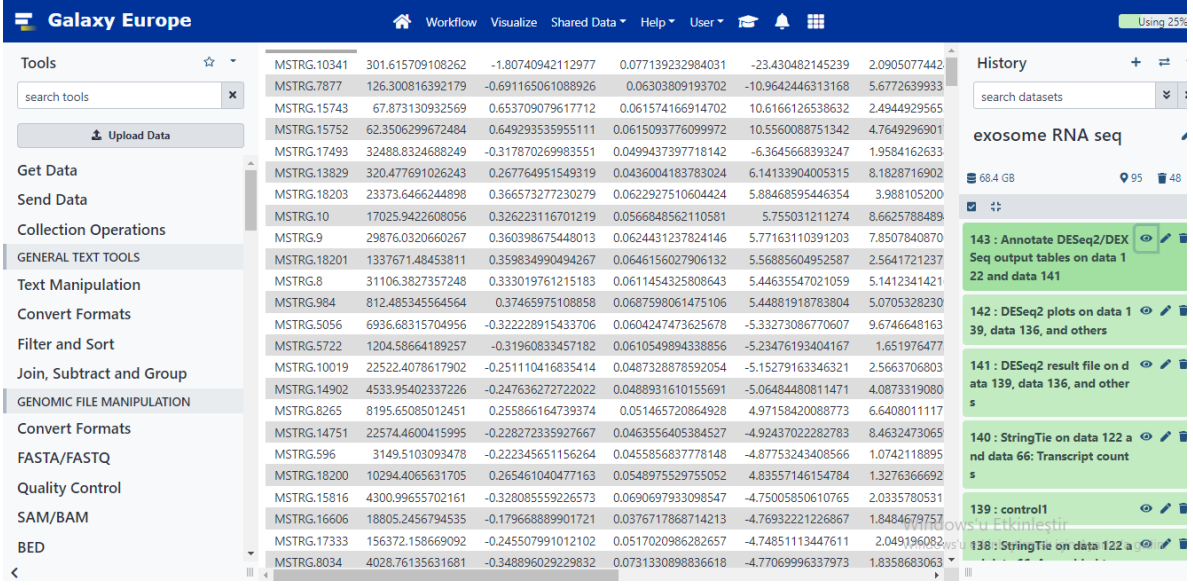
HISAT2, yeni nesil dizileme okumalarını (hem DNA hem de RNA) bir insan genomu popülasyonuna ve tek bir referans genoma eşlemek için hızlı ve hassas bir hizalama programıdır. HISAT2, dizileme okumalarının bir genoma hızlı ve hassas bir şekilde hizalanmasını ve küçük varyantlardan oluşan geniş bir koleksiyon sağlamak için grafik tabanlı bir veri yapısı ve bir hizalama algoritması uygulamaktadır (Şekil 4.39). Ayrıca, tekrarlayan bir okumanın hizalamalarının bir konuma yansıtıldığı ve daha sonra tamamen geri kazanıldığı, bir genomdaki tekrar dizileri için de bir indeksleme algoritması sunmaktadır. HISAT-genotipi, HLA tipleme ve DNA parmak izi analizi yapmak için ek algoritmalarla birlikte HISAT2'yi bir hizalama motoru olarak kullanır. HISAT2, referans genomunun doğrusal bir grafiğini oluşturarak başlar ve ardından grafik boyunca alternatif yollar olarak mutasyonlar, silmeler ve eklemeler yapmaktadır (Kim vd. 2019).



Şekil 4.39: HISAT2 analizi

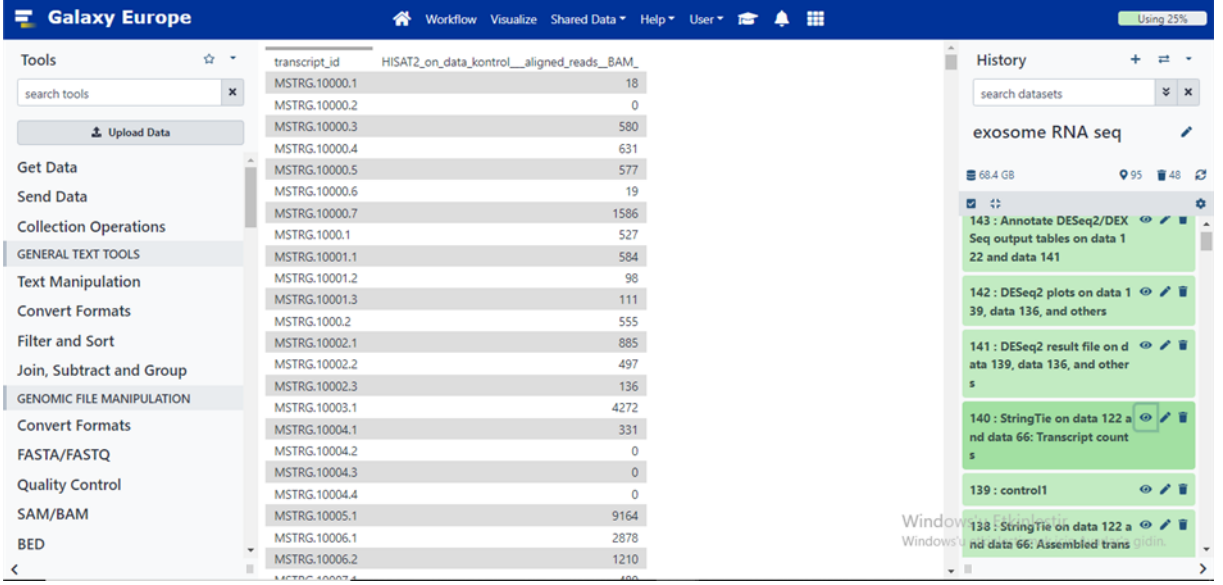
FeatureCounts, RNA veya DNA dizileme teknolojilerinden üretilen okumaları tüm genomik özellik açısından ölçmek için kullanılabilir. Yüksek verimli özelliklere okuma atamak için kromozom karma, özellik engelleme ve diğer tüm stratejileri uygulamaktadır. Unix komutu olarak veya R paketi Rsubread'te bir işlev olarak mevcuttur. Her iki durumda da tüm temel işlevler C programlama dilinde yazılmıştır. R işlevi, derlenmiş C kodu için, C uygulamasının verimliliğinden ödün vermeden R programlama ortamının rahatlığını sağlayan bir sarmalayıcıdır (Liao vd. 2014).

Gene annotation (gen açıklaması) gen modelleri hakkında bilgi sağlar ve diferansiyel ekspresyon analizi için gereklidir. Ayrıca bu adım, genomun aktif olarak kopyalanan bölgelerini hızlı bir şekilde belirlememizi sağlamaktadır (Şekil 4.40). Annotation homoloji tabanlı arama araçlarına dayanır ancak elde edilen veriler daha sonra genleri ve genomları açıklamak için kullanılır. Bu sayede açıklama platformuna bilgi eklendikçe, manuel açıklayıcılar, aynı açıklama verilen genler arasındaki tutarsızlıkları çözebilir hale gelmektedir (Hamaguchi vd. 2021).

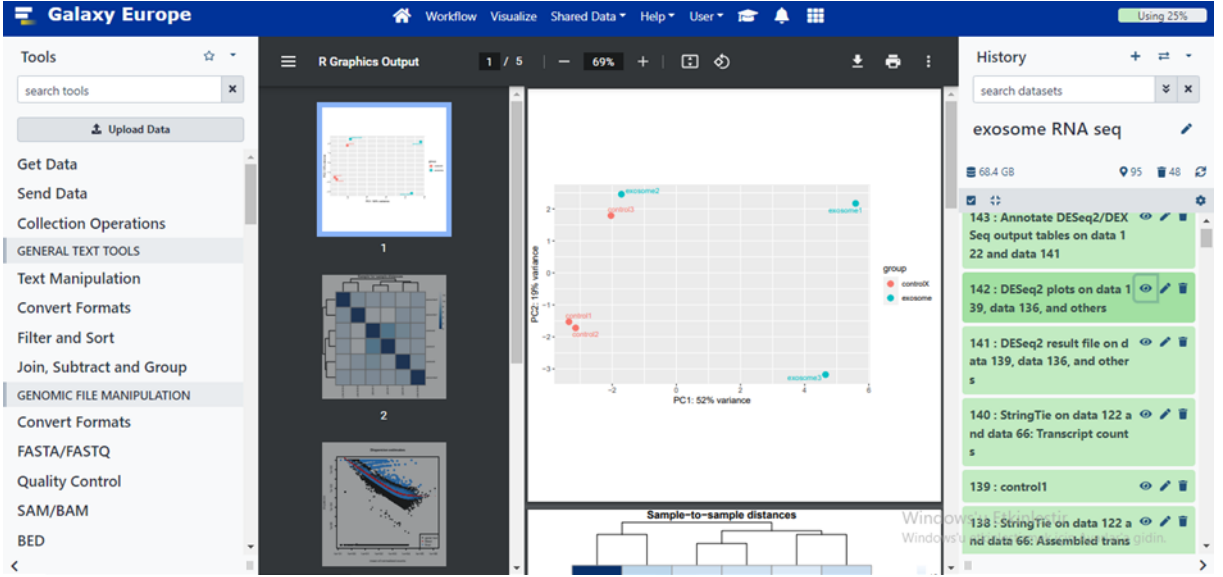


Şekil 4.40: Annotation analizi

Limma, orijinal olarak mikrodizi verilerinin diferansiyel ifade (DE) analizi için geliştirilmiş bir R paketidir. Birlikte, RNA-Seq verilerinin hızlı, esnek ve güçlü analizlerine izin vermektedir. DE için oldukça esnek model spesifikasyonuna sahiptir. Böylece hemen hemen her türden meta verinin dahil edilmesine izin vererek birden fazla kategorik ve sürekli değişken dahil edebilmektedir. Ayrıca simülasyon çalışmalarında yanlış keşif oranını nominal oranda veya altında tutar. Gen bazında standart sapmaların yumuşatılmasında önemli katkı sağlamaktadır (Holmes vd. 2006). Yapılan StringTie ve DESeq analizleri ile büyük veri sorunlarında daha fazla hız iyileştirmesi sağlayan çoklu iş parçacığını desteklemektedir. Bu araçlar kullanılarak yapılan diferansiyel ekspresyon analizi, bir örnek grubunun transkriptomundaki (gen ekspresyonu) farklılıkları belirlemek için kullanılır (örneğin, ilaç uygulanmış ve uygulanmamış gruplar) (Şekil 4.41 ve Şekil 4.42).

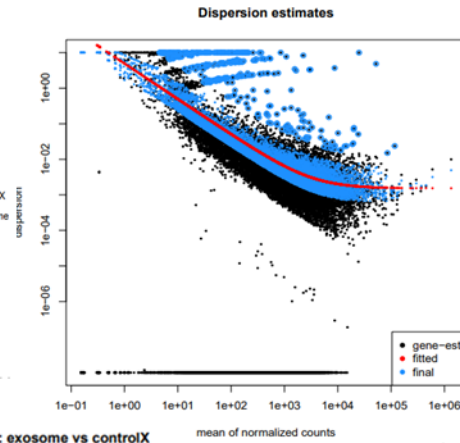
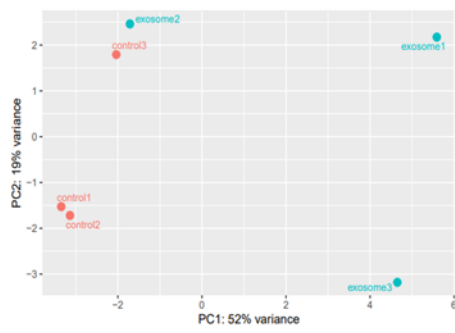
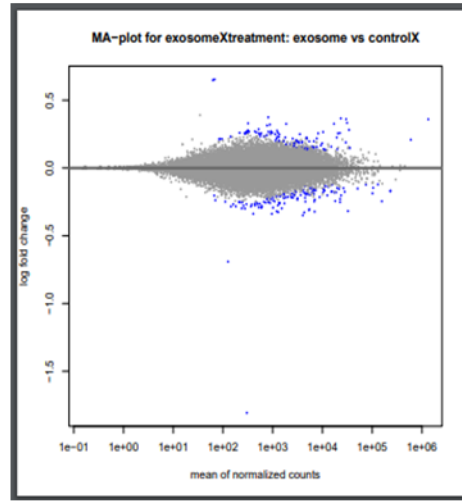
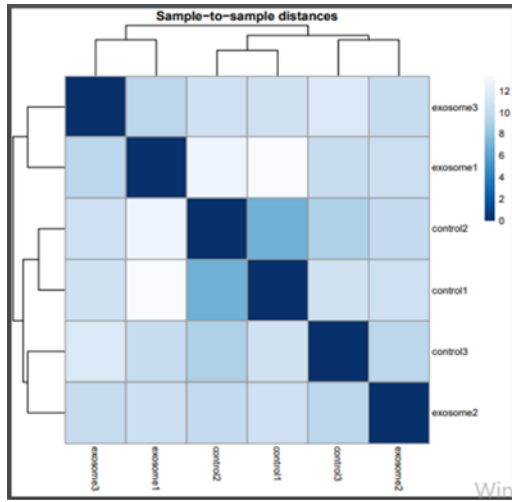


Şekil 4.41: StringTie analizi

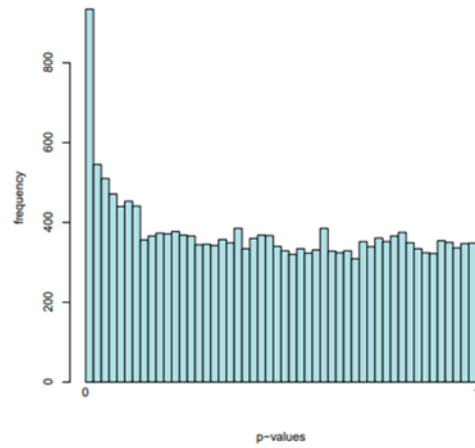


Şekil 4.42: DESeq Analizi

DESeq plot analizi sonucunda veriler aşağıdaki Şekil 4.43'deki gibi bulunmuştur.

