ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

İNSAN KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI-MEZENKİMAL KÖK HÜCRE EKSOZOMLARININ KOLOREKTAL KANSER (KRK) HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Öznur Coşkun

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Kâmil Can Akçalı

Ocak

2022

ÖZET

Doktora Tezi

İnsan Kemik İliği Kaynaklı-Mezenkimal Kök Hücre Eksozomlarının Kolorektal Kanser (KRK) Hücre Hatları Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Öznur Coşkun

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Kâmil Can Akçalı

Kanser; insidansı ve mortalitesinin yüksek olması nedeniyle dünyanın en önemli halk sağlığı problemlerinden biridir. Kanserin progresyonu ve yayılımına etki eden faktörleri saptamak, kanser araştırmalarının en önemli hedeflerinin başında gelmektedir. Bu doktora tezinin amacı, dünyada en sık görülen kanser tiplerinden biri olan kolorektal kanserde (KRK) Mezenkimal Kök Hücre (MKH) eksozomlarının progresyon ve yayılıma nasıl etki ettiğinin saptanmasıdır.

Bu tez çalışmasında, insan kemik iliği kaynaklı MKH (primer ve hücre hattı) eksozomları izole edilip karakterize edilmiştir. MKH eksozomları kolorektal kanser hücreleri içinde görüntülenmiş ve ardından HT29 hücre hatlarına uygulanarak yara iyileşmesi deneyi, MTT deneyi ve invazyon-metastaz deneyi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra biyoinformatik analizle KRK'da farklı eksprese olan ve EMT ile ilişkilendirilmiş miRNA'lar tespit edilmiştir. Eksozom uygulaması yapılmış HT29 hücrelerinde, EMT-transkripsiyon faktörlerinin ve EMT ilişkili miRNA'ların ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Daha sonra HT29 hücreleri miR126 mimikleri ile transfekte edilmiş ve transfeksiyon sonrası HT29 hücrelerinin yara iyileşmesi ve MTT deneyi ile EMT-transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon düzeyleri saptanmıştır. Son olarak miR126'nın yolak analizi yapılmış ve kolorektal kanserle bağlantılı muhtemel hedeflerine ulaşılmıştır.

Bu tez çalışması ile, Ki-MKH eksozomlarının kolorektal kanser progresyonunu artırdığı ve ayrıca invazyon ve metastaz yeteneğini artırıcı yönde etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu etki, yapılan moleküler deneyler ile desteklenmiştir. Çalışmanın devamında, bu etkiye sebep olan eksozom kargolarına odaklanılması planlanmaktadır.

2022, 181 sayfa

Anahtar kelimeler: Mezenkimal kök hücre, kolorektal kanser, eksozom, ekstraselüler veziküller, hücresiz tedavi, miRNA

ABSTRACT

PhD Thesis

Investigation of The Effect of Human Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cell (BM-MSC)-Derived Exosomes on Colorectal Cancer (CRC) Cell Lines

Öznur Coşkun

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Kâmil Can Akçalı

Cancer is one of the most important public health problems in the world due to its high incidence and mortality rates. Determining the factors affecting the progression and metastasis of cancer is one of the most important targets of cancer research. The aim of this doctoral thesis is to determine how Mesenchymal Stem Cell (MSC) exosomes affect progression and spread in colorectal cancer, which is one of the most common types of cancer in the world.

In the thesis, bone marrow-derived mesenchymal stem cell (cell line) exosomes will be isolated and characterized and applied to HT29 cell lines to perform wound healing assay, MTT assay and invasion-metastasis assay.

In this thesis, bone marrow-derived mesenchymal stem cell (cell line) exosomes were isolated and characterized. MSC exosomes were viewed inside colorectal cancer cells and then applied to HT29 cell lines to perform wound healing assay, MTT assay and invasion-metastasis assay. Later, in the meta-analysis, different expressed miRNAs in CRC and associated with EMT were detected. Expression levels of EMT-transcription factors and EMT-related miRNAs were investigated in exosome-treated HT29 cells. HT29 cells were then transfected with miR126 mimics. Wound healing assay, MTT assay and expression levels of EMT-transcription factors were determined in the post-transfection HT29 cells.

The outcomes of this thesis study showed that BM-MSC exosomes increase colorectal cancer progression and increase the invasion and metastasis ability of cells. This effect of BM-MSC exosomes was supported by molecular experiments. In the continuation of the study, it is planned to focus on the exosome cargos that cause this effect.

2022, 181 pages

Keywords: Mezenchymal stem cell, colorectal cancer, exosome, extraceluler vesicles, cell-free therapy, microRNA

TEŞEKKÜR

Mesleğimde ustalaşmak için başladığım doktora eğitimimin sonuna gelmiş bulunuyorum. Engebeli bir arazide keşfe çıkmış gibi bazen heyecanlı ve umutlu, bazen yolun sonunu bulamayacak gibi umutsuz ilerlediğim bu yolun sonunda hayata ve bilime bakış açım değişti. Başıma ne gelirse gelsin yaptığım işten her zaman keyif alarak ilerledim ve doğru yolda olduğuma inandım.

Öncelikle doktora eğitimimin ortalarında tanıştığım, bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, kendimi geliştirmem için fırsatlar sunan, iyi bir bilim insanı olmam için engin bilgilerini esirgemeyen çok değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI'ya,Tezimin gelişim sürecinde sağladıkları olumlu katkılar ve benden esirgemedikleri engin tecrübeleri için saygıdeğer TİK üyesi hocalarım Prof. Dr. Hakan AKBULUT'a ve Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ SEVGİLİ'ye,

Laboratuvar çalışmalarımı yürütürken tüm imkanlarından faydalanmamı sağladıkları için başta Enstitü müdürümüz Prof. Dr. Günhan GÜRMAN olmak üzere tüm Kök Hücre Enstitüsü idarecilerine ve çalışanlarına,

Labaratuvar çalışmalarımda ne zaman sıkıntıya düşsem kapısını çaldığım, her zaman güler yüzü ve samimiyeti ile yardım elini uzatan sevgili çalışma arkadaşım Dr. Öğr. Gör. Ceylan Verda BİTİRİM'e ve biricik dostum Dr. Öğr. Gör. Cansu ÖZDEMİR SAKA'ya,

Biyonformatik çalışmalarında verdiği destek ve içten, samimi arkadaşlığı için Mol. Bio. Dünya AYDOS'a,

Beraber çalışmaktan keyif aldığım, her zaman manevi desteğini üzerimde hissettiğim çok sevgili çalışma ve oda arkadaşım Blm. Uzm. Meltem BAY'a,

Doktora tez çalışmama finansal katkılarından dolayı Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine,

Bu hayatta sahip olduğum en değerli varlıklar olan AİLEME,

Öncelikle bana dürüstlüğü, çalışkanlığı ve her koşulda iyiliği öğreten canım annem Arzu ERDOĞAN'a, doktoramın ortalarında aramızdan ayrılan canım babam Rüştü ERDOĞAN'a (beni mutlaka duyduğunu hissediyorum),

Her zaman, her koşulda bana sonsuz destek veren, bitip tükenmek bilmeyen sabrı ve sevgisi ile hayatımı kolaylaştıran ve güzelleştiren sevgili eşim Ümit Güven COŞKUN'a,

Biri doktoramın başında, biri sonunda dünyaya gelen ve bana dünyadaki en mükemmel duygunun annelik olduğunu anlamamı sağlayan biricik oğullarım Ömer Faruk COŞKUN ve Mete COŞKUN'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım…

Düşe kalka ilerlediğim ve hayatımın dokuz yılını içine alan doktora sürecimde öğrendiğim şu ki; yaşamımızı değerli kılan şey sevdiklerimizin varlığı ve kaybettiklerimizin zihnimize kazınan anıları. Onlara hep sahip çıkabilmem dileğiyle…

Öznur Coşkun

Ocak

2022

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ŞEKİLLER DİZİNİ

ÇİZELGELER DİZİNİ

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Baz çifti
BSA	Bovin Serum Albumin
CAF	Kanser ilişkili fibroblast
CD	Cluster of differentiation
ddH_2O	Double distile su
DMEM	Dublecco's Modified Eagle Medium
dk	dakika
ECM	Ekstraselüler Matrix
EMT	Epitelial-Mezenkimal Geçiş
ER	Endoplazmik Retikulum
EV	Ekstraselüler Vezikül
FBS	Fetal Bovine Serum
Hsp	Heat Shock Protein
Ig	İmmünoglobulin
IL	İnterlökin
ILV	Lümen içi vezikül
ISCT	Uluslararası Hücresel Terapi Derneği
kDA	kilodalton

Ki-MKH	Kemik iliği kökenli Mezenkimal Kök Hücre
KRK	Kolorektal kanser
MAPK	Mitogen activated protein kinaz
MET	Mezenkimal-Epitelial Geçiş
MHC	Major Histocompatibility Complex
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
ml	mililitre
MMP	Matrix Metalloproteinaz
mRNA	Messanger ribonükleik asit
miRNA	Mikro ribonükleik asit
MVB	Multiveziküler cisim
µg	mikrogram
µl	mikrolitre
µM	mikromolar
nm	nanometre
PE	Fikoeritrin
PBS	Fosfat buffer salin
TNF-α	Tümör nekrosis faktör-alfa
TRPS	Ayarlanabilir direnç darbe algılama
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Kanser; insidansı ve mortalitesinin yüksek olması nedeniyle dünyanın en önemli halk sağlığı problemlerinden biridir. Ülkemizde 2020 TÜİK verilerine göre kanser; nedeni bilinen ölümler arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır (1). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2020 yılında 19,3 milyon yeni kanser tanısı konulmuş ve 10 milyon kanser hastası yaşamını yitirmiştir. Ülkemizde ise 2020 yılında; 233 bin yeni kanser tanısı konmuş olup, 126 bin kişi ise kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Tüm dünyada kanser yükü her geçen yıl artış göstermekle birlikte Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tahminlerine göre 2040 yılına kadar kanser vakalarının %47 artış göstereceği öngörülmektedir (2,3).

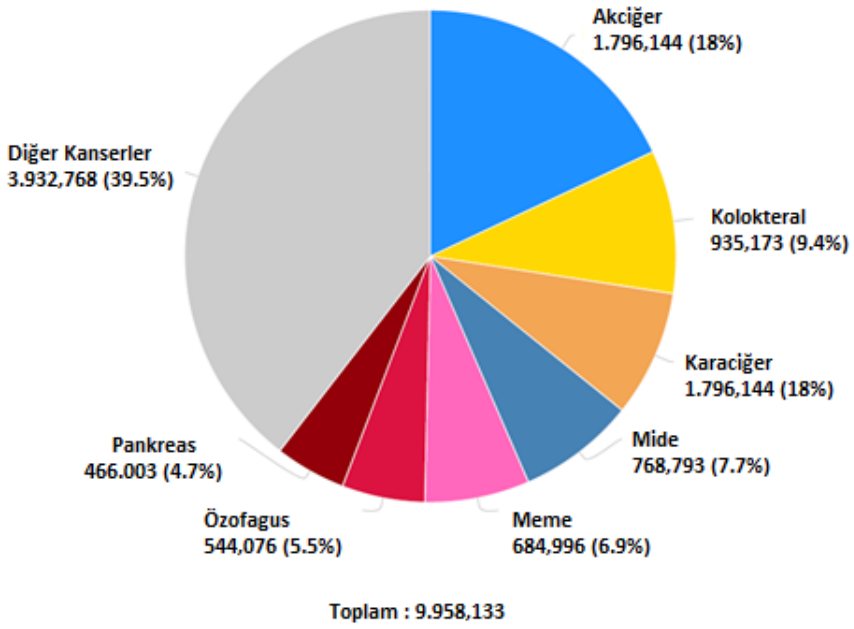
Kansere bağlı ölümlerin çok önemli bir kısmını oluşturan kolorektal kanser, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de oldukça sık görülmektedir. Yeni tanı sayısında, meme ve akciğer kanserinden sonra üçüncü sırada yer alan kolorektal kanser; kanser kaynaklı ölümlerde de akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Dünya genelinde 2020 yılında 1,9 milyon kolorektal kanser tanısı konmuş iken bu sayı ülkemizde 21 bindir (2). Yeni tanı alan hastaların çoğu, ileri evrelerde hekime ve hastaneye başvurmaktadır. Bu durumda erken tedavi şansları azalmaktadır.

Kanser istatistikleri değerlendirildiğinde; tüm dünyada milyonlarca insanı etkileyen bu hastalığın yayılımını azaltacak, kanserin gelişimi, tanısı ve tedavisine yönelik her türlü çalışma son derece değerlidir. Kanser araştırmalarının hedeflerinden biri de, kanserin progresyonu ve yayılımına etki eden faktörleri saptamaktır. Bu doğrultuda; bu doktora tezi kapsamında kolorektal kanser progresyonu ve yayılımına etki eden bir faktör olarak, insan primer kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre (Ki-MKH) eksozomları incelenmiştir. İnsan Ki-MKH eksozomları kolorektal kanser üzerinde bir model olarak uygulanmış ve pro ve/veya antitümör etkisi ile EMT profilinde oluşturduğu değişim değerlendirilmiştir.

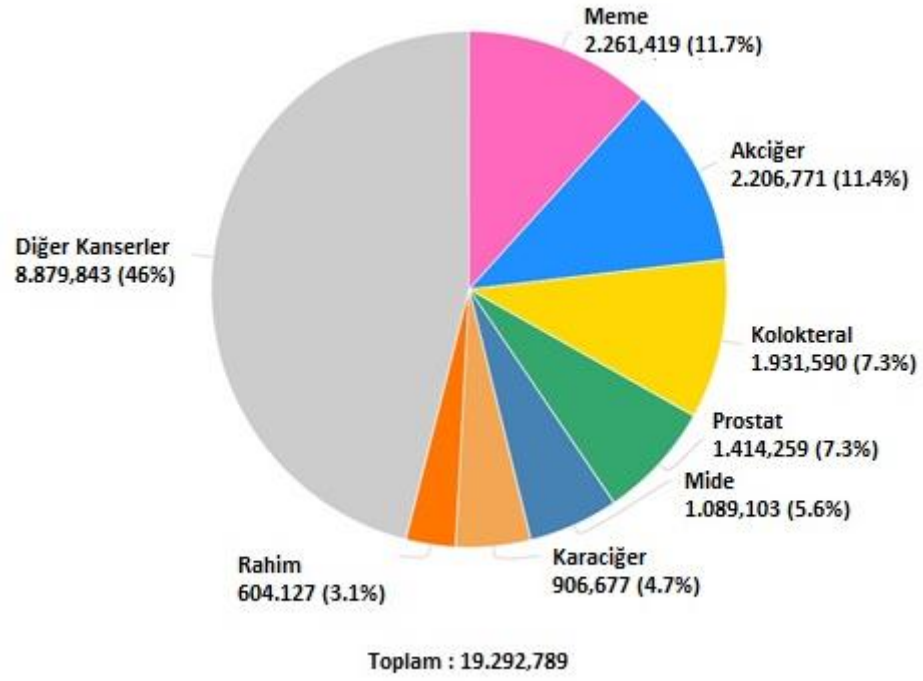
2. KURAMSAL TEMELLER

Kanser hem çevresel hem de kalıtsal etkenlerden kaynaklı, çok genli, çok faktörlü ve çok basamaklı gelişim gösteren bir hastalıktır (4). Kanser, kontrolsüz hücre bölünmesiyle iyi huylu bir lezyondan kötü huylu bir tümöre ilerleyen çok aşamalı bir süreçte, normal hücrelerin tümör hücrelerine dönüşmesi ile ortaya çıkar (3). Bu dönüşüm süreci; hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve ölümünü regüle eden genlerde mutasyon, epigenetik değişiklikler, DNA replikasyon hataları, serbest radikallerin bazı DNA bazları üzerinden hasar oluşturması, iyonize radyasyon, UV ve kimyasal karsinojen gibi ajanların etkileşimi gibi birçok nedenden kaynaklanabilir (4).

Kanser nedeniyle hayatını kaybedenlerin sayısı 2020 yılında yaklaşık 10 milyon olmakla birlikte kanserden ölümlerin birincil nedeni metastazlardır (3). Kanser istatistikleri değerlendirildiğinde, dünyamızda kolorektal kanser (935 000 ölüm), akciğer kanserinden (1,80 milyon ölüm) sonra en çok ölüme neden olan kanser tipidir (Şekil 2.1.). Bununla birlikte kolorektal kanser (1,93 milyon vaka), meme (2,26 milyon vaka) ve akciğer kanserinden (2,21 milyon vaka) sonra en çok tanı alan kanser olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 2.2.) (3).



Şekil 2.1. 2020 yılında Dünya Sağlık Örgütü kanser ölüm istatistikleri (2)



Şekil 2.2. 2020 yılında Dünya Sağlık Örgütü kanser yeni tanı istatistikleri

2.1. KOLOREKTAL KANSER

Kolorektal kanser, normal kolon mukozasından tek bir kript epitelindeki değişikliklere, küçük iyi huylu tümörlerden (adenomatöz polipler) adenokarsinomlara kadar uzanan bir dizi morfolojik değişimle oluşan bir kanser tipidir (5).

Kolorektal kanser gelişiminde hem çevresel hem genetik faktörler rol almaktadır. Genetik yatkınlık kolorektal kanser gelişme riskini büyük oranda artırsa da vakaların %70'i sporadik, %30'i kalıtsal olarak ortaya çıkmaktadır (6,7). Kalıtsal kolorektal kanserin en iyi bilinenleri Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser (HNPCC, Lynch Sendromu) ve Familyal Adenomatöz Polipozis (FAP) sendromlarıdır (6). Sporadik kolorektal kanser olgularının birinci derece arabalarında kolorektal kanser öyküsü yoktur. Genellikle poliplerden köken alan ve kalıtımsal olmayan değişimlerle ortaya çıkmaktadır. Sporadik kolorektal kanserlerde genellikle en önemli risk faktörü yaştır (8). Sporadik kolon kanserlerde , kolon epitelinde bir dizi genetik değişim sonucunda önce hiperplazi oluşur, daha sonra adenom gelişimi, ardından karsinom ve metastaz ile karsinogenez süreci tamamlanır (9).

2.2. KÖK HÜCRELER

Kök hücreler hem embriyoda hem yetişkin hücrelerde bulunan özelleşmemiş hücrelerdir. Bir organizmada herhangi bir hücreye farklılaşma ve kendini yenileme özelliğine sahiptirler (10,11).

Yetişkin kök hücreler, embriyo gelişimi sonrasında tüm vücutta farklılaşmış hücreler içinde farklılaşmadan kalırlar. Bu hücrelerin farklılaşma potansiyeli embriyonik kök hücrelere göre daha sınırlıdır. Mezenkimal kök hücreler, nöral kök hücreler, hematopoietik kök hücreler, deri kök hücreleri yetişkin kök hücre çeşitleridir (11).

2.2.1. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER (MKH)

Mezenkimal kök hücreler (MKH)'ler ilk olarak 1960-1970'lerde Friedenstein ve arkadaşları tarafından izole edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır (12). Uluslararası Hücresel Terapi Derneği (The International Society of Cellular Therapy, ISCT), MKH'leri üç kriter ile tanımlamaktadır: a) MKH'ler standart kültür koşulları altında flaska yapışabilirler b) MKH'ler, endotel, hematopoetik veya CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 ve HLA-DR gibi immünolojik hücresel biyobelirteçleri eksprese etmeyen; CD105, CD73 ve CD90 hücre yüzey biyobelirteçlerini ifade eden hücrelerdir c) MKH'ler, uygun uyarıcılara maruz kaldıklarında osteositlere, adipositlere ve kondrositlere farklılaşma yeteneğine sahiptirler (13).

MKH'ler; yetişkin kök hücre tipi olmakla birlikte genel olarak her dokuda bulunabilen ve nişi regüle eden ana stromal hücrelerdir. Kemik iliği başta olmak üzere birçok dokudan izole edilebilirler. MKH'ler; kolay elde edilebilir olmaları, immün yanıt oluşturmayan yapıları, hızlı bölünmeleri ve kan yoluyla verildiğinde yaralı bölgeye göç edebilme özellikleri nedeniyle hücresel tedavilerde ve doku mühendisliğinde en çok kullanılan hücre tipi olmuştur (14,15).

MKH'lerin, göreceli olarak immün ayrıcalıkları ve genel immün yanıt oluşturmayan yapıları nedeniyle, allojenik olarak kullanılmaları mümkündür. Kullanıma hazır bir hücre terapötik ajanı olarak çok uygundur ve bu nedenle klinikte sıklıkla kullanılmaktadır (16).

MKH'ler, bağışıklık hücreleri üzerindeki parakrin etkilerinin yanı sıra, büyüme faktörleri, sitokinler ve hücre dışı matriks (ECM) dahil olmak üzere hücrenin hayatta kalmasını destekleyen bir salgı repertuvarına sahiptir. MKH sekretomunun bileşenleri, yaralı hücreleri

kurtarıp doku hasarını azaltabilir ve onarımı hızlandırabilir (17). MKH'lerin kemik iliği, adipoz, ligament, deri, plasenta, diş özü, sinovyum, plasenta, göbek kordonu ve diğer fetal dokular gibi çok çeşitli dokulardan izole edilebileceği gözlemi (18), stromal destek hücreleri olarak işlev gördükleri kavramını desteklemektedir (17).

MKH'ler salgıladıkları çeşitli regülatör faktörler ile inflamasyon, anjiyojenez, hücre ölümü, doku rejenerasyonu ve fibroza katkıda bulunurlar (19). Ayrıca hücre sağ kalımı, hücre proliferasyonu ve doku anjiyojenezini artırabilen çeşitli parametreler salgıladıkları da daha önce bildirilmiştir (20–22). Ayrıca periferik kan ve stromal hücre dışı matriks (ECM) içindeki kemoatraktan gradyanlar boyunca yaralı dokulara doğru göç edebilirler (23). Bir doku hasara uğradığında, çeşitli sitokinler ve Toll benzeri reseptör ligandları, MKH'leri uyarır ve doku rejenerasyonunu artırmaya yönelik çok miktarda büyüme faktörünün oluşumu desteklenir (24,25).

MKH'ler mitokondriyi epitel hücreleri, endotelyal hücreler ve kardiyak miyositler gibi birkaç farklı hücre tipine transfer edebilirler (26). Bu tür transferler, özellikle potansiyel hedef hücreler yaralandığında veya stres altında olduğunda yaralı hücreye fayda sağlamak için büyük bir öneme sahiptir. Örneğin, MKH'lerin hipoksik/iskemik stres sırasında mitokondriyi transfer ederek endotel hücrelerinde apoptozu önlediği gösterilmiştir (27).

Çeşitli klinik uygulamalar ve hayvan deneyleri göstermiştir ki MKH'lerin tedavi edici etkisi yalnızca vücut içinde farklılaşmasıyla açıklanamaz. MKH'ler bir dizi madde salgılayarak ilgili hücreler üzerinde regülatör parakrin etkiler oluşturmaktadır. MKH tarafından salgılanan biyomoleküller anjiyojenik ve anti-apoptotik etki oluşturarak yaralanan bölgedeki hasarın büyümesini durdurmaya yardımcı olur ve bu bölgeye olan kan akımını artırır (28).

Kemik iliği kaynaklı MKH'ler ve eksozomlarının intervertabral disk rejenerasyonu (29), kardiyovasküler doku hasarı (30), karaciğer fibrozu (31) gibi birçok dejeneratif hastalıkta teröpatik etkinliği başarılı bir şekilde gösterilmiştir. Ayrıca graft versus host hastalığı (GvHD) tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır (32).

Yapılan çalışmalarda; MKH'lerin tıpkı yaralanma bölgesine göç etmesi gibi tümör bölgelerine de göç ettiği ve tümör stromasına dahil olduğu bildirilmiştir (33). Bu durum tümör bölgesinde bol miktarda büyüme faktörü, sitokin ve matrix re-modeling proteinlerinin bulunmasını ve

tümörlerin neden iyileşmeyen bir yaraya benzetildiğini açıklayabilir. Ancak tümör hücresi ile MKH'lerin arasındaki etkileşiminin yansımaları ve altında yatan mekanizmalar henüz açık değildir (34). Yapılan çalışmalar MKH'lerin, tümör invazyonu ve anjiyojenez, immünosüpresyon ve apoptozun inhibisyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir (35). Ancak son yıllarda çok sayıda çalışma; MKH'lerin/MKH kaynaklı sekresyonların çeşitli koşullar altında tümörijenezi artırabildiği veya azaltabildiğini göstermektedir (36–40). Bu konu halen tartışmalı olup yapılan her bir çalışma literatüre önemli bir katkı sağlamaktadır.

2.3. KOLON DOKUSU GELİŞİMİ VE MKH

MKH ve tümör hücresi arasındaki etkileşim, kolorektal kanserin de dahil olduğu birçok kanser tipinde gösterilmiştir. Kolorektal kanser ve MKH arasındaki etkileşimden önce kolorektal dokusunun embriyonik gelişim aşamaları ve bu süreçte MKH hücrelerinin katkısını inceleyecek olursak; embriyonik gelişimde epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) sürecinin de dahil olduğu birkaç mekanizma ile üç germ tabakası (ektoderm, mezoderm ve endoderm) oluşur. İlkel barsak tüpü, mezodermin (dıştan) altında yer alan endodermden (içte) oluşan invaginasyonlar ile oluşturulur. Epitelyal sinyalleşmeye yanıt olarak mezenkimal kümelerin oluşumu, villus morfogenezinin başlangıcını işaretler. Mezenkimal sinyalleme yoluyla kolumnar epitel hücrelerinin stereotipik villi ve proliferatif intervilli olarak progresif epitelin yeniden şekillenmesi sağlanır. Villusun tepesindeki mezenkimal kümeler, post-mitotik sinyalleşme yoluyla daha fazla epitel proliferasyonunu engellerken, intervillilerin altındaki kümeler, bağırsak kök hücrelerinin bölünmesini düzenler (41). Embriyonik gelişim sırasında kolorektal dokularının oluşumu bu şekildedir. Kolorektal dokusu her ne kadar epitelyal kökenli bir doku olsa da oluşum aşamalarında mezenkimal sinyallerin katkısı vardır. Bu durum embriyonik gelişim sürecinde, EMT sırasında, meydana gelen mutasyonların, parsiyel farklılaşmaların özellikle sporadik olgulardaki rolünü anlamamız açısından faydalı olacaktır. Buradan yola çıkarak Kİ-MKH eksozomlarını kolorektal kanser hücreleri üzerinde uygulayarak mezenkimal dokunun kolorektal kanser ilerlemesi ve yayılımındaki rolünü araştırmaya odaklanıyoruz.

2.4. KOLOREKTAL KANSER VE MKH

Kolorektal kanser vakalarının büyük çoğunluğunu sporadik vakaların oluşturması, çevresel faktörlerin bu kanser tipinin gelişiminde rolünün büyük olduğunu göstermektedir. Başlık 2.2.1'de de bahsedildiği gibi MKH'lerin tümör stromasına dahil olduğu ve ve tümör gelişimi

ya da ilerlemesine katkı sağladığı daha önce birçok çalışmada bildirilmiştir. Bu bilgiden yola çıkarak, MKH'leri kolorektal kanserlerin gelişimi ve yayılımına etki eden bir faktör yapılan çalışmaları incelemek faydalı olacaktır.

MKH ve kolon kanseri hücrelerinin ko-kültüre edildiği in-vitro bir çalışmada MKH'nin kolon kanseri hücrelerindeki Wnt sinyal yolağını uyararak kolon kanseri hücrelerinin metastatik kapasitelerini arttırdığı gösterilmiştir (42). İnsan kemik iliği kaynaklı MKH'den salgılanan IL-8'in kolorektal kanser gelişimi ve anjiyojenezi üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmada interlökin-8'in (IL-8), KRK hücreleriyle birlikte ko-kültürlenen MKH'lerde en yüksek düzeye çıkartılmış pro-anjiyojenik faktör olduğu saptanmıştır. MKH tarafından salgılanan IL-8'in insan umbilikal ven endotel hücre (HUVEC) proliferasyonunu ve göçünü, tüp oluşum kabiliyetini ve CRC hücre çoğalmasını arttırdığı bildirilmiştir. Ek olarak, in vivo çalışmalar, MKH'lerin kısmen IL-8 aracılığıyla tümör anjiyojenezisini ilerlettiğini göstermiştir (43). Ortotopik hayvan modeli kullanılan bir çalışmada MKH'lerin yalnızca primer kolon tümörüne değil metastatik karaciğer tümörlerine de geçtiği gösterilmiştir. Buna ek olarak, MKH'lerin kolon kanseri büyümesi ve metastazını teşvik ettiği ve tümör stromasına dahil olan MKH'lerin CAF (kanser ilişkili fibroblastlar) belirteçlerini eksprese ettiği gösterilmiştir (34). Bir diğer çalışmada ise MKH'lerin direk hücre-hücre teması yoluyla EMT'yi indükleyerek kolon tümörlerinin progresyonunu teşvik ettiği saptanmıştır (44).

Tümörün başlatılması ve progresyonunda MKH'lerin nasıl etki gösterdiğine dair olası mekanizmalar araştırılmaktadırlar. Son yıllarda, parakrin etki gösteren sitokinler ve çeşitli büyüme faktörleri gibi, hücre kaynaklı eksozomlar da bir hücre-hücre iletişimi türü olarak tanımlanmış ve kabul görmüştür (45). Eksozomların, tümörler ve MKH'ler arasındaki *crosstalk*da rol oynayabildiği de daha önce bildirilmiştir.

Literatür bilgileri değerlendirildiğinde, mezenkimal kök hücre eksozomlarının çeşitli kanser tiplerinde etkisini araştıran az sayıda çalışmanın yanısıra, kolorektal kanser hücreleri üzerindeki etkisini kısmen gösteren birkaç çalışma mevcuttur (46–48). Bu çalışmalardan birinde MKH ekzosomlarının, xenograft fare modeli ile tümör oluşturulmuş farelere subkütanöz olarak uygulandığında tümör yükünün ("*burden")* arttığı sonucuna varılmıştır (49,50). Bir diğer çalışmada ise; MKH eksozomlarının kolorektal kanser hücre hatlarında miR142-3p aracılığı ile kanser kök hücre profilinde artışa sebep olduğu saptanmıştır (51). Bahsi geçen çalışmalardan

MKH'lerin tümörijenezi artırdığı sonucu çıkarılırken başka iki çalışmada da MKH'lerin tümörijenezi azalttığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu çalışmaların ilkinde MKH eksozomlarında yüksek eksprese olan miR-16-5p molekülünü kolorektal kanser hücre hatlarına transfekte ettiklerinde tümör migrasyon ve invazyonunun azaldığı gösterilmiştir (38). Diğer çalışmada ise miR-4461 molekülünün MKH eksozomlarında yüksek düzeyde eksprese olduğunu, kolorektal kanser dokusunda (HCT116 hücre hattı) ise normal kolon dokusuna (FHC hücre hattı) göre daha düşük eksprese olduğunu göstermişlerdir. Yine kolorektal kanser hücre hatlarına miR-4461 transfekte ettiklerinde tümör migrasyon ve invazyonunun azaldığını göstermişlerdir (37). Ancak farklı olarak, bu iki çalışmada, MKH eksozomları kanser hücrelerine direk uygulanmamış, yalnızca MKH eksozomlarında yüksek eksprese olan miRNA'lar uygulanmıştır.

2.5. EKSTRASELÜLER VEZİKÜLLER

Ekstraselüler veziküller (EV'ler) ilk kez 50 yıl önce Wolf tarafından plazmada gözlemlenmiş ve "trombosit tozu" olarak adlandırılmıştır (52). Devam eden yıllarda birçok çalışmada, tüm biyolojik sıvıların veziküller içerdiği gösterilmiştir (53). Salıverilme mekanizmaları ve boyutlarına göre üç ana EV tipi tanımlanmıştır: eksozomlar (150 nm'den daha küçük çaplı), mikroveziküller/ektozomlar (100-1000nm) ve apoptotik cisimler (>1000nm). Mikroveziküller ve apoptotik cisimcikler sırasıyla canlı ve ölmekte olan hücrelerde doğrudan plazma zarından salınır. Eksozomlar, ekstraselülar veziküllerin (EV) en küçük üyesidir. Diğer EV'lerden farkları; kargo içerikleri, lipid kompozisyonları ve kendilerine özgü biyogenez yolaklarıdır (52,53).

2.5.1. EKSOZOMLAR

Başlangıçta yalnızca atıkların uzaklaştırılmasında görevli olduğu düşünülen (51,54) eksozomların son yıllarda hücreler arası haberleşme, sinyal iletimi gibi önemli rollerde kullanılmak üzere nükleik asit, protein, mRNA, miRNA ve çeşitli enzimler taşıdıkları gösterilmiştir (55,56). Yapılan çalışmalar, eksozomların, hücresel homeostazı sürdürmek için atık ürünleri ortadan kaldırmanın alternatif bir yolu olduğu fikrini desteklemektedir (57,58). Ek olarak, bu veziküllerin hücreler arası iletişimde rol oynadığı ve çok sayıda fizyolojik ve patolojik fonksiyon ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (51). İlginç bir şekilde, kanser hücrelerinden alınan eksozomların anjiyojenezi arttırdığı, bağışıklık sistemini modüle ettiği ve

çevresindeki parankimal dokuyu yeniden şekillendirdiği, dolayısıyla tümör ilerlemesini desteklediği gösterilmiştir (59).

Eksozomlar hemen hemen tüm hücrelerden salgılanabilir ve salgılandıkları hücrenin plazma membranından köken alırlar. Hedef hücrelerce tanınmasını sağlayacak serin membran lipitleri, kolesterol, sfingolipit, gliserofosfolipit, sfingomiyelin, seramid gibi membran proteinlerinin yanı sıra köken aldıkları hücrenin plazma membranında bulunan özgün proteinler, transmembran proteinleri ve reseptör moleküllerini de taşırlar (60). Eksozomlar farklı nükleik asitler, proteinler ve lipitler içermektedir. Taşıdıkları kargo içerikleri, hücre tipine bağlıdır. Bu kargo içeriği farklı hücresel koşullardan veya tedavilerden etkilenebilirler. Hatta tek bir hücre hattından salınan eksozomlar bile oldukça heterojenlik gösterebilir (63). Birkaç çalışma, eksozomların protein, lipit ve RNA yükünü tanımlamıştır, ancak yükün veziküllere ayrılıp ayrılmadığı ve nasıl sınıflandırıldığı hakkında çok fazla bilgi mevcut değildir (64).

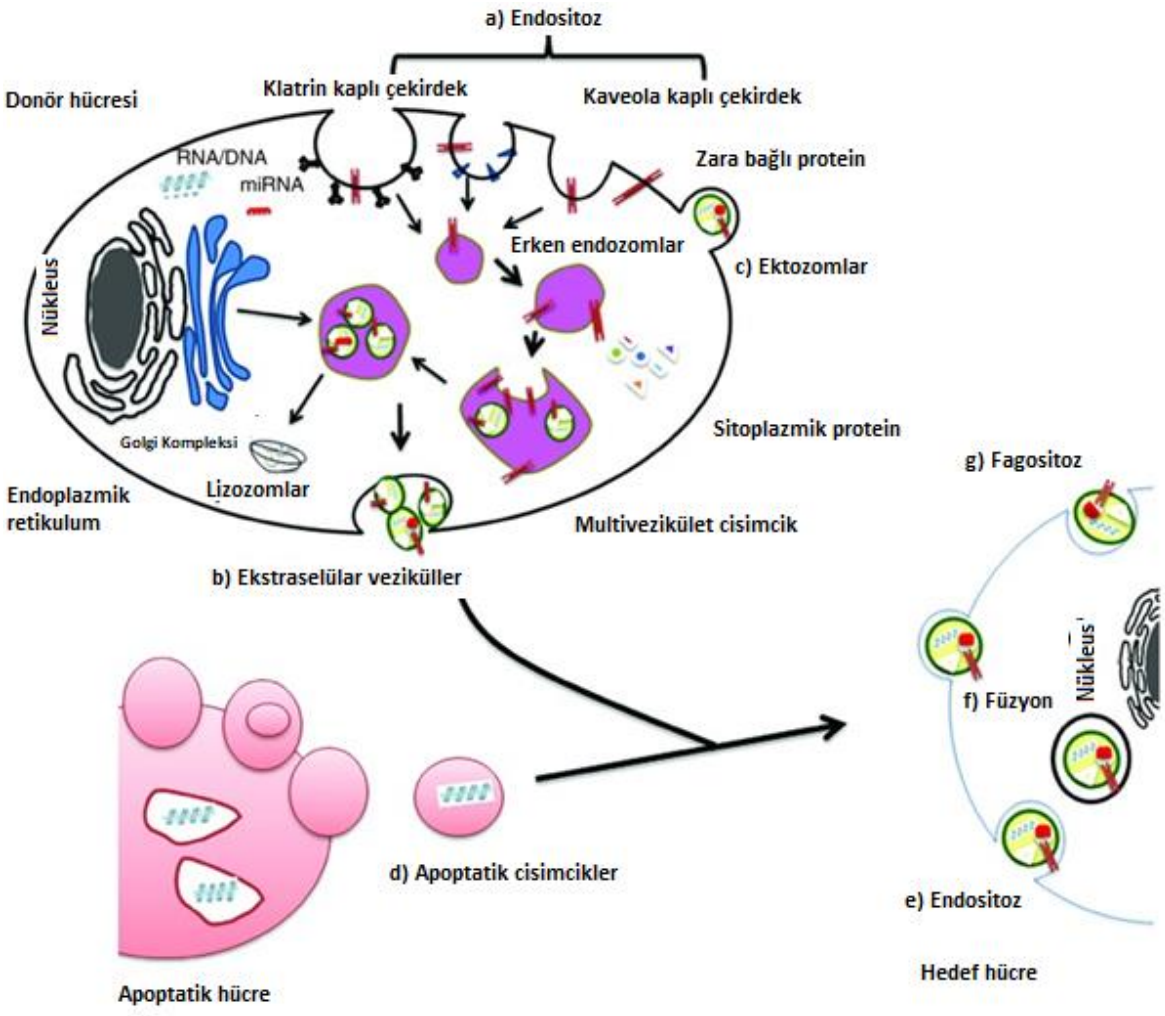
Ekzozomlar; proteinler, mRNA ve miRNA'lar dahil olmak üzere birçok biyoaktif molekülü taşıyabilirler (15). Bu sayede bir hücreden diğerine, genetik bilgi alışverişini ve alıcı hücrelerin yeniden programlanmasını sağlarlar (15).

Eksozomlar, çok miktarda biyoaktif molekül aktararak alıcı hücrede bazı fenotipik değişikliklere sebep olur ve rejeneratif programlamayı modüle ederler (65,66). Bu fenotipik değişiklikler, hedef hücrelerde apoptozun önlenmesi, hedef hücre proliferasyonunun indüklenmesi, immünomodülatör yanıtların uyarılması ve hedef hücrelerde oksidatif stresin azaltılmasından oksijen arzının arttırılmasına kadar uzanan çeşitli mekanizmaları içermektedir (65).

2.5.2. EKSOZOM BİYOGENEZİ

Hücrelerden EV salınımının evrimsel olarak iyi korunmuş bir mekanizma olduğu bilinmektedir (33). Eksozomlar, endozomal kaynaklı EV'lerdir. Endozomlar, membranöz veziküllerinin içe doğru tomurcuklanması ve bunların multivesiküler cisim (MVB) olarak bilinen bir yapı şeklinde salınması ile oluşmasına karşın eksozomların biyogenezi genel olarak Trans-Golgi ağı ve indüklenebilir salınım olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır (67). Taşıma için gerekli olan endozomal sınıflandırma kompleksi ve bununla ilişkili proteinler, multivesiküler cisimlerin (MVB'ler) ve lümen içi veziküllerin (ILV) oluşumunda rol oynarlar (68). Ekzozom

membranları, ILV'lerin MVB'lere tomurcuklanmasında rol oynayan kolesterol, seramid ve sfingolipidler gibi lipitler bakımından zengindir (69). ILV'ler, plazma membranı ile MVB füzyonu ile hücrelerden salınır ve serbest bırakıldıktan sonra eksozom adını alırlar (70). Eksozomlar daha sonra doğrudan membran füzyonu, endositoz veya hücre tipine özgü fagositoz yoluyla kargo içeriklerini bırakmak için hedef hücreler ile etkileşime geçer. Böylece eksozomlar, taşıdıkları biyoaktif faktörlerin bir alıcı hücreye taşınmasına izin veren doğal nano taşıyıcılar olarak işlev görür (54,55) . Şekil 2.3.'de ekzozomlar ve EV'nin diğer ana alt tipleri ile ilişkili hücre içi kaynakları, salım ve alım mekanizmaları gösterilmektedir (70).



Şekil 2.3. Eksozomların biyogenezi (70)

2.5.3. MKH EKSOZOMLARI

MKH eksozomları ilk kez 2010 yılında miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarı fare modelinde gösterilmiştir (69). MKH eksozomları, proliferasyonu artırmak ve hasarlı hücrelerin apoptozunu durdurmak suretiyle rejeneratif etkiler oluşturur. Bu nedenle, MKH eksozomları doku rejenerasyonu için büyük bir potansiyele sahiptirler (70).

MKH'den türetilen eksozomların lipid tabakası yağ asidi bağlayıcı proteinlerin iletiminde rol oynar (71). MKH kaynaklı eksozomlar; heat shock proteinleri, MHC-I ve MHC-II antijen sunan proteinler, integrin, aktin, tüberin ve büyüme faktörleri gibi hücre yapısının ve bileşiminin korunmasında rol oynayan proteinler olmak üzere yaklaşık 2000 çeşit protein içermektedir. Ek olarak, sinyal molekülleri, enzimler, sitokinler ve çeşitli hücresel regülasyonları sağlayacak olan miRNA'ları içermektedirler (72).

MKH eksozomları, çeşitli RNA'ların ekspresyonuna aracılık edip, doku onarımını artırır ve taşınmaya özgü miRNA'lar ve mRNA'ları paketleyebilir. Bu miRNA'lar, doku hasarının onarımında önemli bir rol oynar (70). Bir çalışmada endoteliyal projenitör hücrelerden elde edilen mikroveziküllerin mRNA aracılığıyla endotelyal hücrelere taşınarak doku anjiyojenezini desteklediği gösterilmiştir (73). RNA'ların yatay transferi ile potansiyel terapötik etki gösteren MKH eksozomlarının; akut akciğer hasarı fare modelinde, keratinosit büyüme faktörü mRNA'sı sunarak akciğer protein geçirgenliğini etkili bir şekilde düzelttiği ve alveolar inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (74). MKH eksozomlarının aktif proteinlere aracılık ettiği ve bu nedenle yaralanma onarımında önemli bir rol oynadığı da rapor edilmiştir. Bununla birlikte, kargolarının tamamı ve işlevleri hala iyi bilinmemektedir.

Ekzozomların karakterizasyonunun hücre orijini ile ilişkili olduğu bilinmektedir. MKH'den türetilen tüm eksozomlar, CD9, CD63 ve CD81 eksozomal biyobelirteçleri ifade etmektedir (53,75).

Transmisyon elektron mikroskobu altında, MKH'den türetilen eksozomlar, heterojen boyuttadır ve karakteristik yuvarlak morfoloji sergilemektedirler (53). MKH eksozomlarının ortalama boyutu 48.72 ± 2.7 nm iken (76), MKH eksozomların partikül boyutundaki ana tepe 65-75 nm ve genel boyut dağılımı 60 ile 200 nm arasında değişmektedir (75).

2.5.4. MKH KÖKENLİ EKSOZOMLARIN TÜMÖR GELİŞİMİNDEKİ ROLÜ

MKH'lerin doku iyileşmesindeki rolü ne olursa olsun, tümörijenez veya tümör regresyonundaki destekleyici veya baskılayıcı rolüne ilişkin bir tutarsızlık vardır (77,78). Bu sebeple MKH tarafından üretilen eksozomların tümör biyolojisindeki kesin rolleri ve mekanizmaları büyük ölçüde belirsizliğini korumaktadır.

Tümör invazyon ve metastazındaki bir dizi anahtar adım, epitelyal-mezenkimal geçişi kolaylaştırmak ve kanser kök hücrelerinin dolaşım yoluyla hayatta kalımlarını artırmalarına izin veren kök hücre benzeri özelliklerin indüklenmesi de dahil olmak üzere MKH'lerle ilişkilidir (77,79).

MKH'ler xenogenik bir ortamda hayatta kalmalarını sağlayan benzersiz immünolojik özelliklere sahip olmaları nedeniyle hücre ve gen terapisinin araştırılmasında ilginç bir model sunar. MKH'lerin terapötik potansiyellerinin yüksek olması nedeniyle tümör gelişimindeki rolleri de birçok araştırmaya konu olmuştur. MKH'lerin tümör mikro çevre oluşumuna katkı sağlayabileceği ve tümör hücre biyolojisini etkileyebileceğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin Karnoub ve arkadaşları, kemik iliği kaynaklı insan MKH'lerinin kanser hücrelerinin metastatik potansiyelinde önemli bir artışa neden olabileceğini bulmuşlardır (80). MKH ekzozomları, tümör bölgesine ulaşabilir ve hücre proliferasyonu, ilaç direnci, anjiyojenez ve metastaz, immün modülasyon gibi kanser gelişimi için uygun bir mikroçevre sağlayabilirler.

Araştırmacılar; tümörün başlatılması ve progresyonunda, MKH'lerin nasıl etki gösterdiğine dair olası mekanizmalarını araştırmaktadırlar. Bu mekanizmalardan biri MKH'ler tarafından salgılanan parakrin faktörlerdir. De Boeck A. ve arkadaşları, MKH'lerin kolorektal kanser progresyonunu parakrin neuregulin 1/HER3 sinyalizasyon yoluyla teşvik ettiğini bildirmişlerdir (83). Parakrin etki gösteren sitokinler ve çeşitli büyüme faktörlerine ek olarak, hücre kaynaklı eksozomlar da bir hücre-hücre iletişimi türü olarak tanımlanmıştır (45). Eksozomların, tümörler ve MKH'ler arasındaki *crosstalk*da rol oynayabildiği daha önce bildirilmiştir. Örneğin adipoz kökenli MKH eksozomlarının meme kanseri hücre modelinde Wnt sinyal yolağı aracılığıyla migrasyonu teşvik ettiği gösterilmiştir (84). Bir çalışmada p53-negatif Kİ-MKH'ler tarafından salgılanan eksozomların mide kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve göçünü artırabileceği gösterilmiştir (85). Başka bir çalışmada mide kanserlerinde MKH eksozomlarının ERK1/2 ve p38 MAPK yolaklarının aktivasyonu yoluyla

tümör hücrelerinde VEGF artışlarını teşvik ettiği, bunun da tümörün *in vivo* büyümesini teşvik eden gelişmiş tümör anjiyojeneziyle sonuçlandığı gösterilmiştir (86). Lee ve arkadaşları, MKH'nin miR-124 ve miR-145 mimiklerini, ekzozomlarla birlikte kültürlenmiş glioma hücrelerine vererek glioma hücrelerinin migrasyonunu büyük ölçüde azalttığını göstermişlerdir (87).

Bir malign hücre, hayatta kalabilmek için immün sistemden kaçmayı başarabilmelidir. Vücutta oluşan malign hücre gibi anormal özellikteki hücreler özellikle NK hücreleri ve MHC sınıf 1 ilişkili sitotoksik T lenfositler tarafından hızlı bir şekilde yok edilir. Sitotoksik T lenfositlerin kullandığı granzim/perforin ve hücre ölüm reseptör modülleri regülatör T hücreleri (Treg) tarafından modüle edilir (81). Bununla birlikte kanser hücreleri birkaç mekanizma ile immün sistemden kaçısı gerçekleştirebilirler. Örneğin hücresel immün yanıt MHC sınıf 1 ile sınırlı olduğu için MHC sınıf 1 gen ekspresyonunu azaltabilirler (88). Böylece immün tanımadan kaçabilirler. MKH'lerin bu sürece yardımcı olduğu bilinmektedir. MKH'lerin genellikle immünsüpresif etki oluşturarak ve anjiyojenik etki ile onarım hücrelerini çağırarak yara iyileşme sürecine katkı sağladığı düşünülmektedir. MKH'ler, Treg'leri destekleyip G0/G1 fazında hücre döngüsünün durmasına yol açan siklin D2'nin inhibisyonu ile mitojenle aktive olan T hücre proliferasyonunu inhibe edecektir (89,90). Böylece "iyileşmeyen yara" olarak tanımlanan tümörlerin hem immün kaçışı hem de proliferasyonu birlikte desteklenecektir.

Tümör proliferasyonu ve ilerleyişi için yeni kan damarlarının oluşumu gereklidir. Anjiyojenez süreci oldukça karmaşıktır. Bu süreç genellikle vasküler endotelyal substrat bozulması, vasküler endotelyal hücre göçü ve endotelyal hücre proliferasyonu, vasküler dallanmaları ve ayrıca yeni bir bazal membranı içerir. MKH'ler kanser hücrelerinin varlığında kümeler halinde organize olup kılcal damar benzeri yapılar oluşturma eğilimindedir (89). Ayrıca MKH'ler, vasküler endotel hücreleri gibi vaskülojenik hücreleri ortama çekmekle kalmaz, ek olarak apoptozu inhibe eden interlökin-6 (IL-6), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve monosit kemoatraktan proteini (MCP-1) gibi çeşitli faktörler salgılarlar. Böylece MKH'ler sayesinde tümör mikroçevresinde oluşabilecek hipoksi etkisi azaltılarak yeni damar oluşumu desteklenmiş olur (79).

MKH'lerin anjiyojenik uyarıcı etkisi, inflamatuar faktörler interferon-y (IFN-y) ve tümör nekroz faktörü-a (TNF-a) aracılığı ile yüksek oranda hipoksik ve inflamatuar tümör mikroçevresinde gösterilmiştir. IFN-y ve TNF-a ile daha önceden uyarılan MKH'lerin BALB/c

farelerine deri altından enjekte edildiğinde, tümör büyümesini ve anjiyojenezi IFN-y ve TNF-a uyarılmayan MKH'lere göre daha yüksek derecede arttırdığı in vivo olarak gösterilmiştir. Aynı çalışmada, IFN-y/TNF-a ile uyarılmış ve uyarılmamış MKH'lerden elde edilen hücre süpernatanı kullanılarak bir ex vivo tavuk yumurtası testi-koryoallantoik membran (HET-CAM) deneyi ile benzer şekilde arttırılmış bir anjiyojenik etki gözlenmiştir (90).

Eksozomlar, tümör anjiyojenezini düzenleyen bol miktarda anjiyojenik faktör içerir. Örneğin, MKH'den türetilen eksozomlar, tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonunu artırarak ve ERK1/2 ve p38 mitojenle aktive olan protein kinaz yolaklarını aktive ederek tümör anjiyojenezini destekler (91). Yapılan bir çalışmada, plasental MKH eksozomlarının vasküler ağ oluşumunu desteklediği ve oksijene bağlı bir şekilde mikrovasküler endotelyal hücre göçünü artırdığı gösterilmiştir (92). Ayrıca adipoz mezenkimal kök hücreler tarafından salınan EV'ler, adipoz mezenkimal kök hücrelerin neden olduğu anjiyojeneze katkıda bulunabilir (93). Başka bir çalışmada, kanser kök hücrelerinde, yalnızca CD105-pozitif kanser kök hücrelerinden türetilen eksozomların, normal insan endotel hücrelerine aktifleştirilmiş bir anjiyojenik fenotip vererek büyümeleri ve damar oluşumu uyarılmıştır. Sonuçta belirli bir kanser kök hücreden köken alan mikroveziküllerin tümör progresyonu sırasında anjiyojenik uyarı oluşturarak metastatik difüzyonu koordine etmeye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (94). Bu sonuçlarla tezat bir şekilde, Lee ve arkadaşları, MKH kökenli eksozomların, anti-anjiyojenik molekülleri transfer ederek ve tümör mikroçevresi içinde hücreden hücreye iletişimin sağlayarak anjiyojenezi baskıladığını gözlemlemiştir (95). Yine başka bir çalışmada, MKH kökenli eksozomlarda bulunan miR-16, 4T1 hücrelerinde VEGF ekspresyon seviyesini azaltarak, miR-16'nın VEGF ekspresyonunu kontrol ettiği gösterilmiştir (96,97). Sonuç olarak, MKH eksozomları, tümör anjiyojenezi ile önemli ölçüde ilişkili olmakla birlikte literatürde gördüğümüz birbirine zıt sonuçlar, MKH eksozomlarının kanser ilerlemesindeki rolünün halen tartışmalı olduğunu gözler önüne sermektedir.

Bu gözlemler birlikte değerlendirildiğinde, anti-anjiyojenik kanser tedavilerinin, tümörler içindeki MKH'ler gibi tümörle ilişkili stromal hücreleri hedef almada yararlı olabileceğini düşündürmektedir. MKH'ler yalnızca anjiyojenezi uyarmaya yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda invaziv kanser kök hücrelerinin hipoksik tümör ortamından ayrılabilecekleri ve metastaz yapmak üzere kaçabilecekleri şekilde kan damarlarına yönlendirilmesine de yardımcı olabilirler.

MKH’ler, lösemi gibi bazı kanser türlerinde kanser hücrelerinin çeşitli tedavilerden korunma özelliği sağlayabilirler. Kemik iliğinde bulunan MKH'ler, hematopoietik kök hücrelerin (HKH'ler) kendini yenilemesi ve farklılaşmasını fizyolojik olarak desteklemektedir. Benzer bir ilişki MKH’ler ile malign hematopoietik hücreler arasında da vardır. MKH’lerin sağladığı bu mitojenik destek, teröpatik ilaçlara karşı da koruyucu etki oluşturmaktadır. Dazzi ve arkadaşları, MKH’lerin CXCL12/CXCR4 ekseni aracılığı ile anti-apoptotik Bcl-XL ekspresyonunu modüle ederek ve kaspaz-3 aktivasyonunu azaltarak kronik miyeloid lösemi (KML) hücrelerini imatinib tedavisinden koruduğunu ve bu ilaca KML direnci kazandırdığını göstermişlerdir (98). Buna ek olarak, MKH’lerin ilaçlara direnç oluşturma ve kanser hücrelerini koruma özelliği kemik iliği nişinde gelişen kanserler ile sınırlı değildir (99). MKH’ler tarafından regüle edilen çeşitli IncRNA’lar aracılığı ile çeşitli solid tümörlerde (meme, mide kanseri…vb) yağ asidi oksidasyonu aracılığı ile kemoresistans ve köklülüğün *(stemness)* desteklendiği gösterilmiştir (100–102).

Mezenkimal kök hücrelerin yanı sıra; kanser kök hücresi kökenli eksozomların da tümör büyümesi üzerinde kayda değer bir etkisi vardır. Örneğin insan gliomalarının, tümör büyümesini destekleme özelliğine kök hücre popülasyonuna sahip olduğu bilinmektedir; bu hücrelere glioma ile ilişkili kök hücreler (GASC'ler) denir. Bourkoula ve arkadaşları, GASC'lerden türetilen eksozomların tümör büyümesini desteklediğini ve tümör destekleyici bir fenotipe sahip olduklarını göstermiştir (103).

2.6. KANSER VE EPİTELYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞ (EMT)

Embriyonik gelişim sırasında hücreler, epitelyal ve mezenkimal karakterler arasında geçiş yapabilir. Bu geçiş oldukça dinamik ve çoklu ilerleyen bir süreçtir. Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) olarak adlandırılan bu süreçte, adezyon moleküllerinin ifadesinin kaybedilerek hareket kabiliyeti ile migrasyon ve invazyon özelliği kazanması söz konusudur. Böylece mezenkimal fenotipe doğru bir kayma gerçekleşir. Bu sürecin tersi olan mezenkimal-epitelyal geçiş (MET) ise hücrenin hareket kabiliyetinin kaybı, adezyon moleküllerinin ifadesinin artması ve apiko-bazal polarizasyonun artması ile epitelyal karakterin ortaya çıkışına izin verir (104,105).

EMT, embriyonik gelişimin olmazsa olmaz temel taşlarından biridir. Birçok çalışma göstermiştir ki embriyojenez sırasında Snail1, Twist1 ve Zeb1 gibi transkripsiyon faktörleri susturulursa mezoderm tabakasının yapısı bozulur, embriyonik gelişim sona erer ve bu durum

embriyonun ölümü ile sonuçlanır (106–109). Embriyonik gelişimde EMT programlaması ile hücrelerin epitelden mezenkimal fenotipe tam olarak geçişi kabul görmüş olsa da karsinom gelişiminde kısmi ya da eksik bir EMT programlaması vardır (110,111). Bir tümör hücresinde hem epitelyal hem mezenkimal biyobelirteçlerin ekspresyonu kısmi bir EMT sürecini tetiklemek için yeterli kabul edilmektedir (109,112).

Epiteliyal-mezenkimal geçiş (EMT), bir dizi transkripsiyon faktörü (temel olarak Snail, Twist ve Zeb aileleri) tarafından yürütülen, kanser progresyonundan primer tümör büyümesi ve invazyon-metastaz basamaklarını içine alarak tüm evrelerde etkinlik gösterebilen bir süreçtir. Normalde EMT, embriyonik gelişim sürecinde yeri olan epitel hücrelerinin, mezenkimal fenotipli hücrelere geçişi ile tanımlanır. EMT süreci, embriyonik gelişimin birçok aşaması için son derece önemlidir. Çeşitli kanser tiplerinde yeniden aktifleşmiş olsa da EMT süreci tümör hücrelerinde tam olarak yürütülemez. Genellikle son dönem belirteçlerini eksprese etmezler. Ancak bu kısmi aktivasyon, tümör hücresinin hareketliliğini artırarak invazyon ve metastazı desteklemek için yeterlidir (113).

Kanser hücrelerinde gözlenen EMT sürecinin en önemli özelliği; aktive olan EMT transkripsiyon faktörleri aracılığıyla hücrelere ek pleotrofik özellikler kazandırmasıdır. Bu özellikler; tümörijeniteyi artırması ve bunları kanser kök hücre kavramına bağlaması şeklindedir (114). Söz konusu özellikler, EMT transkripsiyon faktörlerinin, tümörün başlangıcında ve öncü lezyonların oluşum aşamalarında da aktif rol oynaması ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak, EMT transkripsiyon faktörleri (EMT-TF) DNA onarımında ve anti-apoptotik süreci indüklemede rol oynamaktadırlar. Böylece bu faktörler malign ilerlemeyi de desteklerler. Ek olarak pro-inflamatuar ve immünosupresif sitokinlerin ekspresyonunu indükleyerek tümör mikroçevresinde tümörijeniteyi artırıcı etki gösterirler (116).

Karsinom gelişim sürecinde dokuya özgü farklılıklar ve ek fonksiyonları olması nedeniyle EMT-TF'lerin rolü oldukça karmaşıktır. Örneğin, meme kanserinde Snail (117), pankreas kanserinde ise Zeb1 (118) metastazı tetiklemektedir. Pankreastaki etkinliğinin tam tersi olacak şekilde aynı aileden olan Zeb2'nin melanomlarda tümör agresifliğini azalttığı gösterilmiştir (119). Ek olarak, kanser biyolojisinde kısmi EMT nedeniyle prototipik EMT biyobelirteçlerinin kullanımı EMT aktivasyonunu göstermek için uygun belirteçler değildir. Ancak sonuç

itibariyle; EMT-TF'ler kanserin başlangıcından invazyon ve metastaz sürecine kadar epitelyal olan ve olmayan birçok kanser tipinde kötü klinik sonuçları yansıtmaktadırlar (114).

2.7. KANSER VE MİRNA

İlk kez 1993 yılında tanımlanan mikroRNA'lar (miRNA'lar), boyutları 19 ila 25 nükleotit arasında değişen hedef genlerin post-transkripsiyonel susturulmasını düzenleyen kısa RNA moleküllerdir (120,121).

miRNA'ların oluşumu için öncelikle saç tokası yapısındaki birincil RNA'ların (pri-miRNA) transkripsiyonu yapılır. Daha sonra pri-RNA'lar, RNA bağlayıcı protein DGCR8 ve tip III RNase Drosha'dan oluşan kompleks aracılığı ile yaklaşık 85 nükleotitden oluşan miRNA öncülü olan pre-miRNA'lara dönüştürülür. Pre-miRNA'lar Ran/GTP/Exportin 5 kompleksi tarafından çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Bir RNase III enzimi olan Dicer ile kesilerek ~20-22 nükleotid uzunluğunda miRNA/miRNA* dupleksi şeklinde işlenirler. Dubleksin açılmasından sonra, olgun miRNA, RNA ile indüklenen susturma kompleksi (RISC)'ne dahil edilir ve RISC, miRNA'yı mRNA'yı hedeflemesi için yönlendirir (122–124). miRNA'lar translasyon inhibisyonu, mRNA bölünmesi veya degregasyonu ile hedef proteinin downregülasyonunu indükleyebilirler (124,125). Tek bir miRNA, genellikle fonksiyonel etkileşim yolunda yer alan birçok genin ekspresyonunu etkileyerek yüzlerce mRNA'yı hedefleyebilir (126). miRNA'lar, hedef mRNA'ların 3'UTR tamamlayıcı hedef bölgeleri tanıyarak, transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu baskılarlar.

miRNA'lar kanser gelişiminde çeşitli biyolojik etkiler oluştururak malign transformasyonun desteklenmesine katkı sağlamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, DNA, RNA, protein, glikoprotein gibi miRNA'ların da kanserde yeni tanısal, prognostik ya da teröpatik biyobelirteç olabileceğini göstermektedir (127–129). miRNA profilleme ve/veya sekanslaması ile kanserde oluşan miRNA imzasının tümörün sınıflandırılması, teşhisi ve prognozu için bilgi sağlayabileceği düşünülmektedir (130).

Kanserde miRNA deregülasyonunda overeksprese olan miRNA'lar çoğunlukla apoptoz ve tümör baskılayıcı genleri negatif regüle eden miRNA'lardır. Bunlar "onkomiR" olarak adlandırılır. Başka bir grup miRNA ise kanserde downregüledir ve bunlar tümör gelişimini

baskılayarak tümör ilerlemesini durdurmaya katkı sağlarlar. Bunlar da "tümör baskılayıcı miRNA'lar" olarak adlandırılır (131).

miRNA'ların kanserde deregülasyonu ilk kez, Dr.Croce ve arkadaşları tarafından B hücreli kronik lenfositik lösemi (KLL) hücrelerinde gösterilmiştir (132). Bu çalışmada kromozom 13q14 bölgesinde yer alan tümör baskılayıcı bölgelerin tanımlamasında miR15a ve miR16-1'in susturulduğu ya da downregüle olduğunu saptamışlardır (132). Daha sonra, birçok solid tümör tipinde de (kolorektal kanser, akciğer kanserinde, glioblastomada..vb) miRNA ekspresyonu değişiklikleri bildirilmiştir (133–135).

Kolorektal kanserdeki ilk miRNA profilleme çalışması 2006 yılında Cummins ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (135). İnsan kolorektal kanserlerinden elde edilen 273.966 cDNA etiketi, uyumlu normal kolon dokusu ve KRK hücre hatları, miRAGE (miRNA seri gen ekspresyon analizi) teknolojisi kullanılarak analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda o güne kadar tanımlanmış miRNA sayısından çok daha fazla miRNA'nın var olduğu gösterilmiş ve miRNA'ların, normal kolon dokusu miRNA'ları ile kıyaslandığında KRK dokularında ve hücre hatlarında çok daha yüksek eksprese oldukları saptanmıştır. Böylece miRNA'ların kolorektal karsinojenezdeki rolü ilk kez gösterilmiştir (135).

2.7.1. KOLOREKTAL KANSERDE EMT'DE ETKİLİ miRNA'LAR

Son on yılda çok sayıda miRNA molekülünün kolorektal kanserde etkisi gösterilmiş ve hedeflediği genler valide edilmiştir. Bunlardan bazıları, Çizelge 2.1.ve Çizelge 2.2.'de sırasıyla proliferasyonla ve metastazla ilişki durumuna göre hedeflediği genler ile birlikte gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Kolorektal kanserde proliferasyonla ilişkili bazı mikroRNA'lar

miRNA	**İfade düzeyi**	**Hedefler**	**Referans(lar)**
miR-10b	↑	KLF4	(136)
miR-17, miR-20a/b, miR-106a/b,	↑	GABBR1	(137)
miR-16-5p	↓	ITGA2	(38)
miR-17	↑	SIK1	(138)
miR-20a/miR-106a	↑	AMER1	(139)
miR21	↑	PDCD4	(140)
miR27a	↓↑	Calreticulin, SGPP1, Smad2	(141–143)
miR-28-5p	↓	SSRP1	(144)
miR-31-5p	↑	NUMB	(145)
miR-92a-3p	↑	NF2	(146)
miR-106a	↑	PTEN	(138)
miR-125	↓	TAZ	(149)
miR126	↓	ROCK, IRS1, SLC7A5 ve TOM1	(150,151)
miR-135a/miR-135b	↑	APC	(152)
miR-141-3p	↓	TRAF5, EGFR	(153,154)
miR-143	↓	DNMT3A, PART1	(154,155)
miR-143/miR-145	↓	IGF1R	(156)
miR-143-3p	↓	CTNND1	(157)
miR146a	↓	MDM2/p53	(158)
miR148a	↑	ERBB3, MMP7	(159,160)
miR150	↓	VEGFA, Gli1, β-catenin	(161–163)
miR-185	↓	WNT1	(164)
miR-193a-3p	↓	PLAU	(165)
miR194	↑	PDK1/AKT2/XIAP, MAP4K4 ve HMGA2	(166–168)

miR-200b-3p	↓	WNT1	(169)
miR-203a-3p	↑	PDE4D	(170)
miR-301a-3p	↑	DLC1, RUNX3	(171)
miR-362	↓	SIX1	(172)
miR-410	↑	DKK1	(173)
miR-4319	↓	ABTB1	(174)
miR-452	↑	VEGFA, GSK3β	(175,176)
miR-488	↓	CLDN2	(177)
miR-494	↑	APC	(178)
miR-500a-5p	↓	HDAC2	(179)
miR-501-3p	↑	APC	(181)
miR-519b-3p	↓	CKMT1B	(182)
miR-548c-5p	↓	PGK1	(183)
miR582	↓	RAB27A	(184)
miR-590-3p	↑	WIF1, DKK1	(185)
miR-708	↓	ZEB1	(185)
miR-760	↓	BATF3	(186)
miR-873-5p	↓	JMJD8	(187)
miR-942	↑	APC	(188)
miR-1258	↓	E2F8, CKS1B	(189,190)
miR-1271	↓	MTDH	(191)
miR-6803-5p	↑	PTPRO	(192)

Çizelge 2.2. Kolorektal kanserde metastazla ilişkili bazı mikroRNA'lar

miRNA	**İfade düzeyi**	**Hedefler**	**Referanslar**
miR-16-5p	↓	ITGA2	(38)
miR21	↑	PDCD4	(193)
miR-20a/miR-106a	↑	AMER1	(139)
miR27a	↑	FAM172A	(194)
miR-28-5p	↓	SSRP1	(144)
miR-31-5p	↑	NUMB	(195)
miR-32-5p	↑	TOB1	(196)
miR-107	↓	TFRC	(197)
miR126	↓	CXCL4, ROCK, IRS1, SLC7A5 ve TOM1	(149,150,198)
miR-139-5p	↓	NOTCH1	(199)
miR-141-3p	↓	TRAF5, EGFR	(152,153)
miR-143-3p	↓	ITGA6, ASAP3	(200)
miR-145	↓	TWIST1	(201)
miR146a	↓	Carboxypeptidase M (CPM)	(203)
miR-148a	↓	WNT10B	(204)
miR150	↓	TP53, VEGFA, Gli1, MUC4	(162,164,205, 206)
miR-181a-5p	↓	MMP14	(207)
miR-186-5p	↓	ZEB1	(207)
miR-191	↑	TIMP3	(208,209)
miR194	↑	MMP2, MMP9, Vimentin ve E-Cadherin	(210)
miR-200	↓	ZEB1, ZEB2	(211–213)
miR-204	↓	CXCL8	(214)
miR-206	↓	TM4SF1	(215)
miR-301a-3p	↑	DLC1, RUNX3	(171)
miR-302a	↓	NFIB, CD44	(216)
miR-324-5p	↓	ELAVL1	(217)

miR-330	↓	HMGA2	(218)
miR-338-5p	↑	PIK3C3	(219)
miR-519b-3p	↓	CKMT1B	(181)
miR-520e	↓	MTDH	(220)
miR582	↓	RAB27A	(183)
miR-590-5p	↑	RECK	(221)
miR-708	↓	ZEB1	(185)
miR-873-5p	↓	ZEB1	(222)
miR-6716-5p	↑	NAT10	(223)

Metastatik hücrelerin primer tümörden uzak metastaz bölgelerine gidişi oldukça zorlu bir yolculuktur. Uzak bir lokasyona gidip yeni bir koloni oluşturması için aşılması gereken bariyerler vardır. Bu süreci anlamak için anahtar yol, epitelyal-mezenkimal (EMT) programlamasını çözümlemekten geçmektedir. EMT; primer tümör hücrelerinin primer tümörden ayrılarak yeni bir metastatik nişi oluşturması için geçirmesi gereken fiziksel değişiklikleri açıklar. Bu doğrultuda tümör hücrelerinin metastazı için mikroçevre değişikliği gerektiği de kabul görmektedir (224,225). Bu mikroçevre değişikliğini oluşturacak çok sayıda faktör tanımlanmıştır. Bunlardan biri de mikroRNA'lardır. Hücrelerin EMT geçişi miRNA'lar tarafından regüle edilebilir. miRNA'lar E-cadherin, N-cadherin, ZEB, SNAI1 ve TWIST1 gibi EMT transkripsiyon faktörlerini regüle ederek kolorektal kanserde (ve birçok kanser tipinde) tümör hücrelerinin invazyon ve metastazını destekleyebilir ya da inhibe edebilir (124,226–228). Kolorektal kanserde miR204'ün yüksek ekspresyonu ile CXCL8'i inhibe edilerek E-cadherinin upregüle, N-cadherinin downregüle olduğu bildirilmiştir (214). Başka bir çalışmada, miR191'in ekspresyonundaki azalışın kolorektal kanserlerde migrasyonu engellediği ve N-cadherin ile E-cadherin seviyelerini değiştirdiği gösterilmiştir (208). Ek olarak, miR-6716-5p'in NAT10 ekspresyonunu inhibe ederek E-cadherini downregüle ettiği gösterilmiştir (224). Qian ve arkadaşları ise, miR141-3p'nin EGFR'yi hedefleyerek E-cadherin, N-cadherin, SNAI1 ve Vimentin düzeylerini değiştirdiğini ve EMT sürecini desteklediğini rapor etmişlerdir (153).

Bu tez çalışmasında EMT ile ilişkisi olan bazı miRNA'ların ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Bu miRNA'lar; miR21, miR27a, miR126, miR146a, miR148a, miR150, miR194 ve miR582'dir. "*The Cancer Genome Atlas (TCGA) COAD (colorectal adenocarcinoma)*" miRNA-seq verileri kullanılarak bir biyoinformatik analiz yapılmış ve kolorektal kanserde

farklı eksprese olan miRNA'lar çıkarılmıştır. Daha sonra EMT ile ilişkili olanlar saptanarak içlerinden bir seçim yapılmıştır.

2.7.2. KOLOREKTAL KANSERDE EKSOZOMAL miRNA ÇALIŞMALARI

Yukarıda bahsedildiği üzere çok sayıda miRNA molekülünün kolorektal kanserde etkinliği gösterilmiş olmakla birlikte çok az çalışmada MKH eksozomlarının taşıdığı miRNA'ların kolorektal kanser üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmaların ilki 2019 yılında Xu ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada MKH eksozomlarında yüksek eksprese olan miR-16-5p molekülünü kolorektal kanser hücre hatlarına transfekte ederek tümör migrasyon ve invasyonunun ITGA2'yi hedefleyerek azalttığını göstermişlerdir. MKH eksozomlarının taşıdığı miRNA'ların kolorektal kanserde etkinliğini gösteren çalışmalar, Çizelge 2.3.'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. Kolorektal kanserde eksozomal mikroRNA çalışmaları

exo miRNA	**Hedeflediği gen**	**KRK'daki etkisi**	**Referans**
exo miR-16	ITGA2	Apoptozu artırırken proliferasyon, migrasyon ve invazyonu inhibe eder	(38)
exo miR-4461	COPB2	Proliferasyon, migrasyon ve invazyonu inhibe eder	(37)
exo miR-3940	Integrin α6 (ITGA6)	TGF-β1 inaktivasyonu ile KRK hücrelerinin proliferasyonunu, EMT'sini,invazyon ve metastazını inhibe eder.	(229)
exo miR-222	ATF3	AKT yolunu aktive ederek KRK'in gelişimini destekler ve tümör büyümesini arttırır. İmmün sistemden kaçışı destekler.	(230)
exo miR-22	RAP2B	PI3K/AKT yolunu inhibe ederek KRK hücrelerinin proliferasyonunu ve invazyonuınu baskılar.	(231)
exo miR-424	TGFR3	KRK'da tümör büyümesini hızlandırır. miR-424 inhibe edilirse KRK'da tümör büyümesi kısıtlanır.	(232)
exo miR-30a ve exo miR-222	MIA3	KRK hücre proliferasyonunu ve metastazı destekler.	(233)

3. GEREKÇE VE AMAÇ

İnsidansı ve mortalitesinin yüksek olması nedeniyle kanserin progresyonu ve yayılımına etki eden faktörleri saptamak, kanser araştırmalarının en önemli hedeflerinden biridir. Bu doğrultuda bu doktora tezinin konusu; dünyada en sık görülen kanser tiplerinden biri olan kolorektal kanserin progresyonu ve yayılımına insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre (MKH) eksozomlarının etkisini araştırmaktır.

Bu tez çalışmasında MKH eksozomlarının kolorektal kanser gelişimi ve ilerlemesinde etkisini saptamak ve normal biyolojik süreçlerde MKH'nin KRK hücreleri üzerindeki etkisini anlayabilmek için invitro olarak insan kemik iliği kaynaklı MKH eksozomları kullanılmıştır. Bu eksozomlar, KRK hücre hatlarına uygulanarak proliferasyon, invazyon/metastaz/EMT bağlamında etkisi değerlendirilmiştir.

Literatür bilgileri eşliğinde; bu tez çalışmasının hipotezi, "İnsan Ki-MKH kaynaklı eksozomların, kolorektal kanser hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve invazyon yeteneğini artırır" şeklinde ifade edilebilir. Buna ek olarak, EMT transkripsiyon faktörlerinin ve EMT ilişkili miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde de EMT'yi artırma yönünde bir değişim olacağı öngörülmüştür. Bu tez çalışmasından elde edilen veriler ile kolorektal kanser progresyonunda ve yayılmasında, MKH'lerin salgıladığı ve parakrin etki gösterdiği bilinen çeşitli sitokinlere (örn IL-8) ek olarak eksozomların rolü incelenmiş ve Başlık 2.4.5'de bahsi geçen ve literatürde halen çelişkili görünen MKH-kolorektal kanser ilişkisinde MKH eksozomlarının pro ve/veya anti-tümör etkisine dair bir yorum yapılmıştır.

MKH eksozomlarının pro ve/veya anti-tümör etkisi, EMT sürecindeki etkisi saptandıktan sonra bunun ilişkili olduğu moleküler mekanizmalar ile ilgili çalışmalar yapılmış ve fonksiyonel olarak saptanan sonuçlar, biyoinformatik ve moleküler deneylerle de desteklenmiştir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Çalışmada 22 Ocak 2018 tarih ve 02-61-18 karar nolu ile Ankara Üniversitesi Etik kurulu izni ile 5 ayrı sağlıklı donörden elde edilen Ki-MKH süpernatanı ve bir adet Ki-MKH hücre hattı süpernatanı kullanılmıştır. Bu süpernatanlardan elde edilen eksozomların uygulanması için de kolorektal kanser hücre hattı kullanılmıştır. Kanser hücre hattı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji ABD'ndan Prof. Dr. Hakan AKBULUT'tan, Ki-MKH hücre hattı ise ATCC'den temin edilmiştir. Kullanılan hücre hatları ve üretim koşulları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kullanılan hücre hatları ve üretim koşulları

Tarih	**Pasaj no**	**Hücre hattı**	**Hücre adı**	**Kullanılan besiyeri katalog numaraları**	**Ortam içeriği**
19.02.2018	12	ATCC HT29	Kolorektal Kanser (insan)	Gibco Cat No: 16600082 Lot No: 2120383	McCoy's 5A (Modified) Medium +%10FBS* +Penisilin/Streptomisin
21.05.2019	5	ATCC PCS-500-012	Ki-MKH Hücre Hattı (insan)	Biological Industries Cat.No: 05-200-1A Lot.No: 1610177	MSC Nutristem Media XF + MSC Nutristem XF Supplement Mix +%10FBS* +Penisilin/Streptomisin

* Hücrelerin çoğaltılması için bir süre FBS kullanılmıştır. Ancak süpernatan toplanmasında ve eksozom uygulaması yapılacak deneylerde (yara iyileşmesi deneyi…vs) FBS kullanılmamıştır.

Kullanılan başlıca kimyasallar; **Sodyum klorür** (**NaCI**, molekül ağırlığı, 58.44, Sigma-Aldrich-500g, Alabaster, AL, ABD), **Potasyum klorür** (**KCI**, molekül ağırlığı, 74.55, Sigma-

Aldrich-250g, Alabaster, AL, ABD), **Sodyum fosfat dibasik heptahidrat** (**$Na_2HPO_4.7H_2O$,** molekül ağırlığı, 268.07, Sigma-Aldrich-250g, Alabaster, AL, ABD), **Potasyum fosfat monobasik** (**KH_2PO_4**, molekül ağırlığı, 136.09, Sigma-Aldrich-500g, Alabaster, AL, ABD), **Sodyum azide** (**NaN_3**, molekül ağırlığı, 65.01, Sigma-Aldrich-100g, Alabaster, AL, ABD), **Sodyum hidroksit** (**NaOH**, molekül ağırlığı, 40, Sigma-Aldrich-500g, Alabaster, AL, ABD), **Bovine Serum Albumin** (**BSA**, Sigma-Aldrich-50g, Alabaster, AL, ABD), **Metanol** (**CH_4O**, Invitrogen LifeTechnologies,), **Karboksil Latex Bead** (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Kaliforniya, ABD), Mounting Medium (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD), **Tween 20** (molekül ağırlığı, 1228, Sigma-Aldrich-100 ml, Alabaster, AL, ABD), **Dil stain** (**('Dil'; DilC18(3)**1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate), Invitrogen Life Technologies, katalog no:D3911, Carlsbad, Kaliforniya, ABD), DAPI (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD), **PE anti-human CD81 (TAPA-1) antibody** (Biolegend, San Diego, CA, ABD), **Pürifiye anti-human CD9 antibody** (Biolegend, San Diego, CA, ABD), **Dimetilsülfoksit** (DMSO, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD), **Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide** (**MTT,** molekül ağırlığı, 414,32, Sigma-Aldrich-500g, Alabaster, AL, ABD), **Matrigel Matrix** (Corning Life Sciences, New York, ABD), **Paraformaldehit** (moleküler ağırlığı 30, Sigma-Aldrich-500g, Alabaster, AL, ABD)

4.2. YÖNTEM

4.2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

4.2.1.1. Kİ-MKH KÜLTÜRÜ

İnsan Ki-MKH hücre kültürü için "*Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells; Normal, Human (ATCC® PCS-500-012™)*" hücre hattı kullanılmış ve ATCC'den temin edilmiştir.