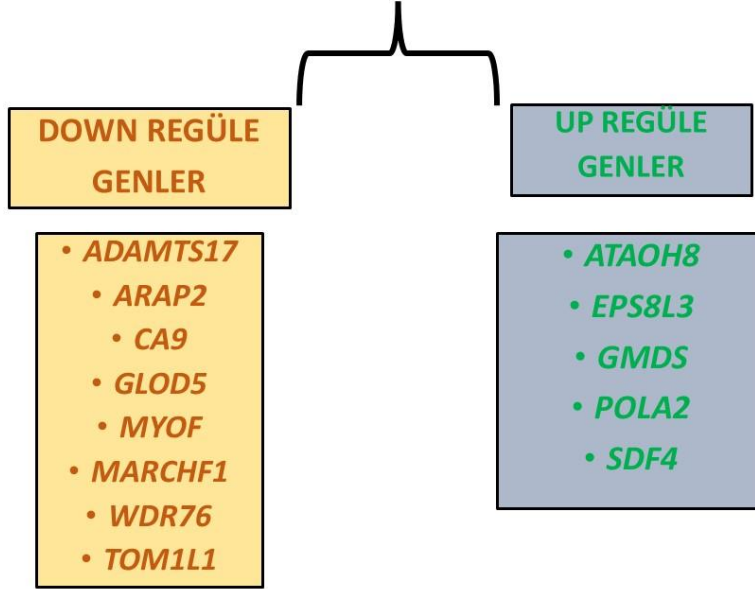


Histogram of p-values for exosomeXtreatment: exosome vs controlX



Şekil 4.43: DESeq plot analizi sonucu

Tüm analizler sonucunda 13 gen belirlenmiştir. Bu genlerden 8'i down, 5'i up regüle genler olarak öne çıkmıştır (Şekil 4.44). Bu genler NCBI veri tabanında accession numarası ile doğrulanmıştır. Bu genlerin mRNA seviyesindeki değişimleri değerlendirilmiştir.



Şekil 4.44: Galaxy programı ile belirlenen genler

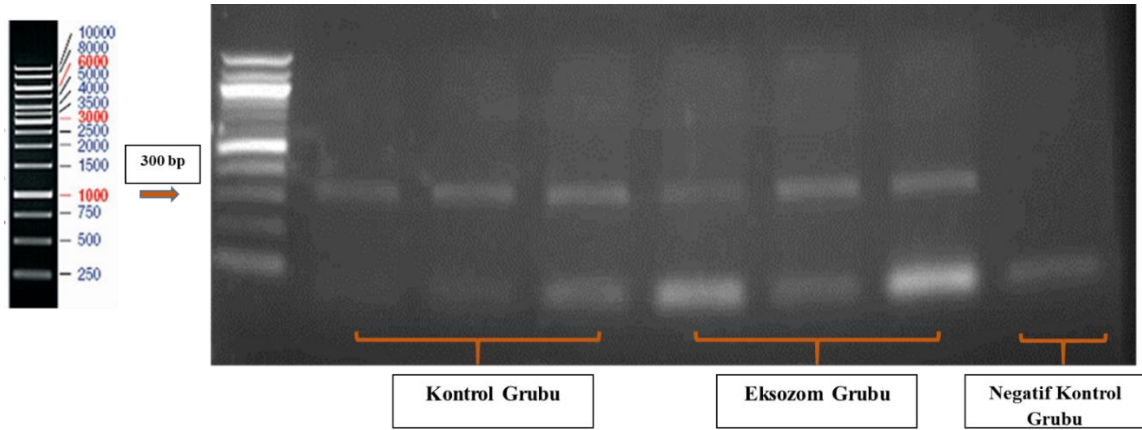
4.17 cDNA Sentezi

Eksozom ve kontrol grubunda gerçekleştirilen RNA izolasyonu sonucunda RNA kalitesi, saflığı ve alt birimleri doğrulandıktan sonra eksozom uygulanmış grup ve kontrol grubu üç tekrarlı örnekler olacak şekilde RNA sekans analizine gönderilmiştir. Burada gönderilen örneklerin RNA kalitesi yeniden doğrulandıktan sonra sekanslama aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada örneklere yeni nesil dizileme tekniği uygulanarak okuma işlemleri yapılmıştır. Refgen Biyoteknoloji firmasından hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilen çalışmada okuma işlemleri, okuma işlemleri sonrasında elde edilen verilerin kalite kontrolü, dizileme süreci, kırpma işlemleri, kırma sonrası hizalamalar ve referans genomu hizalama aşamalarından geçirilerek veriler elde edilmiştir. Buna ek olarak hizalama sonrasında gen anotasyonu, ekzon ve transkript bilgileri için Ensembl veriseti kullanılmıştır. Normalizasyon ve filtre işlemleri kullanılarak istatistiksel karşılaştırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu analize ek olarak gerçekleştirilen biyoinformatik analiz olan Galaxy RNA sekans aracı ile de çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen tüm verilerden belirlenen up regüle ve down regüle genlerin mRNA seviyesindeki gen ekspresyon profili çalışılmıştır. Buna göre Şekil 4.44'de

belirtilen up regüle ve down regüle genler belirlenmiştir. Belirlenen genler Primer 3 programı ile tasarlanmış, OligoAnalyzer™ Tool programı tasarlanan primerlerin saç tokası yapısı oluşturmamasının yanısıra Tm sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına dikkat edilerek Tablo 3.10’da primer tasarımı yapılmıştır. Ardından tasarlanan primerler ile cDNA sentezi Bölüm 3.2.16’da belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.18 Biyoinformatik Analizler ile Belirlenen Genlerin Ekspresyon Seviyesinin SW480 Hücrelerinde Tespiti

Eksozom uygulanan grup ve kontrol grubunda gerçekleştirilen RNA izolasyonu sonucunda RNA kalitesi, saflığı ve alt birimleri doğrulandıktan sonra, cDNA sentezi yapılmış ve cDNA kalitesini kontrol etmek için insan beta mikroglobulin primerleri kullanılarak Bölüm 3.2.17’de anlatılan koşullarda kontrol PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Eksozom uygulaması yapılmış grup, kontrol grubu ve negatif kontrol olarak gerçekleştirilen PZR sonunda cDNA’ların kontrol edilmesi için % 1’lik agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir. Buna göre Bölüm 3.2.18’de anlatılan prosedüre uygun şekilde agaroz jel elektroforezi yapılmıştır (Şekil 4.45).

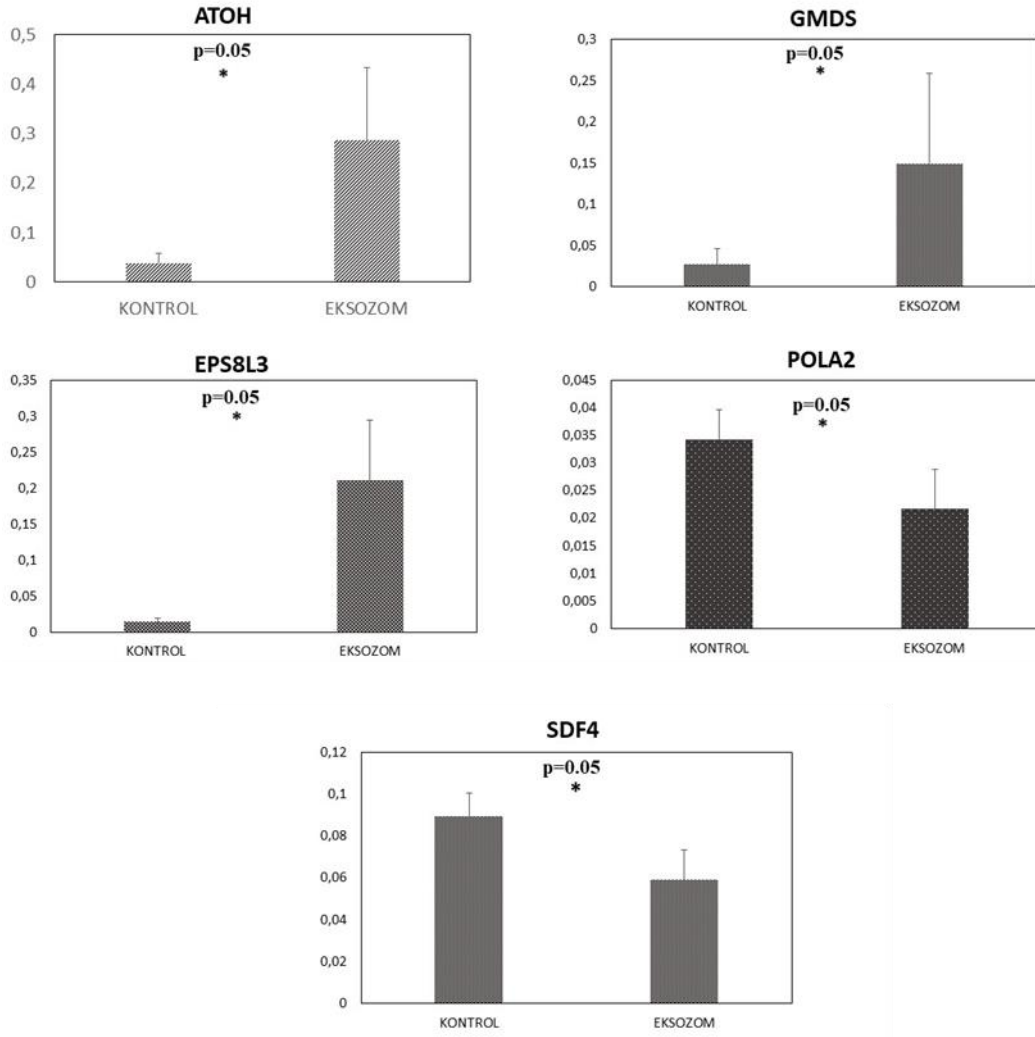


Şekil 4. 45: Agaroz jel görüntüsü

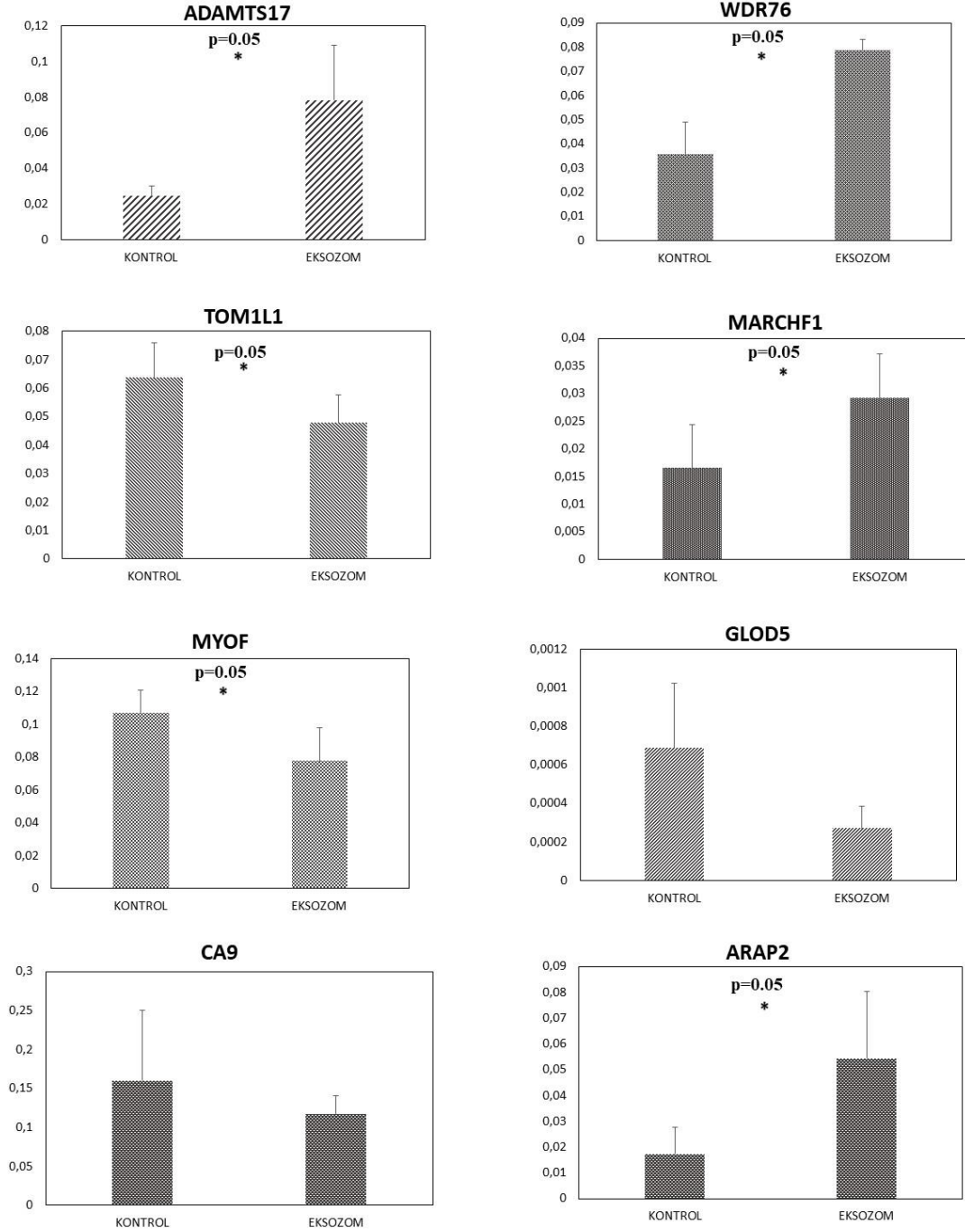
4.19 Gerçek Zamanlı PZR Analizi

Tablo 3.10’da verilen primerler kullanılarak gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR analiz sonuçları Şekil 4.46 ve Şekil 4.47’de verilmiştir. Verilen grafiklerde up regüle ve down regüle olarak ayrılmış genlerde ekspresyon analizleri bazılarında birbiri ile korelasyon gösterirken (ATOH8, EPS8L3, TOM1L1, MYOF, GLOD5, CA9 ve GMDS), bazılarının

bibriyle korele olmadığı (SDF4, POLA2, ADAMTS17, MARCHF2, WDR76 ve ARAP2) tespit edilmiştir.