Kİ-MKH Hücre hattı %10 fetal bovin serum (FBS), MSC Nutristem Media XF + MSC Nutristem XF Supplement Mix +%10FBS +Penisilin/Streptomisin ile kültüre edilmiştir (235).
.

Hücreler %80-90 konfluent olduğunda %10 FBS içeren besiyeri uzaklaştırılmış ve PBS'le hücreler yıkandıktan sonra FBS içermeyen besiyeri ile inkübe edilmiştir. Daha sonra süpernatanlar toplanıp -80 ^{0}C'de saklanmıştır.

Not: Hücrelerin FBS içermeyen ortamda strese girme ihtimali vardır. Bu durum eksozom içeriğinde değişikliğe sebep olabilir. Bunun önüne geçmek için "*GMP grade* insan büyüme faktörleri içeren bir *supplement mix"* kullanılmıştır.

Primer Ki-MKH hücreleri için kültür işlemi yapılmamıştır. Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü Doku ve Hücre Üretim Merkezi bünyesinde klinik için üretilmiş olan primer Ki-MKH hücrelerin süpernatanları etik kurul onayı ile kullanılmıştır.

4.2.1.2. HT29 (KOLOREKTAL KANSER HÜCRE HATTI) KÜLTÜRÜ

"HT29 (ATCC HTB-38) kolorektal kanser hücre hattı kullanılmış ve hücreler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji ABD'ndan Prof. Dr. Hakan AKBULUT'tan temin edilmiştir. HT29 hücre hattı %10 fetal bovin serum (FBS), McCoy's 5A (Modified) Medium +Penisilin/Streptomisin ile kültüre edilmiştir (235).

4.2.1.3. TRİPSİNİZASYON ve HÜCRE SAYIMI

HT29 hücreleri yaklaşık %90 konfluent olduğunda süpernatan uzaklaştırılıp 1xPBS ile yıkanmış ve ardından 2X Tripsin EDTA tampon eklenerek 37 ^{0}C'de 4-5 dakika bekletilmiştir. Tripsin inaktivasyonu için 1X Tripsin İnhibitörü kullanılmıştır. Hücreler 200 g'de 3 dakika santrifüjlenip %10 FBS'li besiyeri ile resüspanse edilmiştir. Hücre sayımı için 10 µl hücre süspansiyonu hemasitometreye alınıp 4 büyük alan sayılmıştır. Buna göre aşağıdaki formül ile hücre sayısı hesaplanmıştır (236).

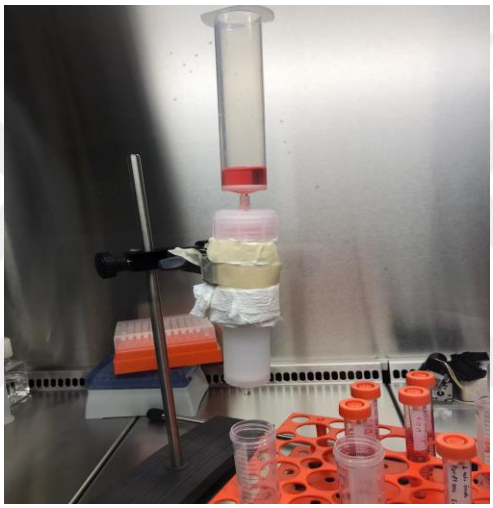
1 ml'deki toplam hücre sayısı = (Sayılan hücre/4) **x** Dilüsyon faktörü **x** 10^4

4.2.2. EKSOZOM İZOLASYONU

Ki-MKH hücre süpernatanlarından eksozom izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonlar için güncel literatürün tavsiye ettiği şekilde iki ayrı yöntemin kombinasyonu (size exclusion kromotografi ve ultrasantrifüjasyon) kullanılmıştır (237). Size exclusion kromotografi için "İzon Science qEV10 Size Exclusion" kolonları kullanılmış (238) ve Şekil 4.1.'de kullanılan kolonlar gösterilmiştir. Kullanıcı talimatına uygun olarak eksozom izolasyonu yapılmıştır (240).

Protokole göre; süpernatanlar bir gece önceden -80^{0}C'den çıkarılıp +4^{0}C'ye alınmış ve gece boyu yavaşça çözünmesi sağlanmıştır. Öncelikle süpernatanlar, hücre debrislerinin ve olası büyük partiküllerin uzaklaştırılması için 10.000 g'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Her izolasyon

için yaklaşık 10 ml süpernatan temiz bir tüpe alınmış ve kolonlar yaklaşık 1 saat önceden $+4^0$C'den çıkarılarak oda ısısına gelmesi sağlanmıştır. Kolon, dik ve sabit durması için bir standa sabitlenmiş, üst hazne önce PBS ile ıslatılıp akış sağlandıktan sonra kolonun üst ve alt vidası çıkarılıp buraya yerleştirilmiştir. Haznenin hacmi kadar (yaklaşık 70 ml) PBS eklenip kolonun yıkanması sağlanmış, ardından 10 ml hücre süpernatanı eklenmiştir. Bu aşamadan hemen sonra akan ilk 25 ml sıvı daha atıldıktan sonra alta temiz bir 15ml'lik falkon konmuş ve 15 ml eksozom toplanmıştır. Kolonun tamamen temizlenmesi için (yeni örneğe geçebilmek için) 120 ml (1.5 hacim) daha PBS kolondan geçirilmiş ve izolasyonlar tamamlandıktan sonra 1 hacim %0.05 Na Azide geçirilip ve hazne boşalır boşalmaz alt ve üst vidalar kapatılarak kolon $+4^0$C'ye kaldırılmıştır.



Şekil 4.1. Eksozom izolasyon kolonları

Size exclusion kromotografi ile elde edilen 15 ml eksozomun saflığının ve konsantrasyonunun artırılması amacıyla örnekler ultrasantrifüjasyona tabi tutulmuştur (237). Eksozomlar ultrasantrifüj tüpüne aktarılıp 100.000 g'de 1 saat santrifüjlenip fazla süpernatan uzaklaştırılmış ve dipte kalan PBS ile tekrar resüspanse edilmiştir. Böylece her örneğin hacmi yaklaşık 1.5 ml-3 ml aralığına indirilmiştir.

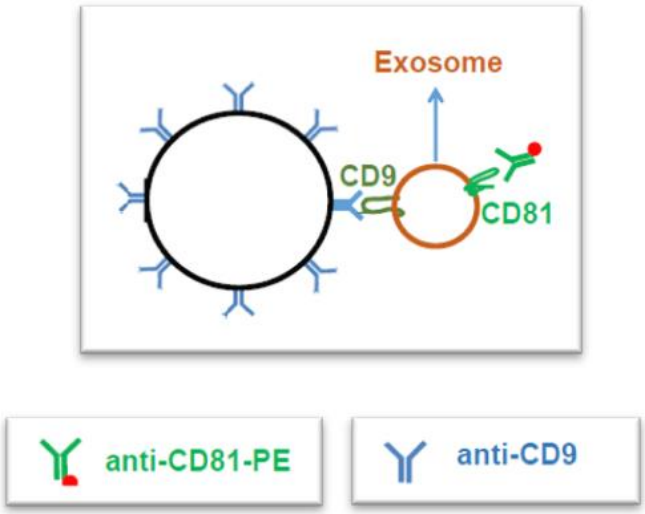
4.2.3. EKSOZOM KARAKTERİZASYONU

4.2.3.1. EKSOZOM BOYUT DAĞILIMININ TRPS ile ANALİZİ

Elde edilen eksozomların partikül büyüklüğü ve gerçek dağılım ile konsantrasyon verilerini elde etmek amacıyla ayarlanabilir direnç darbe algılama (Tunable Resistive Pulse Sensing, TRPS) mekanizmasına dayanan bir sistem olan qNano cihazı (Izon Sciences, Birleşik Krallık, teknik özellikler için bk.: https://www.izon.com/) kullanılarak izole edilen eksozomların analizleri gerçekleştirilmiştir. (240,241). Partikül büyüklüğü ve konsantrasyon kalibrasyonu için Izon CPC100B boncukları kullanılmış ve analiz aralığı 50-330 nm olan 100 nm'lik bir por büyüklüğüne sahip bir membran kullanılmıştır. Minimum 500 veri noktası toplanıp sonuçlar analiz edilmiştir. Bunun için NP100 poru cihaza yerleştirip kullanıcı talimatına uygun olarak önce wetting solüsyonu ile ıslatılmış, daha sonra da eksozomun resüspanse edildiği tampon (1xPBS) ile ayarlamalar yapılmış ve 40 µl örnek yüklenerek 500 veri sayıldıktan sonra kalibrasyon boncukları ile kalibre edilip sonuçlar analiz edilmiştir.

4.2.3.2. FLOW SİTOMETRİ ile EKSOZOMAL BİYOBELİRTEÇLERİN ANALİZİ

Eksozomlar çok küçük yapılar olduğu için flow sitometri ile direkt saptanabilmeleri çok güçtür. Flow sitometride görünür olabilmelerini sağlayabilmek için karboksil latex boncuklar kullanılmaktadır (237). Şekil 4.2.’ de görüldüğü üzere latex boncukların üzeri bir eksozom biyobelirteci olan CD9 antikoru ile kaplanmıştır. Daha sonra BSA ile bloklanıp eksozomlarla inkübe edilerek bead-CD9-eksozom komplexi oluşması sağlanmıştır. Son olarak PE işaretli CD81 antikoru (eksozom biyobelirteci) ile inkübe edilerek boyanması sağlanmış ve PE kanalında analiz edilmiştir (242).



Şekil 4.2. Flow sitometride eksozom analizi için hazırlanan bead-eksozom-antikor komplexinin yapısı (244)

Yukarıdaki kompleksin hazırlığı için öncelikle 200 µl latex boncuk, 100 µl PBS ile karıştırılıp max. rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatan uzaklaştırılıp 20 µg pürifiye CD9 antikoru eklenmiş ve 50 µl PBS eklenip 30 dk rotatorda inkübe edilmiştir. Daha sonra hacmi PBS ile 500 µl'ye tamamlanıp rotatorda gece boyu $+4^0$C'de inkübe edilmiştir. 10 dk. max.rpm'de santrifüjlenip süpernatanı uzaklaştırılmış ve 1 ml %5 BSA (PBS ile hazırlanmış)'da çözülüp rotatorda 4 saat inkübe edilmiştir. Tekrar santrifüjlenip süpernatanı uzaklaştırılmış ve 200 µl %1 BSA içinde çözülmüştür. Bu tüp "bead coating" olarak işaretlenmiştir.

Analizi yapılacak her bir örnek için 2 tüp hazırlanmış, bunlardan biri CD81-PE boyalı, biri boyasız (negatif kontrol) olarak işaretlenmiştir. Her tüp için 1 µg eksozom ve 1 µl bead coating karıştırılmış. 50 µl PBS eklenerek oda ısısında 30 dk döndürülmüştür. PBS ile hacmi 500 µl'ye tamamlanıp rotatorda gece boyu $+4^0$C'de inkübe edilmiş, 10.000 g de 5 dk santrifüjlenip süpernatanı uzaklaştırılmıştır. Her tüp için 50 µl olucak şekilde PBS ile çözülmüş, boyalı olarak işaretlenen tüpe 5 µl PE-CD81 antikoru eklenmiş, boyasız olarak işaretlenen tüpe bir şey eklenmeden tüpler 1 saat karanlıkta rotatorda inkübe edilmiştir. Üzerlerine 100 µl PBS eklenerek flow sitometride okuması yapılmıştır. Okuma öncesinde flow sitometride bir taslak hazırlanmış, bunun için fazladan hazırlanan bir boyasız tüp kullanılmıştır. Boyasız tüpün okutulması ile boncukların nerede konumlandığı anlaşılıp kapı alınarak bir taslak

kaydedilmiştir. Analizler PE kanalındaki sayımlara göre boyalı tüpün boyasız tüpe göre en az 1 birim yüksek sayım verdiğinin gösterilmesi ile tamamlanmıştır.

4.2.3.3. EKSOZOMLARIN HÜCRE İÇİNDE GÖRÜNTÜLENMESİ

İzole edilen eksozomlar bir membran boyası olan ile Dil boyası ile işaretlenip HT29 hücreleri içinde konfokal mikroskopi ile görüntülenmiştir (244). Bunun için $48x10^{10}$ partikül eksozom son hacmi 1 ml olacak şekilde süspanse edilmiştir. Daha önce DMSO ile çözülerek son konsantrasyonu 2,5 mg/ml olan Dil boyasından 4 µl eklenip karanlık ortamda ve oda ısısında 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda üzerine son hacmi 6 ml olacak şekilde PBS eklenip 100.000 g'de 1 saat santrifüj edilmiştir. Süpernatan uzaklaştırılıp PBS ile tekrar çözülmüştür.

HT29 hücreleri $5x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara steril lamel üzerine ekilip 24 saat inkübe edilmiştir ve eksozomlar $4x10^{10}$ partikül/ml konsantrasyonda olacak şekilde HT29 hücrelerine uygulanmıştır. Hücreler Dil işaretli eksozomlar ile 24 saat inkübe edildikten sonra %100 metanol ile fikse edilip DAPI'li mounting besiyeri ile kapatılmış ve konfokal mikroskopta incelenmiştir. Negatif kontrol olarak işaretsiz eksozomlar kullanılmıştır. Hücre içine alınan eksozomlar 63X büyütme ile görüntülenmiştir.

4.2.4. EKSOZOM UYGULAMASI İLE YARA İYİLEŞMESİ DENEYİ

Eksozom uygulamasının HT29 hücreleri üzerinde migrasyon yeteneği açısından etkisini incelemek için yara iyileşmesi deneyi yapılmıştır (245). Bir hücre tabakasının hücre göçünü yarı kantitatif olarak ölçmek için kullanılan bu yaklaşımda %70-80 konfluent olan hücrelere pipet ucu ile bir çizik atılarak oluşan boşluğa hücrelerin göç etmesini ve boşluğu kapatması beklenmektedir (246).

Yara iyileşmesi deneyi için öncelikle HT29 hücreleri $2x10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş, 24 saat sonra besiyeri uzaklaştırılıp 200 µl'lik pipet ucu ile çizilmiştir. Daha sonra hücre kalıntılarının uzaklaştırılması için 1xPBS ile yıkanmıştır. 2 ml FBS içermeyen besiyeri eklenip her bir eksozom için $2x10^{10}$ partikül/ml olacak şekilde eksozom uygulaması ile 3'lü tekrarlar yapılmıştır. Kontrol grubuna eş hacimde PBS eklenmiştir. Eksozom uygulaması yapıldıktan hemen sonra fotoğraflanmış ve 0. saat olarak

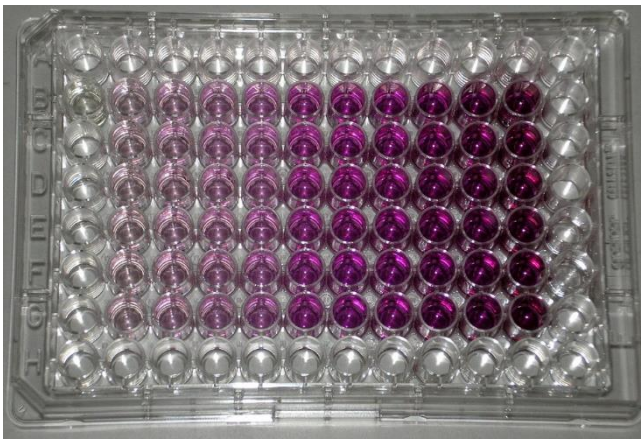
kaydedilmiştir. Hücreler 37 ^{0}C'de hücre inkübatörüne alınıp 48 saat inkübe edildikten sonra tekrar fotoğraflanmış ve ZEN 2012 (blue edition) programı aracılığıyla yara kapanma oranları ölçeklendirilmiş ve sonuçlar two-way ANOVA testi kullanılarak "GraphPad" istatistik programı ile analiz edilmiştir.

4.2.5. EKSOZOM UYGULAMASI İLE MTT DENEYİ

Eksozom uygulamasının HT29 hücreleri üzerinde proliferasyon açısından etkisini incelemek için MTT deneyi yapılmıştır. Temel çalışma prensibi; proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (MTT, Metiltiazol difenil tetrazolyum: sarı renkli) kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayalıdır.

NAD(P)H bağımlı hücresel oksiredüktaz + Tetrazolyum → **Formazan** (mor renkli)

Böylece hücresel büyümeyi ve canlılığı yansıtan mitokondrinin aktivitesi ölçülerek hücre proliferasyonu hakkında bilgi sağlanmaktadır (247). Şeki 4.3.'de formazan kristallerinin oluşturduğu renk değişimi temsili olarak gösterilmiştir.



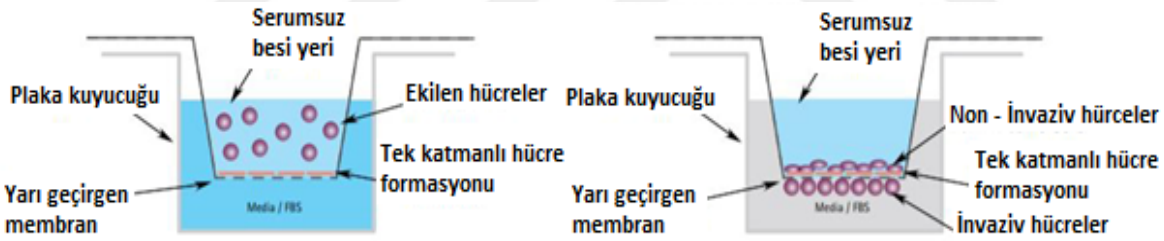
Şekil 4.3. MTT Deney Görüntüsü

MTT deneyi için öncelikle HT29 hücreleri 1x10^{4} hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş, 24 saat sonra besiyeri uzaklaştırılıp 1xPBS ile yıkanmıştır. 100 µl FBS içermeyen besiyeri ve 2x10^{10} partikül/ml konsantrasyonda eksozom uygulaması yapılmış ve

24, 48, 72 saat olarak 3 ayrı plate'de 37 ^{0}C'de inkübe edilmiştir. Kontrol grubu için eş hacimde 1xPBS uygulanmış, blank kontrol için hücresiz 3 kuyucuk ayrılmıştır. İnkübasyon süresi dolunca 10 µl MTT reaktifi eklenip 2 saat 37 ^{0}C'de inkübe edilmiş ve besiyeri uzaklaştırılıp 50 µl DMSO ile formazan kristalleri çözülmüş ve son hacmi PBS ile 100µl'ye tamamlanıp 590 nm multiplate okuyucuda absorbans değerleri okunmuştur. Blank kontrol değerleri ile normalizasyon yapıldıktan sonra sonuçlar two-way ANOVA testi kullanılarak GraphPad programı ile analiz edilmiştir.

4.2.6. EKSOZOM UYGULAMASI İLE HÜCRE İNVAZYON DENEYİ

Eksozom uygulamasının HT29 hücreleri üzerinde invazyon açısından etkisini incelemek için transwell matrigel temelli hücre invazyon deneyi yapılmıştır. Temel çalışma prensibinde, gözenekli bir membran ile iki ayrı ortam oluşturulur. Gözenekli membran, zardaki gözenekleri bloke etmesi için ekstraselüler matristen (ECM) oluşan bir jel ile bloke edilir. ECM, zar gözeneklerini tıkar ve invaziv hücreler matrisi bozabilir ve ECM katmanından geçebilir, oysa non-invaziv hücreler ECM katmanından geçemez. Daha sonra invaziv hücreler boyanıp sayılarak invazyon yeteneği hakkında bilgi alınmış olur (246,248).



Şekil 4.4. Transwell İnvazyon deneyi (250)

Transwell invazyon deneyi için öncelikle 8 µm porlu transwell kuyucukları 24 kuyucuklu plaka içerisine yerleştirilmiştir. Bir gece önceden yavaşça çözünmesi için +4 ^{0}C'ye çıkarılan Matrigel Matrix, FBS içermeyen besiyeri ile uygun konsantrasyonda (250µg/ml) dilüe edilerek transwell kuyucuklarına 100 µl olarak eklenip jelleşmesi için gece boyu 37 ^{0}C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra HT29 hücreleri 5x10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde transwellin üst haznesine 200 µl FBS içermeyen besiyeri ile ekilmiş, ayrıca deney grupları için 2x10^{10} partikül/ml konsantrasyonda eksozom ilave edilmiştir. Alt hazneye ise 750 µl %10 FBS içeren besiyeri eklenmiştir. Ardından hücreler 48 saat 37 ^{0}C'de inkübe edilmiş ve inkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştılıp

transwell kuyucukları 1xPBS ile iki kez yıkanmış ve %3,7 paraformaldehit ile fikse edilip %100 metanol ile permabilize edilmiştir. Daha sonra %2 Giemsa ile 10 dakika boyanıp üst katmandaki non-invaziv hücreler swab ile silinip 2 kez 1xPBS ile yıkanmış, por kuruduktan sonra temiz bir bistüri ucu ile kesilip lam üzerine alınıp ışık mikroskobunda görüntülenmiştir. 5 ayrı alandan çekilen fotoğraflarda invaze hücreler sayılmış ve sonuçlar two-way ANOVA testi kullanılarak GraphPad programı ile analiz edilmiştir.

4.2.7. RNA-SEQ METAANALİZİ

"*The Cancer Genome Atlas (TCGA) COAD (colorectal adenocarcinoma)"* miRNA-seq verileri ve ilgili klinik bilgiler, R istatistik yazılımı (sürüm 4.0.3) kullanılarak Pan-Cancer Atlas üzerinden (https://portal.gdc.cancer.gov/) alınmıştır (249). Bu veri, 463 örnekten (455 primer tümör ve 8 normal kontrol) oluşuyordu. miRNA ekspresyon matrisi, 1881 miRNA'dan oluşmaktadır.

Diferansiyel miRNA ifadesi, DESeq2 ve IHW paketleri kullanılarak analiz edilmiştir. Farklı tümör ve normal kontrol dokuları arasındaki anlamlı ekspresyon farklılığı için mutlak log2 kat değişimi ≥1 ile ayarlanmış p değeri ≤ 0,05 olarak kabul edilmiştir (250).

EMT ile ilgili genler ve kodlayıcı olmayan RNA'lar için kapsamlı literatür araştırması ve işlevsel açıklama içeren bir veritabanı olan dbEMT 2.0 kullanılarak EMT ile ilişkili miRNA'lar saptanmıştır (251). Bu iki verinin (kolorektal kanserde farklı eksprese olan miRNA'lar ve dbEMT üzerinde tanımlı EMT ilişkili miRNA'lar) kesişimi için Venn diyagramı oluşturmak için "InteractiVenn" aracı kullanılmıştır (252). Bu miRNA'lar içinden bazıları seçilerek çalışmaya dahil edilmiştir.

4.2.8. EKSOZOM UYGULAMASI İLE MİRNA VE EMT-TF GEN EKSPRESYON DEĞİŞİMLERİNİN SAPTANMASI

4.2.8.1. Total RNA izolasyonu (Trizol ile)

HT29 hücreleri, 6-kuyucuklu plakalara $2x10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat inkübasyondan sonra (%70-80 konfluensi) DPBS ile yıkanıp $2x10^{10}$ partikül/ml konsantrasyonda FBS içermeyen besiyeri ile eksozom uygulaması yapılmıştır. Kontrol grubuna eksozomlar ile eş hacimde PBS eklenmiştir. 48 saat inkübasyonun sonunda RNA izolasyonu

için "*RiboEX total RNA isolation solution*" kullanılarak trizol temelli bir RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Her kuyucuğa 750 µl trizol eklenerek hücreler pipetaj ile kaldırılıp 1.5 ml'lük mikrosantrifüj tüpüne alınır. 5 dk oda ısısında beklenip 12.000 g'de 4^0C'de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Süpernatan temiz tüpe alınmıştır 200 µl kloroform eklenip 12.000 g'de 4^0C'de 15 dk. santrifüjlenmiş ve ayrılan üst faz temiz tüpe alınmıştır. Üzerine 1 ml isopropil alkol eklenip alt üst edilmiş ve 12.000 g'de 4^0C'de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Süpernatan atılıp 1 ml 750 µl %75 etanol eklenip 7500 g'de 4^0C'de 5 dk. santrifüjlenmiştir. süpernatan atılıp tüp kurutulmuş ve . 50 µl RNAaz free su eklenip 56 ^{0}C'de 10 dk bekletilip buza alınmıştır.

- **RNA'nın spektrofotometrik analizi ve miktar tayini**

İzole edilen RNA'ların saflığı ve konsantrasyonunun tespiti için spektrofotometre (ePoch, BioTek Instruments, Winooski, Vermont, ABD, teknik özellikler için bk.: https://www.biotek.com/) ile iki tekrarlı olarak RNA'lar ölçülmüştür. Nükleik asitler 260 nm dalga boyunda, protein ise 280 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. RNA'nın saflığı değerlendirilirken 260/280 oranının ~2 olması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında da mümkün olduğunca bu orana uygun aralıklar dikkate alınmıştır.

- **Agaroz Jel Elektroforezi**

RNA'ların bütünlük kontrolü ve DNA kontaminasyonu tespiti için %1 agaroz jel ile yatay elektroforezde yürütülmüştür. Örnekler 100 bp DNA ladder eşliğinde yürütülmüştür. RNA'lar 65^0C'de 3 dk. inkübe edilip, daha sonra 6x yükleme boyası ile karıştırılıp jele yüklenmiştir. 80 voltta 1 saat yürütülüp UV transilluminator (Biorad Chemidoc Imaging Systems, Hercules, Kaliforniya, ABD, teknik özellikler için bk.: https://www.bio-rad.com/) ile görüntülenmiştir.

4.2.8.2. cDNA Sentezi

EMT-TF ekspresyonları için, başlangıç RNA miktarı 1000 ng olacak şekilde hesaplamalar yapılıp "EntiLink cDNA sentez kiti" kullanılarak kullanıcı talimatına uygun olarak cDNA sentezlenmiştir.

Buna göre cDNA sentezi için kullanılan protokol ve PCR programı Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. EMT-TF için kullanılan cDNA protokolü

1. aşama	5x gDNA eraser buffer	2 µl
	gDNA eraser	1 µl
	RNA + RNAase free su	7 µl
	Toplam hacim	10 µl
	Program:	42 ^{0}C'de 2 dk.
2. aşama	1. aşama mix	10 µl
	dNTP	1 µl
	RT primer mix	2 µl
	RNAase free su	2 µl
	Toplam hacim	15 µl
	Program:	70 ^{0}C'de 5 dk. Buzda beklet
3. aşama	2. aşama mix	15 µl
	5x RT buffer	4 µl
	RTase	1 µl
	Toplam hacim	15 µl
	Program:	37 ^{0}C'de 60 dk. 95 ^{0}C'de 5 dk. Buzda beklet.

miRNA ekspresyonları için başlangıç RNA miktarı 3000 ng olarak belirlenmiş ve spesifik stem-loop primerler kullanılarak gen spesifik cDNA sentezi kullanıcı talimatına uygun olarak yapılmıştır . Kullanılan miRNA stem-loop primerleri Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. cDNA sentezinde kullanılan miRNA stem-loop primerleri

miRNA	**Primer dizisi (Stem-loop)**
let7a	5′-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC AAC TAT 3'
U6 (küçük nüklear RNA, snRNA)	5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′
hsa-miR21-5p	5′- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC TCA ACA -3′
hsa-miR27a-5p	5′-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC TGCTCA- 3’
hsa-miR126-5p	5’-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACCGC GTA-3’
hsa-miR146a-5p	5′-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC AAC CCA- 3’
hsa-miR148a-5p	5′-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACAGT CGG- 3’
hsa-miR150-5p	5′-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC CACTGG- 3’
hsa-miR194-5p	5′-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC TCCACA- 3’
hsa-miR582-5p	5’-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC AGT AAC-3’

miRNA’lar için kullanılan cDNA sentezinde kullanılan protokol ve PCR programı Çizelge 4.4.’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. miRNA'lar için kullanılan cDNA protokolü

1. aşama	Stem-loop primer mix	10 µl
	dNTP	1 µl
	RNA + RNAase free su	4 µl
	Toplam hacim	15 µl
	Program:	70 ^{0}C'de 5 dk.
2. aşama	1. aşama mix	15 µl
	5x RT buffer	4 µl
	RTase	1 µl
	Toplam hacim	15 µl
	Program:	42 ^{0}C'de 60 dk. 95 ^{0}C'de 5 dk. Buzda beklet

4.2.8.3. Kantitatif Real time PCR

Gen ekspresyon değişimlerini saptamak için Q-PCR yapılmıştır. EMT -TF'ler için GAPDH, miRNA'lar için let7a ve U6 housekeeping gen olarak kullanılmıştır (253,254).

Kullanılan miRNA ve EMT genlerinin primerleri Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Kantitatif PCR'da kullanılan tüm primer dizileri

Genler	**Primer dizileri (forward ve reverse)**
GAPDH	**F:** 5'- CTGGGCTACACTGAGCACC-3' **R:** 5'- AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'
E-Cadherin	**F:** 5'-TTGACGCCGAGAGCTACAC-3' **R:** 5'-GTCGACCGGTGCAATCTT-3'
N-Cadherin	**F:** 5'- TCCAGACCCCAATTCAATTAATATTAC-3' **R:** 5'-AAAATCACCATTAAGCCGAGTGA-3'
Twist1	**F:** 5'-GGAGTCCGCAGTCTTACGAG-3' **R:** 5'-TCTGGAGGACCTGGTAGAGG-3'
Slug (Snail2)	**F:** 5'-CTTTTTCTTGCCCTCACTGC-3' **R:** 5'-AGCAGCCAGATTCCTCATGT-3'
Universal primer	**F:** 5′-CCA GTG CAG GGT CCG AGG TA-3′
let7a	**F:** 5' AGG CAG TGA GGT AGT AGG 3'
U6	**F:**5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′ **R:** 5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′
miR21	**F:** 5′- TAGCTTATCAGACTGATGTTGTCCGCT -3′
miR27a	**F:** 5' -CAC CAG AGG GCT TAG CTG - 3'
miR126	F: 5'-GCA GCG CAG CAT TAT TAC TTT-3'
hsa-miR148a-5p	**F:** 5' - GCG CAG TGA GAA CTG AAT T - 3'
hsa-miR148-5p	**F:** 5' -GCG CAG AAA GTT CTG AGA - 3'
miR150	**F:** 5'- GCA GTC TCC CAA CCC T- 3'
miR194	**F:** 5' -GCG CAG TGT AAC AGC AAC - 3'
miR582	**F**: 5'-AGC GCA GTT ACA GTT GTT C-3'

Kantitatif PCR için Promega GoTaq® Green Master Mix, (2X) kullanılmış olup ilgili protokol ve PCR programı EMT-TF'ler için Çizelge 4.6.'da, miRNA'lar için Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. EMT-TF için kullanılan Q-PCR protokolü

Protokol	Promega GoTaq® Green Master Mix, (2X)	5 µl
	Forward Primer (10 pmol)	0,5 µl
	Reverse Primer (10 pmol)	0,5 µl
	RNAse free su	3 µl
	cDNA	1 µl
Program	Pre-inkübasyon	95 ^{0}C 5 dk.
	Amplifikasyon (40 döngü)	95 ^{0}C 15 sn. 60 ^{0}C 60 sn 72 ^{0}C 30 sn
	Melting Curve	95 ^{0}C 10 sn 65 ^{0}C 60 sn 95 ^{0}C bekleme
	Soğuma	40 ^{0}C 30 sn.

Çizelge 4.7. miRNA'lar için kullanılan Q-PCR protokolü

Protokol	Promega GoTaq® Green Master Mix, (2X)	8 µl
	Forward Primer (10 pmol)	1 µl
	Universal Primer (10 pmol)	1 µl
	RNAse free su	4,5 µl
	cDNA	1,5 µl
Program	Pre-inkübasyon	95 ^{0}C 5 dk.
	Amplifikasyon (40 döngü)	95 ^{0}C 15 sn. 59 ^{0}C 60 sn 72 ^{0}C 30 sn
	Melting Curve	95 ^{0}C 10 sn 65 ^{0}C 60 sn 95 ^{0}C bekleme
	Soğuma	40 ^{0}C 30 sn.

4.2.9. HT29 HÜCRELERİNDE miRNA TRASFEKSİYON ÇALIŞMASI

Yapılan QPCR analizinde HT29 hücrelerinde düşük eksprese olduğu görülen miR126'nın overekspresyonunu sağlamak için lipozomal bazlı geçici transfeksiyon yapılmıştır. Transfeksiyon için miRIDIAN microRNA mimikleri ve Dharmafect transfeksiyon ajanları kullanılmıştır. Bu teknikte miRNA mimiklerinin konak hücreye girişini sağlayacak hücrenin fosfolipit tabakası ile sorunsuz birleşebilen pozitif yüklü lipid agregatlarının oluşumunu sağlayan bir reaktif kullanılmıştır (255,256).

Her bir mimik için 3 tekrarlı olarak deney planlanmış olup hücreler 6 kuyucuklu plakalara $2x10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilip 24 saat inkübe edildikten sonra (%40-50 konfluent olmalı) besiyerleri transfeksiyondan en az 12 saat önce antibiyotiksiz besiyeri ile değiştirilmiştir. Her kuyucuğa 50µm mimik ve transfeksiyon ajanı eklenip 24 saat inkübe edilmiştir. Mevcut besiyeri, antibiyotikli besiyeri ile değiştirilip hücreler 48 saat daha inkübe edildikten sonra RNA

izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu için "RiboEX Total RNA izolation solution" kiti kullanılarak trizol temelli bir RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA'ların bütünlük kontrolü ve DNA kontaminasyonu tespiti için %1 agaroz jel ile agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. RNA'ların konsantrasyonu spektrofotometre ile iki tekrarlı ölçülmüştür.

Başlık 4.2.9.2 ve 4.2.9.3 de tarif edildiği gibi cDNA sentezi ve qPCR'ları yapılarak miR126 için ekspresyon artışı analiz edilerek transfeksiyonun başarısı kontrol edilmiştir. Kontrol mimiklere göre istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon artışının sağlanması durumunda transfeksiyon başarılı kabul edilip ileri deneylere devam edilmiştir.

4.2.9.1. TRANSFEKSİYON SONRASI YARA İYİLEŞMESİ DENEYİ

Transfeksiyon sonrası HT29 hücrelerinin migrasyon yeteneği açısından değişimini incelemek için yara iyileşmesi deneyi yapılmıştır. miR126 overekspresе hücrelerde, overekspresе olmayanlara göre yara kapanma oranı hesaplanmıştır. Başlık 4.2.5.'deki protokole göre yara iyileşmesi deneyi yapılmış ve two-way ANOVA testi kullanılarak "GraphPad" istatistik programı ile analiz edilmiştir.

4.2.9.2. TRANSFEKSİYON SONRASI EMT-TF GEN EKSPRESYON DEĞİŞİMİ

Transfeksiyon sonrası HT29 hücrelerinin EMT profilindeki değişimi göstermek için qPCR yapılmıştır. Bunun için Başlık 4.2.9.2 ve 4.2.9.3'deki protokole göre cDNA sentezi ve qPCR'ları gerçekleştirilmiştir.

4.2.9.3. miR126-5p'NİN YOLAK ANALİZİ

DIANA-mirPath v.3 web sunucusu (257) aracılığı ile "*pathway union*", TarBase v7.0 (P-değeri eşiği 0.05, mikroT eşiği 0.7 ve Fisher'ın doğruluk testi (Hipergeometrik dağılım)) kullanılarak KEGG yolak analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonucuna göre kolorektal kanserde etkinliği öngörülen hedef genler listelenmiş ve miR126-5p'nin belirtilen hedefleri şematize edilmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu tez kapsamında yapılan tüm deneyler Çizelge 5.1.'de gruplandırılmış ve ilgili başlık altında sonuçları paylaşılmıştır.

Çizelge 5.1. İş Akış Şeması

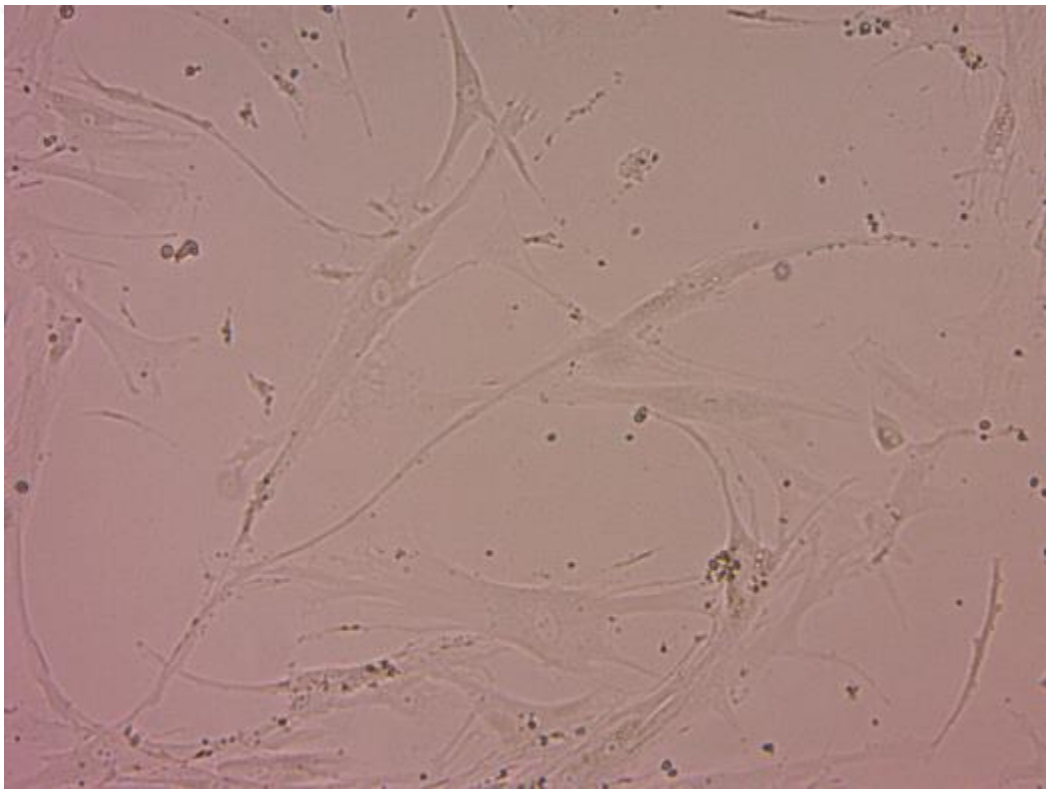
Deney grubu	Deney adı	Kullanılan yöntem
Eksozomların hazırlanması	Ki-MKH'lerden süpernatan toplanması	Ki-MKH primer ve hücre hattı kültürü
	Eksozom izolasyonu	Size exclusion kromotografi Ultrasantrifüjasyon
	Eksozom karakterizasyonu	Q Nano Gold ile konsantrasyon ve boyut dağılımı analizi
		Flow sitometri ile biyobelirteç tayini
Fonksiyonel deneyler	MKH Eksozomlarının KRK Hücre İçinde Görüntülenmesi	Floresan boyama ve konfokal mikroskopi
	Hücre Proliferasyon Deneyi	MTT deneyi
	Hücre Migrasyon deneyi	Yara iyileşmesi deneyi
	Hücre İnvazyon deneyi	Transwell invazyon deneyi
Biyoinformatik Çalışmalar	Kolorektal kanserde farklı eksprese olan ve EMT ilişkili miRNA'ların tespiti	Metaanaliz: R yazılımı, Deseq2 paketi dbEMT veritabanı İnteractiVenn aracı
Moleküler Deneyler	EMT ilişkili gen ekspresyon değişimleri	EMT-TF gen ekspresyonu analizi
		EMT ilişkili miRNA ekspresyon analizi
	miRNA overekspresyonu	miR126 mimik transfeksiyonu
		Transfeksiyon sonrası EMT-TF gen ekspresyon değişimi
		Transfeksiyon sonrası yara iyileşmesi deneyi

5.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

5.1.1. ATCC PCS-500-012 (İNSAN Kİ-MKH HÜCRE HATTI) KÜLTÜRÜ SONUÇLARI

Pasaj 5-7 arası çoğaltılan hücreler, %80-90 konfluent olduğunda besiyeri uzaklaştırılıp 1xPBS ile yıkanmış ve FBS içermeyen besiyeri ile 48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra toplanan besiyeri (süpernatanlar) -80 ^{0}C'de saklanmıştır.

Primer Ki-MKH'lerin süpernatanları ise Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü bünyesinde yer alan Doku ve Hücre Üretim Merkezi'nde üretimi yapılan hücrelerden temin edilmiş ve -80^{0}C'de saklanmıştır. Hücre hattından çoğaltılan insan Kİ-MKH hücreleri, 10x objektif ile fotoğraflanmış ve Şekil 5.1.'de gösterilmiştir.

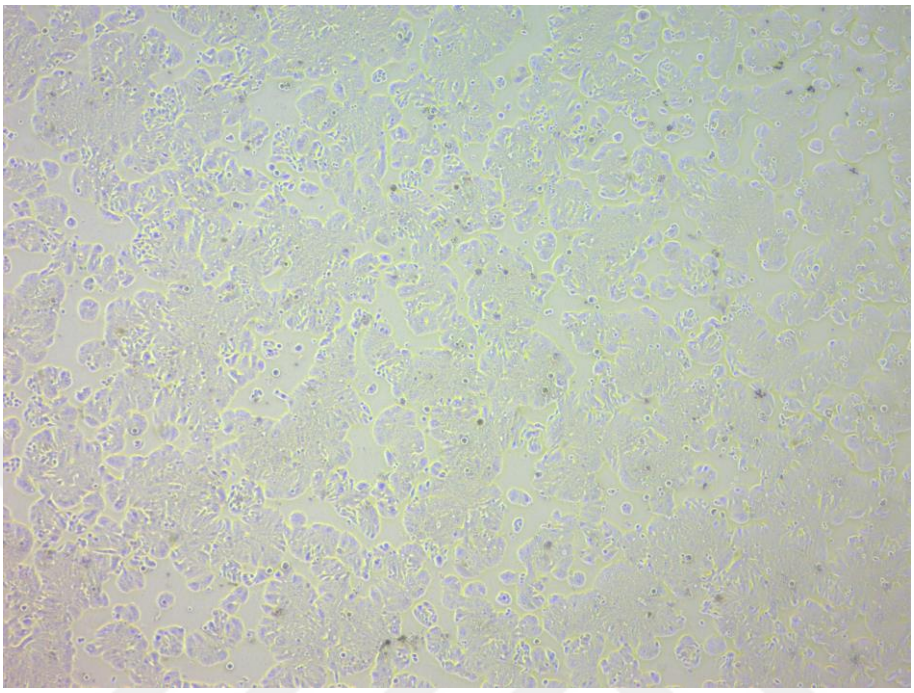


Şekil 5.1. ATCC PCS-500-012 (insan Ki-MKH hücre hattı) hücreleri

5.1.2. HT29 (KOLOREKTAL KANSER HÜCRE HATTI) KÜLTÜRÜ SONUÇLARI

"HT29 (ATCC HTB-38) kolorektal kanser hücre hattı %10 fetal bovin serum (FBS), McCoy's 5A (Modified) Medium +Penisilin/Streptomisin ile kültüre edilmiştir. Yeteri kadar pasajlanarak

tüm deneylerde kullanılmak üzere sıvı azotta %5 DMSO ve %95 FBS ile dondurularak saklanmıştır. HT29 hücreleri çoğaltılıp, 10x objektif ile fotoğraflanmış ve Şekil 5.2.'de gösterilmiştir.



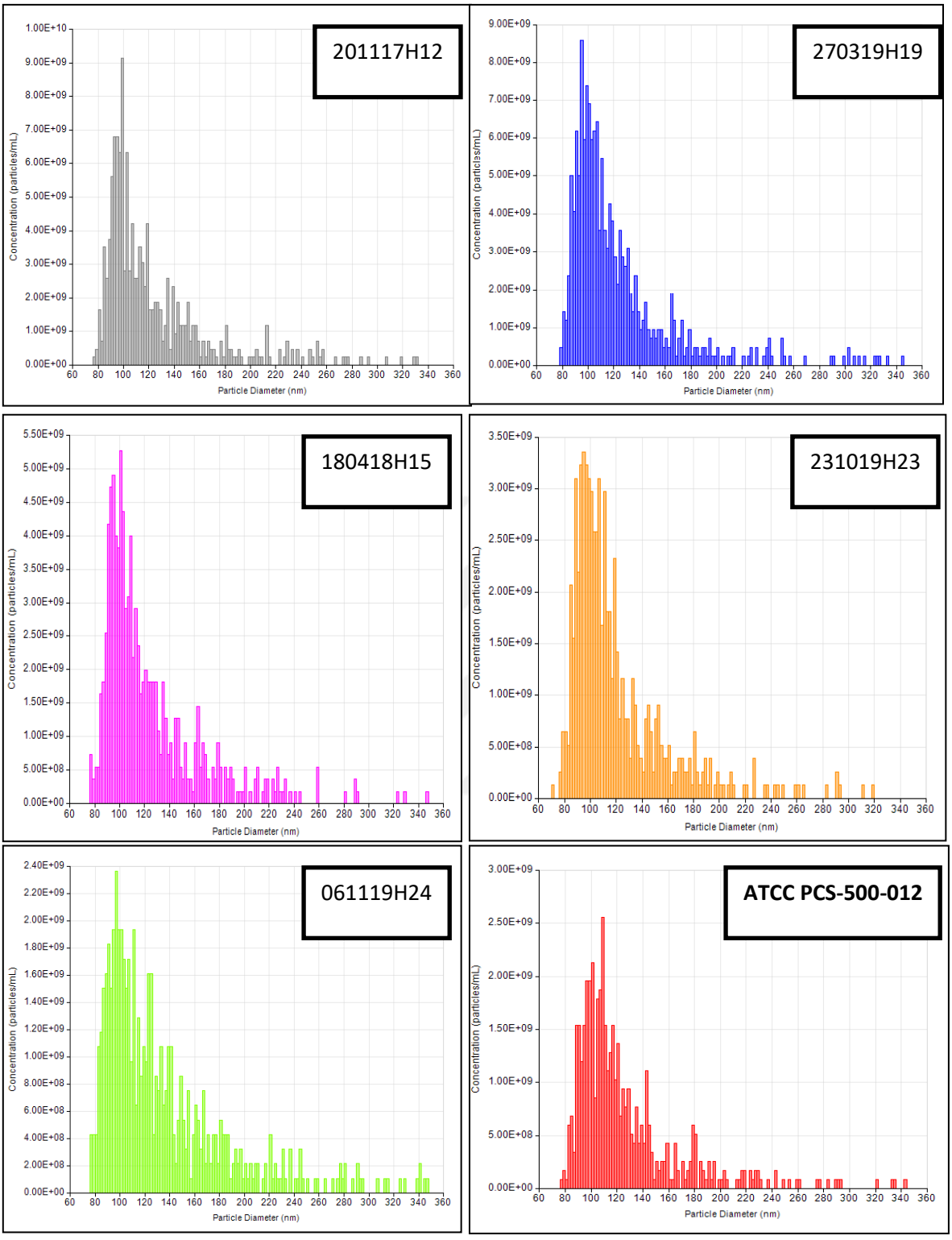
Şekil 5.2. HT29 (insan kolorektal kanser) hücreleri

5.2. EKSOZOM İZOLASYON VE KARAKTERİZASYON SONUÇLARI

5 ayrı donörden elde edilen Ki-MKH süpernatanlarından ve insan Ki-MKH hücre hattından eksozom izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon için aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir:

5.2.1. EKSOZOM BOYUT DAĞILIMININ TRPS İLE ANALİZ SONUÇLARI

Elde edilen eksozomlar; boyut ve miktar tayini için Q-Nano Gold cihazında analiz edilmiştir. Şekil 5.3.'de eksozomların boyut ve miktar dağılım grafikleri yer almaktadır. MKH eksozomlarının kodları Şekil 5.3.'de, grafik üzerinde gösterilmiştir. Partikül büyüklüğü ve sayılarının detaylı analizi Çizelge 5.2.'de özetlenmiştir.



Şekil 5.3. İzole edilen eksozomların boyut ve miktar dağılım grafikleri

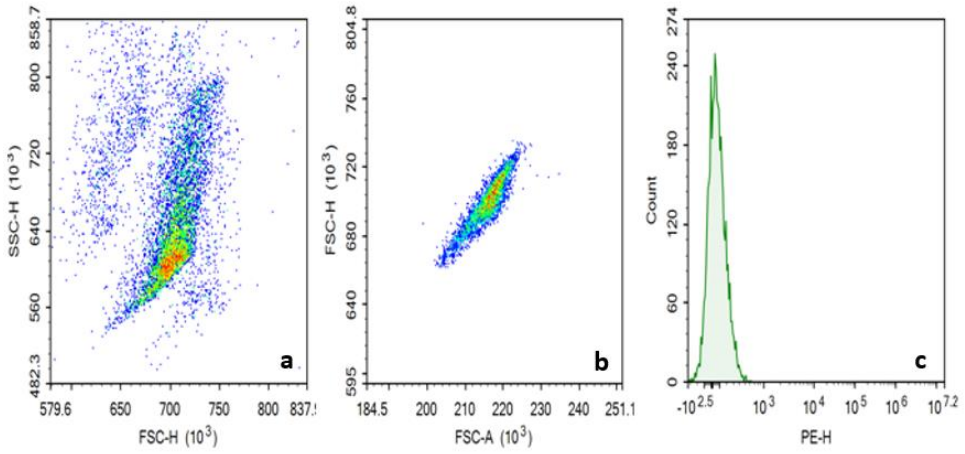
Q-Nano Gold cihazında analizi yapılan eksozomların; boyut ve miktar tayin grafikleri incelendiğinde, eksozom boyut dağılımının 70-350 nm bandında yer aldığı görülmektedir. Şekil 5.3.'de, sırasıyla ilk 5 grafik primer MKH eksozomlarını, 6.sı ise ATCC Ki-MKH hücre hattından elde edilen eksozomu göstermektedir. Eksozom boyutlarının literüratürde 150 nm'den küçük olduğu bilinmekle birlikte MISEV kılavuzu (*Minimal information for studies of extracellular vesicles*) eksozomların tek başlarına izole edilemediğini ve onlara bir miktar da daha büyük boyutta olan mikroveziküllerin eşlik ettiğini bildirmektedir (237). Biz yaptığımız ek analizler ile Çizelge 5.2.'de ayrıntılı olarak boyut dağılımını verdiğimiz izolasyonlarımızı değerlendirdik ve izole ettiğimiz tüm örneklerde yaklaşık %80 oranında partikül boyutlarının 80-160 nm aralığı içinde ve eksozom boyutları ile uyumlu olduğunu saptadık.

Çizelge 5.2. İzole edilen eksozomların boyutlara göre dağılımları

Sample	Q-Nano total ölçüm partikül/ml	80-120 nm partikül/ml	120-160 nm partikül/ml	160-200 nm partikül/ml	200-240 nm partikül/ml	240-340 nm partikül/ml
MKH EV 1(primer)	7,89E+12	5,25E+12	1,29E+12	4,58E+11	2,14E+11	1,14E+11
201117H12		66,54%	16,35%	5,80%	2,71%	1,44%
MKH EV 2(primer)	6,54E+12	4,10E+12	1,01E+12	3,71E+11	1,35E+11	1,24E+11
270319H19		62,69%	15,44%	5,67%	2,06%	1,89%
MKH EV 3(primer)	4,52E+12	2,98E+12	8,11E+11	1,97E+11	9,01E+10	9,01E+10
180418H15		65,92%	17,94%	4,36%	1,99%	1,99%
MKH EV 4(primer)	1,22E+12	7,37E+11	2,25E+11	6,23E+10	3,65E+10	1,72E+10
231019H23		60,40%	18,44%	5,10%	2,99%	1,40%
MKH EV 5(primer)	1,87E+12	1,02E+12	3,64E+11	1,73E+11	7,96E+10	6,58E+10
061119H24		54,50%	19,46%	9,26%	4,25%	3,51%
MKH EV 6 (hücre hattı)	1,39E+12	8,05E+11	2,62E+11	8,00E+10	4,45E+10	2,89E+10
ATCC PCS-500-012		57,91%	18,84%	5,75%	3,20%	2,08%

5.2.2. FLOW SİTOMETRİ ile EKSOZOMAL BİYOBELİRTEÇLERİN ANALİZ SONUÇLARI

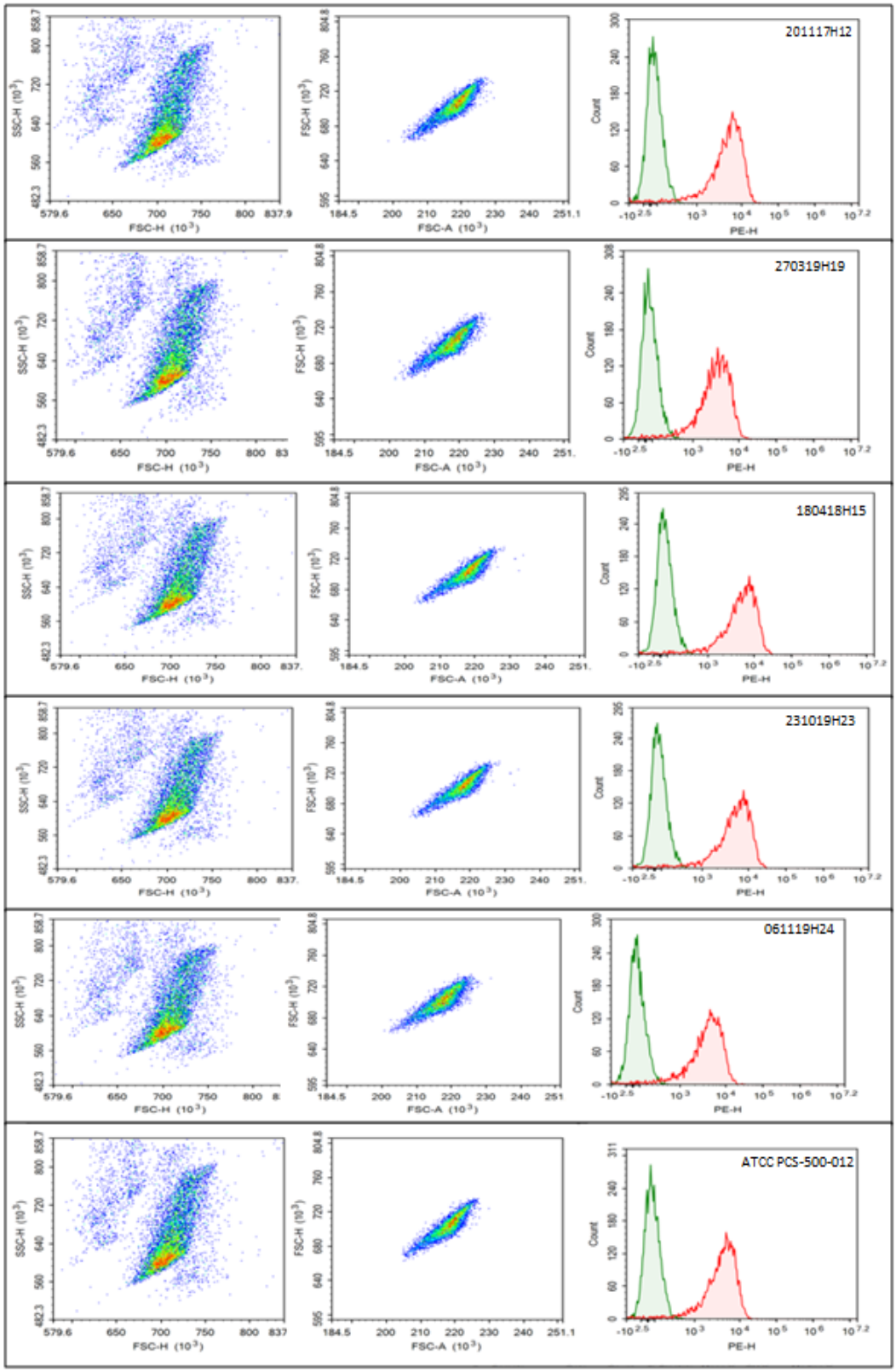
Öncelikle boyasız işaretli tüpün okutulması ile boncukların nerede konumlandığı anlaşılmış ve kapı alma yapılarak bir taslak kaydedilmiştir. İlgili taslak Şekil 5.4.' de gösterilmiştir:



Şekil 5.4. Latex boncuk-CD9-eksozom kompleksinin (PE-CD81 içermeyen boyasız işaretli örnek) flow sitometri ile okuması ile kaydedilen taslak

Şekil 5.4.'de kapı alma yapılarak analizler gerçekleştirildi. Öncelikle örnekler **a)** ileri saçılım (*forward scatter, FSC*) ve yana saçılım (*side scatter, SSC*) grafiği ile kapı alınarak boyutlarına göre ayırt edilmiştir. Daha sonra **b)** boncuğa bağlı eksozomların tekli olarak dedektörden geçenleri (*singlet*) seçilmiştir. Son olarak **c)** boncuğa bağlı eksozomlar PE kanalında analiz edilerek PE ışıma miktarı saptanmıştır.

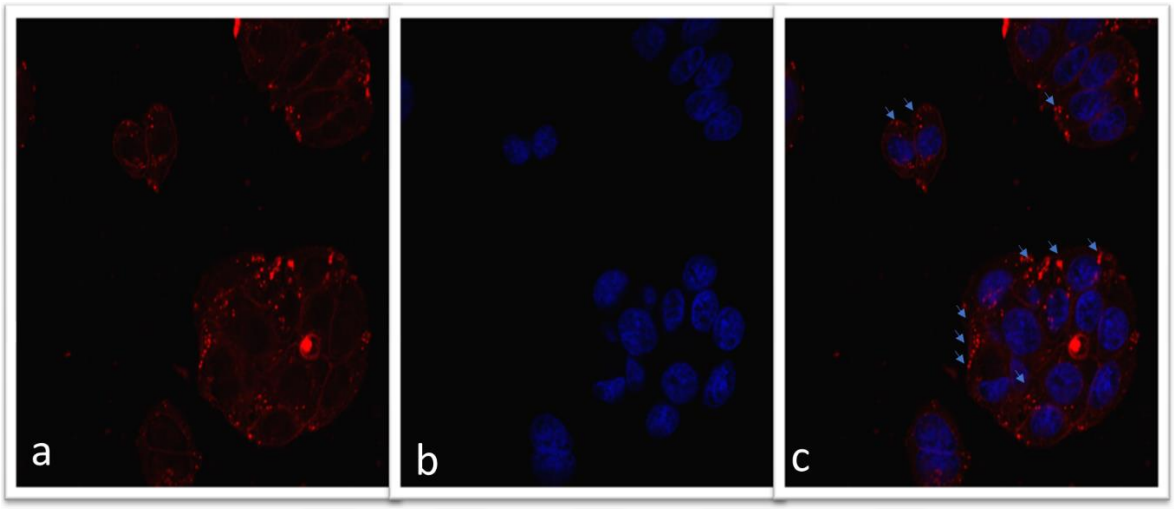
Literatüre uygun olarak CD81 boyalı tüplerin PE kanalında kontrole göre (PE-CD81 içermeyen boyasız işaretli örnek) en az bir birim yüksek sinyal okuma vermesi ile CD81 pozitifliği gösterilmektedir. Buna göre 6 eksozom örneği için de eksozomların CD9 ve CD81 pozitif olarak karakterize olduğu gösterilmiştir. İlgili veriler Şekil 5.5.'de gösterilmiştir. Grafikte kırmızı pikler anti-CD81-PE boyaması içeren eksozomları, yeşil pik ise aynı örneğin negatif tüpünü (anti-CD81-PE antikoru içermeyen örneği) temsil etmektedir. CD81 antikoru ile boyanan eksozomlar, boyanmayanlara göre farklı bir profil oluşturmuştur. Negatif örneklerle çakışma olmaması, örnek içinde CD81 negatif partiküllerin olmadığını da kanıtlamaktadır.



Şekil 5.5. Elde edilen eksozomların flow sitometri sonuçları

5.2.3. EKSOZOMLARIN HT29 HÜCRELERİ İÇİNDE GÖRÜNTÜLENMESİ

Dil C3(18) boyası ile boyanıp HT29 hücrelerine verilen eksozomlar, konfokal mikroskobi ile 63X büyütme ile görüntülenmiştir. Negatif kontrol olarak işaretsiz eksozomlar kullanılmıştır. Hücre çekirdeği DAPI boyası ile boyanmış ve Image J programı ile birleştirilen görüntüler Şekil 5.6.'da gösterilmiştir.



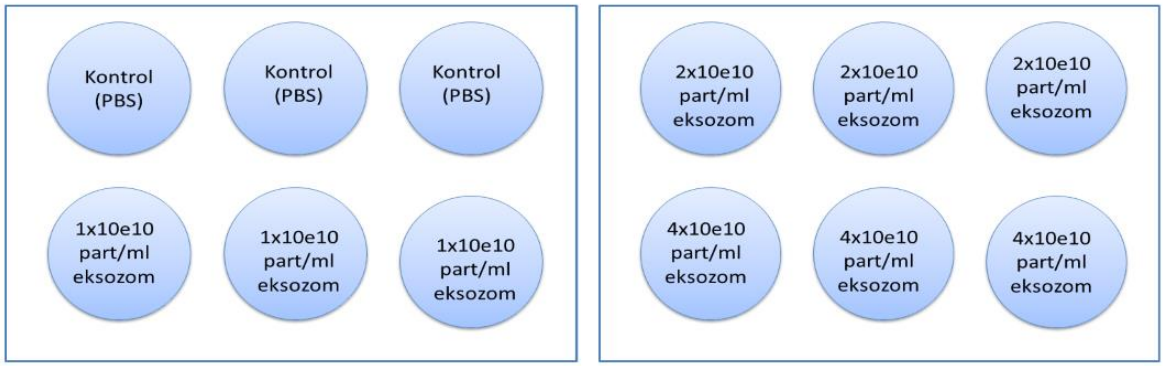
Şekil 5.6. MKH eksozomlarının HT29 hücre içinde görüntülenmesi.

Konfokal mikroskobi ile yapılan görüntülemelerde, **(a)** kırmızı renk Dil C3(18) ile boyanmış eksozomları, **(b)** mavi renk DAPI ile boyanmış HT29 hücre çekirdeğini göstermektedir. Image J ile yapılan analizle görüntüler birleştirilmiş ve **(c)** HT29 hücresi içinde eksozomlar görüntülenmiş ve resimde ok ile işaretlenmiştir.

5.3. EKSOZOM UYGULAMASINDA ETKİN DOZ VE SÜRE TAYİNİ İÇİN OPTİMİZASYON ÇALIŞMASI

Eksozom uygulaması ile yara iyileşmesi deneyi için literatür taraması yapılarak uygun bir etkin doz tayini için optimizasyon deneyi tasarlanmıştır. Literatür bilgileri incelendiğinde; hücreye eksozom uygulamasında farklı konsantrasyonlarda eksozom uygulaması ile etkin doz tayin edilmektedir (96,257). Buna göre HT29 hücrelerine 72 saat boyunca $1x10^{10}$, $2x10^{10}$ ve $4x10^{10}$ partikül/ml olmak üzere 3 farklı dozda eksozom uygulaması yapılmış ve her 24 saatte bir (0, 24, 48 ve 72. saatlerde), 10X objektif ile fotoğrafları çekilmiştir. "ZEN 2012 (blue edition)"

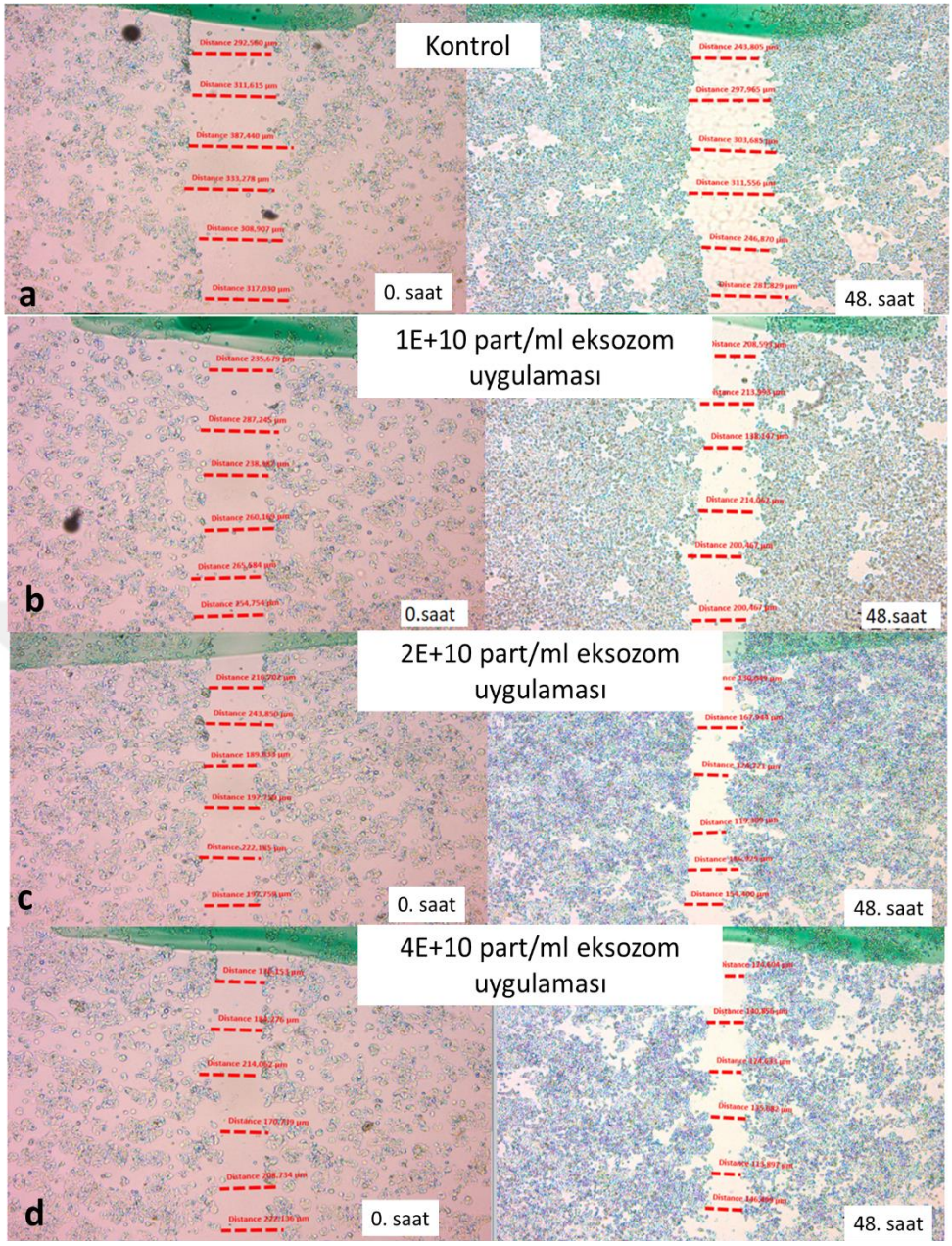
programı aracılığıyla yara kapanma oranları ölçeklendirilmiş ve sonuçlar "GraphPad" istatistik programı ile analiz edilmiştir. Protokol şöyle gerçekleştirilmiştir: Öncelikle HT29 hücreleri $2x10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyulu plakalara ekilmiş, 24 saat sonra besiyeri uzaklaştırılıp 200 µl'lik pipet ucu ile çizilmiş ve PBS ile yıkanmıştır. FBS içermeyen besiyeri eklenip eksozom uygulaması yapılmıştır. Kontrol grubuna eş hacimde PBS eklenmiştir. 0. saat olarak fotoğrafları çekilmiştir. Her 24 saatte bir fotoğraflanarak 72 saat boyunca inkübasyona devam edilmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde, kontrole göre anlamlı fark saptanan eksozom dozu ve süresi tayin edilmiştir.



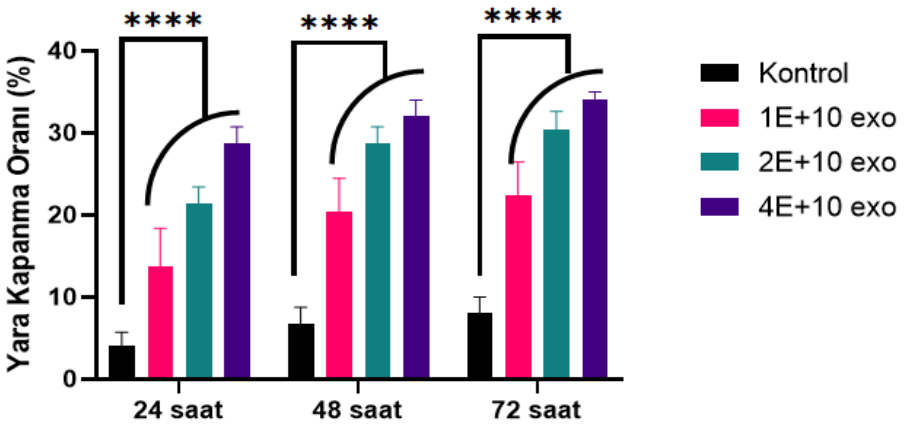
Şekil 5.7. 6-kuyucuklu plakada eksozom etkin doz tayini için optimizasyon deney tasarımı

Yara kapanma oranları $1x10^{10}$, $2x10^{10}$ ve $4x10^{10}$ partikül/ml uygulama yapılan gruplar arasında sırasıyla kontrole göre kıyaslama yapılarak GraphPad programı kullanılarak Anova testi ile sonuçlar analiz edilmiştir. Temsili deney fotoğrafları Şekil 5.8.'de ve analiz grafiği Şekil 5.9.'da gösterilmiştir.

Şekil 5.8.'de, **a)** Eksozom uygulaması yapılmayan (PBS uygulanmış) kontrol gruplarını, **b)** $1x10^{10}$ partikül/ml eksozom uygulaması yapılan grubu, **c)** $2x10^{10}$ partikül/ml eksozom uygulaması yapılan grubu ve **d)** $4x10^{10}$ partikül/ml eksozom uygulaması yapılan grubu temsil eden fotoğraflar 10x objektif ile çekilmiştir.



Şekil 5.8. Kontrol ve eksozom uygulaması yapılan gruplara ait yara iyileşmesi deneyi analizleri

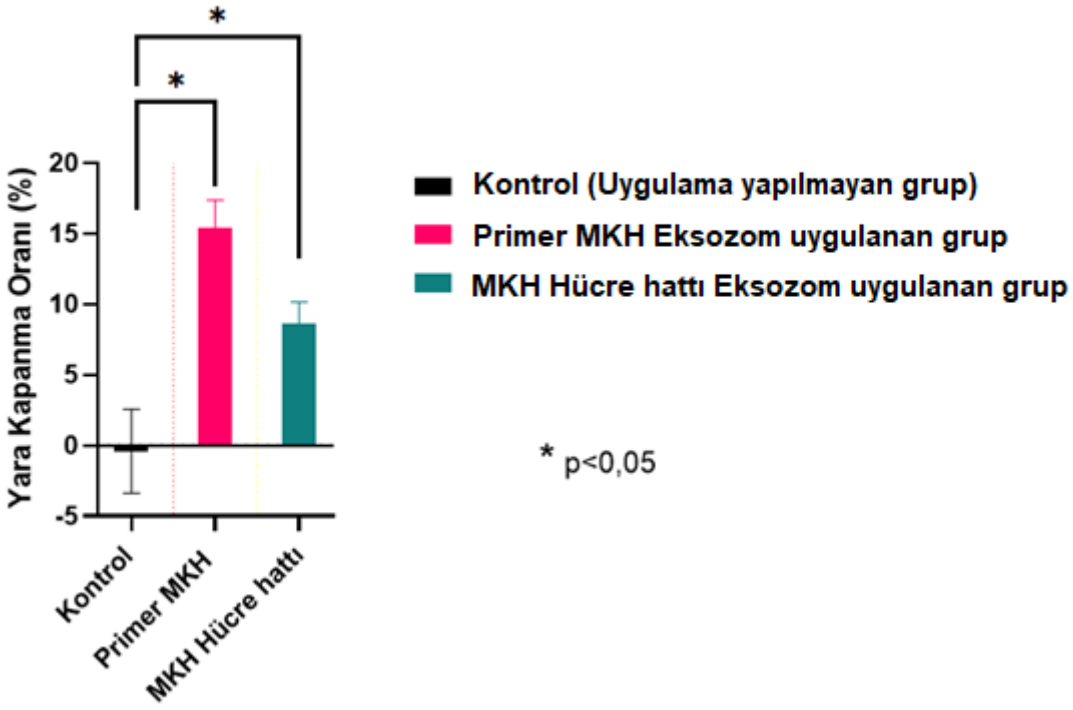


Şekil 5.9. Eksozom Uygulamasında Konsantrasyon ve Süre Optimizasyon Analiz Sonuçları

Yapılan optimizasyon çalışması sonuçlarına göre Şekil 5.9.'da gösterildiği üzere her üç dozda da kontrole göre daha hızlı yara kapanma profili görülmüş ve sonuçların istatistiki olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0.0001$). Ek olarak, dozlar arası karşılaştırma yapıldığında, $1x10^{10}$ ve $2x10^{10}$ eksozom uygulanan gruplar arasında ve analiz saatleri arasında karşılaştırma yapıldığında 24 ila 48. saatler arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.001$). Bu sebeple tüm deneylerde kullanılmak üzere **$2x10^{10}$ partikül/ml eksozom konsantrasyonu** ve **48 saat uygulaması süresi**nin uygun olduğu saptanmıştır.

5.4. EKSOZOM UYGULAMASI İLE YARA İYİLEŞMESİ DENEYİ SONUÇLARI

Yara iyileşmesi deneyi için eksozom uygulaması yapılan hücreler eksozom uygulamasının yapıldığı 0. ve 48. saatlerde fotoğraflamış, "Zen 2012" programı kullanılarak her fotoğraf alanından 6 ölçüm yapılarak ortalamaları kaydedilmiştir. Sonuçlar two-way ANOVA testi kullanılarak Graphpad programı ile analiz edilmiştir. Analiz grafiği Şekil 5.10.' da gösterilmiştir.

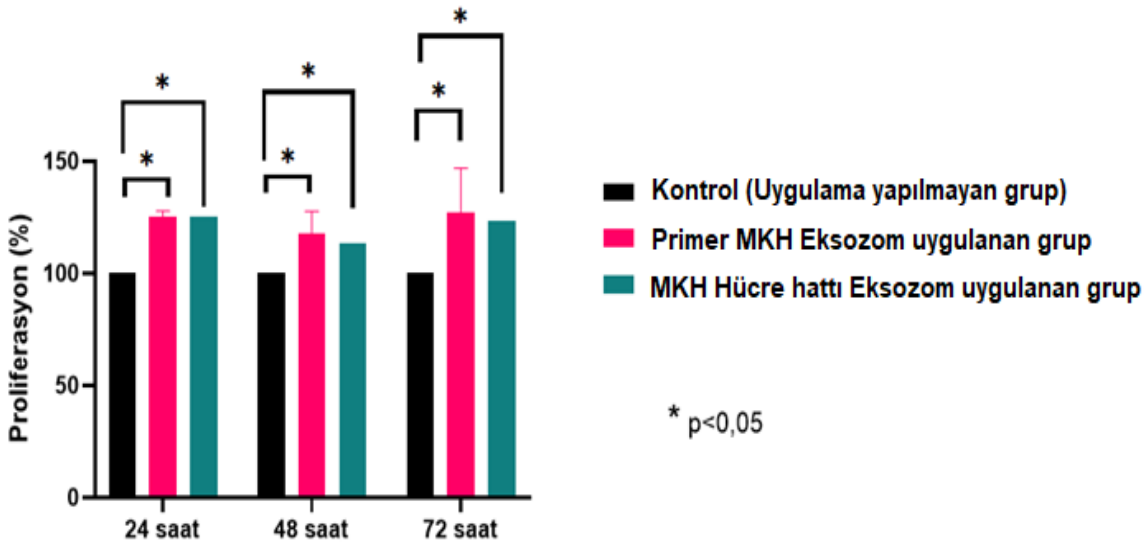


Şekil 5.10. MKH eksozom uygulaması ile yapılan yara iyileşmesi analiz sonuçları

Analiz sonuçlarına göre hem primer hem hücre hattından elde edilen MKH eksozomlarının uygulandığı HT29 hücrelerinde, eksozom uygulanmayanlara göre yara kapanma hızının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum MKH eksozom uygulamasının HT29 hücrelerinde migrasyon yeteneğini arttığını göstermektedir.

5.5. EKSOZOM UYGULAMASI İLE MTT DENEYİ SONUÇLARI

Hücre proliferasyon deneyi için eksozom uygulaması yapılan hücreler uygulama yapıldıktan sonra 24., 48. ve 72. saatlerde MTT reaktifi ile muamele edilmiş, inkübasyon süresinden sonra oluşan formazan kristalleri çözülerek mikroplate spektrofotometrede (ePoch, BioTek Instruments) absorbans değerleri ölçülmüştür. Öncelikle blank kontrollere göre normalizasyon yapılmış ve sonuçlar Graphpad programı ile two-way ANOVA testiyle analiz edilmiştir. Analiz grafiği Şekil 5.11.'de gösterilmiştir.