Şekil 4.46: RT-PCR analizi up regüle genler

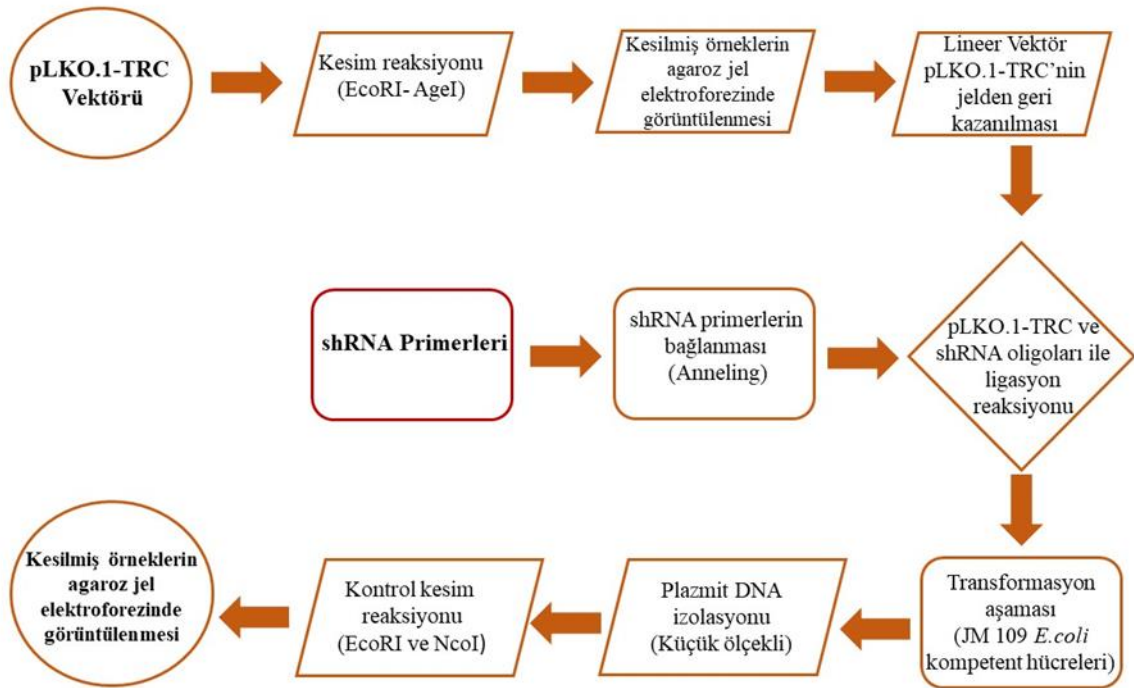


Şekil 4.47: RT-PCR analizi down regüle genler

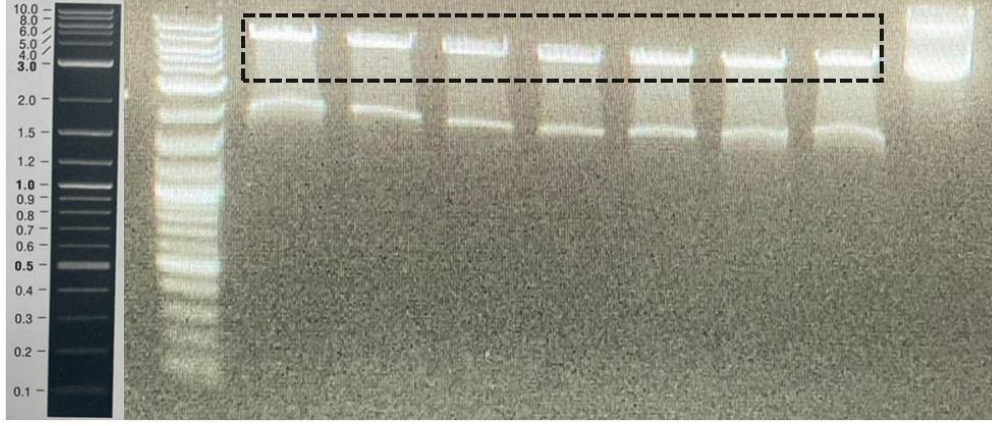
4.20 Gen İfadesi Susturma

ATOH8 için susturma çalışmalarında kullanılmak üzere sh oligolarının pLKO.1-TRC vektörüne klonlama çalışması gerçekleştirilmiştir. Bunun için sh oligoları tasarlanarak lentiviral tabanlı vektöre klonlama basamakları Şekil 4.48'deki gibi takip edilmiştir. Gerçekleştirilen klonlama basamakları Şekil 4.48'deki diagrama göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre tasarımı yapılmış sh oligoları 20 pmol olacak şekilde sulandırıldı. Ardından sh

ileri ve geri primerleriyle 5 µl ileri ve 5 µl geri primer, 5 µl 10X NEB Tamponu 2 ve 35 µl dH₂O eklenerek PCR cihazında 95°C’de 5 dk ve ardından 75°C’de 10 dk inkübe edilerek bağlanma (annealing) reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda bağlanma reaksiyonu gerçekleştirilen örnekler oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. pLKO.1-TRC vektörünü lineer haline getirmek için EcoRI ve AgeI restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu kurulmuştur. Reaksiyon sonunda örnekler % 0.8’lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir. Lineer hale getirilmiş vektörün jelde görüntüsü Şekil 4.49’de gösterilmiştir. Görüntülenen jelde 7 kb’ye karşılık gelen kesilmiş vektör ve en son kuyucukça yüklenen kesilmemiş bant gösterilmiştir

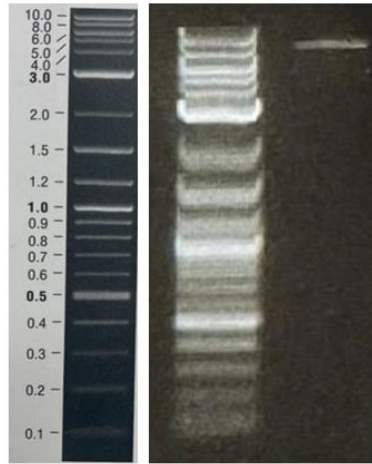


Şekil 4.48: sh ATOH8 dizisinin, pLKO.1-TRC vektörüne klonlanma basamaklarının şematik gösterimi



Şekil 4.49: pLKO.1-TRC vektörünün EcoRI ve AgeI enzimleri kullanılarak yapılan kesimin jel elektroforez görüntüsü

Jel görüntüsünde siyah kesikli işaretli büyük olan bant 7 kb'lik jelden geri kazanım kiti kullanarak geri kazanım yapılmıştır. Ardından lineer hale getirilip geri kazanım yapılmış pLKO.1-TRC vektörünün jelden geri kazanımın kontrol edilmesi için % 0,8'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Geri kazanım sonucu agaroz jelde yürütülen pLKO.1-TRC vektörü Şekil 4.49 gösterilmiştir. Şekil 4.50'de gösterildiği gibi geri kazanım sonucu doğrulanmıştır.



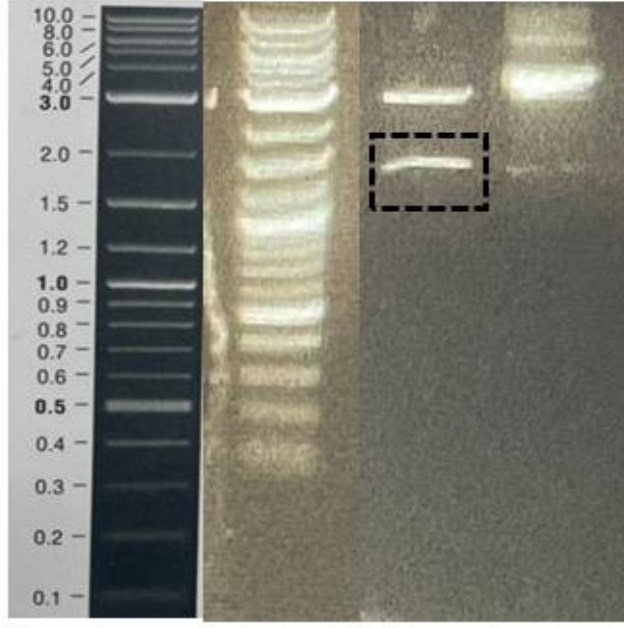
Şekil 4.50: Jelden geri kazanım sonucu pLKO.1-TRC vektörünün agaroz jel elektroforez görüntüsü

Jelden geri kazanım yapılmış pLKO.1-TRC vektörü ile sh ATOH 8 bağlanma reaksiyonu gerçekleştirilen primerler Bölüm 3.2.26'da anlatılan ligasyon aşamasına tabi tutulmuştur. Ligasyon çalışmasında kesilmiş pLKO.1-TRC vektöründen 2 µg, sh ATOH 8 bağlanmış oligolardan 2 µl, T4 DNA ligaz tamponundan 2 µl ve T4 DNA ligaz enziminde 1 µl eklenerek elde edilen reaksiyon 16°C'da 16 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Ertesi gün alınan ligasyon ürünleri Bölüm 3.21'de anlatılan transformasyon aşamasına tabi tutulmuştur. JM 109 *E.coli* kompetent hücrelerine Bölüm 3.2.21'de belirtilen transformasyon için *E.coli* kompetent hücre kaynağı JM 109 hücreleri -80°C'dan alınıp buz üstünde 10 dk bekletildikten sonra ligasyon ürünü 10 µl alınarak JM 109 kompetent hücreye eklenmiştir. Eklenen karışım buz üstünde 40 dk bekletilmiş devamında 42°C'daki su banyosu içinde 2 dk ısı şokuna uygulanmıştır. Ardından 2 dk daha buz üzerinde bekletilen karışıma 800 µl LB besiyeri eklenerek 3 saat 37 °C'da çalkalama etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 5000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılmış ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Dipte kalan pellet 50 µl LB besiyeri ile çözülerek ampisilinli petri kullanılarak ekim yapılmıştır. Ardından bir gece 37°C'daki inkübatörde bekletilmiştir. Ertesi gün oluşan koloniler fotoğraflanmıştır. Şekil 4.51'de fotoğraflanan sh ATOH 8 koloni turuncu renkle işaretlenerek gösterilmiştir. Ardından oluşan tek kolonilerden seçilip LB besiyerine ekim işlemi gerçekleştirilmiş ek olarak gliserol stok yapılmıştır.



Şekil 4.51: Transformasyon sonucu sh ATOH 8 koloni oluşumu

Transformasyon sonucunda oluşan koloniler LB broth sıvı besiyerine ekimi gerçekleştirilerek rekombinant kesim aşamasına geçilmiştir. Restriksiyon enzimleri kullanılarak rekombinant koloni olup olmadığı kontrol edilmiştir. Rekombinant kolonilerin belirlenmesi için EcoRI ve NcoI restriksiyon enzimleriyle kesim reaksiyonu Bölüm 3.2.27'deki anlatıldığı gibi kurulmuştur. Rekombinant koloni ATOH 8 için kurulan kesim reaksiyonuna göre EcoRI ve NcoI restiriksiyon enzimlerinden 1 µl, 10X Cut smart tampondan 2 µl, ATOH 8 plazmit DNA'sından 1 µg eklenmiş, ardından karışım 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Reaksiyon sonunda kesim ürünleri %0,8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek, Şekil 4.52'de gösterilmiştir.



Şekil 4.52: Rekombinant sh ATOH 8 kolonisinin EcoRI ve NcoI kullanılarak yapılan control kesim sonucunun agaroz jel görüntüsü siyah kesik çizgilere işaretli ATOH 8 koloni. En son kuyucuk kesimi yapılmayan koloni.

Elde edilen sonuçlarda 5kb ve 2kb'de 2 bant tespit edilerek, kolonilerin rekombinant olduğu doğrulanmıştır. Sonuç olarak rekombinant koloniler yaklaşık 2 kb'de bant verdiği ve doğru bir kesim gerçekleştiği tespit edilmiştir.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Eksozomlar birçok hücre tarafından salınan endositik kökenli küçük membran kesecikleridir. Eksozomlar başlangıçta neoplastik hücre hatlarından salınan 5'-nükleotidaz aktivitesi içeren mikropartiküller olarak tanımlanmış olup birkaç yıl sonra, diğer gruplar kültürlenmiş retikülositler tarafından endositik kökenli veziküllerin salgılandığını bildirmiştir (Théry vd. 2002). Eksozomların boyutları 30-150 nm çapında en küçük EV ve endosomal kökenlidir. Hücre-hücre iletişimde moleküler bilgi taşıyıcıları olarak rol almaları ve hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde yer alan kargo moleküllerini alıcı hücrelere aktarmaları EV'ler ile eksozomların ortak özellikleridir. Eksozomlar tüm vücut sıvılarında bulunmalarının yanı sıra, analizlerinin ucuz ve minimal invaziv olması, özgüllük ön koşulunu yerine getiren progenitör hücrelere özgü bilgi taşımalarıyla ideal biyobelirteçleri temsil etmektedir. Ek olarak, tüm vücut sıvılarında eksozomların her yerde bulunması, hücre dışı ortamlardaki stabilitelerini ortaya koymakta ve ayrıca endokrin iletişim potansiyellerini de açıklamaktadır. Bu veziküllere yönelik son zamanlarda klinik ilgi, tanı uygulamalarında ve yeni tedavi stratejilerinin bir parçası olarak potansiyel kullanımları sebebiyle ortaya çıkmıştır (Farooqi vd. 2017).

Neredeyse tüm hücre tiplerinden salgılanan eksozomlar, immünoloji alanının da ötesinde olan nörobiyolojiye, kök hücre ve tümör biyolojisine kadar uzanarak klinik uygulamalarda biyobelirteç veya terapötik araç olarak kullanımı kapsamlı bir araştırma alanı haline gelmiştir (Bobrie vd. 2011). iMKH'ler; kas, kemik, kıkırdak ve yağ gibi mezenkimal dokuların soy hatlarına farklılaşma yeteneğiyle uygun koşullar altında çok yönlülük göstermektedir. Genel olarak iMKH'lerin doku bakımı ve onarımı için yedek hücrel fraksiyon oluşturdukları ile ilgili çalışmalar da mevcuttur. (Dicker vd. 2005). Son zamanlarda iAMKH'ler kök hücre bankaları için potansiyel bir kaynak ve doku mühendisliği için ideal bir hücre ekim kaynağı haline gelmektedir. Yapılan çalışmalar ile iAMKH'lerin etik kaygılar veya transplantasyon sorunları olmaksızın yağ dokusundan kolayca elde edilebileceğini ve bu hücrelerin *in vitro* ortamda büyütülmesi için yüksek çoğalma oranlarına sahip olduğunu ve çok soylu farklılaşma kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir (Yang vd. 2011). MKH ile ilgili yapılan çalışmalarda, MKH'ler tarafından salgılanan biyoaktif moleküller, artrit ve karaciğer hasarı gibi hastalıklarda farklı terapötik etkilere sahip olduklarından, hücre tutunması ve farklılaşmasından ziyade ana tedavi stratejisi olarak kabul edilmektedir (Heo vd. 2019). Bol miktarda veri, iAMKH kaynaklı eksozomların; anjiyogenezde, immünomodülasyonda, iskemi-reperfüzyonun neden olduğu yaralanmanın

azaltılmasında ve diğer süreçlerde yer aldığını göstermiştir. Daha sonra miyokardiyal onarım, nöroproteksiyon ve nörotrofik etkiler, hepatik onarım, renal onarım, cilt onarımı, rejenerasyon gibi en son araştırma çalışmaları ile açıklanmaktadır (Fang vd. 2019). Birçok çalışma, yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden, kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ve göbek kordonu mezenkimal kök hücre kaynaklı ekzosomların yara iyileşmesini hızlandırabileceğini göstermiştir. Buna ek olarak adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre ekzosomlarının diyabetik cilt yaralarının iyileşmesini hızlandırmak için damarlanmayı teşvik ettiği düşünülmektedir (Fu vd. 2023). Konak hücrelerden işlevsel moleküller içeren ve hücreler arası iletişime katılan küçük hücre dışı veziküllerin içerisinde bulunan tüm biyoaktif maddeler arasında, mikroRNA'lar ve nükleik asitler yaygın olarak araştırılmaktadır. Bununla beraber eksozomal proteinlerde sinyal iletimi ve düzenlemesinde eşit derecede önemli bir rol oynamaktadır (Xing vd. 2020). Ekstraselüler ortama bırakılan eksozomlar buldukları mikroçevrenin hedef hücreleri tarafından alınıp idrar, anne sütü, kan, beyin-omurilik sıvısı gibi biyolojik sıvılar yoluyla uzak bölgelere taşınabilmektedir. Bu bağlamda MKH'lerden kaynaklı eksozomlar doku içinde homeostaziyi korumanın yanı sıra bulunduğu mikro ortamının hastalık veya yaralanma nedeniyle bozulduğunda dış uyaranlara yanıt verme yeteneğinde önemli bir role sahiptir. Böylece MSC'lerin dokuya özgü rejeneratif özelliklerinden sorumlu olan MKH'ler parakrin aktivitesinin düzenleyici mekanizmasına ışık tutabilmektedir (Asgarpour vd. 2020).