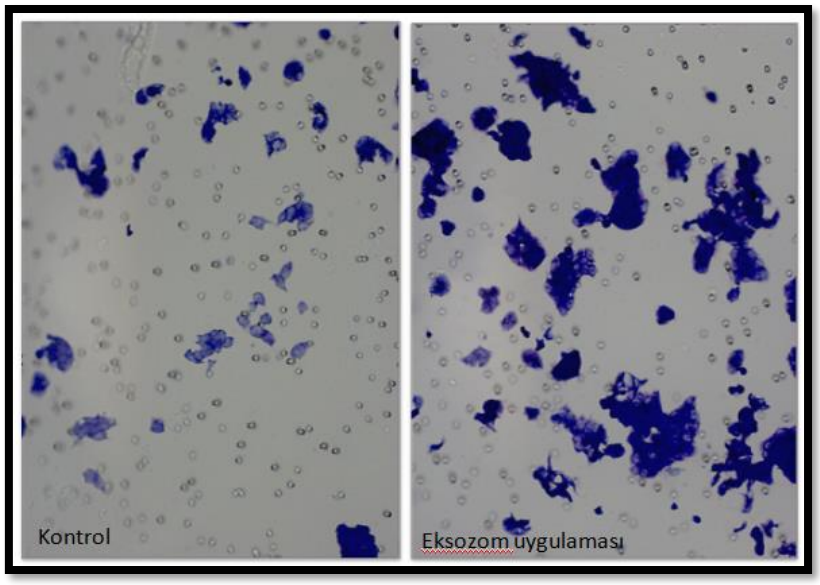


Şekil 5.11. MKH eksozom uygulaması ile yapılan MTT deneyi analiz sonuçları

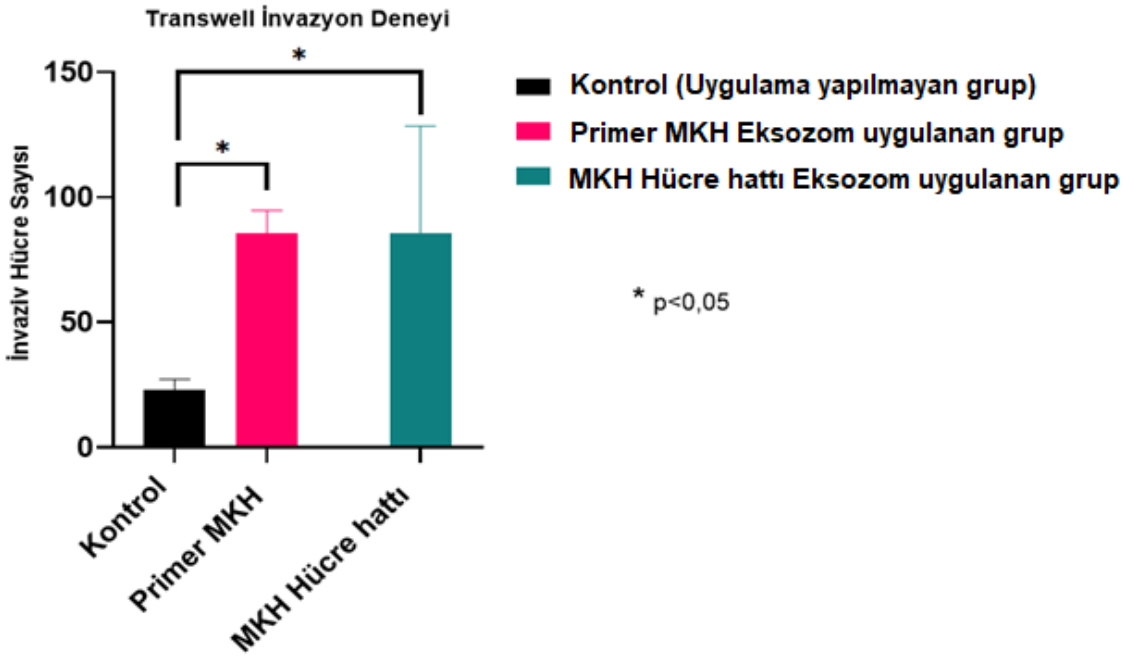
Analiz sonuçlarına göre hem primer hem hücre hattından elde edilen MKH eksozomlarının uygulandığı HT29 hücrelerinde, eksozom uygulanmayanlara göre proliferasyon hızının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum MKH eksozom uygulamasının HT29 hücrelerinde proliferasyon hızının arttığını göstermektedir.

5.6. EKSOZOM UYGULAMASI İLE HÜCRE İNVAZYON DENEYİ SONUÇLARI

Hücre invazyon deneyi için HT29 hücreleri transwell kuyucuklarına ekilerek eksozom uygulaması yapılmış, 48 saat inkübasyondan sonra uygun şekilde boyanmıştır. Şekil 5.12.'de boyanan transwell kuyucuklarına ait temsili fotoğraf gösterilmiştir. 5 farklı alandan 20x objektif ile fotoğraf çekilmiş ve yapılan hücre sayımlarının ortalaması alınmıştır. Sonuçlar Graphpad programı ile analiz edilmiş olup, analiz grafiği Şekil 5.13.' de gösterilmiştir.



Şekil 5.13. Eksozom uygulaması ile transwell kuyucukları görüntüsü



Şekil 5.14. MKH eksozom uygulaması ile yapılan hücre invazyon deneyi analiz sonuçları

Analiz sonuçlarına göre hem primer hem hücre hattından elde edilen MKH eksozomlarının uygulandığı HT29 hücrelerinde, eksozom uygulanmayanlara göre invaziv hücre sayısının arttığı gözlenmiştir. Bu durum MKH eksozom uygulamasının HT29 hücrelerinde invazyon yeteneğini arttığını göstermektedir.

5.7. METAANALİZ SONUÇLARI

"The Cancer Genome Atlas (TCGA) COAD (colorectal adenocarcinoma)" üzerinden çekilen miRNA-seq verileri, 1881 miRNA ve 463 örnekten (455 primer tümör ve 8 normal kontrol) oluşuyordu. Bu miRNA ekspresyon matrisi R yazılımında DESeq2 ve IHW paketleri kullanılarak analiz edildi.

Analiz sonucunda 159 upregüle ve 318 downregüle olmak üzere toplam 477 farklı eksprese olan miRNA (DEMI) saptanmıştır. Bu miRNA'lar Çizelge 5.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.3. Metaanalize göre KRK'da farklı eksprese olan miRNA'lar

KRK'da upregüle miRNA'lar	**KRK'da downregüle miRNA'lar**	
hsa-let-7f-1	hsa-let-7b	hsa-mir-4664
hsa-let-7f-2	hsa-let-7c	hsa-mir-4665
hsa-let-7g	hsa-let-7d	hsa-mir-4674
hsa-mir-1-1	hsa-let-7e	hsa-mir-4676
hsa-mir-1-2	hsa-mir-1180	hsa-mir-4683
hsa-mir-101-1	hsa-mir-1181	hsa-mir-4685
hsa-mir-101-2	hsa-mir-1224	hsa-mir-4687
hsa-mir-106a	hsa-mir-1226	hsa-mir-4700
hsa-mir-10a	hsa-mir-1227	hsa-mir-4707
hsa-mir-10b	hsa-mir-1228	hsa-mir-4717
hsa-mir-1245a	hsa-mir-1229	hsa-mir-4728
hsa-mir-126	hsa-mir-1234	hsa-mir-4732
hsa-mir-1277	hsa-mir-1248	hsa-mir-4733
hsa-mir-130a	hsa-mir-1249	hsa-mir-4738
hsa-mir-135b	hsa-mir-1254-1	hsa-mir-4742
hsa-mir-136	hsa-mir-1254-2	hsa-mir-4745
hsa-mir-141	hsa-mir-125a	hsa-mir-4746
hsa-mir-142	hsa-mir-125b-1	hsa-mir-4749
hsa-mir-143	hsa-mir-125b-2	hsa-mir-4754
hsa-mir-144	hsa-mir-1260b	hsa-mir-4758
hsa-mir-146a	hsa-mir-1266	hsa-mir-4768
hsa-mir-147b	hsa-mir-127	hsa-mir-4780
hsa-mir-148a	hsa-mir-1270	hsa-mir-4787
hsa-mir-151a	hsa-mir-1271	hsa-mir-4800
hsa-mir-152	hsa-mir-1275	hsa-mir-484
hsa-mir-153-1	hsa-mir-1287	hsa-mir-485
hsa-mir-153-2	hsa-mir-129-1	hsa-mir-486-1
hsa-mir-15a	hsa-mir-129-2	hsa-mir-486-2
hsa-mir-16-1	hsa-mir-1291	hsa-mir-487a

hsa-mir-16-2	hsa-mir-1292	hsa-mir-490
hsa-mir-17	hsa-mir-1295a	hsa-mir-491
hsa-mir-181d	hsa-mir-1296	hsa-mir-497
hsa-mir-182	hsa-mir-1301	hsa-mir-5001
hsa-mir-183	hsa-mir-1306	hsa-mir-500a
hsa-mir-185	hsa-mir-1307	hsa-mir-501
hsa-mir-188	hsa-mir-132	hsa-mir-5010
hsa-mir-18a	hsa-mir-133a-1	hsa-mir-504
hsa-mir-190a	hsa-mir-133a-2	hsa-mir-505
hsa-mir-192	hsa-mir-133b	hsa-mir-5090
hsa-mir-194-1	hsa-mir-1343	hsa-mir-5091
hsa-mir-196a-1	hsa-mir-138-1	hsa-mir-5187
hsa-mir-196a-2	hsa-mir-139	hsa-mir-5193
hsa-mir-196b	hsa-mir-140	hsa-mir-543
hsa-mir-199a-1	hsa-mir-145	hsa-mir-550a-2
hsa-mir-199a-2	hsa-mir-1468	hsa-mir-550a-3
hsa-mir-199b	hsa-mir-149	hsa-mir-5571
hsa-mir-19a	hsa-mir-150	hsa-mir-5588
hsa-mir-19b-1	hsa-mir-151b	hsa-mir-5690
hsa-mir-19b-2	hsa-mir-1538	hsa-mir-5698
hsa-mir-203a	hsa-mir-15b	hsa-mir-574
hsa-mir-203b	hsa-mir-181a-1	hsa-mir-579
hsa-mir-20a	hsa-mir-181a-2	hsa-mir-589
hsa-mir-21	hsa-mir-181b-1	hsa-mir-605
hsa-mir-215	hsa-mir-181b-2	hsa-mir-6087
hsa-mir-216a	hsa-mir-187	hsa-mir-6125
hsa-mir-217	hsa-mir-191	hsa-mir-615
hsa-mir-218-1	hsa-mir-1914	hsa-mir-618
hsa-mir-218-2	hsa-mir-193a	hsa-mir-625
hsa-mir-22	hsa-mir-193b	hsa-mir-632
hsa-mir-223	hsa-mir-197	hsa-mir-639

hsa-mir-224	hsa-mir-1976	hsa-mir-642a
hsa-mir-2355	hsa-mir-200c	hsa-mir-6501
hsa-mir-24-1	hsa-mir-2110	hsa-mir-6503
hsa-mir-24-2	hsa-mir-2116	hsa-mir-6507
hsa-mir-26a-1	hsa-mir-214	hsa-mir-6509
hsa-mir-26a-2	hsa-mir-219a-1	hsa-mir-6510
hsa-mir-26b	hsa-mir-2277	hsa-mir-6511b-1
hsa-mir-27a	hsa-mir-28	hsa-mir-6511b-2
hsa-mir-29b-1	hsa-mir-296	hsa-mir-6514
hsa-mir-29b-2	hsa-mir-3074	hsa-mir-652
hsa-mir-29c	hsa-mir-30c-2	hsa-mir-658
hsa-mir-301a	hsa-mir-30d	hsa-mir-659
hsa-mir-301b	hsa-mir-3127	hsa-mir-664a
hsa-mir-3065	hsa-mir-3130-1	hsa-mir-664b
hsa-mir-30b	hsa-mir-3130-2	hsa-mir-668
hsa-mir-30e	hsa-mir-3131	hsa-mir-671
hsa-mir-31	hsa-mir-3138	hsa-mir-6715b
hsa-mir-32	hsa-mir-3150b	hsa-mir-6716
hsa-mir-335	hsa-mir-3154	hsa-mir-6720
hsa-mir-337	hsa-mir-3155a	hsa-mir-6726
hsa-mir-338	hsa-mir-3157	hsa-mir-6727
hsa-mir-33a	hsa-mir-3158-1	hsa-mir-6730
hsa-mir-33b	hsa-mir-3158-2	hsa-mir-6734
hsa-mir-340	hsa-mir-3173	hsa-mir-6741
hsa-mir-34a	hsa-mir-3177	hsa-mir-6747
hsa-mir-3613	hsa-mir-3183	hsa-mir-6748
hsa-mir-3662	hsa-mir-3188	hsa-mir-6749
hsa-mir-3677	hsa-mir-3190	hsa-mir-6750
hsa-mir-3682	hsa-mir-3191	hsa-mir-6751
hsa-mir-369	hsa-mir-3193	hsa-mir-6762
hsa-mir-374a	hsa-mir-3199-2	hsa-mir-6763

hsa-mir-374b	hsa-mir-3200	hsa-mir-6766
hsa-mir-376a-1	hsa-mir-320a	hsa-mir-6769a
hsa-mir-376a-2	hsa-mir-320b-1	hsa-mir-6769b
hsa-mir-376b	hsa-mir-320b-2	hsa-mir-6777
hsa-mir-376c	hsa-mir-320c-1	hsa-mir-6779
hsa-mir-379	hsa-mir-320c-2	hsa-mir-6783
hsa-mir-380	hsa-mir-323a	hsa-mir-6784
hsa-mir-3913-1	hsa-mir-324	hsa-mir-6788
hsa-mir-411	hsa-mir-326	hsa-mir-6793
hsa-mir-412	hsa-mir-328	hsa-mir-6797
hsa-mir-421	hsa-mir-330	hsa-mir-6798
hsa-mir-424	hsa-mir-331	hsa-mir-6802
hsa-mir-429	hsa-mir-339	hsa-mir-6803
hsa-mir-4444-2	hsa-mir-342	hsa-mir-6805
hsa-mir-450a-1	hsa-mir-346	hsa-mir-6806
hsa-mir-450a-2	hsa-mir-3605	hsa-mir-6807
hsa-mir-450b	hsa-mir-3609	hsa-mir-6808
hsa-mir-451a	hsa-mir-361	hsa-mir-6810
hsa-mir-452	hsa-mir-3614	hsa-mir-6812
hsa-mir-454	hsa-mir-3615	hsa-mir-6820
hsa-mir-4662a	hsa-mir-3620	hsa-mir-6821
hsa-mir-4668	hsa-mir-3622a	hsa-mir-6824
hsa-mir-4677	hsa-mir-363	hsa-mir-6833
hsa-mir-4791	hsa-mir-3651	hsa-mir-6837
hsa-mir-493	hsa-mir-3652	hsa-mir-6842
hsa-mir-494	hsa-mir-3653	hsa-mir-6851
hsa-mir-495	hsa-mir-365a	hsa-mir-6852
hsa-mir-496	hsa-mir-365b	hsa-mir-6853
hsa-mir-499a	hsa-mir-3678	hsa-mir-6871
hsa-mir-5000	hsa-mir-3680-1	hsa-mir-6875
hsa-mir-508	hsa-mir-3690-1	hsa-mir-6877

hsa-mir-514a-1	hsa-mir-370	hsa-mir-6879
hsa-mir-514a-2	hsa-mir-375	hsa-mir-6882
hsa-mir-514a-3	hsa-mir-377	hsa-mir-6885
hsa-mir-542	hsa-mir-378a	hsa-mir-6887
hsa-mir-548f-1	hsa-mir-383	hsa-mir-6891
hsa-mir-549a	hsa-mir-3909	hsa-mir-6892
hsa-mir-552	hsa-mir-3917	hsa-mir-6894
hsa-mir-556	hsa-mir-3928	hsa-mir-6895
hsa-mir-5586	hsa-mir-3934	hsa-mir-7110
hsa-mir-5683	hsa-mir-3940	hsa-mir-7114
hsa-mir-570	hsa-mir-3944	hsa-mir-7155
hsa-mir-576	hsa-mir-409	hsa-mir-744
hsa-mir-577	hsa-mir-423	hsa-mir-760
hsa-mir-582	hsa-mir-4286	hsa-mir-7641-1
hsa-mir-584	hsa-mir-431	hsa-mir-7641-2
hsa-mir-590	hsa-mir-432	hsa-mir-766
hsa-mir-592	hsa-mir-4326	hsa-mir-7702
hsa-mir-598	hsa-mir-433	hsa-mir-7706
hsa-mir-627	hsa-mir-4433a	hsa-mir-7845
hsa-mir-628	hsa-mir-4433b	hsa-mir-7846
hsa-mir-643	hsa-mir-4442	hsa-mir-7854
hsa-mir-651	hsa-mir-4443	hsa-mir-8072
hsa-mir-653	hsa-mir-4446	hsa-mir-874
hsa-mir-655	hsa-mir-4449	hsa-mir-877
hsa-mir-660	hsa-mir-4453	hsa-mir-885
hsa-mir-7-1	hsa-mir-4479	hsa-mir-887
hsa-mir-7-2	hsa-mir-4521	hsa-mir-891a
hsa-mir-7-3	hsa-mir-4522	hsa-mir-92a-1
hsa-mir-708	hsa-mir-4525	hsa-mir-92a-2
hsa-mir-7705	hsa-mir-455	hsa-mir-92b
hsa-mir-889	hsa-mir-4632	hsa-mir-937

hsa-mir-9-1	hsa-mir-4638	hsa-mir-939
hsa-mir-9-2	hsa-mir-4640	hsa-mir-940
hsa-mir-9-3	hsa-mir-4646	hsa-mir-99b
hsa-mir-95	hsa-mir-4651	
hsa-mir-96	hsa-mir-4658	
hsa-mir-98	hsa-mir-4660	

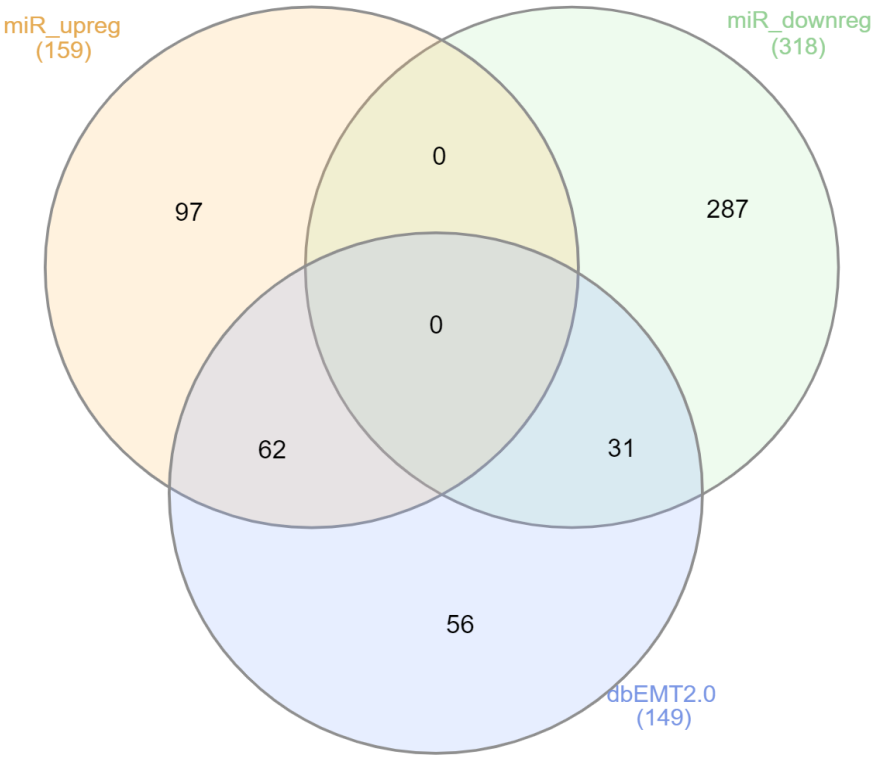
dbEMT 2.0 veritabanında EMT ile ilgili genler ve kodlayıcı olmayan RNA'lar için kapsamlı literatür araştırması ve işlevsel açıklama kullanılarak EMT ile ilişkili 149 miRNA saptandı. Veritabanında EMT ile ilişkilendirilmiş miRNA'ların listesi Çizelge 5.4.'de verilmiştir.

Çizelge 5.4. dbEMT 2.0 veritabanında EMT ile ilişkilendirilmiş miRNA'lar

dbEMT 2.0 veritabanından alınan miRNA'lar		
hsa-mir-101-1	hsa-mir-190A	hsa-mir-31
hsa-mir-101-2	hsa-mir-191	hsa-mir-326
hsa-mir-106A	hsa-mir-193A	hsa-mir-331
hsa-mir-106B	hsa-mir-194-1	hsa-mir-33A
hsa-mir-10A	hsa-mir-196B	hsa-mir-345
hsa-mir-10B	hsa-mir-199A-1	hsa-mir-34A
hsa-mir-1181	hsa-mir-199A-2	hsa-mir-34C
hsa-mir-122	hsa-mir-19A	hsa-mir-361
hsa-mir-1236	hsa-mir-200A	hsa-mir-373
hsa-mir-124-1	hsa-mir-200B	hsa-mir-375
hsa-mir-124-2	hsa-mir-200C	hsa-mir-381
hsa-mir-124-2HG	hsa-mir-203A	hsa-mir-382
hsa-mir-124-3	hsa-mir-204	hsa-mir-424
hsa-mir-125B-1	hsa-mir-205	hsa-mir-429
hsa-mir-1271	hsa-mir-206	hsa-mir-449A
hsa-mir-128-1	hsa-mir-208A	hsa-mir-452
hsa-mir-129-1	hsa-mir-20A	hsa-mir-454
hsa-mir-130A	hsa-mir-21	hsa-mir-485
hsa-mir-130B	hsa-mir-211	hsa-mir-487B
hsa-mir-132	hsa-mir-214	hsa-mir-489
hsa-mir-134	hsa-mir-216A	hsa-mir-491
hsa-mir-135A-1	hsa-mir-217	hsa-mir-494
hsa-mir-135B	hsa-mir-218-1	hsa-mir-497
hsa-mir-136	hsa-mir-218-2	hsa-mir-506
hsa-mir-137	hsa-mir-221	hsa-mir-517C
hsa-mir-141	hsa-mir-222	hsa-mir-520G
hsa-mir-143	hsa-mir-223	hsa-mir-522
hsa-mir-144	hsa-mir-224	hsa-mir-573
hsa-mir-145	hsa-mir-23A	hsa-mir-590

hsa-mir-146A	hsa-mir-23B	hsa-mir-612
hsa-mir-148A	hsa-mir-24-1	hsa-mir-616
hsa-mir-149	hsa-mir-24-2	hsa-mir-630
hsa-mir-150	hsa-mir-25	hsa-mir-638
hsa-mir-152	hsa-mir-26A-1	hsa-mir-639
hsa-mir-153-1	hsa-mir-26A-2	hsa-mir-646
hsa-mir-153-2	hsa-mir-26B	hsa-mir-655
hsa-mir-155	hsa-mir-27A	hsa-mir-663A
hsa-mir-15A	hsa-mir-29A	hsa-mir-675
hsa-mir-15B	hsa-mir-29B-1	hsa-mir-7-1
hsa-mir-16-1	hsa-mir-29C	hsa-mir-802
hsa-mir-17	hsa-mir-300	hsa-mir-875
hsa-mir-181A-1	hsa-mir-301A	hsa-mir-888
hsa-mir-181A-2	hsa-mir-302A	hsa-mir-9-1
hsa-mir-181B-1	hsa-mir-30A	hsa-mir-92B
hsa-mir-182	hsa-mir-30B	hsa-mir-93
hsa-mir-183	hsa-mir-30C-1	hsa-mir-96
hsa-mir-185	hsa-mir-30C-2	hsa-LET-7B
hsa-mir-186	hsa-mir-30D	hsa-LET-7D
hsa-mir-187	hsa-mir-30E	hsa-LET-7G

Tespit edilen DEMI'ler içinde EMT ile ilişkili olan miRNA'ların tespiti için InteractiVenn aracı kullanılarak Venn diyagramı oluşturuldu. Ven diyagramı Şekil 5.14'de gösterilmiştir. Buna göre 477 farklı eksprese olan miRNA arasından 93'ü, EMT ile direk ilişkili olarak saptanmıştır.



Şekil 5.15. KRK'da farklı eksprese olan ve EMT ile ilişkili miRNA'lar

Buna göre Venn diyagramında kesişimi gösterilen miRNA'lar Çizelge 5.5.'de listelenmiştir.

Çizelge 5.5. KRK'da farklı eksprese olan ve EMT ile direk ilişkili miRNA'lar

KRK'da downregüle ve EMT ile ilişkili miRNA'lar	**KRK'da upregüle ve EMT ile ilişkili miRNA'lar**	
hsa-let-7b	hsa-let-7g	hsa-mir-21
hsa-let-7d	hsa-mir-101-1	hsa-mir-216a
hsa-mir-1181	hsa-mir-101-2	hsa-mir-217
hsa-mir-125b-1	hsa-mir-106a	hsa-mir-218-1
hsa-mir-1271	hsa-mir-10a	hsa-mir-218-2
hsa-mir-129-1	hsa-mir-10b	hsa-mir-223
hsa-mir-132	hsa-mir-130a	hsa-mir-224
hsa-mir-145	hsa-mir-135b	hsa-mir-24-1
hsa-mir-149	hsa-mir-136	hsa-mir-24-2
hsa-mir-150	hsa-mir-141	hsa-mir-26a-1
hsa-mir-15b	hsa-mir-143	hsa-mir-26a-2
hsa-mir-181a-1	hsa-mir-144	hsa-mir-26b
hsa-mir-181a-2	hsa-mir-146a	hsa-mir-27a
hsa-mir-181b-1	hsa-mir-148a	hsa-mir-29b-1
hsa-mir-187	hsa-mir-152	hsa-mir-29c
hsa-mir-191	hsa-mir-153-1	hsa-mir-301a
hsa-mir-193a	hsa-mir-153-2	hsa-mir-30b
hsa-mir-200c	hsa-mir-15a	hsa-mir-30e
hsa-mir-214	hsa-mir-16-1	hsa-mir-31
hsa-mir-30c-2	hsa-mir-17	hsa-mir-33a
hsa-mir-30d	hsa-mir-182	hsa-mir-34a
hsa-mir-326	hsa-mir-183	hsa-mir-424
hsa-mir-331	hsa-mir-185	hsa-mir-429
hsa-mir-361	hsa-mir-190a	hsa-mir-452
hsa-mir-375	hsa-mir-194-1	hsa-mir-454
hsa-mir-485	hsa-mir-196b	hsa-mir-494
hsa-mir-491	hsa-mir-199a-1	hsa-mir-590
hsa-mir-497	hsa-mir-199a-2	hsa-mir-655

hsa-mir-639	hsa-mir-19a	hsa-mir-7-1
hsa-mir-92b	hsa-mir-203a	hsa-mir-9-1
	hsa-mir-20a	hsa-mir-96

Yukarıda listelenen KRK'da farklı eksprese olan ve EMT ile ilişkilendirilen miRNA'lar arasından birkaç tane miRNA seçilmiş ve qPCR ile ifade düzeylerine bakılmıştır. Bu listede yer almayan miR126'nın da gen ekspresyon profiline bakılmıştır. Bu miRNA her ne kadar dbEMT veri tabanında EMT ile ilişkili miRNA olarak bulunmasa da literatür taramasında çok sayıda yayında KRK'de EMT, metastaz ve invazyon ile ilişkilendirilmiş bir miRNA olması sebebiyle seçilmiştir (150,199,258–261). Yapılan metaanaliz sonucunda seçilen ve bu tez çalışmasında ekspresyon düzeylerine bakılan miRNA'lar Çizelge 5.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 5.6. Metaanaliz sonucunda seçilen miRNA'ların listesi

Seçilen EMT ile ilişkili miRNA'lar
hsa-miR21-5p
hsa-miR27a-5p
hsa-miR126-5p
hsa-miR146a-5p
hsa-miR148a-5p
hsa-miR150-5p
hsa-miR194-5p
hsa-miR582-5p

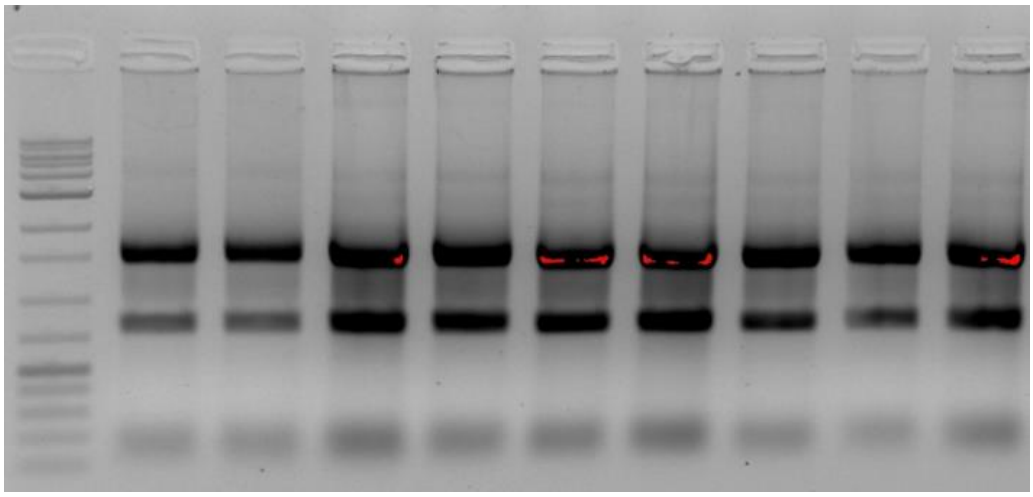
5.8. EKSOZOM UYGULAMASI SONRASI RNA İZOLASYON SONUÇLARI

EMT-TF ve miRNA ekspresyon değişimini saptamak için eksozom uygulaması yapılan hücrelerden, uygulama yapıldıktan 48 saat sonra RNA izolasyonu yapıldı. RNA'lar konsantrasyon ve saflık tayini için spektrofotometre (ePoch, BioTek Instruments) ile iki tekrarlı olarak ölçülmüştür. Çizelge 5.7.'de RNA'ların ölçüm sonuçları gösterilmiştir.

Çizelge 5.7. Eksozom uygulaması yapılan HT29 hücrelerinin RNA spektrofotometre ölçüm sonuçları

Grup	260/280 oranı	Kons. (ng/µL)	Ortalama konsantrasyon
Eksozom uygulanan grup 1	2,015	788,221	779,56 ng/µL
	2,011	770,899	
Eksozom uygulanan grup 2	2,018	503,12	517,032 ng/µL
	2,029	530,944	
Eksozom uygulanan grup 3	1,961	748,252	742,972 ng/µL
	1,956	737,693	
Kontrol 1	2,041	482,88	489,229 ng/µL
	2,047	495,579	
Kontrol 2	2,019	339,764	353,585 ng/µL
	2	367,406	
Kontrol 3	1,97	746,435	739,289 ng/µL
	1,928	732,144	

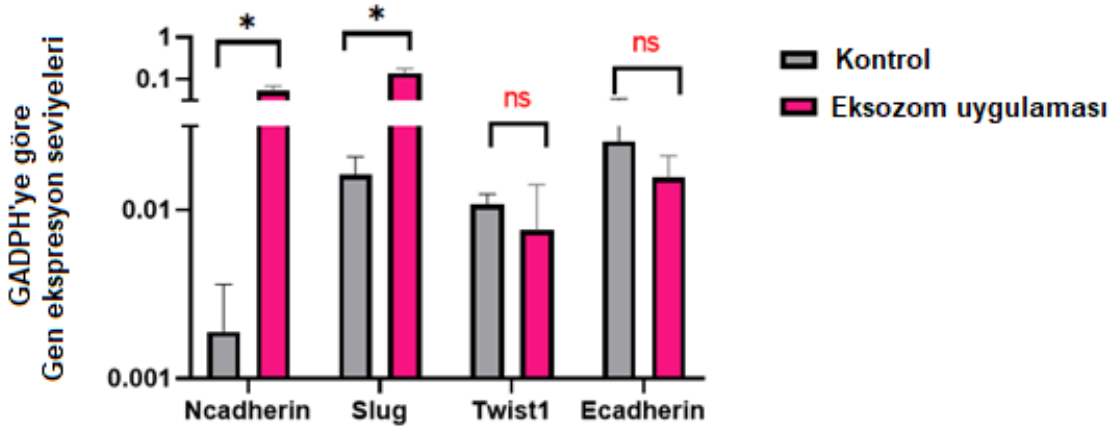
RNA'lar bütünlük kontrolü için %1 agaroz jelde yürütülmüştür. RNA 260 nm dalga boyunda, protein 280 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. RNA'nın saflığı değerlendirilirken 260/280 oranının yaklaşık 2 civarında olması gerekmektedir. İzolasyonu yapılan RNA'ların hepsinin 260/280 oranı beklenen aralıktadır. RNA jel görüntüsü incelendiğinde; DNA kontaminasyonu ve RNA degregasyonunu gösteren smear görüntüsü yoktur. Beklenildiği üzere 18S ve 28S ribozomal RNA'ları gösteren iki bant gözlenmiştir. Şekil 5.15.'de RNA'ların agaroz jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 5.16. Eksozom uygulaması yapılan HT29 hücrelerinin RNA jel görüntüsü

5.9. EKSOZOM UYGULAMASI İLE EMT-TF EKSPRESYON SONUÇLARI

Eksozom uygulaması yapılan ve yapılmayan (kontrol) HT29 hücrelerinden elde edilen RNA'lar kullanılarak cDNA ve qPCR yapılmıştır. Housekeeping gen olarak kullanılan *GAPDH* genine göre $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak verilerin normalizasyonu yapılmıştır (262). Sonuçlar Graphpad programı ile two-way ANOVA testiyle analiz edilmiştir. Analiz grafiği Şekil 5.16.'da gösterilmiştir.

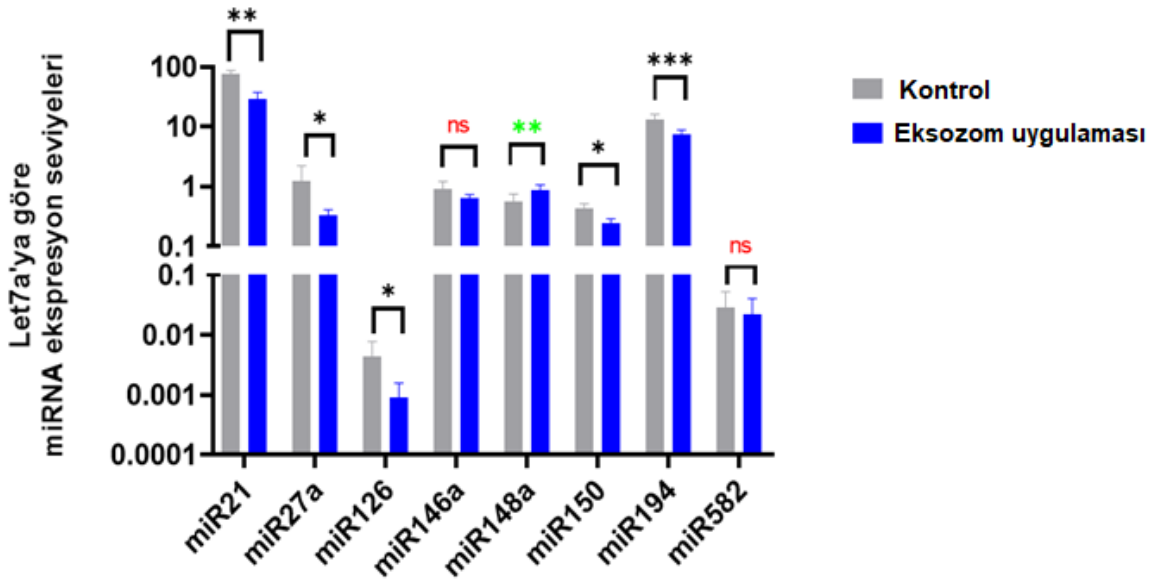


Şekil 5.17. Eksozom uygulaması ile EMT-TF ekspresyon düzeyleri

Analiz sonuçlarına göre; N-cadherin ve Slug genlerinin ekspresyon düzeyleri MKH eksozom uygulaması yapılan HT29 hücrelerinde, yapılmayanlara göre istatistiki olarak anlamlı artış göstermiştir (*p<0.05). Bu artış, N-cadherin ve Slug'ın mezenkimal biyobelirteçler olması sebebiyle MKH eksozomları uygulanan HT29 hücrelerinde EMT'nin indüklendiğini göstermektedir.

5.10. EKSOZOM UYGULAMASI İLE MİRNA EKSPRESYON SONUÇLARI

Eksozom uygulaması yapılan ve yapılmayan (kontrol) HT29 hücrelerinden elde edilen RNA'lar kullanılarak gen spesifik cDNA ve qPCR yapılmıştır. Housekeeping gen olarak kullanılan let7a genine göre $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak verilerin normalizasyonu yapılmıştır (262). Sonuçlar Graphpad programı ile two-way ANOVA testiyle analiz edilmiştir. Analiz grafiği Şekil 5.17.'de gösterilmiştir.



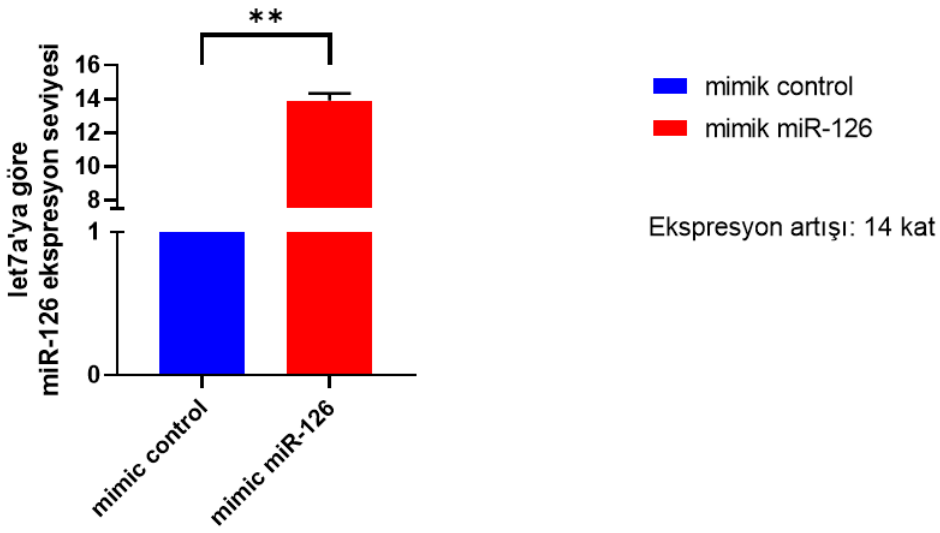
Şekil 5.18. Eksozom uygulaması ile miRNA ekspresyon düzeyleri

Analiz sonuçlarına göre; miR21, miR27a, miR126, miR150 ve miR194'ün ekspresyon düzeyleri eksozom uygulaması yapılan HT29 hücrelerinde, yapılmayanlara göre istatistiki olarak anlamlı azalış, miR148a'da ise artış göstermiştir (*p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001).

Bu durum, MKH eksozomlarının HT29 hücrelerinde EMT süreçlerinde ilişkili miRNA'ların regülasyonlarına etki ettiğini göstermektedir.

5.11. HT29 HÜCRELERİNDE MİR126 TRANSFEKSİYON ÇALIŞMASI SONUÇLARI

Yapılan eksozom uygulaması sonrasında miR126'nın ekspresyonunun azaldığı gözlenmişti. Bu sebeple HT29 hücrelerinde miR126'nın nasıl bir etki oluşturduğunu test etmek için bu hücrelerde miR126'nın overkespresyonu hedeflenmiştir. Hücrelerin transfeksiyonun başarısını göstermek için transfeksiyon yapılan hücrelerden RNA izolasyonu yapılarak, miR126 ekspresyonuna bakılmıştır. Veriler let7a'ya göre normalize edilip Graphpad ile student's t testi uygulanmıştır.

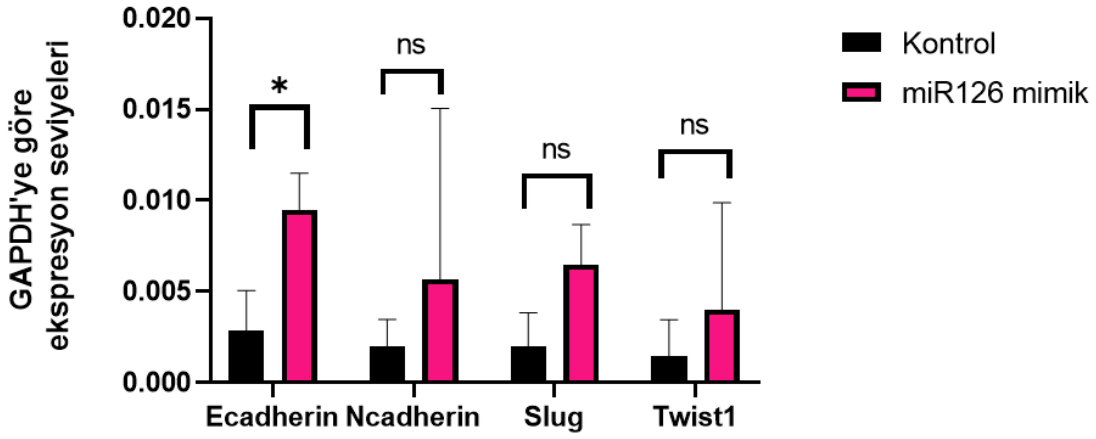


Şekil 5.19. miR126 mimik transfeksiyon kontrolü

Analiz sonucunda miR126 mimik transfeksiyonu yapılan hücrelerin miR126 ekspresyon seviyesi, yapılmayanlara göre 14 kat artış göstermiştir (**p<0.001). Ekspresyon artışı, miR126 mimik transfeksiyonunun başarılı bir şekilde yapıldığını göstermektedir.

5.11.1. TRANSFEKSİYON SONRASI HT29 HÜCRELERİNDE EMT-TF GEN EKSPRESYON SONUÇLARI

miR126 mimik transfeksiyonu yapılan hücrelerin EMT-TF açısından ekspresyon değişimi incelendiğinde E-cadherin ekspresyonunun miR126 mimik transfeksiyonu yapılmayanlara göre istatistiksel olarak anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (*p<0.05).

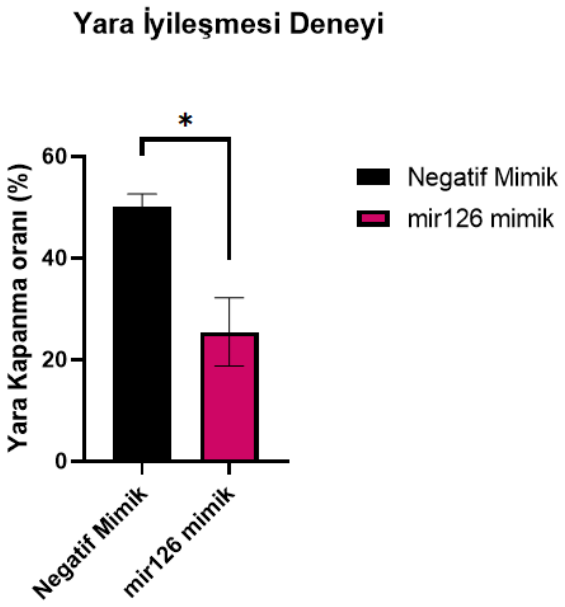


Şekil 5.20. miR126 mimik transfeksiyonu sonrası EMT-TF ekspresyon düzeyleri

Analiz sonuçlarına göre, miR126 overeksprese edilen HT29 hücrelerinde epitelyal biyobelirteç olan E-cadherin ekspresyonunun artması, hücrelerin MET sürecine yönlendiğini, yani miR126'nın tümör süpresör olarak görev yapan bir miRNA olduğunu göstermektedir.

5.11.2. TRANSFEKSİYON SONRASI HT29 HÜCRELERİNDE YARA İYİLEŞMESİ DENEYİ SONUÇLARI

miR126 mimik transfeksiyonu sonrası hücrelerin migrasyon yeteneğindeki değişimi gözlemlemek için yara iyileşmesi deneyi yapılmıştır. miR126 mimik transfeksiyonu yapılanların, yapılmayanlara göre yara kapanma hızının istatistiksel olarak anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (*p<0.05).

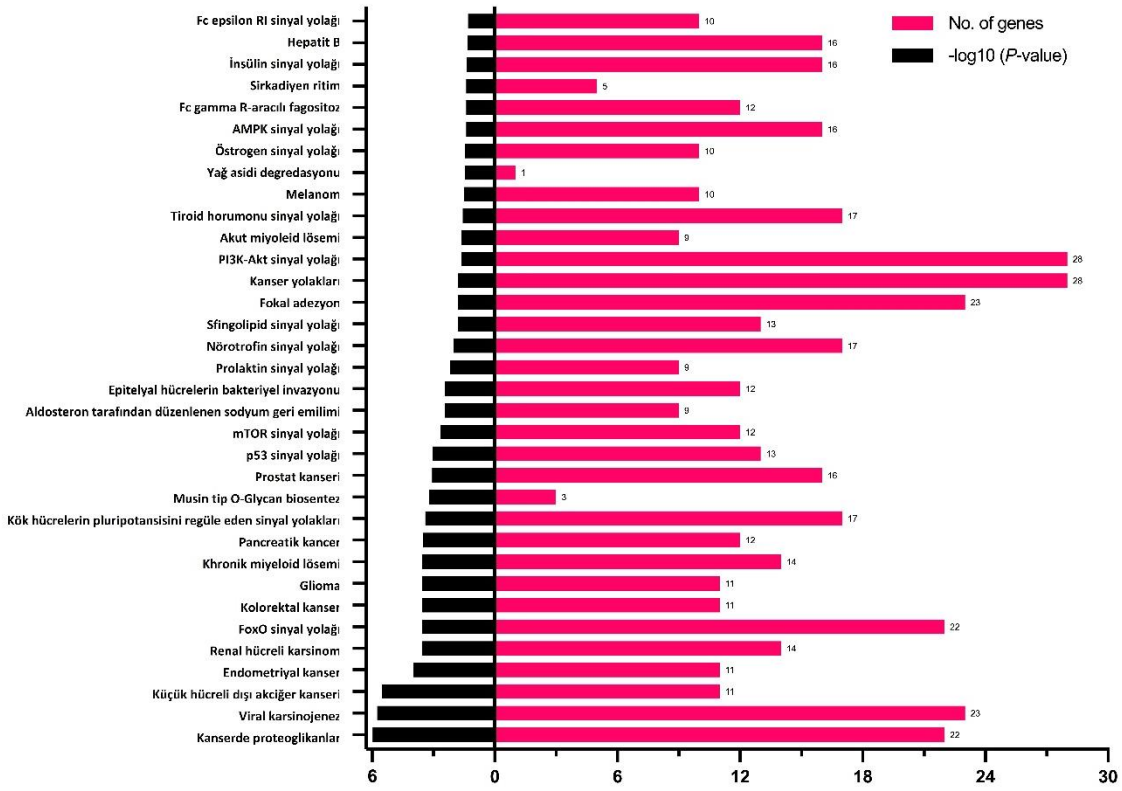


Şekil 5.21. miR126 mimik transfeksiyonu sonrası yara iyileşmesi analiz sonuçları

Analiz sonuçlarına göre, miR126 overeksprese edilen HT29 hücrelerinde yara kapanma hızının azalması, hücrelerin migrasyon yeteneğinin azaldığını göstermektedir. Bu durum yine miR126'nın tümör süpresör olarak görev yapan bir miRNA olduğunu göstermektedir.

5.11.3. miR126-5p'NİN YOLAK ANALİZİ

KEGG yolak analizi sonucunda tespit edilen ilişkili yolaklar Çizelge 5.8.'de ve Şekil 5.21.'de gösterilmiştir. Şekil 5.21.'de de görüldüğü üzere kanser, viral karsinojenez, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, endometriyal kanser, renal hücreli karsinom, FoxO sinyal yolu ve kolorektal kanserde, proteoglikanları içeren birçok yolakda hsa-miR-126-5p, önemli ölçüde zenginleşmiştir. Buna göre Şekil 5.21.'de dikey eksen, yolak kategorisini, yatay eksenler, zenginleştirme puanını [−log(P-value)] ve her yolak için zenginleştirilmiş hedeflenen genlerin sayısını temsil etmektedir ($P < 0,05$). Veriler DIANA-mirPath v.3 web sunucusu tarafından analiz edilmiştir.



Şekil 5.21. hsa-miR-126-5p'nin öngörülen hedeflerinin KEGG yolak analizi.

Çizelge 5.8. miR126-5p yolak analizi sonuçları

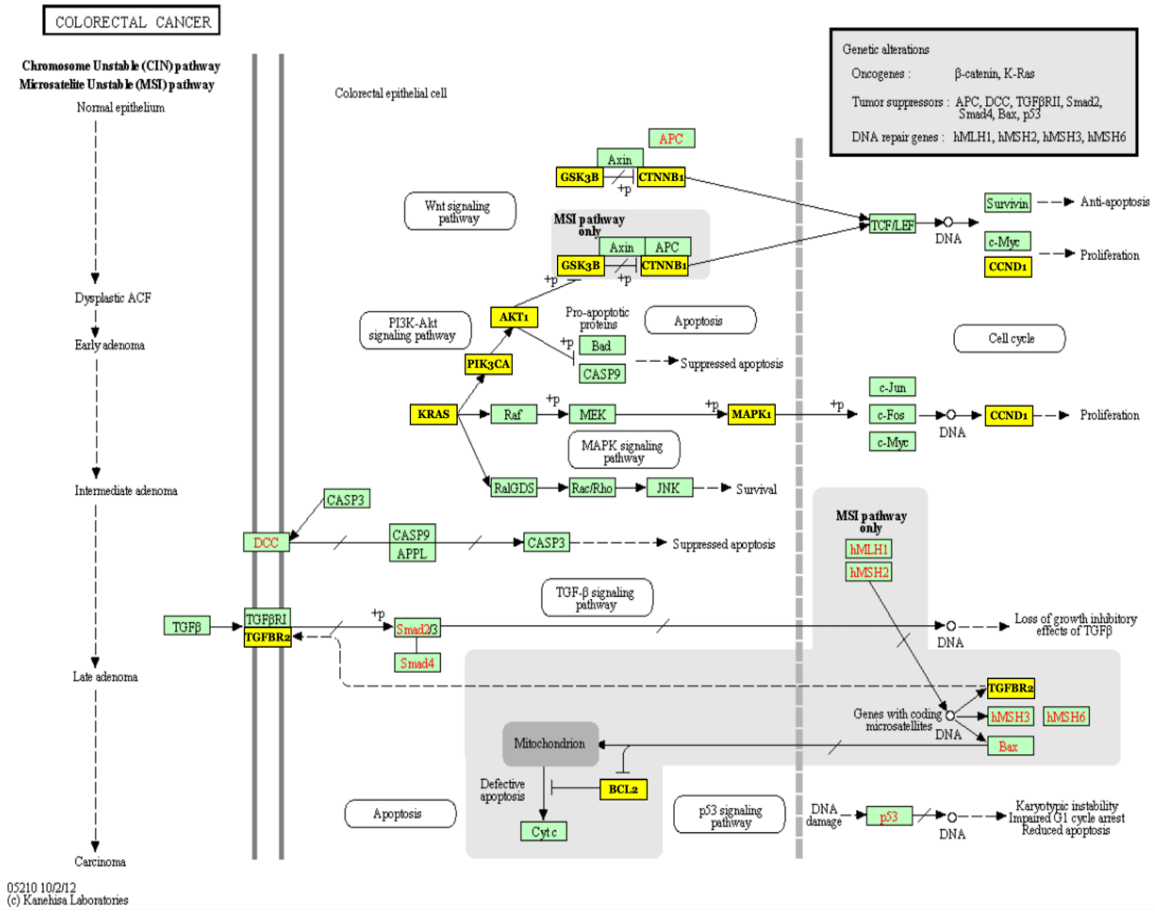
KEGG yolakları	**P değeri**	**Gen sayısı**
Kanserde proteoglikanlar	1,071127E-06	22
Viral karsinojenez	1,760756E-06	23
Küçük hücreli dışı akciğer kanseri	3,076149E-06	11
Endometriyal kanser	1,047558E-04	11
Renal hücreli karsinom	2,707590E-04	14
FoxO sinyal yolağı	2,756600E-04	22
Kolorektal kanser	2,756600E-04	11
Glioma	2,756600E-04	11
Khronik miyeloid lösemi	2,756600E-04	14
Pancreatik kancer	3,012736E-04	12
Kök hücrelerin pluripotansisini regüle eden sinyal yolakları	4,036501E-04	17
Musin tip O-Glycan biosentez	6,042454E-04	3
Prostat kanseri	8,755590E-04	16
p53 sinyal yolağı	9,076332E-04	13
mTOR sinyal yolağı	2,244049E-03	12
Aldosteron tarafından düzenlenen sodyum geri emilimi	3,457811E-03	9
Epitelyal hücrelerin bakteriyel invazyonu	3,457811E-03	12
Prolaktin sinyal yolağı	6,417650E-03	9
Nörotrofin sinyal yolağı	9,999778E-03	17
Sfingolipid sinyal yolağı	1,638371E-02	13
Fokal adezyon	1,638371E-02	23
Kanser yolakları	1,638371E-02	28
PI3K-Akt sinyal yolağı	2,379470E-02	28
Akut miyoleid lösemi	2,379470E-02	9
Tiroid horumonu sinyal yolağı	2,720379E-02	17
Melanom	3,213075E-02	10
Yağ asidi degredasyonu	3,575913E-02	1
Östrogen sinyal yolağı	3,575913E-02	10

AMPK sinyal yolağı	3,951185E-02	16
Fc gamma R-aracılı fagositoz	3,951211E-02	12
Sirkadiyen ritim	3,951211E-02	5
İnsülin sinyal yolağı	4,107658E-02	16
Hepatit B	4,797315E-02	16
Fc epsilon RI sinyal yolağı	4,921655E-02	10

hsa-miR-126-5p için yapılan KEGG yolak analiz sonuçları incelendiğinde, kolorektal kanser yolakları ile bağlantılı olduğu görülmektedir. 'Kolorektal kanser' yolağında (hsa05210) yer alan ve TarBase v7.0 tarafından tahmin edilen hedef genler Çizelge 5.9.'da listelenmiş ve Şekil 5.22.'de ilgili yolaklar üzerinde şematize edilmiştir.

Çizelge 5.9. "Kolorektal Kanser" yolağında zenginleştiği öngörülen hedef genler

Gen ismi	**Gen Ensembl Kimliği**
GSK3B	ENSG00000082701
PIK3R2	ENSG00000105647
BCL2	ENSG00000171791
KRAS	ENSG00000133703
PIK3CD	ENSG00000171608
CCND1	ENSG00000110092
CTNNB1	ENSG00000168036
AKT1	ENSG00000142208
PIK3CA	ENSG00000121879
MAPK1	ENSG00000100030
TGFBR2	ENSG00000163513



Şekil 5.22. KEGG veri tabanına göre kolorektal kanser yolağının şeması.

KEGG veri tabanına göre kolorektal kanser yolağının şeması Şekil 5.22.'de gösterilmiştir. TarBase v7.0 tarafından tahmin edilen miR-126-5p'nin belirtilen hedefleri sarı ile vurgulanmıştır. Bu sonuçlar, miR126'nın kolorektal kanserlerdeki rolünün anlaşılmasında büyük öneme sahiptir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Kolorektal kanser, yüksek insidans ve mortaliteye sahip başlıca kanserlerden biridir. 2020 yılında, 1,9 milyondan fazla yeni kolorektal kanser vakası saptanmıştır ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından kolorektal kanser kaynaklı 935.000 ölüm olduğu bildirilmiştir (3). Bu nedenle, kolorektal kanser için yeni tanı ve tedavi stratejilerini araştırmak hala son derece önemlidir.

Yapılan çalışmalar, mezenkimal kök hücrelerin, genetik bilgi alışverişinde bulunarak parakrin aracıları olarak hareket edebilecek ekzozomlar ürettiğini göstermiştir. Bu sebepledir ki MKH-eksozom aracılı mekanizmaları anlamak, kansere yeni terapötik yaklaşımlar getirebileceğinden kritik öneme sahiptir.

Bu tez çalışmasında; eksozomların hücre-hücre etkileşimlerindeki rolü ve MKH'lerin önceki çalışmalarda gösterilen tümör büyümesi üzerindeki etkileri göz önüne alınarak insan Ki-MKH-eksozomlarının kolorektal kanserde tümör büyümesi ve yayılımındaki rolünü araştırmaya odaklandık.

Bu tez çalışmasında, kolorektal kanser hücre hattı olarak HT29 kullanılmıştır. HT29 hücre hattı; primer tümörden (kolon) izole edilmiş, iyi diferansiye bir adenokarsinoma örneğidir. MKH eksozomları ise primer insan Kİ- MKH hücre süpernatanlarından ve insan Kİ-MKH hücre hattı süpernatanlarından izole edilmiştir.

Bu çalışmada izole edilen MKH eksozomları kolorektal kanser hücre hattı olan HT29 hücreleri üzerinde denenmiştir. Öncelikle, HT29 hücreleri floresan işaretli MKH eksozomları ile muamele edilip eksozomların hücre içine girişi konfokal mikroskopi ile gösterilmiştir. Daha sonra proliferasyon ve viyabilitedeki etkisini göstermek için MTT deneyi, metastazdaki etkisini göstermek için yara iyileşmesi deneyi ve invazyondaki etkisini göstermek için transwell matrigel deneyi yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda; insan kemik iliği kaynaklı MKH eksozomlarının kolorektal kanser progresyonu ve yayılımını artırıcı yönde etkisi olduğu gösterilmiştir. Daha sonra bu fonksiyonel sonuçları moleküler düzeyde desteklemek için insan Ki-MKH eksozomu uygulanmış, HT29 hücrelerinden RNA izole edilmiş ve EMT-transkripsiyon faktörlerinin ve EMT ile ilişkili miRNA'ların (metaanalizle belirlendi)

ekspresyon değişimlerine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar, fonksiyonel deneyleri destekler niteliktedir.

Tümör proliferasyonu, viyabilitesi, metastazı ve invazyonunu artıran spesifik bir mikroçevre oluşumu için uygun bir niş gerekmektedir (263). Birçok çalışmada, MKH kaynaklı eksozomların metastaz, invazyon ve metastaz öncesi niş oluşumundaki rolü incelemiştir. Çeşitli kanserlerde Ki-MKH eksozomlarının etkisini gösteren birkaç çalışma mevcuttur. Mao ve ark., p53-negatif Kİ-MKH'ler tarafından salgılanan eksozomların mide kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve göçünü artırabileceğini göstermiştir (83). Başka bir çalışmada, mide kanserlerinde MKH eksozomlarının ERK1/2 ve p38 MAPK yolaklarının aktivasyonu yoluyla tümör hücrelerinde VEGF artışlarınıuyardığı, bu şekildetümörün in vivo büyümesini teşvik eden, gelişmiş tümör anjiyojeneziyle sonuçlandığı gösterilmiştir (264). Meme kanseri hücre hattı MCF7'de, MKH eksozomları ile muameleden sonra, MCF7 meme kanseri hücrelerinin migrasyon yeteneğinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, MKH eksozom uygulaması, β-katenin mRNA ve protein seviyelerinde, ayrıca Axin2 ve DKK1 gibi Wnt hedef genlerinin ekspresyonununda önemli bir artışa sebep olmuştur. Bu sonuçlar, MKH eksozomlarının, Wnt sinyal yolağının aktivasyonu yoluyla MCF7 hücre göçünü artırdığını göstermiştir. Bu, MKH eksozomlarının tümör migrasyonunu artırdığını gösteren ilk rapordur (48). Bundan sonra Wang ve ark., miRNA'ların MKH tarafından salgılanan eksozomlar halinde paketlendiğini ve mide kanseri hücrelerine verildiğinde mide kanseri metastazını artırdığını göstermiştir(265). Bu durum, miR-221 overekspresyonunun, gelişmiş tümör-lenf nodu-metastaz evresi, lokal invazyon ve lenfatik metastaz ile önemli bir korelasyon içinde olduğunu göstermektedir(266). Bu tez çalışmasında elde edilen veriler, insan Ki-MKH eksozomlarının KRK'de invazyon ve metastazı artırdığı yönündedir ve bu sonuçlar yukarıda bahsettiğimiz çalışmalarla uyumlu görünmektedir.

Öte yandan literatür incelendiğinde başka bir grup çalışmada, MKH eksozomlarının kanser büyümesini inhibe ettiği, metastaz ve invazyonu azalttığı yönünde sonuçlar görülmektedir. Bir çalışmada MKH'lerin miR-146b'yi salgılanan eksozomlara paketlendiğini, daha sonra miR-146b taşıyan MKH eksozomlarının miRNA'yı glioma hücrelerine verdiğini, bu da MKH eksozomların anti-tümör miRNA'ları (miR-146b) transfer etmek için bir araç olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir (267). Lee ve ark., MKH'nin sentetik miR-124 ve miR-145 mimiklerini, ekzozomlarla birlikte kültürlenmiş glioma hücrelerine vererek glioma hücrelerinin

migrasyonunu büyük ölçüde azalttığını göstermişlerdir (85). Ayrıca MKH eksozomları miR-143'ü osteosarkom hücrelerine aktarabilir ve bu da osteosarkom hücrelerinin migrasyon yeteneğini önemli ölçüde azaltabilir (154). Meme kanserinde ise, Ki-MKH eksozomlarında artmış miR-23b ve azalan MARCKS ekspresyonu meme kanserinde migrasyon ve invazyonun inhibisyonu ile sonuçlanan mekanizmalardan biri olan hücre döngüsü baskılanmasına ve dormansiye katkıda bulunmaktadır (39,268).

Kolorektal kanser hedefli çalışmalar incelendiğinde benzer birkaç çalışma mevcuttur. Bunların ilkinde Xu ve ark.ları MKH eksozomlarında yüksek eksprese olan miR-16-5p molekülünü kolorektal kanser hücre hatlarına transfekte ederek tümör migrasyon ve invasyonunun azaldığını göstermişlerdir (269). Diğerinde ise Chen ve ark.ları miR-4461 molekülünün MKH eksozomlarında yüksek düzeyde eksprese olduğunu, kolorektal kanser dokusunda (HCT116 hücre hattı) ise normal kolon dokusuna (FHC hücre hattı) göre daha düşük eksprese olduğunu göstermişlerdir. Yine kolorektal kanser hücre hatlarına miR-4461 transfekte ettiklerinde tümör migrasyon ve invasyonunun azaldığını göstermişlerdir (37). Son olarak Li ve ark.'nın yaptığı çalışmada kordon kanı kaynaklı MKH eksozomlarının miR-3940-5p'yi KRK hücrelerine taşıdığı ve miR-3940-5p'nın yüksek ekspresyonunun EMT ve invazyonu inhibe ederek tümör metastazını ve invazyonunu baskıladığı gösterilmiştir (229). Sonuçlarımız, bu çalışmaların sonuçları ile farklılık/uyumsuzluk göstermekle birlikte, literatürde bu konuda bir çelişkinin/tartışmanın olduğunu da göz önüne sermektedir. Ek olarak, bu çalışmalarda tek başına MKH eksozomlarının etkisi değil onların taşıdığı moleküller (miRNA'lar) üzerinden çalışmalar planlanmıştır. Bu durum daha sonra ayrıntılı olarak bahsedeceğim "miRNA-kanser ilişkisi"nin karmaşıklığı nedeniyle oldukça çelişkilidir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında görüyoruz ki mevcut çok sayıda çalışma; MKH'lerin/MKH kaynaklı sekresyonların çeşitli koşullar altında tümörijenezi artırabildiği veya azaltabildiğini göstermektedir (36). Tümörler, mikroçevresi içinde inflamatuar mediyatörler salgılayarak immün sistem tarafından tanınmayı engelleyen stabil bir inflamatuvar ortam oluştururlar (270). Kanser hücreleri, normal hücreler ve tümör mikroçevresi arasında bir etkileşim oluşur. Bu etkileşimler anjiyojenez, immünomodülasyon, metastaz ve invazyonun yanı sıra apoptotik direnç gibi kanser gelişiminin önemli basamaklarına katkıda bulunur (271,272). Bazı çalışmalar, MKH'lerin kanser mikroçevresine girerek tümör vasküler sisteminin oluşumunu desteklediklerini ve immün reaksiyonları baskıladıklarını göstermiştir (273–277). Solid

tümörlerde ortaya çıkabilen oksidatif stres, ısı şoku, hipoksi ve besinden yoksun koşullar altında MKH'nin, tümörün sağkalım oranlarını artırdığı saptanmıştır. Bunu, sitoprotektif genlerin ekspresyonunu indükleyerek sağlamaktadırlar (278–281). Bu bilgi ile uyumlu olarak MKH'ler, uzun süreli sağkalım için gerekli besinleri sağlamada bir otofajik metabolizma kullanırlar. Sağkalım faktörlerinin salgılanması, MKH'lerin ve çevresindeki diğer hücrelerin sağkalım oranını artırmaya katkı sağlar (282). Tümör gelişimini artıran bunca özelliğin aksine MKH'lerin ayrıca anjiyojenezi baskılayarak, PI3K, Wnt ve AKT gibi proliferasyonla ilişkili sinyal yolaklarını inhibe ederek ve hücre döngüsü ilerlemesini durdurarak tümör büyümesini kısıtlayabildiği de bildirilmiştir (283–288).

MKH eksozomları aynı kanser tiplerinde dahi farklı etkiler oluşturabilmekte ve çeşitli tümör hücre tiplerinde MKH eksozomlarının mekanizmasının izlenmesi gerektiğini göstermektedir. Görüldüğü üzere MKH'ler ve MKH kaynaklı eksozomların tümör üzerindeki etkileri halen tartışmalıdır (36). Bunun en önemli nedeni, MKH'lerin ve MKH kaynaklı eksozomların heterojenitesi olabilir (289). Teorik olarak; yeni elde edilen bir MKH, morfolojik homojenliğe ve çeşitli pasajlar için belirli yüzey antijenlerinin tekdüze ifadesine sahiptir (290,291). Bununla birlikte, elde edilen MKH genellikle fenotipik, fonksiyonel ve biyokimyasal olarak farklı hücrelerin bir karışımını temsil eder (292,293). Pasaj ilerledikçe MKH'lerin klonojenitesi azalır ve proliferasyon yavaşlar (294,295). Ancak yapılan çalışmalar, insan MKH'sinin tek hücreden türetilmiş kolonilerinin morfolojik olarak en az üç farklı hücre tipi içerdiğini göstermiştir: (a) son derece küçük ve hızla kendi kendini yenileyen hücreler; (b) uzun iğ şeklindeki fibroblast benzeri hücreler ve (c) büyük, kübik şekilli ve yavaş çoğalan hücreler (296,297). Ek olarak, hücre farklılaşmasında, proteomik, transkriptomik ve epigenetik durumda açık bir klonal değişkenlik vardır. Klonların farklılaşma potansiyeli (osteo-kondro, osteo-adipo veya osteoprojenitörler) gösterdiği gözlenmiştir (298). Öte yandan, MKH'nin hızlı ve yavaş büyüyen klonal popülasyonlarının, ara filamentler, kalsiyum bağlayıcı proteinler ve glikolitik proteinler dahil proteinlerin farklı ekspresyonu ile proteomik olarak farklı olduğu gösterilmiştir (299).

Benzer şekilde farklı dokulardan izole edilen MKH kaynaklı sekretomların/eksozomların heterojenliği de gösterilmiştir. Diğer MKH'lere kıyaslandığında adipoz kökenli MKH'lerin daha yüksek miktarlarda hücre dışı matriks bileşenleri ve metaloproteinazlar (MMP'ler) (300) veya vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi pro-anjiyojenik moleküller salgıladığı gösterilmiştir (301). Bu, adipoz kökenli MKH'lerin, anjiyojeneze bağlı terapötik yaklaşımları

arttırmak için diğer MKH popülasyonlarına göre tercih edilebileceğini gösterir. Kordon kanı kökenli MKH'ler ise, IL-6, IL-7 ve IL-10 ile PDGF-AA ve TGF-α gibi immünomodülatör faktörleri yüksek düzeyde salgılamaktadır (300). Yukarıdaki bilgilere ek olarak MKH kaynaklı eksozomların fonksiyonları ve kanserdeki etkinliğini gösteren bazı çalışmalar ayrıca Çizelge 6.1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 6.1. MKH kaynaklı eksozomların fonksiyonları

Ekzozom Kaynağı	Fonksiyon	Hedef/ Yolak	Referans
İnsan kemik iliğinden türetilmiş MKH'ler	↑ In vivo meme tümörü büyümesi	miRNA-21 ve 34a	(302)
Fare kemik iliğinden türetilmiş MKH'ler	↓ İn vitro ve in vivo anjiyojenezi baskılama	miRNA-16, VEGF	(96)
İnsan kemik iliğinden türetilmiş MKH'ler	↑ In vivo olarak tümör büyümesini uyarma	VEGF, ERK1/2	(303)
Mezenkimal stromal hücre	İn vitro tümör hücrelerine temozolomide kemosensitivite kazandırma	Anti-miRNA-9	(304)
Mezenkimal stromal hücre ekzozomları	↓ İn vivo olarak azaltılmış intrakraniyal tümör hacmi	miRNA-146b	(267)
Multipl miyelom kaynaklı MKH'ler	↑ in vitro MM hücre büyümesi ↑ in vivo tümör büyümesi ↑ BM homing	MM BM-MSC kaynaklı eksozomlar	(46)
İnsan göbek kordonu MKH	↓ Önemli ölçüde tümör boyutu ↑ Apoptoz	hWJMSC-EV'ler + hWJMSC'ler	(305)
İnsan yetişkin karaciğer kök hücresi;	↓ Önemli ölçüde tümör boyutu ↑ Apoptoz	HLSC kaynaklı eksozomlar	(306)
Kemik iliği MKH (Ki-MKH)	↓Proliferasyon ↓ Tümör oluşumu	Ki-MKH ekzozomu uygulanmış hücreler	(268)
Glioma İlişkili insan MKH	↑ glioma kök benzeri hücrelerin tümörijenitesini arttırır ↑ glioblastomun agresifliğini arttırır	miR-1587	(307)
MKH	↓ Mide kanseri hücrelerinde ilaç direnci yaratır	CaM-Ks / Raf / MEK / ERK	(50)
Murin veya insan Ki- MKH	↓ in vivo ve in vitro murin kemik iliğinde ters radyasyon hasarı ↓ Apoptoz	FDC-P1	(308)

KRK ve EMT-TF'ler

Metastatik hücrelerin primer tümörden uzak metastaz bölgelerine gidişi oldukça zorlu bir yolculuktur. Uzak bir lokasyona gidip yeni bir koloni oluşturması için aşılması gereken bariyerler vardır. Bu süreci anlamak için anahtar yol, epitelyal-mezenkimal (EMT) programlamasını çözümlemekten geçmektedir. EMT; primer tümör hücrelerinin primer tümörden ayrılarak yeni bir metastatik nişi oluşturması için geçirmesi gereken fiziksel değişiklikleri açıklar. Bu doğrultuda tümör hücrelerinin metastazı için mikroçevre değişikliği gerektiği de kabul görmektedir (225,226). Bu mikroçevre değişikliğini oluşturacak çok sayıda faktör tanımlanmıştır. Bunlardan biri de MKH eksozomlarıdır. MKH eksozomlarının taşıdığı kargo içerikleri ile tümörlerde farklı etkiler oluşturabilmektedir.

Söz konusu etkinin EMT sürecindeki yansımasını gözlemlemek amacıyla bu tez çalışmasında, insan Ki-MKH eksozomu uygulanan HT29 hücrelerinde EMT-TF ekspresyon değişimi incelenmiştir. Buna göre; N-cadherin ve Slug gen ekspresyonlarının eksozom uygulanan hücrelerde, uygulanmayanlara göre artmış olduğu gözlenmiştir.

Kadherinler, hücre-hücre adezyonunu ve normal doku mimarisini korumayı sağlayan transmembran glikoproteinlerdir. Kateninlerle etkileşime giren ve bir adhezyon molekül sınıfı olan kadherinler, birçok alt gruptan oluşmaktadır (309). Bu tez çalışmasında, kadherin ailesinden olan N-cadherin (nöral cadherin, CDH2) ve E-cadherin (epitelyal kadherin, CDH1) molekülleri incelenmiştir.

Çeşitli kanser tiplerinde EMT'nin başlatılması ya da desteklenmesi, hipoksi ve tümör mikroçevresinin sinyalleri dahil olmak üzere birçok onkojenik sinyal yolu ile olabilmektedir. Bu sinyallerin devamında, epitel hücreleri hücre polaritelerini ve hücre-hücre adezyonunu kaybederler ve metastatik özellikler kazanırlar. Bu durum, kadherin değişimi (*"kadherin-switch")* olarak ifade edilen durum ile hücrelerde E-cadherin kaybı ve tümör ilerlemesi sırasında artan N-kadherin ekspresyonu olarak tanımlanmaktadır (310). Bu değişim ile, kanser hücrelerinin metastatik kapasitesi indüklenir.

N-cadherin, EMT sürecinde etkili, iyi bilinen bir mezenkimal biyobelirteçtir. N-cadherin nöral hücreler, endotelyal hücreler, stromal hücreler ve osteoblastlar gibi epitelyal olmayan birçok hücre tipinde yüksek eksprese olan bir adezyon molekülüdür (311). N-cadherin, nörülasyon

sırasında E-Cadherin ile yer değiştirir. Böylece nöral progenitör hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşmasını regüle edecek bağlantılar oluşturur (312). N-cadherin, fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1 (FGFR1) aktivitesini uyarır (313). Epitel kökenli bir hücrede N-cadherinin uyarılması, heterotipik bir hücre-hücre adezyon moduna geçişi ile tıpkı normalde N-cadherin eksprese eden stromal ve endotelyal hücreler gibi diğer hücre tiplerine bağlanma yeteneği kazanmalarını sağlar. Bu durumun, tümör hücresinin lokal invazyon ve metastatik yayılımına katkıda bulunacağı düşünülmektedir (314). Ek olarak N-kadherin, mikrodamarların stabilizasyonu için endotel hücrelerini ve duvar hücrelerini kaplayarak anjiyojenezi destekler ve kan damarlarının bütünlüğünü korur (315).

N-cadherin, devam eden bir EMT sürecinin temel göstergelerinden biridir. N-kadherinin ekspresyon artışı, başta akciğer kanseri, karaciğer kanseri, kolorektal kanser ve prostat kanseri gibi diğer birçok kanserde gösterilmiş ve kanser gelişimi, invazyon, metastaz, anjiyojenez ile ilişkilendirilmiştir (317–321). N-cadherin, KRK'da bağımsız bir prognostik biyobelirteç olarak tanımlanmıştır (317). N-cadherin ekspresyonunun artması KRK'de malign ilerlemeyi artırmasının yanı sıra, tümör boyutu, lenf nodu ve metastaz ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu, HT29'larda direk olarak migrasyonu ve proliferasyonu artırdığı gösterilmiştir (317). Bu tez çalışmasında HT29 hücrelerinde Ki-MKH eksozomu uygulanan HT29 hücrelerinde N-cadherin ekspresyonunun eksozom uygulanmayanlara göre artmış olduğunu gözlemledik ($p<0.05$). Bu durum, Ki-MKH eksozomlarının EMT sürecinin ilerlemesine katkı sağladığını, doğrudan ya da dolaylı olarak N-cadherin ekspresyon artışına sebep olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda kadherin değişimi göstermek için E-cadherin ekspresyon düzeyine de bakılmış, Ki-MKH eksozomu uygulanan HT29 hücrelerinde E-cadherin ekspresyonunun eksozom uygulanmayanlara göre azalmış olduğu gözlenmiştir. Ancak E-cadherin ekspresyon azalışı, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Öte yandan kadherin değişimi, SNAI1, SLUG, TWIST, ZEB1 ve ZEB2 gibi birçok çinko parmak ailesine bağlı transkripsiyon faktörleri (TF) aracılığı ile kadherin ekspresyonunun transkripsiyonel regülasyonunun bir sonucudur (322). Temel olarak, bu TF'ler, E-cadherin promotoruna bağlanarak E-kadherin ekspresyonunu negatif olarak regüle ederler (310). EMT'nin transkripsiyonel aktivasyonu için ana sinyal yolakları, Wnt/β katenin, TGF-β, Notch ve Hedgehog'dur (310,323,324). TGF- β, Ras ile iş birliği halinde çalışarak Snail ve Slug'ı indükler ve bu durum desmozomların bozulmasına, daha sonra hücre hareketliliğine, sitokeratin

ekspresyonunun inhibisyonuna yol açar. Nihai olarak, hücre-hücre bağlantılarının ayrılması ile hücre invazyonu ortaya çıkar (310). Bu tez çalışmasında kadherin moleküllerine ek olarak yukarıda EMT ilişkisi özetlenen Slug ve Twist1 ekspresyon düzeyleri de incelemiştir.

Slug, embriyonik gelişim sürecinde mezoderm oluşumu, nöral krest hücre oluşu ve göçüne, hücresel farklılaşma, adezyon, metastaz, hücre döngüsü ve apoptozun regülasyonuna katıldığı gösterilen Snail çinko parmak ailesine ait bir transkripsiyon faktörüdür (326).

Slug'ın çeşitli kanserlerde, tümör hücrelerinin epitelyal biyobelirteçleri downregüle ederek ya da mezenkimal biyobelirteçleri upregüle ederek tümör hücrelerinin mobilite kazanmasını ve invaziv hale gelmesini sağladığı daha önce bildirilmiştir (326,327). Ayrıca birçok çalışma göstermiştir ki Slug'ın overekspresyonu meme, mide, kolorektal, yumurtalık gibi çeşitli insan kanserlerinde artan metastatik kapasite ve azalmış postoperatif sağkalım ile ilişkilidir (328–331).

Kolorektal kanserlerde Slug ekspresyonunun artışı, kötü prognozla ilişkili bağımsız bir parametre olarak tanımlanmıştır. Slug pozitif ekspresyonu olan hastaların genel sağkalımının, negatif ekspresyonu olanlara göre daha kötü olduğu görülmüştür (332). Başka bir çalışmada benzer şekilde, artmış Slug ekspresyonunun KRK hastalarında bağımsız bir prognostik faktör ve lenf nodu metastazının öngörücü bir biyobelirteci olduğu gösterilmiştir (325).

Buna göre çalışmamızda Slug ve Twist1 ekspresyon düzeyine de bakılmış, Ki-MKH eksozomu uygulanan HT29 hücrelerinde Slug ekspresyonunun eksozom uygulanmayanlara göre artmış olduğu gözlenmiştir. Slug ekspresyonunun artışı, fonksiyonel deneyler ile gösterdiğimiz, Ki-MKH eksozomlarının HT29 hücrelerinin EMT sürecini artırdığı verileri destekler nitelikte olup ana hatları ile literatür ile uyumlu olarak yorumlanmıştır. Dolayısıyla Slug ekspresyon artışı ile birlikte Ki-MKH eksozomlarının HT29 hücrelerini daha agresif bir karaktere dönüştürdüğü söylenebilir.

KRK ve EMT ilişkili miRNA'lar

miRNA'ların keşfinden sonra, kanser ile olan ilişkisini inceleyen çok sayıda çalışmada, miRNA'ların ekspresyonunun farklı tümörlerde değişkenlik gösterdiği gösterilmiştir. Bu değişkenlik, miRNA genlerinin amplifikasyonu veya silinmesi/susturulması, miRNA'ların anormal transkripsiyonel kontrolü, deregüle epigenetik değişiklikler ve miRNA biyogenez

sürecindeki defektler olmak üzere birçok mekanizmadan kaynaklı olabilir. Anormal miRNA ekspresyonuna sahip kanser hücreleri, proliferatif sinyal oluşturma ve sürdürme, tümör baskılayıcılardan ve apoptozdan kaçış, invazyon ve metastaz aktivasyonu ve anjiyojenezi indükleme yeteneklerini geliştirirler. Buna göre miRNA'lar belirli koşullar altında kanserde gösterdiği işleve göre tümör baskılayıcı veya onkogen olarak adlandırılabilirler. Bu oncomiR ya da tümör baskılayıcı miRNA'ların sırasıyla inhibe edilmesi veya uyarılması durumunda, kanser tipine ve etkilenen spesifik miRNA'ya bağlı olarak kanser hücresi proliferasyonu, metastazı ve/veya sağkalımı büyük ölçüde azalabilir.