Kanserde, eksozomlar büyük ölçüde tümör ilerlemesinin promotörleri olarak tanımlansa da, eksozomların aynı zamanda antitümör işlevlerine sahip olması ve hastalığın ilerlemesini sınırlamada görev aldığı düşünülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar eksozomlar ve içeriklerinin, özellikle kanseri tespit etmede, tümör ilerlemesi ve metastazının potansiyel düzenleyici bir bilgi kaynağı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bununla beraber eksozomların organların patolojik olarak yeniden şekillenmesinde doku homeostazında normal fizyolojik işlevleri bilinmemekle beraber eksozomların karmaşıklığını ve işlevsel heterojenliğini belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Kalluri, 2016). MKH'lerin tüm bu özellikleri göz önüne alındığında tümör gelişimindeki rolleri de yoğun bir şekilde incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda MKH'lerin tümör gelişiminin başlatılması ve ilerlemesi üzerindeki etkilerinin hem pro-tümörijenik hem de anti-tümörijenik olduğu bildirilmiştir. Günümüzde bu paradoks, MKH'ler ve tümör hücreleri arasındaki etkileşimleri yöneten mekanizmaların az sayıda olmasından dolayı yeterince anlaşılammıştır. Bu mekanizmalar, MKH'lerin tümör hücreleri üzerinde doğrudan hücre-hücre etkileşimleri yoluyla veya

büyüme faktörleri ve sitokinler gibi çeşitli yayılabilir faktörleri salgılayarak etki gösterebildiği düşünülmektedir (Lin vd. 2013). MKH türevi eksozomlar (MKH-ekso), MKH'lerin kanser hücreleri üzerinde anti-tümör medyatörleri içeren MKH-ekso tümör büyümesini inhibe edebilmektedir. Bu yönüyle MKH- ekso'ların potansiyel terapötik araç olarak gösterilmektedir. Öte yandan, MKH-ekso, lipid çift katmanlı zarları nedeniyle, terapötik molekülleri bozunmadan koruyabilen uygun bir iletim vektörü sağlayarak terapötik araçlar olarak tümör baskılayıcı MKH-ekso'larının kullanılması, terapötik hedef olarak tümörjenik MKH-ekso'nun baskılanması ve terapötik taşıyıcılar olarak MKH-ekso'nun kullanılması olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Guo vd. 2022).

Literatür incelendiğinde eksozom izolasyonu, eksozomal içeriklerin doğru tespiti için en önemli aşamalardan biridir. Ultra santrifüjleme, boyut dışlama kromatografisi, ultrafiltrasyon, immünoafinite izolasyonu, mikroakışkan teknikleri ve polimerik çöktürme yöntemi dahil olmak üzere eksozomları izole etmek için birçok metodoloji kullanılmaktadır (Ding vd. 2018). Yapılan çalışmalar sonucunda eksozom izolasyonu için standart bir yöntem mevcut değildir. Bizim çalışmamızda ultra santrifüj ve Total Eksozom İzolasyon kiti (TEI) kullanarak eksozom miktarı ve verimliliğini karşılaştırarak diğer çalışmalara ışık tutması amaçlanmıştır. Ayrıca elde edilen eksozomların sitotoksik etkilerinin kolon kanseri hücreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bizim çalışmamızda iAMKH-ekso iki farklı yöntem kullanılarak izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemlerden ultrasantrifüj ve kit yönteminde elde edilen eksozomların protein içeriği hesaplanmıştır. Eksozom izolasyonu ile ilgili literatürde farklı birçok metod bulunmaktadır. Wang vd. 2015 yaptıkları bir çalışmada eksozomları saflaştırmak, analiz etmek ve eksozom araştırmaları için daha iyi ve ekonomik bir yöntem sağlamak amacıyla üç farklı yöntem kullanmışlardır. Bu yöntemler, yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjleme yöntemi, ultrasantrifüjleme ve ultrafiltrasyon yöntemi, ExoQuick™ Ekstraksiyon kiti yöntemi olarak belirlenmiştir. THP-1 makrofaj benzeri hücrelerinden elde edilen eksozom 3 yöntemle izole edilmiştir. Ardından yapılan Bradford analizi sonucunda yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüjleme metoduyla elde edilen protein miktarı 1.09 µg/µl, ultrasantrifüjleme metoduyla elde edilen protein miktarı 1.38 µg/µl ve ExoQuick™ Ekstraksiyon kiti metoduyla elde edilen protein miktarı 1.82 µg/µl olarak bulunmuştur (Wang vd. 2015). Çalışmamız kapsamında kullanılan ultrasantrifüj ve kit metoduyla elde edilen protein miktarlarının literatürdeki çalışmalarla uyumlu olduğu ve kit kullanılarak

eksozom izolasyonu yapılmasının elde edilen eksozom miktarı açısından daha avantajlı olduğu belirlenmiştir.

Eksozom izolasyonu ile ilgili Helwa vd. 2017 yapmış olduğu çalışmada ticari kitler ve ultrasantrifüj yöntemi ile eksozom izolasyon çalışması gerçekleştirmiştir. Elde edilen sonuçlarda farklı kitler ve ultrasantrifüj yöntemi değerlendirilmiştir. Farklı miktarlarda serum örneğinden elde edilen eksozom izolasyonu sonucunda ultrasantrifüj yönteminin kitlere göre nispeten daha büyük partiküllere sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak bu kadar yüksek hızlarda santrifüjleme, serum içindeki parçacıkların kirletici maddelerin ve diğer proteinlerle füzyonuna yol açabileceğine ve eksozomların fiziksel özelliklerini ve proteomik analizin duyarlılığını etkileyebileceği düşünülmektedir. Eksozom izolasyonunda ticari kitlerin kullanılması ise reaktiflerden gelen daha fazla partikül, PEG (polietilen glikol) bazlı içeriklerin eksozom dışındaki nanopartikülleri de çökeltebileceğinden düşük eksozom saflığıyla ilişkilendirilmiştir. Fakat hem kit hemde ultrasantrifüj yöntemi ile gerçekleştirilen izolasyonda serum örneklerindeki eksozom parçacıklarının çapı ve konsantrasyonu tutarlılık göstermiştir ki bu da farklı hacimlerde izolasyonu yapılan serum örneklerinde eksozom izolasyonu için uygulanabilir bir alternatif olduğunu göstermektedir. Ultrasantrifüj yöntemi uzun zamandır eksozom izolasyonu için geleneksel teknik olarak benimsense de deneyim ve bir ultra santrifüjün bulunmasını gerektirir. Ayrıca bu yöntem nispeten sıkıcı, zaman alıcı ve teknik açıdan hassastır (Helwa vd. 2017). Buradan yola çıkarak biz de çalışmamızda kit yöntemini tercih ederek deneysel çalışmalarımızı sürdürdük.

Eksozom izolasyonunda elde edilen eksozomların boyutu, konsantrasyonu, morfolojisi ve saflığı son derece önem taşımaktadır (Muller vd. 2014). Bununla beraber eksozomların karakterize edilmesi en önemli basamaklardan biridir. Çalışmamız kapsamında izole edilen iAMKH-ekso'ların karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İzole edilen eksozomlar karakterizasyon için TEM analizine tabi tutulmuştur. iAMKH-ekso'ların karakterizasyonu için gerçekleştirilen TEM analizinde iAMKH-ekso'lar için 100 KV, 150000 kat ve 100 KV, 50000 kat büyütme oranında küre benzeri yapılar gözlemlenmiştir. Bununla beraber iAMKH-ekso'ların ölçülen çap boyutları ölçülmüştür. Büyütme oranı 150000 olan görüntüdeki eksozomların çap boyutu 65.46 nm ve 64.83 nm olarak hesaplanmış, büyütme oranı 50000 olan görüntüdeki eksozomların çap uzunlukları 89.40, 85.52, 80.58 ve 64.44 nm olarak hesaplanmıştır. Rauschenberger vd. 2016 tarafından izole edilen eksozomların boyutlarının 50-100 nm aralığında olduğu bildirilmiş, bu durum tarafımızdan elde edilen

görüntülerdeki eksozomların boyut ve morfolojisinin literatürde yapılan çalışmalar ile benzer ve uyumlu olduğunu göstermektedir.

TEM analizlerinde en önemli aşamalardan biri olan numune hazırlama aşaması EV'lerin morfolojisinde değişikliklere neden olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda TEM kullanılarak gerçekleştirilen eksozom karakterizasyonunda elde edilen görüntülerde heterojen bir görüntü olduğu gözlemlenmiştir (Colombo vd. 2014) . Bazı durumlarda elektron ışınının biyolojik örnekler de zarar verebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. TEM ile incelenen eksozomlar karakteristik fincan benzeri yapılar gösterirken, kriyo-TEM ile incelenen dondurulmuş eksozomlar yuvarlak yapılar göstermektedir. Kriyo-TEM elektron ışınının neden olduğu hasarı önlemek için, farklı bir numune hazırlama protokolü kullandığından örneklerin ultra yapısal değişiklikler veya elementlerin yeniden dağılımı olmadığından dehidratasyon ve fiksasyon etkilerinden arındırılmıştır. Bu nedenle Kriyo-TEM, dehidratasyon kalıntıları olmadan nanopartikülleri ve proteinleri görselleştirmek için en iyi yöntem olarak kabul edilmektedir. Böylece membran yapıları ve lümenleri olan eksozomların görüntülerini yakalamak için de uygun olmaktadır (Gurunathan vd. 2019).

Gerçekleştirilen bu çalışmada iAMKH-ekso'ların karakterizasyon yöntemlerinden biri de Western blot aşamasıdır. Hücreler tarafından kültür ortamına salınan eksozom miktarının belirlenmesi için eksozomlardaki protein miktarı hesaplanmaktadır. Bilinen tüm hücrelerden eksozom salınımı gerçekleşirken, salınan eksozom miktarı hücre kaynağına bağlı olarak değişmektedir (Thery vd. 2006). Çalışmamızda eksozom izolasyonu sonrasında toplam protein miktarının belirlenmesi amacıyla Bradford analizi yapılmıştır. Ölçülen protein miktarı eksozom konsantrasyonu belirlemede bir yöntem olarak literatürde bildirilmiştir (TSMLT vd. 2018). Yapılan çalışmalar ile eksozom örneklerinin protein konsantrasyonu belirlenmiştir. Sonuç olarak Bradford tayini ile ölçülen protein miktarından eksozom verimine geçiş yapılmıştır.

Eksozomların sahip olduğu toplam protein içeriği Bradford protein analizi ile ölçülürken, plazma membranında yer alan eksozom yüzey belirteçlerinin tayininde Western blot yöntemi kullanılmaktadır (Paolini vd. 2016). Çalışmamızda CD9, CD63, CD81 ve HSP70 eksozom marker proteinleri western blot ile gösterilmiştir. Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinden izole edilen eksozomların fibroblastlardaki tip-1 kollajen metabolizmasındaki önemini belirttiği çalışma (Liu vd. 2018) ve diğer ilgili literatür çalışmaları (Cheng vd.

2018) ile uyumlu olacak şekilde elde ettiğimiz eksozomlardaki marker proteinlerin ekspresyonları western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuçlar beklenildiği gibi eksozomların karakterizasyonunda geçerli ve literatür ile uyumlu sonuç vermiştir.

iAMKH-ekso'ların karakterizasyon çalışmaları için yapılan immüno Floresans analizlerinde SW480 hücreleri üzerine eksozom uygulaması yapılmış ve CD81 ve CD63 antikorları kullanılarak görüntülenmiştir. Yuan vd.2020 tarafından yapılan çalışmada kolon kanseri hücre hatlarında CD81 ekspresyonu immüno Floresans analizleriyle gösterilmiştir. Aynı çalışmada hasta örneklerinden yapılan analizlerde CD81'in yüksek ekspresyonu ile kolon kanserinde kötü prognoz arasında ilişki belirlenmiştir (Yuan vd. 2020). Çalışmamızda hem eksozom uygulanmamış NT grubunda hem de PBS kontrol grubunda CD81 boyanması zayıf da olsa görüntülenmiş, eksozom uygulanan grupta ise boyanmanın daha yüksek olduğu görünmüştür. Bu durum hücrelerin etrafında eksozomların olduğu şeklinde yorumlanmıştır. CD63 içinde benzer sonuçlar bulunmuş ve eksozomların hücrelerin etrafında yer aldığı şeklinde yorumlanmıştır. İmmüno Floresans görüntüleme ile kantitatif olarak bir belirleme yapılamamıştır ancak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında eksozom uygulanan gruplardaki CD63 ve CD81 boyanma şiddetindeki artış eksozomların karakterizasyonunu sağlamıştır.