Literatürde miRNA'ların kanserdeki etkinliği incelendiğinde, spesifik miRNA'ların onkojenik mi yoksa tümör baskılayıcı mı olduğu konusu son derece çelişkilidir (332). Çok sayıda raporda, belirli miRNA'ların bir çalışmada onkojenik olduğu, ancak diğerinde tümör baskılayıcı olduğu gösterilmiştir. Belirli bir miRNA'dan etkilenen çok sayıda hedef/gen/yolak göz önüne alındığında, etkilerin çeşitli olması beklenti dahilindedir. Bu tez çalışmasında yer alan miRNA'lar için bu çelişkiyi gözler önüne seren ayrıntılı bir analiz aşağıda verilmiştir:

miR-21, proliferasyon, apoptoz ve metastaz ile ilişkili çok sayıda tümör baskılayıcı geni hedef alan, erken dönemde kanseri teşvik eden 'oncomiR'lerden biridir (121). miR-21 meme, kolorektal, akciğer, pankreas kanseri, glioblastoma, nöroblastom, lösemi ve lenfomada aşırı eksprese edilir (333). miR-21, tümör hücrelerinin proliferasyonunu, apoptozu, göçünü, invazyonunu artırır. KRK'de miR21 ekspresyonunun Spry2 ve PTEN ekspresyonu ile ters ilişkili olduğu ve kanser progresyonunun artmasına neden olduğu gösterilmiştir (334). Kolorektal kanserlerde miR21, bir tümör baskılayıcı olan PDGD4'ü hedefleyerek (negatif regüle ederek) invazyon, intravazasyon ve metastazı uyarır (195). Benzer bir sonuç, eksozomal miR21 için de gösterilmiştir (335).

Başka bir çalışmada miR-21'in kolon kanseri dokularındaki ekspresyon seviyesinin, bitişik dokulardakinden önemli ölçüde daha yüksek olduğu ve yüksek miR-21 ekspresyonuna sahip hastaların hayatta kalma süresinin, miR-21'in düşük ekspresyonuna sahip hastalardan önemli ölçüde daha kısa olduğunu saptanmıştır. Böylece miR-21, kolon kanseri dokularında yüksek ekspresyonlu hastaların malignite derecesi ile pozitif, sağkalım ile negatif olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir (336).

miR-21'in, PTEN ekspresyonunu downregüle ederek proliferasyon, anti-apoptoz, hücre döngüsü progresyonu ve KRK hücrelerinin invazyonu gibi malign fenotipleri modüle edebileceği bildirilmiştir (337). Başka bir çalışmada, miR-21'in, Sec23A ekspresyonunu downregüle ederek in vitro SW-480 ve DLD-1 KRK hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunun desteklediği gösterilmiştir (338).

Yukarıda bahsi geçen çok sayıda çalışma miR21'i "onkomir" olarak tanımlarken güncel başka bir çalışmada, miR21'in programlı hücre ölümünü artırdığı bildirilmiş olup, miR21-5p'nin overekspresyonunun TGFβ1'i downregüle ederek piroptoza yol açtığı saptanmıştır (339). Piroptoz, ökaryotik hücrelerde programlı hücre ölümünün farklı bir şekli olup plazma zarından ayrılan büyük kabarcıklarla hücrelerin şişmesi ile karakterizedir (340,341).

Bizim çalışmamızda, Ki-MKH eksozomu uygulanan HT29 hücrelerinde miR21 ekspresyonunun, eksozom uygulanmayanlara göre azalmış olduğu gözlenmiştir. miR21 downregülasyonu, mevcut literatür ile birlikte değerlendirildiğinde uyumlu ya da uyumsuz olarak değerlendirilebilir. Fakat bu değerlendirme yapılırken fonksiyonel deneylerimizin sonuçları da dikkate alındığında MKH eksozomlarının HT29 hücrelerinde invazyon/metastaz/EMT profilinde artış sağladığı ve bu artışa miR21 ekspresyon değişikliğinin de doğrudan ya da dolaylı olarak katılım sağladığı söylenebilir. Ancak miR21'in mevcut senaryo içindeki etkisini net bir şekilde yorumlayabilmek için ek deneylere ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda incelediğimiz EMT ilişkili miRNA'lardan olan miR-27a, bazı çalışmalarda onkomiR, bazılarında tümör supresör olarak ifade edilmiştir. miR27a, FAM172A ekspresyonunu inhibe ederek KRK hücre hatlarının metastazını destekler (342). miR-27a, bir onkomiRNA gibi davranarak kalretikülini downregüle ederek MHC sınıf I yüzey maruziyetini baskılar. Böylece anti-tümör bağışıklık tepkisini etkileyerek kolon kanserinde tümörijenezini destekler (143). Başka bir çalışmada miR-27a, AMPK'yi negatif, mTOR'u ise pozitif olarak modüle ederek otofajiyi ve apoptozu azaltır. Ayrıca mir27a, kemoterapiye karşı artan direnç ile ilişkili aerobik bir glikolitik metabolizmayı zorlayarak onkogenler ve tümör hücresi metabolik düzenleyicileri ile uyum içinde çalışır (343). Bir diğer çalışmada, miR-27a-3p'nin KRK'de yine bir onkogen olarak görev yaptığı, miR-27a-3p'nin ekspresyonun, KRK'de eşleştirilmiş tümör olmayan dokulara kıyasla önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. miR-27a-

3p’nin B hücresi translokasyon geni 1 (BTG1)’i hedefleyerek, HCT-116 (KRK hücre hattı) hücrelerinin çoğalmasını desteklediği ve miR-27a-3p mimik ile transfeksiyonu ile, HCT-116 hücrelerinde erken apoptozu indüklediği saptanmıştır (344).

Öte yandan, başka bir çalışmada tümör süpresor olarak işlev gördüğü bildirilen miR27a’nın downregülasyonu, KRK patolojik evreleri ve uzak metastaz ile de ilişkilendirilirken, in vitro çalışmalarda miR-27a'nın artan ekspresyonunun kolorektal kanser hücresi proliferasyonunu inhibe ettiği, apoptozu teşvik ettiği ve kanser hücresi migrasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Daha sonra tümörlü fare modelinde tümöre direk miR27a enjeksiyonu yapıldığında, miR27a’nın tümör büyümesini baskıladığı görülmüştür. Bu çalışmada miR-27a’nın bir tümör supresör gibi davranarak KRK progresyonununda teröpatik etki oluşturduğu gösterilmiştir. MiR27a, bu etkiyi SGPP1 ve Smad2'yi hedefleyerek, STAT3 ile bağlantılı olarak gerçekleştirir (142).

Bizim çalışmamızda, Ki-MKH eksozomu uygulanan HT29 hücrelerinde miR27a ekspresyonunun, eksozom uygulanmayanlara göre azalmış olduğu gözlenmiştir. miR27a downregülasyonu, mevcut literatür ile birlikte değerlendirildiğinde uyumlu ya da uyumsuz olarak değerlendirilebilir. Fakat bu değerlendirme yapılırken fonksiyonel deneylerimizin sonuçları da dikkate alındığında MKH eksozomlarının HT29 hücrelerinde invazyon/metastaz/EMT profilinde artış sağladığı ve bu artışa miR27a ekspresyon değişikliğinin de doğrudan ya da dolaylı olarak katılım sağladığı söylenebilir. Ancak miR27a’nın mevcut senaryo içindeki etkisini net bir şekilde yorumlayabilmek için ek deneylere ihtiyaç duyulmaktadır.

Tez çalışmasında analiz edilen bir diğer EMT ilişkili miRNAolan miR-148a, tümör baskılayıcı olarak görev yapan bir miRNA olarak tanımlanmaktadır. Birkaç çalışma, miRNA-148a'nın KRK hücrelerinde downregüle olduğunu ve kötü prognozla ilişkili olduğunu bildirmiştir (345–348). miR148a, BCL2’yi posttranskripsiyonel olarak susturarak apoptozu indüklemektedir (349). miR-148a, ErbB3'ün ekspresyonunu doğrudan regüle ederek kolorektal kanser hücrelerinde proliferasyon ve migrasyonu baskılanmasını sağlar (160). Ayrıca, miR148a’nın downregülasyonun EMT geçişine aracılık ettiği düşünülen tümör tomurcuklanmasını artırdığı saptanmıştır (350). Kolorektal kanser hastalarında hsa-miR-148a-3p'nin hipoksik downregülasyonu, ITGA5 ve PRNP’yi hedefleyip upregüle ederek tümör progresyonu ve zayıf

sağkalıma katkıda bulunmuştur (351). miR-148a, NF- κ B ve STAT3 tarafından yürütülen sinyalleri ve bunların proinflamatuar sonuçlarını baskılayarak kolit ve kolit ile ilişkili tümörijenezi modüle eden dolaylı bir tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır (352).

Bu tez çalışmasında, Ki-MKH eksozomu uygulanan HT29 hücrelerinde miR148a ekspresyonunun eksozom uygulanmayanlara göre artmış olduğu gözlenmiştir. miR148a upregülasyonu, mevcut literatür ile birlikte değerlendirildiğinde EMT sürecinin baskılanması beklenmektedir. Ancak bizim fonksiyonel deneylerimiz bunu doğrulamamakta ve dolayısıyla sonuçlarımızın literatür ile uyumsuz olduğu görülmektedir. Ancak miR148a'nın mevcut senaryo içindeki etkisini net bir şekilde yorumlayabilmek için ek deneylere ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda analiz ettiğimiz bir diğer miRNA olan miR150, KRK'de tanısal bir biyobelirteç olarak tanımlanmıştır (353). KRK hastalarında serumdan elde edilen eksozomal miR-150-5p seviyesinin sağlıklı donörlerle karşılaştırıldıında önemli ölçüde downregüle olduğu ve miR150'nin KRK hastalığında tanısal biyobelirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (354).

miR-150'nin literatür taraması yapıldığında, yine hem onkogen hem tümör supresör olarak işlev gören bir miRNA olduğu görülmektedir. Bir çalışmada, onkomiR olarak görev yapıp TP53'ü hedefleyerek proliferasyon, hücre döngüsü ilerlemesi, hücre apoptozu ve KRK hücrelerinin invazyon ve metastazını desteklediği gösterilmiştir (206).

Öte yandan başka bir grup çalışmada miR-150, tümör supresör gibi davranıp β-katenin'i in vivo modüle ederek kolorektal kanser büyümesini baskılamıştır. miR-150'nin, β-katenin yolunu inaktive ederek kolorektal kanser ilerlemesini engellediği gösterilmiştir (163). Bir diğer çalışmada miR-150'nin, KRK'da VEGFA/VEGFR2/Akt/mTOR sinyali aracılığıyla KRK başlatma ve ilerlemesini baskılayarak tümör büyümesini, metastazı ve anjiyojenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (164). Benzer şekilde, miR-150, Gli1'i inhibe ederek KRK'da EMT'yi, proliferasyon ve invazyonu azaltmıştır (163). miR-150-5p, MUC4'ü hedefleyerek KRK hücrelerinin metastazını baskıladığı da gösterilmiştir (355).

Bizim çalışmamızda, Ki-MKH eksozomu uygulanan HT29 hücrelerinde miR150 ekspresyonunun, eksozom uygulanmayanlara göre azalmış olduğu gözlenmiştir. miR150 downregülasyonu, mevcut literatür ile birlikte değerlendirildiğinde uyumlu ya da uyumsuz

olarak değerlendirilebilir. Fakat bu değerlendirme yapılırken fonksiyonel deneylerimizin sonuçları da dikkate alındığında MKH eksozomlarının HT29 hücrelerinde invazyon/metastaz/EMT profilinde artış sağladığı ve bu artışa miR150 ekspresyon değişikliğinin de doğrudan ya da dolaylı olarak katılım sağladığı söylenebilir. Ancak miR150'nin mevcut senaryo içindeki etkisini net bir şekilde yorumlayabilmek için ek deneylere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasında incelemesi yapılan bir diğer miRNA olan miR-194, yine hem onkomiR hem de tümör supresör olarak işlev gören bir miRNA olarak tanımlanmıştır.

Yapılan bir çalışmada bir tümör supresör gibi görev yaparak, hücre proliferasyonunu ve tümör büyümesini in vitro ve in vivo azalttığı gösterilmiştir (169). MiR194 doğrudan PDK1/AKT2/XIAP 3'UTR'yi hedeflediği ve AKT2 yolu aktivasyonunu engelleyerek hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (167). Başka bir çalışmada miR194, MAP4K4/c-Jun/MDM2 sinyal yolağını regüle ederek KRK hücre hatlarında hem in vitro hem de in vivo olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini gösterilmiştir (356). miR194'ün downregülasyonunun KRK'de kötü prognoz ile ilişkili olduğu saptandığı bir çalışmada KRK dokularında FoxM1 ekspresyonunun miR-194-5p ekspresyonu ile negatif korelasyon gösterdiği, FoxM1'in, miR-194-5p'nin KRK hücrelerinin invazyon ve metastaz ile EMT sürecindeki inhibisyon etkisini tersine çevirebileceği gösterilmiştir (357).

Öte yandan, başka bir çalışmaya göre, miR-194'ün KRK progresyonunda bir tümör promotörü olarak görev yaptığı düşünülmektedir. Bu çalışmada, miR-194 overekspresyonu ile MMP2, MMP9, Vimentin ve E-Cadherini hedeflenerek EMT'nin indüklendiği gösterilmiştir (211).

Bu tez çalışmasında, Ki-MKH eksozomu uygulanan HT29 hücrelerinde miR194 ekspresyonunun, eksozom uygulanmayanlara göre azalmış olduğu gözlenmiştir. miR194 downregülasyonu, mevcut literatür ile birlikte değerlendirildiğinde uyumlu ya da uyumsuz olarak değerlendirilebilir. Fakat bu değerlendirme yapılırken fonksiyonel deneylerimizin sonuçları da dikkate alındığında MKH eksozomlarının HT29 hücrelerinde invazyon/metastaz/EMT profilinde artış sağladığı ve bu artışa miR194 ekspresyon değişikliğinin de doğrudan ya da dolaylı olarak katılım sağladığı söylenebilir. Ancak miR194'ün mevcut senaryo içindeki etkisini net bir şekilde yorumlayabilmek için ek deneylere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasında incelenen son miRNA olan miR-126'nın çalışmalarda bir tümör supresör olarak işlev gördüğü saptanmıştır. Buna göre, metastatik KRK'deki ifadesi, lokalize KRK'deki ifadesinden farklı olduğu gözlenmiş olup metastatik dokuda downregüledir (150). Bu nedenle serumda erken evre karaciğer metastazının klinik teşhisi için yeni bir imza olarak önerilmektedir (258). miR-126 ekspresyonu, farklı histolojik alt tiplerde, kanser evreleri ve metastaz durumu ile değişkenlik göstermiş olup, mikrosatellit instabilite (MSI) ve hasta sağkalımı ile de korele olduğu bulunmuştur (358).

KRK'de miR126'nın overekspresyonu CXCR4 ekspresyonunun negatif regülasyonu ile tümör hücresi invazyon ve metastaz kapasitesini azalttığı bulunmuştur (199). Başka bir çalışmada kolon kanserinde miR-126'nın, hücre proliferasyonu ve metastazı inhibe etmek için RhoA/Rho ile ilişkili protein kinaz (ROCK) sinyal yolunu baskıladığı gösterilmiştir (150). Bir diğer çalışmada miR126'nın KRK hücrelerinin proliferasyonu, invazyon ve metastazı inhibe ettiği, ancak in vitro hücre apoptozunda etkili olmadığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada endojen miR-126 ve eksojen miR-126 mimiklerinin IRS-1 ekspresyonunu engelleyebileceği saptanmıştır. Ayrıca miR-126'nın downregülasyonunun IRS-1'i hedefleyerek AKT ve ERK1/2 aktivasyonunu destekleyebileceği de gösterilmiştir (261). miR-126, BCL-2 ve p53 gibi birçok yolu hedefleyerek KRK'de potansiyel bir tümör baskılayıcı olarak hareket etmektedir.

miR-126'nın upregülasyonu ile hücre apoptozu hızlandığı, IRS1 , SLC7A5 ve TOM1 genlerini hedefleyerek kolon kanseri büyümesini ve migrasyonu baskıladığı ve kolon kanseri hücrelerinin oksaliplatin gibi kemoterapi ilaçlarına duyarlılığı artırdığı saptanmıştır (359). miR-126'nın upregülasyonu ile LC3-I/II transformasyonu ve p62 degradasyonu ile birlikte hücre otofajisinde artış ve apoptoz indüksiyonu gözlenmiştir. HCT116 hücreleri miR-126 mimik ile transfekte edildiklerinde, mTOR ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. Ek olarak, mTOR'un overekspresyonu, miR-126'yı otofaji ve apoptoz üzerinde etkisiz hale getirmiştir (360).

Benzer şekilde başka bir çalışmada, HCT116, SW620 ve HT-29 gibi metastastatik kolorektal kanserlerde miR-126 ekspresyonu diğer hücre hatlarına göre çok daha düşük olduğu görülmüş ve miR-126'nın HT-29 hücre proliferasyonunu, hücre döngüsü ilerlemesini ve invazyon yeteneğini RhoA/ROCK sinyal yolunu bloke ederek inhibe etttiği gösterilmiştir (150).

Çalışmamızda, Ki-MKH eksozomu uygulanan HT29 hücrelerinde miR126 ekspresyonunun, eksozom uygulanmayanlara göre azalmış olduğu gözlenmiştir. miR126 downregülasyonu,

mevcut literatür ile birlikte değerlendirildiğinde uyumlu olarak değerlendirilebilir. MKH eksozomu uygulaması sonrası miR126 downregülasyonu -bir tümör süpresör miRNA'sının kaybı olarak- değerlendirdiğinde fonksiyonel deneylerimizin sonuçları da uyumluluk içindedir ve MKH eksozomlarının HT29 hücrelerinde invazyon/metastaz/EMT profilinde artış sağladığı ve bu artışa miR126 ekspresyon değişikliğinin de doğrudan ya da dolaylı olarak katılım sağladığı söylenebilir. Bu aşamada incelediğimiz miRNA'lar içinde ekspresyonu en düşük miRNA olan miR126'ün mevcut senaryo içindeki etkisini net bir şekilde yorumlayabilmek için miR126 mimikleri kullanılarak HT29 hücrelerinde miR126 overekspresе edilmiştir. miR126 overekspresе HT29 hücrelerinde, overekspresе olmayan HT29 hücrelerine göre kıyaslandığında, hücrelerin migrasyon yeteneklerinin azaldığı (yara iyileşmesi deneyi ile) ve MET sürecinin göstergesi olan kadherin değişimi ile E-cadherin ekspresyon artışı saptanmıştır. Elde edilen bu veriler, miR126'nın upregülasyonun HT29 hücrelerinde invazyon/metastaz/EMT profilinde azalma sağladığı, dolayısıyla çalıştığımız hücre grubunda miR126'nın tümör supresör olarak işlev gösterdiğini de doğrular niteliktedir.

6.2. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, insan Ki-MKH eksozomlarının HT29 kolorektal kanser hücreleri üzerindeki etkisi, invazyon/metastaz/EMT bağlamında incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda; insan Ki-MKH eksozomlarının KRK'de invazyon ve metastazı artırdığı, Ncadherin ve Slug ekspresyonlarını artırarak EMT sürecine destek sağladığı ve EMT ile ilişkisi metaanalizle ve literatür desteği ile gösterilen miRNA'ların ekspresyon seviyelerini değiştirdiği gösterilmiştir. Ek olarak, incelenen miRNA'lardan biri olan ve tümör süpresör gibi davrandığı düşünülen miR126, HT29 hücrelerinde miR126 mimikleri ile transfekte edilerek overekspresе edildiğinde, MET sürecine destek sağlayacak şekilde E-cadherin ekspresyonlarını artırdığı ve hücrelerin migrasyon yeteneğinin azalttığı saptanmıştır.

Son yıllarda birçok araştırmacı, MKH eksozomlarının in vivo ve in vitro olarak kanser hücresi ile etkileşiminde giderek daha önemli bir rol oynadığını göstermiştir. MKH'den alıcı hücrelere birçok molekül türünü transfer etmek için taşıyıcı olabilirler ve ardından kanser hücresinde bir dizi etkiyi aktive edebilirler. Kanser gelişimini baskılamanın ya da desteklemenin ana yolu olarak, MKH eksozomlarının lökomonosit proliferasyonu gibi bağışıklığı etkileyebileceği durumlarla benzer şekilde kanser tedavisi için de gelecekte iyi birer araçolacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte, kanser hücreleri arasında MKH eksozomlarının potansiyeli

daha derinlemesine araştırılarak gelecekte yüksek güvenlikli, etkili tedaviler oluşturulacağı umulmaktadır.

Elde edilen veriler ışığında; bu çalışma ile halen literatürde tartışmalı görünen MKH eksozomları kanseri nasıl etkiliyor? sorusunun cevabı için in vitro çalışmalarla küçük bir pencere açılmıştır. Bir sonraki aşamada ise bu eksozomların hangi kargoları taşıdığı, bu kargolar ile hangi yolakların/moleküllerin aktivasyonu ile EMT sürecinin indüklendiği sorgulanacaktır.

KAYNAKLAR

1. TÜİK Kurumsal [Internet]. [cited 2021 Apr 7]. Available from: https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri-2019-33710

2. Global Cancer Observatory [Internet]. [cited 2021 Apr 7]. Available from: https://gco.iarc.fr/

3. World Health Organization: WHO [Internet]. [cited 2020 Nov 3]. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer

4. Klaunig JE. Carcinogenesis. An Introduction to Interdisciplinary Toxicology [Internet]. 2020 [cited 2021 Dec 1];97–110. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128136027000089

5. Michor F, Iwasa Y, Lengauer C, Nowak MA. Dynamics of colorectal cancer. Seminars in cancer biology [Internet]. 2005 Dec [cited 2021 Dec 1];15(6):484–93. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16055342/

6. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and Familial Colon Cancer. Gastroenterology [Internet]. 2010 [cited 2021 Dec 1];138(6):2044. Available from: /pmc/articles/PMC3057468/

7. Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. Annals of Internal Medicine. 2002 Oct 1;137(7):603–12.

8. Chung TP, Fleshman JW. The Genetics of Sporadic Colon Cancer. Seminars in Colon and Rectal Surgery. 2004 Sep 1;15(3):128–35.

9. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 1990 Jun 1;61(5):759–67.

10. Bloushtain-Qimron N, Yao J, Shipitsin M, Maruyama R, Polyak K. Epigenetic patterns of embryonic and adult stem cells. Cell cycle (Georgetown, Tex) [Internet]. 2009 Mar

15 [cited 2021 Dec 2];8(6):809–17. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19229128/

11. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. Stem Cell Research & Therapy [Internet]. 2019 Feb 26 [cited 2021 Dec 2];10(1). Available from: /pmc/articles/PMC6390367/

12. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. Experimental Hematology. 1974;2(2):83–92.

13. Dominici M, le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006 Aug;8(4):315–7.

14. Bang OY. Autologous Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients with Stroke. In: Cell Therapy for Brain Injury [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [cited 2017 May 30]. p. 21–35. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-15063-5_3

15. Phinney DG, Pittenger MF. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. STEM CELLS [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2021 Mar 29];35(4):851–8. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/stem.2575

16. Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: Immune evasive, not immune privileged. Vol. 32, Nature Biotechnology. Nature Publishing Group; 2014. p. 252–60.

17. Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function [Internet]. Vol. 7, Stem Cell Research and Therapy. BioMed Central Ltd.; 2016 [cited 2020 Aug 11]. Available from: /pmc/articles/PMC5007684/?report=abstract

18. Murray IR, West CC, Hardy WR, James AW, Park TS, Nguyen A, et al. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels [Internet]. Vol. 71, Cellular and Molecular Life Sciences. Birkhauser Verlag AG; 2014 [cited 2020 Aug 11]. p. 1353–74. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24158496/

19. Kupcova Skalnikova H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome [Internet]. Vol. 95, Biochimie. Biochimie; 2013 [cited 2021 Mar 30]. p. 2196–211. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23880644/

20. Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. Hepatology [Internet]. 2004 Dec [cited 2021 Mar 30];40(6):1304–11. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15565662/

21. Wang L, Wang X, Wang L, Chiu JD, van de Ven G, Gaarde WA, et al. Hepatic vascular endothelial growth factor regulates recruitment of rat liver sinusoidal endothelial cell progenitor cells. Gastroenterology [Internet]. 2012 [cited 2021 Mar 30];143(6). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22902870/

22. Kim SU, Oh HJ, Wanless IR, Lee S, Han KH, Park YN. The Laennec staging system for histological sub-classification of cirrhosis is useful for stratification of prognosis in patients with liver cirrhosis. Journal of Hepatology [Internet]. 2012 Sep [cited 2021 Mar 30];57(3):556–63. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22617153/

23. Wu Y, Zhao RCH, Tredget EE. Concise review: Bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration [Internet]. Vol. 28, Stem Cells. Stem Cells; 2010 [cited 2021 Mar 30]. p. 905–15. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20474078/

24. Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, Wang M, Lahm T, Meldrum DR. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-α, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NFκB- but not JNK-dependent mechanism. American Journal of Physiology - Cell Physiology [Internet]. 2008 Mar [cited 2021 Mar 30];294(3). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18234850/

25. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators [Internet]. Vol. 98, Journal of Cellular Biochemistry. J Cell Biochem; 2006 [cited 2021 Mar 30]. p. 1076–84. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16619257/

26. Plotnikov EY, Khryapenkova TG, Vasileva AK, Marey M v., Galkina SI, Isaev NK, et al. Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. Journal of Cellular and Molecular Medicine [Internet]. 2008 Sep [cited 2020 Aug 11];12(5A):1622–31. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18088382/

27. Liu K, Ji K, Guo L, Wu W, Lu H, Shan P, et al. Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. Microvascular Research [Internet]. 2014 [cited 2020 Aug 11];92:10–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24486322/

28. Can A. Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımı. Ankara: Akademisyen Tıp Kitabevi; 2014. 715.

29. Lu K, Li H yin, Yang K, Wu J long, Cai X wei, Zhou Y, et al. Exosomes as potential alternatives to stem cell therapy for intervertebral disc degeneration: in-vitro study on exosomes in interaction of nucleus pulposus cells and bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cell Research and Therapy [Internet]. 2017 May 10 [cited 2021 Nov 8];8(1):1–11. Available from: https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-017-0563-9

30. Davidson SM, Takov K, Yellon DM. Exosomes and Cardiovascular Protection. Cardiovascular Drugs and Therapy [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2021 Nov 8];31(1):77–86. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s10557-016-6698-6

31. Rong X, Liu J, Yao X, Jiang T, Wang Y, Xie F. Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate liver fibrosis through the Wnt/β-catenin pathway. Stem Cell Research and Therapy [Internet]. 2019 Mar 18 [cited 2021 Nov 8];10(1):1–11. Available from: https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-019-1204-2

32. Kordelas L, Rebmann V, Ludwig AK, Radtke S, Ruesing J, Doeppner TR, et al. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. Leukemia 2014 28:4 [Internet]. 2014 Apr 9 [cited 2021 Nov 8];28(4):970–3. Available from: https://www.nature.com/articles/leu201441

33. Álvarez-Viejo M. Mesenchymal stem cells from different sources and their derived exosomes: A pre-clinical perspective [Internet]. Vol. 12, World Journal of Stem Cells. Baishideng Publishing Group Co; 2020 [cited 2021 Mar 26]. p. 100–9. Available from: /pmc/articles/PMC7062037/

34. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, et al. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. International Journal of Cancer [Internet]. 2010 May 6 [cited 2017 May 30];127(10):2323–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473928

35. Ramasamy R, Lam EW-F, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. Leukemia [Internet]. 2007 Feb 14 [cited 2017 May 30];21(2):304–10. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.leu.2404489

36. Liang W, Chen X, Zhang S, Fang J, Chen M, Xu Y, et al. Mesenchymal stem cells as a double-edged sword in tumor growth: focusing on MSC-derived cytokines [Internet]. Vol. 26, Cellular and Molecular Biology Letters. BioMed Central Ltd; 2021 [cited 2021 Mar 29]. Available from: /pmc/articles/PMC7818947/

37. Chen HL, Li JJ, Jiang F, Shi WJ, Chang GY. MicroRNA-4461 derived from bone marrow mesenchymal stem cell exosomes inhibits tumorigenesis by downregulating COPB2 expression in colorectal cancer. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 2020 Feb 1;84(2):338–46.

38. Xu Y, Shen L, Li F, Yang J, Wan X, Ouyang M. microRNA-16-5p-containing exosomes derived from bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit proliferation, migration, and invasion, while promoting apoptosis of colorectal cancer cells by downregulating ITGA2. Journal of Cellular Physiology. 2019 Nov 1;234(11):21380–94.

39. Bliss SA, Sinha G, Sandiford OA, Williams LM, Engelberth DJ, Guiro K, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulate cycling quiescence and early breast cancer dormancy in bone marrow. Cancer Research [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2020 Nov 5];76(19):5832–44. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27569215/

40. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, et al. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. International Journal of Cancer [Internet]. 2010 May 6 [cited 2017 Jun 9];127(10):2323–33. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.25440

41. Kostouros A, Koliarakis I, Natsis K, Spandidos DA, Tsatsakis A, Tsiaoussis J. Large intestine embryogenesis: Molecular pathways and related disorders (Review). International Journal of Molecular Medicine [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Nov 24];46(1):27–57. Available from: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2020.4583/abstract

42. Chen D, Liu S, Ma H, Liang X, Ma H, Yan X, et al. Paracrine factors from adipose-mesenchymal stem cells enhance metastatic capacity through Wnt signaling pathway in a colon cancer cell co-culture model. Cancer Cell International [Internet]. 2015 Dec 18 [cited 2017 May 30];15(1):42. Available from: http://www.cancerci.com/content/15/1/42

43. Wang J, Wang Y, Wang S, Cai J, Shi J, Sui X, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-secreted IL-8 promotes the angiogenesis and growth of colorectal cancer. Oncotarget [Internet]. 2015 Dec 15 [cited 2017 May 30];6(40):42825–37. Available from: http://www.oncotarget.com/abstract/5739

44. Takigawa H, Kitadai Y, Shinagawa K, Yuge R, Higashi Y, Tanaka S, et al. Mesenchymal Stem Cells Induce Epithelial to Mesenchymal Transition in Colon Cancer Cells through Direct Cell-to-Cell Contact. Neoplasia (New York, NY) [Internet]. 2017 May [cited 2017 Jun 9];19(5):429–38. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1476558617300210

45. Schorey JS, Bhatnagar S. Exosome Function: From Tumor Immunology to Pathogen Biology. Traffic [Internet]. 2008 Jun [cited 2017 May 30];9(6):871–81. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18331451

46. Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, Azab AK, Tai Y-T, Reagan M, et al. BM mesenchymal stromal cell–derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. Journal of

Clinical Investigation [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2017 May 30];123(4):1542–55. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23454749

47. Reza AMMT, Choi Y-J, Yasuda H, Kim J-H. 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 [Internet]. 2016 Dec 8 [cited 2017 May 30];6(1):38498. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27929108

48. Lin R, Wang S, Zhao RC. Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote migration through Wnt signaling pathway in a breast cancer cell model. Molecular and cellular biochemistry [Internet]. 2013 Nov 29 [cited 2017 Jun 9];383(1–2):13–20. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s11010-013-1746-z

49. Zhu W, Huang L, Li Y, Zhang X, Gu J, Yan Y, et al. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo. Cancer Letters [Internet]. 2012 Feb 1 [cited 2019 Jan 31];315(1):28–37. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22055459

50. Ji R, Zhang B, Zhang X, Xue J, Yuan X, Yan Y, et al. Exosomes derived from human mesenchymal stem cells confer drug resistance in gastric cancer. Cell Cycle [Internet]. 2015 Aug 3 [cited 2018 Jun 26];14(15):2473–83. Available from: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15384101.2015.1005530

51. Li H, Li F. Exosomes from BM-MSCs increase the population of CSCs via transfer of miR-142-3p. British Journal of Cancer [Internet]. 2018 Sep 17 [cited 2019 Jan 31];119(6):744–55. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30220706

52. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. British journal of haematology. 1967;13(3):269–88.

53. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. Vol. 4, Journal of Extracellular Vesicles. Co-Action Publishing; 2015. p. 1–60.

54. Ogorevc E, Kralj-Iglic V, Veranic P. The role of extracellular vesicles in phenotypic cancer transformation [Internet]. Vol. 47, Radiology and Oncology. Association of Radiology and Oncology; 2013 [cited 2020 Nov 5]. p. 197–205. Available from: /pmc/articles/PMC3794874/?report=abstract

55. Zhou J, Tan X, Tan Y, Li Q, Ma J, Wang G. Mesenchymal stem cell derived exosomes in cancer progression, metastasis and drug delivery: A comprehensive review [Internet]. Vol. 9, Journal of Cancer. Ivyspring International Publisher; 2018 [cited 2020 Nov 3]. p. 3129–37. Available from: /pmc/articles/PMC6134817/?report=abstract

56. Nagarajah S. Exosome Secretion — More Than Simple Waste Disposal? Implications for Physiology, Diagnostics and Therapeutics. Vol. 5, Journal of Circulating Biomarkers. SAGE Publications Ltd; 2016.

57. van der Pol E, Boing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. Pharmacological Reviews [Internet]. 2012 Jul 1 [cited 2017 May 30];64(3):676–705. Available from: http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/pr.112.005983

58. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. Journal of neuro-oncology [Internet]. 2013 May 2 [cited 2017 May 30];113(1):1–11. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s11060-013-1084-8

59. Hessvik NP, Øverbye A, Brech A, Torgersen ML, Jakobsen IS, Sandvig K, et al. PIKfyve inhibition increases exosome release and induces secretory autophagy. Cellular and Molecular Life Sciences. 2016 Jul 20;73(24):4717–37.

60. Baixauli F, López-Otín C, Mittelbrunn M. Exosomes and autophagy: Coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. Frontiers in Immunology. 2014;5(AUG).

61. Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. Vol. 30, Cancer Cell. Cell Press; 2016. p. 836–48.

62. Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. Cancer and Metastasis Reviews [Internet]. 2013 Dec 25 [cited 2017 May 30];32(3–4):623–42. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10555-013-9441-9

63. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2016 Feb 23;113(8):E968–77.

64. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. Vol. 75, Cellular and Molecular Life Sciences. Birkhauser Verlag AG; 2018. p. 193–208.

65. Hassanzadeh A, Rahman HS, Markov A, Endjun JJ, Zekiy AO, Chartrand MS, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes in regenerative medicine and cancer; overview of development, challenges, and opportunities. Stem Cell Research & Therapy 2021 12:1 [Internet]. 2021 May 21 [cited 2021 Aug 17];12(1):1–22. Available from: https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-021-02378-7

66. Camussi G, Deregibus M-C, Bruno S, Grange C, Fonsato V, Tetta C. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. American Journal of Cancer Research [Internet]. 2011 [cited 2021 Aug 17];1(1):98. Available from: /pmc/articles/PMC3180104/

67. Beach A, Zhang HG, Ratajczak MZ, Kakar SS. Exosomes: An overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer [Internet]. Vol. 7, Journal of Ovarian Research. BioMed Central; 2014 [cited 2020 Nov 5]. p. 14. Available from: /pmc/articles/PMC3932023/?report=abstract

68. Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. Journal of Cell Science [Internet]. 2013 Dec 15 [cited 2021 Mar 29];126(24):5553–65. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24105262/

69. Tan SS, Yin Y, Lee T, Lai RC, Yeo RWY, Zhang B, et al. Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane. Journal of Extracellular Vesicles [Internet]. 2013 Jan [cited 2021 Mar 29];2(1):22614. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24371518/

70. Rani S, Ryan AE, Griffin MD, Ritter T. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Toward cell-free therapeutic applications [Internet]. Vol. 23, Molecular Therapy. Nature Publishing Group; 2015 [cited 2021 Mar 29]. p. 812–23. Available from: /pmc/articles/PMC4427881/

71. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NSK, Choo A, Chen TS, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. Stem Cell Research. 2010 May 1;4(3):214–22.

72. Wu P, Zhang B, Shi H, Qian H, Xu W. MSC-exosome: A novel cell-free therapy for cutaneous regeneration. Vol. 20, Cytotherapy. Elsevier B.V.; 2018. p. 291–301.

73. Muralikumar M, Manoj Jain S, Ganesan H, Duttaroy AK, Pathak S, Banerjee A. Current understanding of the mesenchymal stem cell-derived exosomes in cancer and aging. Biotechnology Reports. 2021 Sep 1;31:e00658.

74. Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, Ahadi AM, Molaei F, Alahari SK. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. Molecular Cancer 2019 18:1 [Internet]. 2019 Apr 2 [cited 2021 Nov 8];18(1):1–14. Available from: https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-019-0991-5

75. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, et al. Endothelial progenitor cell - Derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. Blood. 2007 Oct 1;110(7):2440–8.

76. Zhu YG, Feng XM, Abbott J, Fang XH, Hao Q, Monsel A, et al. Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of Escherichia coli endotoxin-induced acute lung injury in mice. Stem Cells [Internet]. 2014 Jan [cited 2021 Apr 1];32(1):116–25. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23939814/

77. Nakamura Y, Miyaki S, Ishitobi H, Matsuyama S, Nakasa T, Kamei N, et al. Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration. FEBS Letters [Internet]. 2015 May 8 [cited 2021 Mar 31];589(11):1257–65. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25862500/

78. Gong M, Yu B, Wang J, Wang Y, Liu M, Paul C, et al. Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis. Oncotarget [Internet]. 2017 [cited 2020 Nov 5];8(28):45200–12. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28423355/

79. Wu J, Qu Z, Fei Z-W, Wu J-H, Jiang C-P. Role of stem cell-derived exosomes in cancer. Oncology Letters [Internet]. 2017 May 1 [cited 2021 Aug 17];13(5):2855. Available from: /pmc/articles/PMC5431232/

80. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F, III. Concise Review: Dissecting a Discrepancy in the Literature: Do Mesenchymal Stem Cells Support or Suppress Tumor Growth? Stem Cells (Dayton, Ohio) [Internet]. 2011 Jan [cited 2021 Aug 17];29(1):11. Available from: /pmc/articles/PMC3059412/

81. AI C, AH S, JA N, J W. Involvement of mesenchymal stem cells in cancer progression and metastases. Current cancer drug targets [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2021 Aug 18];15(2):88–98. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25619387/

82. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. Nature [Internet]. 2007 Oct 4 [cited 2017 May 30];449(7162):557–63. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17914389

83. de Boeck A, Pauwels P, Hensen K, Rummens J-L, Westbroek W, Hendrix A, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through paracrine neuregulin 1/HER3 signalling. Gut [Internet]. 2013 Apr [cited 2017 May 30];62(4):550–60. Available from: http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2011-301393

84. Lin R, Wang S, Zhao RC. Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote migration through Wnt signaling pathway in a breast cancer cell model. Molecular and Cellular Biochemistry [Internet]. 2013 Nov 29 [cited 2017 May 30];383(1–2):13–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23812844

85. Mao J, Liang Z, Zhang B, Yang H, Li X, Fu H, et al. UBR2 Enriched in p53 Deficient Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Exosome Promoted Gastric Cancer Progression via Wnt/β-Catenin Pathway. STEM CELLS [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2020 Nov 3];35(11):2267–79. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/stem.2702

86. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, et al. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. International Journal of Cancer [Internet]. 2010 May 6 [cited 2017 May 30];127(10):2323–33. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.25440

87. Lee HK, Finniss S, Cazacu S, Bucris E, Ziv-Av A, Xiang C, et al. Mesenchymal stem cells deliver synthetic microRNA mimics to glioma cells and glioma stem cells and inhibit their cell migration and self-renewal. Oncotarget [Internet]. 2013 [cited 2020 Nov 5];4(2):346–61. Available from: /pmc/articles/PMC3712579/?report=abstract

88. AB M, W X, R C, HP S, PC H, AM C-J. An osteosarcoma zebrafish model implicates Mmp-19 and Ets-1 as well as reduced host immune response in angiogenesis and migration. The Journal of pathology [Internet]. 2012 Jun [cited 2021 Aug 18];227(2):245–53. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22297719/

89. S G, I S, PJ D, EW L, F D. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. Blood [Internet]. 2005 Apr 1 [cited 2021 Aug 18];105(7):2821–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15591115/

90. SA P, JR M, SJ G, KE C, M B, P R. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) [Internet]. 2010 May 15 [cited 2021 Aug 18];184(10):5885–94. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20382885/

91. S C, F C, M R. Mesenchymal stem cell-tumor cell cooperation in breast cancer vasculogenesis. Molecular medicine reports [Internet]. 2012 May [cited 2021 Aug 18];5(5):1175–80. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22367291/

92. Liu Y, Han Z, Zhang S, Jing Y, Bu X, Wang C, et al. Effects of Inflammatory Factors on Mesenchymal Stem Cells and Their Role in the Promotion of Tumor Angiogenesis in Colon Cancer. The Journal of Biological Chemistry [Internet]. 2011 Jul 15 [cited 2021 Aug 20];286(28):25007. Available from: /pmc/articles/PMC3137074/

93. C S, J R, L S, M K, K A, M M, et al. Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis. PloS one [Internet]. 2013 Jul 8 [cited 2021 Aug 18];8(7). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23861904/

94. T L, S B, C T, N K, M P, G C. Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential. Cell communication and signaling : CCS [Internet]. 2014 Apr 11 [cited 2021 Aug 18];12(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24725987/

95. Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregibus MC, et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. Cancer Research [Internet]. 2011 Aug 1 [cited 2020 Nov 3];71(15):5346–56. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21670082/

96. Lee J-K, Park S-R, Jung B-K, Jeon Y-K, Lee Y-S, Kim M-K, et al. Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Suppress Angiogenesis by Down-Regulating VEGF Expression in Breast Cancer Cells. Shi S, editor. PLoS ONE [Internet]. 2013 Dec 31 [cited 2019 Dec 19];8(12):e84256. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0084256

97. E D, MH R, M F, X A, N J, GR de P, et al. Hypoxia-microRNA-16 downregulation induces VEGF expression in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive anaplastic large-cell lymphomas. Leukemia [Internet]. 2011 Dec [cited 2021 Aug 20];25(12):1882–90. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21778999/

98. Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Penalva LOF, Sandhu D, Fernández-Hernando C, Suárez Y. MicroRNA-16 and MicroRNA-424 regulate cell-autonomous angiogenic functions in endothelial cells via targeting VEGFR2 and FGFR1. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology [Internet]. 2011 Nov [cited 2021 Aug 20];31(11):2595. Available from: /pmc/articles/PMC3226744/

99. Vianello F, Villanova F, Tisato V, Lymperi S, Ho KK, Gomes AR, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis. Haematologica [Internet]. 2010 [cited 2021 Nov 8];95(7):1081. Available from: /pmc/articles/PMC2895031/

100. Huang M, Zhang D, Wu JY, Xing K, Yeo E, Li C, et al. Wnt-mediated endothelial transformation into mesenchymal stem cell-like cells induces chemoresistance in glioblastoma. Science translational medicine [Internet]. 2020 Feb 26 [cited 2021 Nov 8];12(532). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32102932/

101. Han J, Qu H, Han M, Ding Y, Xie M, Hu J, et al. MSC-induced lncRNA AGAP2-AS1 promotes stemness and trastuzumab resistance through regulating CPT1 expression and fatty acid oxidation in breast cancer. Oncogene. 2021 Jan 28;40(4):833–47.