Çalışmamız kapsamında iki farklı yöntemle eksozomların izole edilmesi ve izole ettiğimiz eksozomların sitotoksik etkisinin belirlenmesi de amaçlanmıştır. Gerçekleştirilen çalışmada bu şartları sağlayan bir izolasyon prosedürü ve standardize edilmiş bir protein analizini gerektirmektedir. Bu amaçla literatürde eksozom izolasyonu ve miktar belirleme yolları farklılık göstermektedir. TSMLT vd. 2018 gerçekleştirdikleri çalışmada insan tükürüğünden eksozom izole etmişlerdir. Ardından elde edilen eksozomların SEM, NTA, Bradford ve western blot analizleri ile karakterize etmeye çalışmışlardır. Ayrıca eksozomal proteinin saklanması proteaz inhibitörlerin etkisini de değerlendirmişler. Elde ettikleri sonuçlarda gerçekleştirilen analizlerin genel olarak birbiriyle tutarlı olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle protein testinin tüm koşullar için eksozomal protein konsantrasyonu değerlerinde önemli bir fark göstermediğini belirtmişlerdir. SEM ve NTA sonuçlarında eksozomların kümelenmesi görülürken özellikle NTA analizinde izole edilen eksozomların konsantrasyonu hesaplanmıştır ancak eksozomların kümelenmesi nedeniyle, hücrelerin *in vitro* çalışmaları için protein testi sonucundan elde edilen eksozomal protein konsantrasyonunun kullanmanın daha güvenilir olduğunu belirtmişlerdir. Buradan yola çıkarak biz de çalışmamızda izolasyonunu gerçekleştirdiğimiz eksozomların miktarının

belirlenmesinde Bradford analizinden faydalanarak eksozomların farklı konsantrasyonlarda uygulamaları için protein miktarından yararlanılmıştır.

İzolasyonu yapılmış olan eksozomların, SW-480 kolon kanseri hücrelerinde MTT analizi gerçekleştirilmiştir. İzolasyonu yapılmış iAMKH-ekso'larda 476.92, 238.46, 105.30, 33.69, 12, 6, 3, 1.5, 0.75, 0.375 ve 0.187 ng/μl şeklinde seri eksozom uygulamaları yapılarak 24, 48 ve 72. saatlerde hücre canlılığı değerlendirilmiştir. iAMKH-ekso'ların kolon kanseri hücrelerinde hücre canlılığı ve sitotoksik etkisi belirlenmiştir. 24,48 ve 72. saatlerde MTT analizinde kontrol ve PBS gruplarının bazılarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğu, bazı gruplarda ise anlamlı bir fark bulunmadığı, sonucuna varılmıştır. Buna göre Şekil 4.16'daki 24. Saatte MTT analizi sonucunda eksozom uygulanmış tüm gruplar arasında hücre canlılığında herhangi bir sitotoksik etki görülmemiştir. Ayrıca kontrol, PBS ve eksozom doz uygulama gruplarının tamamında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Aynı şekilde eksozom doz uygulaması yapılan Şekil 4.17'deki 48. saat uygulamasında yapılan MTT analizi sonucunda kontrol ile 0.75 ng/μl; 6 ng/μl ile 0.75 ng/μl ve 0.75 ng/μl ile 0.375 ng/μl grupları arasında anlamlı bir fark bulunurken kontrol ve PBS gruplarında anlamlı bir fark görülmemiştir. Devamında 72. saatte kontrol, PBS ve eksozom grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmezken aynı zamanda sitotoksik dozlar olmadığı belirlenmiştir. 24, 48 ve 72. saatlerde gerçekleştirilen bu çalışmada kullanılan dozlar 476.92, 238.46, 105.30, 33.69, 12, 6, 3, 1.5, 0.75, 0.375 ve 0.187 ng/μl göz önüne alındığında tüm grup ve saatlerde bazı gruplar arasında anlamlı farklar olsa da eksozomların sitotoksik etkisi görülemediği. Bu çalışmayı takiben daha yüksek eksozom dozları kullanılarak çalışmaya devam edilmiştir. Buna göre 33.69 ng/μl ve 105.30 ng/μl olarak uygulanan iAMKH-ekso'ların SW-480 hücrelerinde gerçekleştirilen MTT analizi sonucunda 48. saatte hücre proliferasyonunda kayda değer bir artış veya azalma görülmemiş ve bu durumda istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlenmiştir. Bir sonraki MTT analizinde eksozom konsantrasyonu 238.46 ng/μl olarak uygulandığında sonuç alınmıştır. 48. saat MTT sonucuna göre kontrol ve PBS gruplarında birbiri ile anlamlı fark olmadığı belirlenmiş ancak 238.46 ng/μl konsantrasyonunda uygulanan eksozomlarda hücre canlılığında azalma meydana gelmiştir. Bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Son olarak gerçekleştirilen MTT çalışmasında eksozom konsantrasyonu 476.92 ng/μl olarak uygulanmıştır. Buradan elde edilen sonuçlarda ise eksozomların SW-480 hücrelerinin önemli bir kısmında sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Kontrol ve PBS gruplarının kendi içinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken eksozom konsantrasyonu

476.92 ng/μl uygulanmış hücrelerde kontrol ve PBS gruplarına göre birbirinden farklı olduğu gösterilmiştir.

Gomari vd. 2018 yaptıkları bir çalışmada mezenkimal stromal hücrelerden eksozom izolasyonu yaparak farklı kanser hücre hatlarında antitümör etkileri değerlendirilmiştir. Buna göre gerçekleştirilen MTT analizinde eksozom uygulaması yapılan ve eksozom ile doksorubisin uygulaması yapılan BT-474 hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Gomari vd. 2018) MTT analizinde 48. saatte kontrol ve PBS grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı, ancak kontrol grubu ve 0.75ng/μl grubu, 6 ng/μl ve 0.75 ng/μl grubu, 0.75 ng/μl ve 0.375 ng/μl gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilmiştir. Buna göre kontrol grubuyla 0.75 ng/μl grubu arasında anlamlı bir azalma ve 6 ng/μl grubu 0.75 ng/μl grubuna göre aralarında anlamlı bir artış görülürken, 0.75 ng/μl grubu 0.375 ng/μl grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Literatürde Kheradjoo vd. 2022 yapmış oldukları bir çalışmada MKH-ekso'ların retinoblastoma hücreleri üzerinde sitotoksik etkisini değerlendirmiştir. Elde edilen sonuçlarda eksozom uygulamasının hücre çoğalmasını engellediği belirtilmiştir. Aynı zamanda eksozom uygulamasının retinoblastoma hücrelerinde apoptozu indüklediği, microRNA-143 ekspresyonunun yukarı regülasyonu görülürken Bcl-2 ekspresyonunu da azalttığını göstermiştir (Kheradjoo vd. 2022).

Tek bir hücrenin bir koloniye dönüşme yeteneğine dayanan bir *in vitro* hücre hayatta kalma testi olan koloni formasyon testi ile hücre göçü ve hücre-hücre interaksiyonlarının belirlenmesinde kullanılan yara iyileşme (hücre migrasyon testi veya çizik testi) analizleri de gerçekleştirilmiştir. Buna göre bu analizler ile ilgili literatür incelendiğinde elde edilen sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmektedir. Xing vd. 2020 GARP knock-out ve knock-out olmayan mezenkimal kök hücre benzeri hücrelerde eksozom izolasyonu yapmış ve ardından fare kolon kanseri hücrelerindeki proliferasyon ve invazyondaki değişimlerini araştırmıştır. Çalışmada GARP knock-out ve knock-out olmayan mezenkimal kök hücre benzeri hücrelerden izole edilen eksozomlar 10 ng/ul olarak uygulanmıştır. GARP knock-out olmayan hücrelerden izole edilen eksozomların 10 ng/ul uygulamasının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunda anlamlı bir azalmaya neden olmadığı belirlenmiştir. Ancak aynı uygulama koloni formasyonunda anlamlı bir azalmaya sebep olmuştur (Xing vd. 2020). Yine iskemik sıçan kalbi ekstreleri ile ön işlem görmüş mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların anjiyogenezi teşvik ettiği gösterilen

çalışmada ise Huvec hücrelerine uygulanan 100 ng/ul eksozomun hücre proliferasyonunu arttırdığı MTT testiyle ve hücre migrasyonundaki artış da yara iyileşme testleri ile gösterilmiştir (Xiao vd. 2022).

Geçtiğimiz birkaç yıl içinde büyük ölçüde paralel cDNA dizilemesi veya RNA-sekanslama teknolojisi transkriptomların karakterizasyonu ve kantifikasyonunun belirlenmesinde birçok ilerleme kaydetmiştir. RNA-sekanslama yöntemlerindeki çeşitli gelişmeler sayesinde, RNA transkriptlerinin eksiksiz bir karakterizasyonu sağlanmıştır. Bu gelişmeler, transkripsiyon başlangıç yeri haritalamasında, iplik-spesifik ölçümlerde, gen füzyonu tespitinde, küçük RNA karakterizasyonunda ve alternatif ekleme olaylarının tespitinde iyileştirmeleri içermektedir. Devam eden bu gelişmeler özellikle doğrudan RNA dizilemesi ve çok küçük miktarda hücre materyalden RNA kantifikasyonuna izin veren yaklaşımlar gelecekte RNA-seq uygulaması için daha fazla ilerleme vaat etmektedir (Ozsolak ve Milos, 2010).

Eksozom uygulaması yapılmış kolon kanseri hücre hattı olan SW-480 hücrelerinde RNA sekans analizi yapılmıştır. RNA sekans analizi genlere ait özgün transkriptomik düzenlerin ortaya çıkarılarak referans transkriptomda ya da yeni transkriptler ve bunların farklı düzenlemeleri ile tanımlanmaya çalışılmaktadır. Çalışmamızda iAMKH-ekso'ların kolon kanseri hücre hattı üzerinde etkisini konsantrasyon ve zaman aralığı göz önünde bulundurularak uygun deney grubu oluşturulmuştur. Ardından eksozom uygulanmış deney grubu ve kontrol deney grubu belirlenmiş ve RNA sekans analizine tabi tutulmuştur. Bu analiz için SW-480 hücreleri 6 kuyucuklu doku kültürü plakalarına her kuyucukta eşit sayıda hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hem eksozom uygulanmış deney grubu hem de kontrol deney grubu 3 tekrarlı olacak şekilde deney dizaynı oluşturulmuştur. Eksozom uygulamasının ardından belirlenecek optimum zamanda hücreler tripsinizasyonla kaldırılmıştır. Elde edilen hücre pelletleri PBS ile yıkanarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu GeneJET RNA Purification Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RNA miktarı mikro plaka okuyucuda µDrop™ kullanılarak belirlenmiş ve RNA miktarı hesaplanmıştır. RNA saflığı, kalitesi ve alt birimleri RNA jel elektroforezi yapılarak kontrol edilmiştir. Ardından RNA sekans analizi için GenEra-ILLUMINA firmasından hizmet alımı yapılmıştır. RNA kalitesi ve miktarı belirlenen örnekler GenEra-ILLUMINA firmasına gönderilerek RNA sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Sekans analizinde Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus kiti ile kütüphane hazırlığı, illumina NovaSeq platformunda minimum 60 milyon okuma (2x150 bp) ile

dizileme ve temel ve ileri biyoinformatik analizleri (DEG analizi, yolak analizi, gen ontoloji analizi, gruplar arası istatistiksel analizler) içermektedir. RNA sekans analizi ile beraber biyoinformatik analizler de gerçekleştirilip başarıyla tamamlanmıştır. Elde edilen biyoinformatik veriler sonucunda belirlenen genler için primer dizaynı yapılmış ve real time PCR ile ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.

Azadani vd. 2024 yaptıkları çalışmada kronik hepatit C virüsü enfeksiyonu olan hastaların karaciğer örneklerinde RNA-sekans transkriptom profillemesi yapılmış, farklı şekilde ifade edilen genler (DEG'ler) tanımlanmıştır. Ardından örnekler biyolojik süreç, moleküler fonksiyon analizi ve KEGG yol zenginleştirme analizine tabi tutulmuştur. Ayrıca, RNA-seq verilerinin doğrulanması için yedi aday gen için qRT-PCR kullanılarak araştırılmıştır. Ekspresyon seviyesi önemli ölçüde farklı olan genleri taramak için, hasta grubunda altı gen qRT-PCR ile doğrulanmıştır. Bununla beraber genler arasında birkaç gende pozitif korelasyon olduğu bulunmuştur. Bu genlerin kronik hepatit C virüsü enfeksiyonu olan hastalara özgül veya ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda dizileme kütüphaneleri, poli-A içeren mRNA moleküllerinin saflaştırılması, mRNA'nın parçalanması, ters transkripsiyon, uç onarımı, tek bir 'A' bazının eklenmesi, adaptörlerin bağlanması ve son cDNA kütüphanesini oluşturmak için PCR ile saflaştırma ve zenginleştirmeyi içeren Illumina® TruSeq™ RNA Örnek Hazırlama Kılavuzu kullanılarak hazırlanmıştır. Ham dizileme okumalarının kalitesi FASTQC yazılımı ile kontrol edilmiş, QC'nin kalite puanı, GC içeriği ve adaptör içeriğinin değerlendirilmesini içermektedir. Kalite puanı 30'un altında, diziler arasında alışılmadık GC içeriği dağılımı ve her kütüphanede önemli miktarda adaptör bulunması gibi düşük kaliteli okumalar kırılmış ve kırılan okumaların kalitesi tekrar test edilmiştir. Azadani vd. 2024 tarafından gerçekleştirilen çalışmada karşılaştırılan gruplar arasında her transkriptin ifade seviyesindeki farkı belirlemek için Deseq2 paketi kullanılarak farklı gen ifadesi analizini gerçekleştirmişlerdir (Azadani vd. 2024).

RNA-sekanslamının yüksek maliyeti de göz ardı edilemeyecek problemlerden biridir. Mevcut tespit sistemlerinin her hücre tipini dizilemesi RNA-sekanslama maliyetini kabul edilebilir bir düzeye getirmiş olsa da, binlerce hücrenin analiz edilmesi gerekebileceğinden genel maliyet halen engelleyici durumdadır. Dizileme maliyetinin azaltılması, RNA-sekanslamının onkoloji ve diğer alanlarda uygulanmasını sağlayacaktır. Moleküler profilin in situ dizileme ve gerçek zamanlı dizileme kullanılarak zamansal ve mekansal ölçümü, tek

hücrelerden DNA-RNA'nın *in vivo* analizini geliştirmiştir. Ancak günümüzde bu yöntemlerin artırılmış hassasiyet, kapsam, erişilebilirlik ve maliyet azaltımına ihtiyacı vardır. Ek olarak uzun okuma RNA-sekans teknolojisi şablon genişlemesinin eksikliklerini giderir, yanlış pozitif oranını azaltır ve daha uzun, açıklama yapılmamış transkriptleri tanımlayabilir, böylece geleneksel kısa okuma yöntemlerinin sınırlamalarını ele almaktadır (Chang vd. 2024).

RNA sekans analizi sonucunda biyoinformatik çalışmalar ile 13 gen belirlenmiştir. usegalaxy.org programı kullanılarak biyoinformatik analizde down regüle ve up regüle genler belirlenmiştir. Bu aşama kısaca dosyaların ham verileri, FastQ ham data olarak sisteme yüklenmesiyle başlamıştır. Ardından okuma kırma ve filtreleme için çeşitli işleme adımı olan trimmomatic analiz yapılmıştır. Verilerin hızlı bir şekilde değerlendirilmesi için FastQC aşamasına geçilmiştir. Burada BAM, SAM gibi dosyalarda oluşabilecek sorunlarda hızlı bir bakış sağlamaktadır. Bu aşamayı takiben HISAT2 analizi yapılmıştır. HISAT2 dizileme okumalarını genoma hızlı ve hassas bir şekilde hizalanmasını sağlamak için grafik tabanlı bir veri yapısı sağlamaktadır. Daha sonra FeatureCounts adımına geçilerek yüksek verimli özelliklere okuma atama işlemlerini gerçekleştirmektedir. Devamında gen anotasyonu ve Limma adımı takip edilerek RNA-Seq verilerini hızlı, esnek ve güçlü analiz edilmesini sağlamaktadır. StringTie ve DESeq analizleri detranskriptomundaki (gen ekspresyonu) farklılıkları belirlemek için kullanılmıştır. Tüm adımlar izlendikten sonra 8'i down, 5'i up regüle genler belirlenerek NCBI veri tabanında accession numaraları ile doğrulanmıştır. Ardından genlerin mRNA seviyesindeki değişimleri değerlendirilmiştir. Bu genler ATOH8, EPS8L3, TOM1L1, MYOF, GLOD5, CA9 ve GMDS, SDF4, POLA2, ADAMTS17, MARCHF2, WDR76 ve ARAP2 olarak belirtilmiştir. Biyoinformatik analiz sonucunda up regüle genler ATOH8, EPS8L3, GMDS, POLA2, SDF4; down regüle genler ADAMTS17, ARAP2, CA9, GLOD5, MYOF, MARCHF2, WDR76, TOM1L1 tespit edilmiştir. Yapılan RT-PZR sonucunda pozitif korelasyongösteren genler ATOH8, EPS8L3, TOM1L1, MYOF, GLOD5, CA9 ve GMDS olurken, SDF4, POLA2, ADAMTS17, MARCHF2, WDR76 ve ARAP2 genlerde negatif korelasyon tespit edilmiştir. Up regüle genlerden istatistiksel olarak anlamlı fark olup öne çıkan genlerden ATOH8, EPS8L3 ve GMDS genleri belirlenmiştir. Bu genlerden shRNA primer tasarımı gerçekleştirilerek gen ifadesi susturma çalışmalarında kullanılmıştır. Susturma çalışmalarında tasarlanan sh oligolarının öncelikle bağlanma reaksiyonuna tabi tutulmasıyla ilk adım gerçekleştirilmiştir. Ardından lentiviral tabanlı pLKO.1-TRC vektörünün uygun restriksiyon enzimleri

kullanılarak kesilmesi ve kesilen vektörün geri kazanılması gerekmektedir. Geri kazanılan vektörün ardından sh oligolarıyla beraber ligasyon protokolü uygulanarak, susturmak istediğimiz hedef genin vektörün içerisine klonalama aşamasına gelinmiştir. Ligasyon sonucu vektöre uygun antibiyotik seçilerek yapılan transformasyonda petriye tek koloni ekimi yapılmıştır. Tek koloni ekimi yapılan ATOH8 geni için oluşan koloni sıvı besiyerine ekilerek çoğaltılmıştır. Gliserol stoğu yapılan örneğin plazmit DNA izolasyonu yapılarak elde edilen üründe rekombinant kesim yapılmıştır. Bunun için EcoRI ve NcoI ile kesimi yapılan örneklerin jel görüntüsünde kesilmiş vektör ve susturulacak hedef genimiz görüntülenmiş bantlar doğru yerde tespit edilmiştir. Sonuç olarak vektör içerisine sh ATOH8'un başarıyla klonlanması sağlanmıştır.

Gen ifadesi ve bunların düzenlenmesinin hastalıklarla ilişkili olup genlerde yanlış düzenlenmeyi daha iyi anlamak için insan genomunun açıklaması esastır. İlk adım olarak, protein kodlayan ve kodlamayan genlerin tam setini tanımlamak ve bunlardan hangilerinin belirli hücre tiplerinde aktif olarak transkripsiyona uğradığını tespit etmek ideal olacaktır (Lee ve Young, 2013). Belirli genlerin devre dışı bırakılmasını hedefleyen kısa saç tokası shRNA'lar, çok sayıda nörodejeneratif bozukluğu olan hastalıkların tedavisinde muazzam bir vaat sunmaktadır. Rohn vd. 2024 yapmış oldukları çalışmada indüklenmiş pluripotent kök hücrelerden farklılaştırılmış nöronlar kullanarak insan HTR2A genini devre dışı bırakmak için shRNA tasarlamışlardır. Buna göre 5HT-2A mRNA ve reseptör proteininin devre dışı bırakılmasının kendiliğinden elektriksel aktivitede bir azalmaya yol açtığını *in vivo*'da ise shRNA içeren AAV9 vektörlerinin intranazal olarak verilmesi, farelerde anksiyete benzeri davranışlarda bir azalmaya ve hem farelerde (%104) hem de sıçanlarda (%92) araçla tedavi edilen hayvanlara kıyasla hafızada önemli bir iyileşmeye yol açtığı belirlenmiştir (Rohn vd. 2024). Bu özelliğine ek olarak kan-beyin bariyerini aşabilen invaziv olmayan bir shRNA'nın çok sayıda nörolojik zihinsel bozukluk gibi diğer hastalıkların tedavisi için de geniş kapsamlı çıkarımlara sahip olduğu düşünülmektedir. Özellikle, HTR2A genini hedeflemek, kronik anksiyete ve yaşa bağlı bilişsel gerilemeyi tedavi etmek için yeni bir terapötik yaklaşım sunmaktadır. Ancak, shRNA ile oluşturulan moleküllerin belirli davranışların altında yatan nöronal devreleri değiştirip değiştiremeyeceği ise halen araştırma konusu olarak tartışılmaktadır (Rohn vd. 2024).

Hücresel gen ifadesi programlarının kontrolüne ilişkin son zamanlardaki öngörüler, hastalıkların gen ifadesinin yanlış düzenlenmesine ilişkin önemli bir etkiye sahip olmuştur. Kanser, otoimmünite, nörolojik bozukluklar, diyabet, kardiyovasküler hastalık ve obezite dahil olmak üzere birçok farklı hastalık ve sendromlar, düzenleyici diziler ve bu bölgelerle etkileşime giren transkripsiyon faktörleri, kofaktörler, kromatin düzenleyicileri ve kodlamayan RNA'lardaki mutasyonlardan kaynaklandığı ön görülmektedir (Lee ve Young, 2013).

Sonuç olarak, çalışmamızda iAMKH'leri kullanarak iki farklı eksozom izolasyon tekniği ile iAMKH-ekso'ları elde edilmiştir. Özellikle kit yönteminin yeterli eksozom izole etmek için kullanılmasının uygulanabilirliğini desteklemektedir. Böylece kit yönteminin ultrasantrifüj yöntemine göre nispeten daha avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır. Özetle bu çalışmada ticari kit sınırlı miktarda eksozom izolasyonuna izin verse de ultrasantrifüj yöntemine göre yeterli bir alternatif olduğu düşünülmektedir. Bu adımdan sonra eksozomların TEM, Western blot ve immünofloresan teknikleriyle karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda eksozomlar gerek boyut ve morfoloji gerekse eksozoma özgü antikolar kullanılarak başarıyla karakterize edilmiştir. Karakterizasyonu yapılan eksozomlarda SW-480 hücreleri üzerinde sitotoksiste çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Eksozomların hücreler üzerindeki etkisi zamana ve doza bağımlı olarak farklılık gösterdiği sonucuna varılmıştır. Devamında eksozomların SW-480 hücreleri üzerinde hücre migrasyonu ve koloni oluşturma kapasitesi değerlendirilmiş elde edilen sonuçların literatür ile uyumlu olduğu kanısına varılmıştır. Buradan yola çıkarak eksozomların hücreler üzerinde etkisinin daha detaylı incelenmesi amacıyla RNA sekanslama analizi gerçekleştirilmiştir. RNA sekanslama analizi ile yapılan biyoinformatik analizler sonucunda gen ekspresyonunu up regüle ve down regüle olarak etkileyen genlerden 13 tanesi istatistiksel olarak öne çıkan genler olarak belirlenmiş ve bu genlerin ekspresyonu yeniden primer tasarımı yapılarak RT-PZR düzeyinde incelenmiştir. Buradan elde edilen sonuçlarda biyoinformatik analizlerle korele olan ve olmayan sonuçlar karşılaştırılmış, özellikle istatistiksel olarak anlamlı 3 up regüle gen belirlenerek shRNA gen susuturma adımına geçilmiştir. Burada lentiviral tabanlı vektöre shRNA olarak tasaranan oligolar klonlanarak SW-480 hücreleri için ATOH8'in susturulacak hücre popülasyonu elde etmemizi sağlamış olacaktır. Tezimiz kapsamında gerçekleştirilen tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında, kanser çalışmalarında eksozomların kullanılabilirliğine destek olacağı aynı zamanda eksozomların işlevini

anlamaya ve eksozom çalışmalarını desteklemeye teşvik edecek örnek bir çalışma olacağına inanılmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Abd Elmageed, Z.Y., Yang, Y., Thomas, R., Ranjan, M., Mondal, D., Moroz, K., Fang, Z., Rezk, B.M., Moparty, K., Sikka, S.C., Sartor, O., Abdel-Mageed, A.B. "Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes." *Stem cells* 32.4 (2014): 983-997.
- Adessi, C., Matton, G., Ayala, G., Turcatti, G., Mermoud, J.J., Mayer, P., Kawashima E. (2000). Solid phase DNA amplification: Xharacterisation of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Res* 28, e87.
- Ahmed, A., Batool, K., & Bibi, A. (2017). Microbial β -glucosidase: sources, production and applications. *Journal of Applied Environmental Microbiology*, 5(1), 31-46.
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, 66(4), 683-691. doi:10.1136/gutjnl-2015-310912
- Asgarpour, K., Shojaei, Z., Amiri, F., Ai, J., Mahjoubin-Tehran, M., Ghasemi, F., Mirzaei, H. (2020). Exosomal microRNAs derived from mesenchymal stem cells: cell-to-cell messages. *Cell Communication and Signaling*, 18, 1-16.
- Aslan, C., Maralbashi, S., Salari, F., Kahroba, H., Sigaroodi, F., Kazemi, T., Kharaziha, P. (2019). Tumor-derived exosomes: Implication in angiogenesis and antiangiogenesis cancer therapy. *Journal of cellular physiology*.
- Azadani, H. N., Toosi, M. N., Shahm Mahmoodi, S., Nejati, A., Rahimi, H., Farahmand, M., Samimi-Rad, K. (2024). New insights into potential biomarkers and their roles in biological processes associated with hepatitis C-related liver cirrhosis by hepatic RNA-seq-based transcriptome profiling. *Virus Research*, 349, 199457.
- Bintu, L., Buchler, N. E., Garcia, H. G., Gerland, U., Hwa, T., Kondev, J., Phillips, R. (2005). Transcriptional regulation by the numbers: applications. *Current opinion in genetics development*, 15(2), 125-135.
- Blankenberg, D., Hillman-Jackson, J. (2014). Analysis of next-generation sequencing data using Galaxy. *Stem Cell Transcriptional Networks: Methods and Protocols*, 21-43.
- Blankenberg, D., Gordon, A., Von Kuster, G., Coraor, N., Taylor, J., Nekrutenko, A., Galaxy Team. (2010). Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics*, 26(14), 1783-1785.
- Blankenberg, D., Kuster, G. V., Coraor, N., Ananda, G., Lazarus, R., Mangan, M., Taylor, J. (2010). Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Current*

- protocols in molecular biology*, 89(1), 19-10.
- Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., Théry, C. (2011). Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*, 12(12), 1659-1668.
- Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Bozkurt, S. (2018). Eksozomlar ve Kanserdeki Rollerini. *Dicle Tıp Dergisi*, 45(2), 209-217.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492
- Cao, W., Chen, H. D., Yu, Y. W., Li, N., Chen, W. Q. (2021). Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020. *Chinese Medical Journal*, 134(7), 783.
- Chang, X., Zheng, Y., Xu, K. (2024). Single-cell RNA sequencing: technological progress and biomedical application in cancer research. *Molecular Biotechnology*, 66(7), 1497-1519.
- Chen, Y., He, Y., Wang, X., Lu, F., Gao, J. (2019). Adipose-derived mesenchymal stem cells exhibit tumor tropism and promote tumorsphere formation of breast cancer cells. *Oncology reports*, 41(4), 2126-2136.
- Cheng, X., Zhang, G., Zhang, L., Hu, Y., Zhang, K., Sun, X., Zhao, J. (2018). Mesenchymal stem cells deliver exogenous miR-21 via exosomes to inhibit nucleus pulposus cell apoptosis and reduce intervertebral disc degeneration. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(1), 261-276.
- Chernyshev, V. S., Rachamadugu, R., Tseng, Y. H., Belnap, D. M., Jia, Y., Branch, K. J., Skliar, M. (2015). Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(12), 3285-3301.
- Collins, F.S. Galas, D. (1993). A new five-year plan for the US Human Genome Project. *Science*, 262(5130), 43-46.
- Collins, F. S., McKusick, V. A. (2001). Implications of the Human Genome Project for medical science. *Jama*, 285(5), 540-544.
- Colombo, M., Raposo, G., Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*, 30(1), 255-289.
- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A.,

- Mortazavi, A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome biology*, 17(1), 1-19.
- Costa V, Angelini C, De Feis I, and Ciccodicola A. (2010). Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq. *J Biomed Biotechnol* 2010, 853916.
- Cullen, B. R. (2005). RNAi the natural way. *Nature genetics*, 37(11), 1163-1165.
- De Sena Brandine, G., Smith, A. D. (2019). Falco: high-speed FastQC emulation for quality control of sequencing data. *F1000Research*, 8, 1874.
- Deng, F., Miller, J. (2019). A review on protein markers of exosome from different bio-resources and the antibodies used for characterization. *Journal of histotechnology*, 1-14.
- Desvergne, B., Michalik, L., Wahli, W. (2006). Transcriptional regulation of metabolism. *Physiological reviews*, 86(2), 465-514.
- Dicker, A., Le Blanc, K., Åström, G., van Harmelen, V., Götherström, C., Blomqvist, L., ... Rydén, M. (2005). Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Experimental cell research*, 308(2), 283-290.
- Ding, M., Wang, C., Lu, X., Zhang, C., Zhou, Z., Chen, X., Zhang, C. (2018). Comparison of commercial exosome isolation kits for circulating exosomal microRNA profiling. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410, 3805-3814.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15–21.
- Donnarumma, E., Fiore, D., Nappa, M., Roscigno, G., Adamo, A., Iaboni, M., Condorelli, G. (2017). Cancer-associated fibroblasts release exosomal microRNAs that dictate an aggressive phenotype in breast cancer. *Oncotarget*, 8(12), 19592-19608.
- Doyle, L. M., Wang, M. Z. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8(7). doi:10.3390/cells8070727
- Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, and Vogelstein B. (2003). Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci*, 100, 8817–8822.
- Dulak, J., Szade, K., Szade, A., Nowak, W., Józkwicz, A. (2015). Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochimica Polonica*, 62(3).
- Dulbecco R: A turning point in cancer research: sequencing the human genome. *Science* 1984, 231:1055–1056.
- Fang, Y., Zhang, Y., Zhou, J., Cao, K. (2019). Adipose-derived mesenchymal stem cell

- exosomes: a novel pathway for tissues repair. *Cell and Tissue Banking*, 20, 153-161.
- Farooqi, A. A., Desai, N. N., Qureshi, M. Z., Librelotto, D. R. N., Gasparri, M. L., Bishayee, A., Daglia, M. (2018). Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds. *Biotechnology advances*, 36(1), 328-334.
- Fedurco, M., Romieu, A., Williams, S., Lawrence, I., Turcatti, G. (2006). BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic acids research*, 34(3), e22-e22.
- Fitzsimmons, R. E., Mazurek, M. S., Soos, A., Simmons, C. A. (2018). Mesenchymal stromal/stem cells in regenerative medicine and tissue engineering. *Stem cells international*, 2018(1), 8031718.
- Fu, S., Zhang, H., Li, X., Zhang, Q., Guo, C., Qiu, K., Liu, D. (2023). Exosomes derived from human amniotic mesenchymal stem cells facilitate diabetic wound healing by angiogenesis and enrich multiple lncRNAs. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 20(2), 295-308.
- Garagnani, P., Pirazzini, C., Franceschi, C. (2013). Colorectal cancer microenvironment: among nutrition, gut microbiota, inflammation and epigenetics. *Current pharmaceutical design*, 19(4), 765-778.
- Giardine, B., Riemer, C., Hardison, R. C., Burhans, R., Elnitski, L., Shah, P., Nekrutenko, A. (2005). Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome research*, 15(10), 1451-1455.
- Goecks, J., Nekrutenko, A., Taylor, J. (2010). Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome biology*, 11(8), 1-13.
- Gojanovich, A. D., Gimenez, M. C., Masone, D., Rodriguez, T. M., Dewey, R. A., Delgui, L. R., Uhart, M. (2018). Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells Handling Protocols. Lipid Droplets and Proteins Double-Staining. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 33.
- Golzio, M., Escoffre, J. M., Teissié, J. (2012). shRNA-mediated gene knockdown in skeletal muscle. *Myogenesis: Methods and Protocols*, 491-501.
- Gomari, H., Forouzandeh Moghadam, M., Soleimani, M. (2018). Targeted cancer therapy using engineered exosome as a natural drug delivery vehicle. *Oncotargets and therapy*, 5753-5762.
- Grady, W. M., Carethers, J. M. (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 135(4), 1079-1099.

- Green, E.D., Guyer, M.S. National Human Genome Research Institute: Charting a course for genomic medicine from base to bedside. *Nature* 2011, 470:204–213.
- Greening, D. W., Gopal, S. K., Xu, R., Simpson, R. J., Chen, W. (2015). Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *In Seminars in cell developmental biology*, 40, 72-81.
- Guo, G., Tan, Z., Liu, Y., Shi, F., She, J. (2022). The therapeutic potential of stem cell-derived exosomes in the ulcerative colitis and colorectal cancer. *Stem cell research therapy*, 13(1), 138.
- Gurunathan, S., Kang, M. H., Jeyaraj, M., Qasim, M., Kim, J. H. (2019). Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes. *Cells*, 8(4), 307.
- Gut, I. G. (2013). New sequencing technologies. *Clinical and Translational Oncology*, 15(11), 879-881.
- Haar, C. P., Hebbar, P., Wallace, G. C. t., Das, A., Vandergrift, W. A., Smith, J. A., Banik, N. L. (2012). Drug resistance in glioblastoma: a mini review. *Neurochem Res*, 37(6), 1192-1200.
- Haas, B. J., Zody, M. C. (2010). Advancing RNA-seq analysis. *Nature biotechnology*, 28(5), 421-423.
- Hamaguchi, Y., Zeng, C., Hamada, M. (2021). Impact of human gene annotations on RNA-seq differential expression analysis. *BMC genomics*, 22(1), 1-12.
- Hammond, W. A., Swaika, A., Mody, K. (2016). Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Therapeutic advances in medical oncology*, 8(1), 57-84.
- Hannafon, B. N., Ding, W.-Q. (2013). Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *International journal of molecular sciences*, 14(7), 14240-14269.
- He, S., Wurtzel, O., Singh, K., Froula, J. L., Yilmaz, S., Tringe, S. G., Hugenholtz, P. (2010). Validation of two ribosomal RNA removal methods for microbial metatranscriptomics. *Nature methods*, 7(10), 807-812.
- Helwa, I., Cai, J., Drewry, M. D., Zimmerman, A., Dinkins, M. B., Khaled, M. L., Liu, Y. (2017). A comparative study of serum exosome isolation using differential ultracentrifugation and three commercial reagents. *PloS one*, 12(1), e0170628.
- Heo, J. S., Choi, Y., Kim, H. O. (2019). Adipose-derived mesenchymal stem cells promote M2 macrophage phenotype through exosomes. *Stem cells international*, 2019(1), 7921760.

- Holmes, D. E., Chaudhuri, S. K., Nevin, K. P., Mehta, T., Methé, B. A., Liu, A., Lovley, D. R. (2006). Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobacter sulfurreducens*. *Environmental Microbiology*, 8(10), 1805-1815.
- Hood, L., Rowen, L. (2013). The human genome project: big science transforms biology and medicine. *Genome medicine*, 5(9), 1-8.
- Hrdlickova, R., Toloue, M., Tian, B. (2017). RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 8(1), e1364.
- Hu, L. I., Wang, J., Zhou, X., Xiong, Z., Zhao, J., Yu, R., Chen, L. (2016). Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Scientific reports*, 6(1), 32993.
- Islam, M. R., Akash, S., Rahman, M. M., Nowrin, F. T., Akter, T., Shohag, S., Simal-Gandara, J. (2022). Colon cancer and colorectal cancer: Prevention and treatment by potential natural products. *Chemico-biological interactions*, 368, 110170.
- Jacquier A. (2009). The complex eukaryotic transcriptome: Unexpected pervasive transcription and novel small RNAs. *Nat Rev Genet* 10, 833–844
- Ji, F., Sadreyev, R. I. (2018). RNA-seq: Basic bioinformatics analysis. *Current protocols in molecular biology*, 124(1), e68.
- Kahlert, C., Kalluri, R. (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *Journal of molecular medicine*, 91(4), 431-437.
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of exosomes in cancer. *The Journal of clinical investigation*, 126(4), 1208-1215.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141(1), 52-67.
- Kheradjo, H., Nouralishahi, A., Hoseinzade Firozabdi, M. S., Mohammadzadehsaliani, S. (2022). Mesenchymal stem/stromal (MSCs)-derived exosome inhibits retinoblastoma Y-79 cell line proliferation and induces their apoptosis. *Nanomedicine Research Journal*, 7(3), 264-269.
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature biotechnology*, 37(8), 907-915.
- King, H. W., Michael, M. Z., Gleadle, J. M. (2012). Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC cancer*, 12(1), 421.
- Kirstein, M. M., Lange, A., Prenzler, A., Manns, M. P., Kubicka, S., Vogel, A. (2014). Targeted therapies in metastatic colorectal cancer: a systematic review and

- assessment of currently available data. *Oncologist*, 19(11), 1156-1168.
- Korurer, E., Kenar, H., Doger, E., Karaoz, E. (2014). Production of a composite hyaluronic acid/gelatin blood plasma gel for hydrogel-based adipose tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(7), 2220-2229.
- Kowal, J., Tkach, M., Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Current opinion in cell biology*, 29, 116-125.
- Kukurba, K. R., Montgomery, S. B. (2015). RNA sequencing and analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(11), 84970.
- Lee, T. I., Young, R. A. (2013). Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*, 152(6), 1237-1251.
- Levy, S., Todd, S. C., Maecker, H. T. (1998). CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annual review of immunology*, 16(1), 89-109.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Durbin, R. (2009). 1000 Genome Project Data Processing SubgroupThe Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25, 2078–2079.
- Liao, Y., Smyth, G. K., Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923-930.
- Lin, R., Wang, S., Zhao, R. C. (2013). Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote migration through Wnt signaling pathway in a breast cancer cell model. *Molecular and cellular biochemistry*, 383, 13-20.
- Lin, W., Huang, L., Li, Y., Fang, B., Li, G., Chen, L., Xu, L. (2019). Mesenchymal stem cells and cancer: clinical challenges and opportunities. *BioMed research international*, 2019(1), 2820853.
- Lindberg, J., Lundeberg, J. (2010). The plasticity of the mammalian transcriptome. *Genomics* 95, 1–6.
- Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y.S. (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 68–73.
- Liu, S. V. (2008). iPS cells: a more critical review. *Stem cells and development*, 17(3), 391-398.
- Liu, X., Wang, S., Wu, S., Hao, Q., Li, Y., Guo, Z., Wang, W. (2018). Exosomes secreted by adipose-derived mesenchymal stem cells regulate type I collagen metabolism in fibroblasts from women with stress urinary incontinence. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 1-10.

- Maia, J., Caja, S., Strano Moraes, M. C., Couto, N., Costa-Silva, B. (2018). Exosome-based cell-cell communication in the tumor microenvironment. *Frontiers in cell and developmental biology*, 6, 18.
- Mansourabadi, A. H., Aghamajidi, A., Faraji, F., Taghizadeh, S., Mohamed Khosroshahi, L., Bahramkiya, M., Azimi, M. (2022). Mesenchymal stem cells-derived exosomes inhibit the expression of Aquaporin-5 and EGFR in HCT-116 human colorectal carcinoma cell line. *BMC Molecular and Cell Biology*, 23(1), 40.
- Maraba, O. (2015). *Catalysis of Atp Hydrolysis By The Chaperone Protein Hsp70*, (Yüksek lisans tezi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi veri tabanından erişildi (Tez No. 418987).
- Marguerat, S., Bähler, J. (2010). RNA-seq: from technology to biology. *Cellular and molecular life sciences*, 67(4), 569-579.
- Matsumura, T., Sugimachi, K., Iinuma, H., Takahashi, Y., Kurashige, J., Sawada, G., Takano, Y. (2015). Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer. *British journal of cancer*, 113(2), 275.
- Matys, V., Fricke, E., Geffers, R., Göbbling, E., Haubrock, M., Hehl, R., Wingender, E. (2003). Transfac®: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic acids research*, 31(1), 374-378.
- Maxson, S., Lopez, E. A., Yoo, D., Danilkovitch-Miagkova, A., LeRoux, M. A. (2012). Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem cells translational medicine*, 1(2), 142-149.
- Mazurov, D., Barbashova, L., Filatov, A. (2013). Tetraspanin protein CD 9 interacts with metalloprotease CD 10 and enhances its release via exosomes. *The FEBS journal*, 280(5), 1200-1213.
- Metzker ML. (2009). Sequencing technologies the next generation. *Nat Rev Genet* 11, 31–46.
- Miana, V. V., González, E. A. P. (2018). Adipose tissue stem cells in regenerative medicine. *Ecancermedicalscience*, 12.
- Mihov, D., Raja, E., Spiess, M. (2015). Chondroitin Sulfate Accelerates Trans-Golgi-to-Surface Transport of Proteoglycan Amyloid Precursor Protein. *Traffic*, 16(8), 853-870.
- Mitchell, M. D., Peiris, H. N., Kobayashi, M., Koh, Y. Q., Duncombe, G., Illanes, S. E., Salomon, C. (2015). Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 213(4), 173-181.

- Moraes, J. A., Encarnação, C., Franco, V. A., Xavier Botelho, L. G., Rodrigues, G. P., Ramos-Andrade, I., Renovato-Martins, M. (2021). Adipose tissue-derived extracellular vesicles and the tumor microenvironment: revisiting the hallmarks of cancer. *Cancers*, 13(13), 3328.
- Muller, L., Hong, C. S., Stolz, D. B., Watkins, S. C., Whiteside, T. L. (2014). Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *Journal of immunological methods*, 411, 55-65.
- Munro, M. J., Wickremesekera, S. K., Peng, L., Tan, S. T., Itinteang, T. (2018). Cancer stem cells in colorectal cancer: a review. *J Clin Pathol*, 71(2), 110-116.
- Murphy, M. E. (2013). The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*, 34(6), 1181-1188.
- Newman, R. E., Yoo, D., LeRoux, M. A., & Danilkovitch-Miagkova, A. (2009). Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. *Inflammation Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)(Discontinued)*, 8(2), 110-123.
- Nguyen, S. T., Van Pham, P. (2015). Stem cell technology and engineering for cancer treatment. *Biomedical Research and Therapy*, 2(06), 279-289.
- Ozsolak, F., Milos, P. M. (2011). RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature reviews genetics*, 12(2), 87-98.
- Paolini, L., Zendrini, A., Noto, G. D., Busatto, S., Lottini, E., Radeghieri, A., Bergese, P. (2016). Residual matrix from different separation techniques impacts exosome biological activity. *Scientific reports*, 6(1), 23550.
- Patharia, P., Sethy, P. K., Nanthaamornphong, A. (2024). Advancements and Challenges in the Image-Based Diagnosis of Lung and Colon Cancer: A Comprehensive Review. *Cancer Informatics*, 23, 11769351241290608.
- Patrikoski, M., Mannerström, B., Miettinen, S. (2019). Perspectives for Clinical Translation of Adipose Stromal/Stem Cells. *Stem cells international*, 2019.
- Peddareddigari, V. G., Wang, D., DuBois, R. N. (2010). The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis. *Cancer microenvironment*, 3(1), 149-166.
- Pillai, R. S. (2005). MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?. *Rna*, 11(12), 1753-1761.
- Pols, M. S., Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental cell research*, 315(9), 1584-1592.
- Qian, X., Ba, Y., Zhuang, Q., Zhong, G. (2014). RNA-Seq technology and its application in fish transcriptomics. *Omics: a journal of integrative biology*, 18(2), 98-110.

- Rahib, L., Wehner, M. R., Matrisian, L. M., Nead, K. T. (2021). Estimated Projection of US Cancer Incidence and Death to 2040. *JAMA network open*, 4(4), 214708-214708.
- Rao, D. D., Maples, P. B., Senzer, N., Kumar, P., Wang, Z., Pappen, B. O., Nemunaitis, J. (2010). Enhanced target gene knockdown by a bifunctional shRNA: a novel approach of RNA interference. *Cancer gene therapy*, 17(11), 780-791.
- Rao, D. D., Vorhies, J. S., Senzer, N., Nemunaitis, J. (2009). siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Advanced drug delivery reviews*, 61(9), 746-759.
- Raposo, E., Bertozzi, N. (2017). How to isolate a ready-to-use adipose-derived stem cells pellet for clinical application. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 21(18), 4252-4260.
- Raucher, D. (2019). Tumor targeting peptides: novel therapeutic strategies in glioblastoma. *Curr Opin Pharmacol*, 47, 14-19.
- Rauschenberger, L., Staar, D., Thom, K., Scharf, C., Venz, S., Homuth, G., Stope, M. B. (2016). Exosomal particles secreted by prostate cancer cells are potent mRNA and protein vehicles for the interference of tumor and tumor environment. *The Prostate*, 76(4), 409-424.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105.
- Reza, A. M. M. T., Choi, Y. J., Yasuda, H., Kim, J. H. (2016). Human adipose mesenchymal stem cell-derived exosomal-miRNAs are critical factors for inducing anti-proliferation signalling to A2780 and SKOV-3 ovarian cancer cells. *Scientific reports*, 6(1), 38498.
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D. I., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic acids research*, 43(7), e47-e47.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140.
- Rodriguez, A. M., Elabd, C., Amri, E. Z., Ailhaud, G., Dani, C. (2005). The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*, 87(1), 125-128.
- Rohn, T. T., Radin, D., Brandmeyer, T., Seidler, P. G., Linder, B. J., Lytle, T., Macciardi, F. (2024). Intranasal delivery of shRNA to knockdown the 5HT-2A receptor enhances memory and alleviates anxiety. *Translational Psychiatry*, 14(1), 154.
- Roma-Rodrigues, C., Fernandes, A. R., Baptista, P. V. (2014). Exosome in tumour microenvironment: overview of the crosstalk between normal and cancer cells.

- BioMed research international*, 2014.
- Rosenzweig, R., Nillegoda, N. B., Mayer, M. P., Bukau, B. (2019). The Hsp70 chaperone network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(11), 665-680.
- Salomon, C., Torres, M. J., Kobayashi, M., Scholz-Romero, K., Sobrevia, L., Dobierzewska, A., Rice, G. E. (2014). A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. *PloS one*, 9(6), e98667.
- Shabbir, A., Cox, A., Rodriguez-Menocal, L., Salgado, M., Badiavas, E. V. (2015). Mesenchymal stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis *in vitro*. *Stem cells and development*, 24(14), 1635-1647.
- Shapiro E, Biezuner T, and Linnarsson S. (2013). Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize wholeorganism science. *Nat Rev Genet* 14, 618–630.
- Shelke, G. V., Yin, Y., Jang, S. C., Lässer, C., Wennmalm, S., Hoffmann, H. J., Lötvall, J. (2019). Endosomal signalling via exosome surface TGFβ-1. *Journal of extracellular vesicles*, 8(1), 1650458.
- Shojaei, S., Hashemi, S. M., Ghanbarian, H., Salehi, M., Mohammadi-Yeganeh, S. (2019). Effect of mesenchymal stem cells-derived exosomes on tumor microenvironment: tumor progression versus tumor suppression. *Journal of cellular physiology*, 234(4), 3394-3409.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., Jemal, A. (2021). Cancer statistics, 2021. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(1), 7-33.
- Silva, J. M., Li, M. Z., Chang, K., Ge, W., Golding, M. C., Rickles, R. J., Hannon, G. J. (2005). Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nature genetics*, 37(11), 1281-1288.
- Singer, N. G., Caplan, A. I. (2011). Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6, 457-478.
- Soekmadji, C., Riches, J. D., Russell, P. J., Ruelcke, J. E., McPherson, S., Wang, C., Nelson, C. C. (2017). Modulation of paracrine signaling by CD9 positive small extracellular vesicles mediates cellular growth of androgen deprived prostate cancer. *Oncotarget*, 8(32), 52237.
- Song Y, Pan G, Chen L, Ma S, Zeng T, Man Chan TH, Li L, Lian Q, Chow R, Cai X, Li Y, Li Y, Liu M, Li Y, Zhu Y, Wong N, Yuan YF, Pei D, Guan XY (2015). Loss of ATOH8 Increases Stem Cell Features of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Gastroenterology*. 149(4):1068-81.e5.

- Sundararajan, V., Sarkar, F. H., Ramasamy, T. S. (2018). The versatile role of exosomes in cancer progression: diagnostic and therapeutic implications. *Cellular Oncology*, 41(3), 223-252.
- Szatanek, R., Baj-Krzyworzeka, M., Zimoch, J., Lekka, M., Siedlar, M., Baran, J. (2017). The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1153.
- Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676.
- Tang F, Barbacioru C, Wang Y. (2009). mRNA-Seq wholetranscriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* 6, 377–382.
- Taxman, D. J., Moore, C. B., Guthrie, E. H., Huang, M. T. H. (2010). Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *RNA Therapeutics: Function, Design, and Delivery*, 139-156.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology*, 30(1), 3-22.
- Théry, C., Zitvogel, L., Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews immunology*, 2(8), 569-579.
- Tonini, V., Zanni, M. (2024). Why is early detection of colon cancer still not possible in 2023?. *World Journal of Gastroenterology*, 30(3), 211.
- Trédan, O., Galmarini, C. M., Patel, K., Tannock, I. F. (2007). Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(19), 1441-1454.
- TSMLT, K., Berahim, Z., SWN, S. (2018). Establishment of the collection, storage and preservation methods and their influence on stability of human salivary exosome. *J Biomed Clin Sci*, 3(1), 44-52.
- Van Giau, V., An, S. S. A. (2016). Emergence of exosomal miRNAs as a diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. *Journal of the neurological sciences*, 360, 141-152.
- Verhagen, M. P., Schmitt, M., Fodde, R. (2024). Western lifestyle, metaflammation and the cell of origin of colon cancer. *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology*, 21(9), 603-604.
- Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Madrid, F., & Mittelbrunn, M. (2014, October). Sorting it out: regulation of exosome loading. *In*

- Seminars in cancer biology*, 28, 3-13.
- Wang Z, Gerstein M, and Snyder M. (2009). RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10, 57–63.
- Wang, J., Yao, Y., Wu, J., Li, G. (2015). Identification and analysis of exosomes secreted from macrophages extracted by different methods. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(6), 6135.
- Wang, M., Zhou, L., Yu, F., Zhang, Y., Li, P., Wang, K. (2019). The functional roles of exosomal long non-coding RNAs in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(11), 2059-2076.
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10(1), 57-63.
- Wang, Z., von Au, A., Schnölzer, M., Hackert, T., Zöller, M. (2016). CD44v6-competent tumor exosomes promote motility, invasion and cancer-initiating cell marker expression in pancreatic and colorectal cancer cells. *Oncotarget*, 7(34), 55409.
- Wang, H., Wang, F., Tao, X., Cheng, H. (2012). Ammonia-containing dimethyl sulfoxide: An improved solvent for the dissolution of formazan crystals in the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. *Analytical Biochemistry*, 421(1), 324-326.
- Wilhelm BT, and Landry JR. (2009). RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNAsequencing. *Methods* 48, 249–257.
- Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Théry, C., Masurier, C., Tursz, T. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature medicine*, 7(3), 297.
- Wu, S., Wang, Y., Yuan, Z., Wang, S., Du, H., Liu, X., Zhu, X. (2019). Human adipose-derived mesenchymal stem cells promote breast cancer MCF7 cell epithelial-mesenchymal transition by cross interacting with the TGF- β /Smad and PI3K/AKT signaling pathways. *Molecular medicine reports*, 19(1), 177-186.
- Xiao, Y., Zhang, Y., Li, Y., Peng, N., Liu, Q., Qiu, D., Yu, G. (2022). Exosomes derived from mesenchymal stem cells pretreated with ischemic rat heart extracts promote angiogenesis via the delivery of DMBT1. *Cell transplantation*, 31.
- Xing, H., Liang, C., Xu, X., Sun, H., Ma, X., Jiang, Z. (2020). Mesenchymal stroma/stem-like cells of GARP knockdown inhibits cell proliferation and invasion of mouse colon cancer cells (MC38) through exosomes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(23), 13984-13990.

- Xing, X., Han, S., Cheng, G., Ni, Y., Li, Z., Li, Z. (2020). Proteomic analysis of exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells: a novel therapeutic strategy for tissue injury. *BioMed research international*, 2020(1), 6094562.
- Yang, X. F., He, X., He, J., Zhang, L. H., Su, X. J., Dong, Z. Y., Li, Y. L. (2011). High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Journal of biomedical science*, 18, 1-9.
- Yu, X., Harris, S. L., Levine, A. J. (2006). The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer research*, 66(9), 4795-4801.
- Yuan, H., Zhao, J., Yang, Y., Wei, R., Zhu, L., Wang, J., Gu, Y. (2024). SHP-2 Interacts with CD81 and Regulates the Malignant Evolution of Colorectal Cancer by Inhibiting Epithelial–Mesenchymal Transition. *Cancer Management and Research*, 16, 115-116.
- Zeng, Y., Cai, X., Cullen, B. R. (2005). Use of RNA polymerase II to transcribe artificial microRNAs. In *Methods in enzymology* (Vol. 392, pp. 371-380). Academic Press.
- Zerbino, D. R., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M. R., Barrell, D., Bhai, J., Gil, L. (2017). Ensembl 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), 754–761.
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., Tang, W. H. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell bioscience*, 9(1), 19.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Burcu Efe DAŞKAN

Doğum tarihi ve yeri:

e-posta :

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Doktora	Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü/Moleküler Onkoloji	2018-2025
Yüksek Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı	2015-2018
Lisans	Fırat Üniversitesi/Mühendislik Fakültesi/Biyomühendislik Bölümü	2010-2014

Yüksek Lisans ve Doktora Tezleri

Yüksek Lisans Tezi

“Sinir Doku Mühendisliği İçin Hücrelerinden Arındırılmış Sığır Omuriliğinin İnsan Adipoz Mezenkimal Kök Hücrelerle Etkileşimlerinin İncelenmesi ” Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı.

Doktora Tezi

“İnsan Adipoz Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozomların Kolon Kanseri Hücresi Üzerindeki Transkriptomik Ve Hücrel Etkilerinin Belirlenmesi” Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü-Biyoloji Bölümü, Moleküler Onkoloji Alt Alanı.

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

Arslan, Y. E., Efe, B., Sezgin Arslan, T. (2019). A novel method for constructing an acellular 3D biomatrix from bovine spinal cord for neural tissue engineering applications. *Biotechnology Progress*, 35(4), e2814.

Arslan, Y. E., Efe, B., Arslan, T. S. (2019). A Novel Protocol to Generate Decellularized Bovine Spinal Cord Extracellular Matrix-based Scaffolds (3D-dCBS). *Bio-protocol*, 9(19), e3380-e3380.

Yıldırım, H., Daşkan, B. E., Aksöz, E., Şen, F., Çelebi, M. (2023). Regional expression differences of SERT and TSPAN8 in hippocampus, cerebellum and cortex of wild-type young, adult and middle-aged rats. *Gene*, 885, 147706.

Yildirim, H., Aksöz, E., Efe Daşkan, B., Şen, F., & Çelebi, M. (2024). Changes in Paraoxonase, β -Glucosidase, and Carbonic Anhydrase Enzymes Related to Age and Scopolamine-Induced Memory Impairment in Rats. *Applied Sciences*, 14(6), 2582.

Yildirim, H., Daşkan, B. E. (2024). Cytotoxic and anti-metastatic effects of Hypericum perforatum olive oil extract in colorectal cancer cells and human bone marrow derived stem cells. *Natural Product Research*, 38(23), 4166-4174.

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

Efe, B., Galata, Y. F., Aslan, Y. E. (2018). Assessment of the cytotoxicity of Melia azedarach L. extracts on human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 46(1), 121-128.

Efe Daskan, B., Yıldırım, H. (basımda). "Exosome isolation by ultracentrifugation and precipitation methods from human adipose-derived mesenchymal stem cells and the effects on human colon cancer cell line.", *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, basımda. [Tezden türetilmiştir].

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Özet Olarak Basılan Bildiriler

Efe B., Galata Y.F., Arslan Y.E., Yener A.Ü., "The cytotoxicity evaluation of Melia azedarach Extracts on Human Adipose Mesenchymal Stem Cells", *International Congress on Fundamental and Applied Sciences*, İSTANBUL, TÜRKİYE, 22-26 Ağustos 2016.

Efe B., Yıldırım H., " The Effects of Hypericum Perforatum L. Olive Oil Extract on Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells", *Izmir Demokrasi University International Congress of Health Sciences 2020*, İZMİR, TÜRKİYE, 20-21 Haziran 2020.

Yuldaşeva F., Efe B., Yıldırım H., " Comparison Of Stem Cell-Like Cell Potentials Of Different Cancer Cell Lines", *Izmir Demokrasi University International Congress of Health Sciences 2020*, İZMİR, TÜRKİYE, 20-21 Haziran 2020.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Özet Olarak Basılan Bildiriler

Tok K., Efe B., Yıldırım H. " Evaluation of The Effects of Wheat Grass (Triticum aestivum L.) Extract on Prostate and Liver Cancer Cell Lines"9. *Ulusal Molbiotech Kongresi*, 2020, Online.

BURSLAR ve PROJELER

BİDEB Destekleri

2211-C Doktora Öncelikli Alanlar Bursiyeri

Öncelikli Alan: Biyoteknolojik İlaç Teknolojileri (2020- 2023)

100/2000 YÖK DOKTORA BURSİYERİ

Alt Alanı: Moleküler Onkoloji (2018- 2022).

TÜBİTAK Proje Bilgileri

116S467, Subventriküler Bölge (Svb) Kaynaklı Eksozomların İzolasyonu ve Mezenkimal Kök Hücreleri Çip-Üstü Nöron-Benzeri Hücrelere Farklılaştırma Potansiyelinin İncelenmesi, 1001- Arastırma, Burslu, ARDEB, SBAG- Sağlık Bilimleri Arastırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 12.10.2017 -31.01.2018, Proje Başlangıç/Bitis Tarihleri: 15.09.2017-15.06.2020.

Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)

Melia azedarach L. Ekstraktlarının Hazırlanması ve İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Davranışları Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi. Fen ve Mühendislik Araştırma Projesi. Proje Numarası: FBA-2015-549. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi.

İnsan Adipoz Mezenkimal Kök Hücrelerinden İzole Edilen Eksozomların Kolon Kanseri Hücrelerinin Tümörojenik Özelliklerine Etkisi. Fen ve Mühendislik Araştırma Projesi. Proje Numarası: 2023/159. Balıkesir Üniversitesi.