102. Wu H, Liu B, Chen Z, Li G, Zhang Z. MSC-induced lncRNA HCP5 drove fatty acid oxidation through miR-3619-5p/AMPK/PGC1α/CEBPB axis to promote stemness and chemo-resistance of gastric cancer. Cell Death and Disease. 2020 Apr 1;11(4).

103. He W, Liang B, Wang C, Li S, Zhao Y, Huang Q, et al. MSC-regulated lncRNA MACC1-AS1 promotes stemness and chemoresistance through fatty acid oxidation in gastric cancer. Oncogene [Internet]. 2019 Jun 6 [cited 2021 Nov 8];38(23):4637–54. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30742067/

104. E B, D M, T I, A P, M I, D M, et al. Glioma-associated stem cells: a novel class of tumor-supporting cells able to predict prognosis of human low-grade gliomas. Stem cells (Dayton, Ohio) [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 17];32(5):1239–53. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24375787/

105. Nieto MA, Huang RYYJ, Jackson RAA, Thiery JPP. EMT: 2016. Cell. 2016 Jun 30;166(1):21–45.

106. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. Cell. 2009 Nov 25;139(5):871–90.

107. Carver EA, Jiang R, Lan Y, Oram KF, Gridley T. The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. Molecular and cellular biology [Internet]. 2001 Dec [cited 2021 Nov 19];21(23):8184–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11689706/

108. Jolly MK, Boareto M, Huang B, Jia D, Lu M, Onuchic JN, et al. Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. Frontiers in oncology [Internet]. 2015 [cited 2021 Nov 19];5(JUN). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26258068/

109. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. Development (Cambridge, England) [Internet]. 2005 Jul [cited 2021 Nov 19];132(14):3151–61. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15983400/

110. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. Cell [Internet]. 2004 Jun 25 [cited 2021 Nov 19];117(7):927–39. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15210113/

111. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. Developmental cell [Internet]. 2008 Jun 10 [cited 2021 Nov 19];14(6):818–29. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18539112/

112. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. Journal of mammary gland biology and neoplasia [Internet]. 2010 Jun [cited 2021 Nov 19];15(2):117–34. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20490631/

113. Liu Y, El-Naggar S, Darling DS, Higashi Y, Dean DC. Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. Development (Cambridge, England) [Internet]. 2008 Feb [cited 2021 Nov 19];135(3):579–88. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18192284/

114. Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. Nature Reviews Cancer 2018 18:2 [Internet]. 2018 Jan 12 [cited 2021 Nov 19];18(2):128–34. Available from: https://www.nature.com/articles/nrc.2017.118

115. Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. Nature reviews Clinical oncology [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2021 Nov 19];14(10):611–29. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28397828/

116. Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. Nature cell biology [Internet]. 2014 [cited 2021 Nov 19];16(6):488–94. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24875735/

117. Tran HD, Luitel K, Kim M, Zhang K, Longmore GD, Tran DD. Transient SNAIL1 Expression Is Necessary for Metastatic Competence in Breast Cancer. Cancer Research [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2021 Nov 19];74(21):6330–40. Available from: https://cancerres.aacrjournals.org/content/74/21/6330

118. Krebs AM, Mitschke J, Losada ML, Schmalhofer O, Boerries M, Busch H, et al. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. Nature cell biology [Internet]. 2017 May 1 [cited 2021 Nov 19];19(5):518–29. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28414315/

119. Denecker G, Vandamme N, Akay Ö, Koludrovic D, Taminau J, Lemeire K, et al. Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. Cell death and differentiation [Internet]. 2014 [cited 2021 Nov 19];21(8):1250–61. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24769727/

120. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell [Internet]. 1993 Dec 3 [cited 2021 Dec 3];75(5):843–54. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8252621/

121. Tan W, Liu B, Qu S, Liang G, Luo W, Gong C. MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy (Review). Oncology Letters [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2021 Dec 3];15(3):2735–42. Available from: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.7638/abstract

122. Yong SL, Dutta A. MicroRNAs in cancer. Annual review of pathology [Internet]. 2009 Feb [cited 2021 Dec 2];4:199. Available from: /pmc/articles/PMC2769253/

123. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. Signal Transduction and Targeted Therapy 2016 1:1 [Internet]. 2016 Jan 28 [cited 2021 Dec 3];1(1):1–9. Available from: https://www.nature.com/articles/sigtrans20154

124. MacFarlane L-A, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. Current Genomics [Internet]. 2010 Dec 19 [cited 2021 Dec 3];11(7):537. Available from: /pmc/articles/PMC3048316/

125. Zhang N, Hu X, Du Y, Du J. The role of miRNAs in colorectal cancer progression and chemoradiotherapy. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2021 Feb 1;134:111099.

126. A M, H M, A S, J S. MicroRNAs: Potential candidates for diagnosis and treatment of colorectal cancer. Journal of cellular physiology [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2021 Aug 4];233(2):901–13. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28092102/

127. Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. The Journal of allergy and clinical immunology [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2021 Aug 4];141(4):1202. Available from: /pmc/articles/PMC5889965/

128. LL W, M Z. miR-582-5p is a potential prognostic marker in human non-small cell lung cancer and functions as a tumor suppressor by targeting MAP3K2. European review for medical and pharmacological sciences [Internet]. 2018 [cited 2021 Aug 3];22(22):7760–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30536321/

129. Lan H, Lu H, Wang X, Jin H. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: Opportunities and challenges. BioMed Research International. 2015;2015.

130. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. Cells [Internet]. 2020 Jan 23 [cited 2021 Aug 4];9(2). Available from: /pmc/articles/PMC7072450/

131. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [Internet]. 2006 Feb 14 [cited 2021 Dec 3];103(7):2257–61. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16461460/

132. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. Nature Reviews Cancer 2006 6:4 [Internet]. 2006 Apr [cited 2021 Dec 5];6(4):259–69. Available from: https://www.nature.com/articles/nrc1840

133. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [Internet]. 2002 Nov 26 [cited 2021 Dec 2];99(24):15524–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12434020/

134. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. Cancer research [Internet]. 2004 Jun 1 [cited 2021 Dec 3];64(11):3753–6. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15172979/

135. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. Cancer research [Internet]. 2005 Jul 15 [cited 2021 Dec 3];65(14):6029–33. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16024602/

136. Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA, Jr., et al. The colorectal microRNAome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States

of America [Internet]. 2006 Mar 7 [cited 2021 Aug 4];103(10):3687. Available from: /pmc/articles/PMC1450142/

137. Journal AI, Xie Y, Zhao J, Liang Y, Chen M, Luo Y, et al. MicroRNA-10b controls the metastasis and proliferation of colorectal cancer cells by regulating Krüppel-like factor 4. Taylor & Francis [Internet]. 2019 Dec 4 [cited 2021 Nov 9];47(1):1722–9. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/21691401.2019.1606006

138. Longqiu Y, Pengcheng L, Xuejie F, Peng Z. A miRNAs panel promotes the proliferation and invasion of colorectal cancer cells by targeting GABBR1. Cancer Medicine [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2021 Nov 9];5(8):2022. Available from: /pmc/articles/PMC4884921/

139. Huang C, Liu J, Xu L, Hu W, Wang J, Wang M, et al. MicroRNA-17 promotes cell proliferation and migration in human colorectal cancer by downregulating SIK1. Cancer Management and Research. 2019;11:3521–34.

140. Zhu G fang, Xu Y wei, Li J, Niu H lin, Ma W xia, Xu J, et al. Mir20a/106a-WTX axis regulates RhoGDIa/CDC42 signaling and colon cancer progression. Nature Communications 2019 10:1 [Internet]. 2019 Jan 10 [cited 2021 Nov 9];10(1):1–14. Available from: https://www.nature.com/articles/s41467-018-07998-x

141. Sun L-H, Tian D, Yang Z-C, Li J-L. Exosomal miR-21 promotes proliferation, invasion and therapy resistance of colon adenocarcinoma cells through its target PDCD4. Scientific Reports 2020 10:1 [Internet]. 2020 May 19 [cited 2021 Aug 6];10(1):1–8. Available from: https://www.nature.com/articles/s41598-020-65207-6

142. Y B, Z C, Y G, Y F, Z L, W H, et al. Tumor suppressor microRNA-27a in colorectal carcinogenesis and progression by targeting SGPP1 and Smad2. PloS one [Internet]. 2014 Aug 28 [cited 2021 Aug 6];9(8). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25166914/

143. Colangelo T, Polcaro G, Ziccardi P, Pucci B, Muccillo L, Galgani M, et al. Proteomic screening identifies calreticulin as a miR-27a direct target repressing MHC class I cell

surface exposure in colorectal cancer. Cell Death & Disease [Internet]. 2016 Feb 25 [cited 2021 Aug 6];7(2):e2120. Available from: /pmc/articles/PMC4849154/

144. Li X, Xu M, Ding L, Tang J. MiR-27a: A Novel Biomarker and Potential Therapeutic Target in Tumors. Journal of Cancer [Internet]. 2019 [cited 2021 Dec 6];10(12):2836. Available from: /pmc/articles/PMC6584939/

145. Wu W, He K, Guo Q, Chen J, Zhang M, Huang K, et al. SSRP1 promotes colorectal cancer progression and is negatively regulated by miR-28-5p. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2019 May 1;23(5):3118–29.

146. Peng H, Wang L, Su Q, Yi K, Du J, Wang Z. MiR-31-5p promotes the cell growth, migration and invasion of colorectal cancer cells by targeting NUMB. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2019 Jan 1;109:208–16.

147. Alcantara KMM, Garcia RL. MicroRNA-92a promotes cell proliferation, migration and survival by directly targeting the tumor suppressor gene NF2 in colorectal and lung cancer cells. Oncology Reports. 2019 Apr 1;41(4):2103–16.

148. Qin Y, Huo Z, Song X, Chen X, Tian X, Wang X. mir-106a regulates cell proliferation and apoptosis of colon cancer cells through targeting the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. Oncology letters [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2021 Nov 9];15(3):3197–201. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29435057/

149. Yang M, Tang X, Wang Z, Wu X, … DT-B, 2019 undefined. miR-125 inhibits colorectal cancer proliferation and invasion by targeting TAZ. portlandpress.com [Internet]. [cited 2021 Nov 9]; Available from: https://portlandpress.com/bioscirep/article-abstract/39/12/BSR20190193/221372

150. Li N, Tang A, Huang S, Li Z, Li X, Shen S, et al. MiR-126 suppresses colon cancer cell proliferation and invasion via inhibiting RhoA/ROCK signaling pathway. Molecular and cellular biochemistry [Internet]. 2013 Aug [cited 2021 Nov 29];380(1–2):107–19. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23615712/

151. Li N, Li X, Huang S, Shen S, Wang X. [miR-126 inhibits colon cancer proliferation and invasion through targeting IRS1, SLC7A5 and TOM1 gene]. Zhong nan da xue xue bao

Yi xue ban = Journal of Central South University Medical sciences [Internet]. 2013 Aug [cited 2021 Dec 6];38(8):809–17. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23981989/

152. Nagel R, le Sage C, Diosdado B, van der Waal M, Oude Vrielink JAF, Bolijn A, et al. Regulation of the Adenomatous Polyposis Coli Gene by the miR-135 Family in Colorectal Cancer. Cancer Research [Internet]. 2008 Jul 15 [cited 2021 Nov 9];68(14):5795–802. Available from: https://cancerres.aacrjournals.org/content/68/14/5795

153. Xing Y, Jing H, Zhang Y, Suo J, Qian M. MicroRNA-141-3p affected proliferation, chemosensitivity, migration and invasion of colorectal cancer cells by targeting EGFR. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2020 Jan 1;118:105643.

154. Liang Z, Li X, Liu S, Li C, Wang X, Xing J. MiR-141–3p inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting TRAF5 in colorectal cancer. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2019 Jun 30;514(3):699–705.

155. Shimbo K, Miyaki S, Ishitobi H, Kato Y, Kubo T, Shimose S, et al. Exosome-formed synthetic microRNA-143 is transferred to osteosarcoma cells and inhibits their migration. Biochemical and Biophysical Research Communications [Internet]. 2014 Mar 7 [cited 2020 Nov 5];445(2):381–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24525123/

156. Hu Y, Ma Z, He Y, Liu W, Su Y, Tang Z. PART-1 functions as a competitive endogenous RNA for promoting tumor progression by sponging miR-143 in colorectal cancer. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2017 Aug 19;490(2):317–23.

157. Su J, Liang H, Yao W, Wang N, Zhang S, Yan X, et al. MiR-143 and MiR-145 regulate IGF1R to suppress cell proliferation in colorectal cancer. PLoS ONE. 2014 Dec 4;9(12).

158. Ding X, Du J, Mao K, Wang X, Ding Y, Wang F. MicroRNA-143-3p suppresses tumorigenesis by targeting catenin-δ1 in colorectal cancer. OncoTargets and therapy [Internet]. 2019 May [cited 2021 Nov 9];12:3255. Available from: /pmc/articles/PMC6501703/

159. Noorolyai S, Baghbani E, Maleki LA, Kojabad AB, Shanehbansdi D, Shahgoli VK, et al. Restoration of miR-193a-5p and miR-146 a-5p Expression Induces G1 Arrest in Colorectal Cancer through Targeting of MDM2/p53. Advanced Pharmaceutical Bulletin [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 2];10(1):130. Available from: /pmc/articles/PMC6983996/

160. Zhao W, Zheng J, Wei G, Yang K, Wang G, Sun X. miR-148a inhibits cell proliferation and migration through targeting ErbB3 in colorectal cancer. Oncology Letters [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2021 Aug 2];18(3):2530–6. Available from: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2019.10581/abstract

161. Hibino Y, Sakamoto N, Naito Y, Goto K, Oo HZ, Sentani K, et al. Significance of miR-148a in Colorectal Neoplasia: Downregulation of miR-148a Contributes to the Carcinogenesis and Cell Invasion of Colorectal Cancer. Pathobiology [Internet]. 2015 Oct 9 [cited 2021 Nov 29];82(5):233–41. Available from: https://www.karger.com/Article/FullText/438826

162. H F, X L, WW Z, ZH Z, CD W. MiR-150 alleviates EMT and cell invasion of colorectal cancer through targeting Gli1. European review for medical and pharmacological sciences [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Aug 2];24(14):7544. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32744649/

163. He Z, Dang J, Song A, Cui X, Ma Z, Zhang Y. The involvement of miR-150/β-catenin axis in colorectal cancer progression. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2020 Jan 1;121:109495.

164. Chen X, Xu X, Pan B, Zeng K, Xu M, Liu X, et al. miR-150-5p suppresses tumor progression by targeting VEGFA in colorectal cancer. Aging (Albany NY) [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2021 Aug 2];10(11):3421. Available from: /pmc/articles/PMC6286841/

165. Zhang W, Sun Z, Su L, Wang F, Jiang Y, Yu D, et al. miRNA-185 serves as a prognostic factor and suppresses migration and invasion through Wnt1 in colon cancer. European Journal of Pharmacology. 2018 Apr 15;825:75–84.

166. Lin M, Zhang Z, Gao M, Yu H, Sheng H, Huang J. MicroRNA-193a-3p suppresses the colorectal cancer cell proliferation and progression through downregulating the PLAU expression. Cancer Management and Research. 2019;11:5353–63.

167. Zhao H-J, Ren L-L, Wang Z-H, Sun T-T, Yu Y-N, Wang Y-C, et al. MiR-194 Deregulation Contributes To Colorectal Carcinogenesis via Targeting AKT2 Pathway. Theranostics [Internet]. 2014 [cited 2021 Jul 8];4(12):1193. Available from: /pmc/articles/PMC4183997/

168. Wang B, Shen ZL, Gao ZD, Zhao G, Wang CY, Yang Y, et al. MiR-194, commonly repressed in colorectal cancer, suppresses tumor growth by regulating the MAP4K4/c-Jun/MDM2 signaling pathway. Cell cycle (Georgetown, Tex) [Internet]. 2015 [cited 2021 Nov 29];14(7):1046–58. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25602366/

169. Chang HY, Ye SP, Pan SL, Kuo TT, Liu BC, Chen YL, et al. Overexpression of miR-194 Reverses HMGA2-driven Signatures in Colorectal Cancer. Theranostics [Internet]. 2017 [cited 2021 Nov 29];7(16):3889–900. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29109785/

170. Chen L, Wang X, Zhu Y, Zhu J, Lai Q. miR-200b-3p inhibits proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer by targeting Wnt1. Molecular Medicine Reports. 2018 Sep 1;18(3):2571–80.

171. Chen L, Gao H, Liang J, Qiao J, Duan J, Shi H, et al. miR-203a-3p promotes colorectal cancer proliferation and migration by targeting PDE4D. undefined. 2018;

172. Zhang L, Zhang Y, Zhu H, Sun X, Wang X, Wu P, et al. Overexpression of miR-301a-3p promotes colorectal cancer cell proliferation and metastasis by targeting deleted in liver cancer-1 and runt-related transcription factor 3. Journal of Cellular Biochemistry. 2019 Apr 1;120(4):6078–89.

173. Wan J, Yang J, Qiao C, Sun X, Di A, Zhang L, et al. MicroRNA-362 inhibits cell proliferation and invasion by directly targeting six1 in colorectal cancer. Yonsei Medical Journal. 2019 May 1;60(5):414–22.

174. Wang W, He Y, Rui J, Xu MQ. Mir-410 acts as an oncogene in colorectal cancer cells by targeting dickkopf-related protein 1 via the Wnt/β-catenin signaling pathway. Oncology Letters. 2019 Jan 1;17(1):807–14.

175. Huang L, Zhang Y, Li Z, Zhao X, Xi Z, Chen H, et al. MiR-4319 suppresses colorectal cancer progression by targeting ABTB1. United European Gastroenterology Journal. 2019 May 1;7(4):517–28.

176. Mo JS, Park WC, Choi SC, Yun KJ, Chae SC. MicroRNA 452 regulates cell proliferation, cell migration, and angiogenesis in colorectal cancer by suppressing VEGFA expression. Cancers. 2019 Oct 1;11(10).

177. Li T, Jian X, He H, Lai Q, Li X, Deng D, et al. MiR-452 promotes an aggressive colorectal cancer phenotype by regulating a Wnt/β-catenin positive feedback loop. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research. 2018 Sep 25;37(1).

178. Wang YB, Shi Q, Li G, Zheng JH, Lin J, Qiu W. MicroRNA-488 inhibits progression of colorectal cancer via inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway by targeting claudin-2. American Journal of Physiology - Cell Physiology. 2019 Jan 1;316(1):C33–47.

179. Zhang Y, Guo L, Li Y, Feng GH, Teng F, Li W, et al. MicroRNA-494 promotes cancer progression and targets adenomatous polyposis coli in colorectal cancer. Molecular cancer [Internet]. 2018 Jan 5 [cited 2021 Nov 9];17(1):1. Available from: https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-017-0753-1

180. Tang W, Zhou W, Xiang L, Wu X, Zhang P, Wang J, et al. The p300/YY1/miR-500a-5p/HDAC2 signalling axis regulates cell proliferation in human colorectal cancer. Nature Communications 2019 10:1 [Internet]. 2019 Feb 8 [cited 2021 Nov 9];10(1):1–17. Available from: https://www.nature.com/articles/s41467-018-08225-3

181. Wu F, Xing T, Gao X, Liu F. miR-501-3p promotes colorectal cancer progression via activation of Wnt/ß-catenin signaling. International Journal of Oncology. 2019;55(3):671–83.

182. Zhang Y, Sun M, Chen Y, Li B. MiR-519b-3p Inhibits the Proliferation and Invasion in Colorectal Cancer via Modulating the uMtCK/Wnt Signaling Pathway. Frontiers in Pharmacology. 2019 Jul 2;10:741.

183. Ge J, Li J, Na S, Wang P, Zhao G, Zhang X. miR-548c-5p inhibits colorectal cancer cell proliferation by targeting PGK1. Journal of Cellular Physiology. 2019 Oct 1;234(10):18872–8.

184. Zhang X, Zhang Y, Yang J, Li S, Chen J. Upregulation of miR-582-5p inhibits cell proliferation, cell cycle progression and invasion by targeting Rab27a in human colorectal carcinoma. Cancer gene therapy [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2021 Dec 6];22(10):475–80. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26384136/

185. Feng ZY, Xu XH, Cen DZ, Luo CY, Wu SB. miR-590-3p promotes colon cancer cell proliferation via Wnt/β-catenin signaling pathway by inhibiting WIF1 and DKK1. European review for medical and pharmacological sciences. 2017 Nov 1;21(21):4844–52.

186. Sun S, Hang T, Zhang B, Zhu L, Wu Y, Lv X, et al. MiRNA-708 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting ZEB1 through Akt/mTOR signaling pathway. American Journal of Translational Research. 2019;11(9):5338–56.

187. Cao L, Liu Y, Wang D, Huang L, Li F, Liu J, et al. MiR-760 suppresses human colorectal cancer growth by targeting BATF3/AP-1/cyclinD1 signaling. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research [Internet]. 2018 Apr 16 [cited 2021 Nov 9];37(1):1–14. Available from: https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-018-0757-8

188. Wang L, Jiang F, Ma F, Zhang B. MiR-873-5p suppresses cell proliferation and epithelial–mesenchymal transition via directly targeting Jumonji domain-containing protein 8 through the NF-κB pathway in colorectal cancer. Journal of Cell Communication and Signaling. 2019 Dec 1;13(4):549–60.

189. Fasihi A, Soltani BM, Ranjbaran ZS, Bahonar S, Norouzi R, Nasiri S. Hsa-miR-942 fingerprint in colorectal cancer through Wnt signaling pathway. Gene. 2019 Sep 5;712:143958.

190. Hwang JS, Jeong EJ, Choi J, Lee YJ, Jung E, Kim SK, et al. MicroRNA-1258 Inhibits the Proliferation and Migration of Human Colorectal Cancer Cells through Suppressing CKS1B Expression. Genes 2019, Vol 10, Page 912 [Internet]. 2019 Nov 8 [cited 2021 Nov 9];10(11):912. Available from: https://www.mdpi.com/2073-4425/10/11/912/htm

191. Zhang Z, Li J, Huang Y, Peng W, Qian W, Gu J, et al. Upregulated miR-1258 regulates cell cycle and inhibits cell proliferation by directly targeting E2F8 in CRC. Cell Proliferation [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2021 Nov 9];51(6):e12505. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cpr.12505

192. Sun X, Zhai H, Chen X, Kong R, Zhang X. MicroRNA-1271 suppresses the proliferation and invasion of colorectal cancer cells by regulating metadherin/Wnt signaling. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2021 Nov 9];32(2):e22028. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbt.22028

193. Yan S, Cheng M, Duan Q, Wang Z, Gao W, Ren B, et al. MiR-6803-5p Promotes Cancer Cell Proliferation and Invasion via PTPRO/NF-κ B Axis in Colorectal Cancer. Mediators of Inflammation. 2019;2019.

194. IA A, SA R, DA N, JH L, NH C, S P, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. Oncogene [Internet]. 2008 Apr 3 [cited 2021 Aug 2];27(15):2128–36. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17968323/

195. Liu W, Qian K, Wei X, Deng H, Zhao B, Chen Q, et al. miR-27a promotes proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer by targeting FAM172A and acts as a diagnostic and prognostic biomarker. Oncology reports [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2021 Dec 6];37(6):3554–64. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28440497/

196. Peng H, Wang L, Su Q, Yi K, Du J, Wang Z. MiR-31-5p promotes the cell growth, migration and invasion of colorectal cancer cells by targeting NUMB. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2019 Jan 1;109:208–16.

197. Liang H, Tang Y, Zhang H, Zhang C. Mir-32-5p regulates radiosensitization, migration and invasion of colorectal cancer cells by targeting tob1 gene. OncoTargets and Therapy. 2019;12:9651–61.

198. Fu Y, Lin L, Xia L. MiR-107 function as a tumor suppressor gene in colorectal cancer by targeting transferrin receptor 1. Cellular and Molecular Biology Letters [Internet]. 2019 May 16 [cited 2021 Nov 10];24(1):1–11. Available from: https://link.springer.com/articles/10.1186/s11658-019-0155-z

199. Li Z, Li N, Wu M, Li X, Luo Z, Wang X. Expression of miR-126 suppresses migration and invasion of colon cancer cells by targeting CXCR4. Molecular and Cellular Biochemistry [Internet]. 2013 Sep 7 [cited 2021 Nov 28];381(1–2):233–42. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-013-1707-6

200. Zhang L, Dong Y, Zhu N, Tsoi H, Zhao Z, Wu CW, et al. MicroRNA-139-5p exerts tumor suppressor function by targeting NOTCH1 in colorectal cancer. Molecular Cancer [Internet]. 2014 Jun 26 [cited 2021 Nov 10];13(1):1–12. Available from: https://link.springer.com/articles/10.1186/1476-4598-13-124

201. Guo L, Fu J, Sun S, Zhu M, Zhang L, Niu H, et al. MicroRNA-143-3p inhibits colorectal cancer metastases by targeting ITGA6 and ASAP3. Cancer Science. 2019 Feb 1;110(2):805–16.

202. Shen X, Jiang H, Chen Z, Lu B, Zhu Y, Mao J, et al. MicroRNA-145 inhibits cell migration and invasion in colorectal cancer by targeting TWIST. OncoTargets and Therapy. 2019;12:10799–809.

203. Lu D, Yao Q, Zhan C, Le-Meng Z, Liu H, Cai Y, et al. MicroRNA-146a promote cell migration and invasion in human colorectal cancer via carboxypeptidase M/src-FAK pathway. Oncotarget [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 2];8(14):22674. Available from: /pmc/articles/PMC5410254/

204. Shi L, Xi J, Xu X, Peng B, Zhang B. MiR-148a suppressed cell invasion and migration via targeting WNT10b and modulating β-catenin signaling in cisplatin-resistant colorectal cancer cells. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2019 Jan 1;109:902–9.

205. MiR-150-5p Suppresses Colorectal Cancer Cell Migration and Invasion through Targeting MUC4. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2021 Aug 2];15(15):6269–73. Available from: http://journal.waocp.org/article_29594.html

206. Liu F, di Wang X. miR-150-5p represses TP53 tumor suppressor gene to promote proliferation of colon adenocarcinoma. Scientific Reports 2019 9:1 [Internet]. 2019 May 1 [cited 2021 Aug 2];9(1):1–7. Available from: https://www.nature.com/articles/s41598-019-43231-5

207. Li Y, Kuscu C, Banach A, Zhang Q, Pulkoski-Gross A, Kim D, et al. miR-181a-5p inhibits cancer cell migration and angiogenesis via downregulation of matrix metalloproteinase-14. Cancer Research. 2015 Jul 1;75(13):2674–85.

208. Li J, Xia L, Zhou Z, Zuo Z, Xu C, Song H, et al. MiR-186-5p upregulation inhibits proliferation, metastasis and epithelial-to-mesenchymal transition of colorectal cancer cell by targeting ZEB1. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2018 Feb 15;640:53–60.

209. Qi Y, Li J. Triptolide inhibits the growth and migration of colon carcinoma cells by down-regulation of miR-191. Experimental and Molecular Pathology. 2019 Apr 1;107:23–31.

210. Qin S, Zhu Y, Ai F, Li Y, Bai B, Yao W, et al. MicroRNA-191 correlates with poor prognosis of colorectal carcinoma and plays multiple roles by targeting tissue inhibitor of metalloprotease 3. Neoplasma. 2014;61(1):27–34.

211. Cai HK, Chen X, Tang YH, Deng YC. MicroRNA-194 modulates epithelial–mesenchymal transition in human colorectal cancer metastasis. OncoTargets and therapy [Internet]. 2017 Feb 28 [cited 2021 Nov 29];10:1269. Available from: /pmc/articles/PMC5338959/

212. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. Genes and Development. 2008 Apr 1;22(7):894–907.

213. Paterson EL, Kazenwadel J, Bert AG, Khew-Goodall Y, Ruszkiewicz A, Goodall GJ. Down-regulation of the miRNA-200 family at the invasive front of colorectal cancers with degraded basement membrane indicates EMT is involved in cancer progression. Neoplasia (United States). 2013;15(2):180–91.

214. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. Nature Cell Biology. 2008 May;10(5):593–601.

215. Shuai F, Wang B, Dong S. MicroRNA-204 Inhibits the Growth and Motility of Colorectal Cancer Cells by Downregulation of CXCL8. Oncology Research [Internet]. 2018 [cited 2021 Nov 10];26(8):1295. Available from: /pmc/articles/PMC7844723/

216. Park YR, Seo SY, Kim SL, Zhu SM, Chun S, Oh JM, et al. MiRNA-206 suppresses PGE2-induced colorectal cancer cell proliferation, migration, and invasion by targetting TM4SF1. Bioscience Reports [Internet]. 2018 Sep 19 [cited 2021 Nov 10];38(5):1–15. Available from: /bioscirep/article/38/5/BSR20180664/87411/MiRNA-206-suppresses-PGE2-induced-colorectal

217. Sun L, Fang Y, Wang X, Han Y, Du F, Li C, et al. MiR-302a inhibits metastasis and cetuximab resistance in colorectal cancer by targeting NFIB and CD44. Theranostics. 2019;9(26):8409–25.

218. Gu C, Zhang M, Sun W, Dong C. Upregulation of miR-324-5p inhibits proliferation and invasion of colorectal cancer cells by targeting ELAVL1. Oncology Research. 2019;27(5):515–24.

219. Mansoori B, Mohammadi A, Naghizadeh S, Gjerstorff M, Shanehbandi D, Shirjang S, et al. miR-330 suppresses EMT and induces apoptosis by downregulating HMGA2 in human colorectal cancer. Journal of Cellular Physiology. 2020 Feb 1;235(2):920–31.

220. Chu CA, Lee CT, Lee JC, Wang YW, Huang CT, Lan SH, et al. MiR-338-5p promotes metastasis of colorectal cancer by inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic subunit type 3-mediated autophagy pathway. EBioMedicine. 2019 May 1;43:270–81.

221. Lv S, Zhang J, He Y, Liu Q, Wang Z, Liu B, et al. MicroRNA-520e targets AEG-1 to suppress the proliferation and invasion of colorectal cancer cells through Wnt/GSK-3β/β-catenin signalling. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2020 Jan 1;47(1):158–67.

222. Kim CW, Oh ET, Kim JM, Park JS, Lee DH, Lee JS, et al. Hypoxia-induced microRNA-590-5p promotes colorectal cancer progression by modulating matrix metalloproteinase activity. Cancer Letters. 2018 Mar 1;416:31–41.

223. Li G, Xu Y, Wang S, Yan W, Zhao Q, Guo J. MiR-873-5p inhibits cell migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer via targeting ZEB1. Pathology Research and Practice. 2019 Jan 1;215(1):34–9.

224. Liu Z, Liu X, Li Y, Ren P, Zhang C, Wang L, et al. miR-6716-5p promotes metastasis of colorectal cancer through downregulating NAT10 expression. Cancer management and research [Internet]. 2019 Jun [cited 2021 Nov 10];11:5317–32. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31239781/

225. Danac JMC, Uy AGG, Garcia RL. Exosomal microRNAs in colorectal cancer: Overcoming barriers of the metastatic cascade (Review). International Journal of Molecular Medicine [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2021 Aug 6];47(6). Available from: /pmc/articles/PMC8075282/

226. L H. Understanding metastasis. Nature reviews Clinical oncology [Internet]. 2015 May 5 [cited 2021 Aug 6];12(5):247. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25921714/

227. Goossens S, Vandamme N, van Vlierberghe P, Berx G. EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET. Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer. 2017 Dec 1;1868(2):584–91.

228. Vu T, Datta PK. Regulation of EMT in colorectal cancer: A culprit in metastasis. Cancers. 2017 Dec 16;9(12).

229. Ning X, Wang C, Zhang M, Wang K. Ectopic expression of miR-147 inhibits stem cell marker and epithelial–mesenchymal transition (EMT)-related protein expression in colon cancer cells. Oncology Research. 2019;27(4):399–406.

230. Li T, Wan Y, Su Z, Li J, Han M, Zhou C. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal microRNA-3940-5p Inhibits Colorectal Cancer Metastasis by Targeting Integrin α6. Digestive Diseases and Sciences [Internet]. 2020 Jul 15 [cited 2021 Apr 12];1:3. Available from: https://doi.org/10.1007/s10620-020-06458-1

231. Li S, Yan G, Yue M, Wang L. Extracellular vesicles-derived microRNA-222 promotes immune escape via interacting with ATF3 to regulate AKT1 transcription in colorectal cancer. BMC Cancer 2021 21:1 [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2021 Aug 3];21(1):1–13. Available from: https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-021-08063-5

232. Y W, C L. Exosomes miR-22-3p Derived from Mesenchymal Stem Cells Suppress Colorectal Cancer Cell Proliferation and Invasion by Regulating RAP2B and PI3K/AKT Pathway. Journal of oncology [Internet]. 2021 Jun 21 [cited 2021 Aug 3];2021:1–10. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34239562/

233. N Z, L L, J L, J T, W H, Z L, et al. Inhibiting microRNA-424 in bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes suppresses tumor growth in colorectal cancer by upregulating TGFBR3. Archives of biochemistry and biophysics [Internet]. 2021 Sep [cited 2021 Aug 3];709:108965. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34129838/

234. Q D, X Y, SR L, H L, HY L, Q Z, et al. Exosomal miR-30a and miR-222 derived from colon cancer mesenchymal stem cells promote the tumorigenicity of colon cancer through targeting MIA3. Journal of gastrointestinal oncology [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2021 Aug 3];12(1):52–68. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33708424/

235. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells; Normal, Human ATCC ® P [Internet]. [cited 2017 Dec 24]. Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Human_Primary_Cells/Cell_Type/Me

senchymal_Stem_Cells/Bone_Marrow-Derived_Mesenchymal_Stem_Cells/PCS-500-012.aspx#generalinformation

236. HT-29 ATCC ® HTB-38 ™ Homo sapiens kolon kolorektal adenokar [Internet]. [cited 2020 Feb 17]. Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-38.aspx?geo_country=tr

237. Vembadi A, Menachery A, Qasaimeh MA. Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances [Internet]. Vol. 7, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. Frontiers Media S.A.; 2019 [cited 2020 Aug 7]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31275933/

238. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. Journal of Extracellular Vesicles. 2018 Jan 1;7(1).

239. Navajas R, Corrales FJ, Paradela A. Serum exosome isolation by size-exclusion chromatography for the discovery and validation of preeclampsia-associated biomarkers. In: Methods in Molecular Biology [Internet]. Humana Press Inc.; 2019 [cited 2020 Aug 7]. p. 39–50. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30852814/

240. 2015 A, Pg. IZON SCIENCE LIMITED Izon qEV: a new tool for rapid EV isolation [Internet]. [cited 2020 Aug 7]. Available from: www.izon.com

241. Oszvald Á, Szvicsek Z, Sándor GO, Kelemen A, Soós AÁ, Pálóczi K, et al. Extracellular vesicles transmit epithelial growth factor activity in the intestinal stem cell niche. STEM CELLS [Internet]. 2019 Nov 23 [cited 2019 Dec 19]; Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/stem.3113

242. Vogel R, Coumans FAW, Maltesen RG, Böing AN, Bonnington KE, Broekman ML, et al. A standardized method to determine the concentration of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing. Journal of Extracellular Vesicles [Internet]. 2016 [cited 2020 Aug 7];5(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27680301/

243. Kahraman T, Gucluler G, Simsek I, Yagci FC, Yildirim M, Ozen C, et al. Circulating LL37 targets plasma extracellular vesicles to immune cells and intensifies Behçet's disease severity. Journal of Extracellular Vesicles. 2017;6(1).

244. Kahraman Tamer. Therapeutic and diagnostic applications of extracellular vesicles / Hücre dışı keseciklerin terapötik ve diagnostik uygulamaları Ulusal Tez Merkezi | Anasayfa [Internet]. [cited 2022 Jan 11]. Available from: https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=-FlUoAhgL3DC4v30aJnsJg&no=izXFFr7tkyhb52FGioPOjg

245. Pulliam L, Gupta A. Modulation of cellular function through immune-activated exosomes. DNA and cell biology [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2020 Aug 7];34(7):459–63. Available from: /pmc/articles/PMC4504252/?report=abstract

246. Oliveira I, Nunes A, Lima A, Borralho P, Rodrigues C, Ferreira RB, et al. New lectins from mediterranean flora. Activity against ht29 colon cancer cells. International Journal of Molecular Sciences [Internet]. 2019 Jun 2 [cited 2020 Aug 7];20(12). Available from: /pmc/articles/PMC6627736/?report=abstract

247. Moutasim KA, Nystrom ML, Thomas GJ. Cell Migration and Invasion Assays. In: Methods in molecular biology (Clifton, NJ) [Internet]. Methods Mol Biol; 2011 [cited 2020 Aug 7]. p. 333–43. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21516419/

248. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. Cold Spring Harbor Protocols [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2020 Aug 10];2018(6):469–71. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29858338/

249. Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang L v. In vitro cell migration and invasion assays. Journal of Visualized Experiments [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2020 Aug 10];(88). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24962652/

250. DifferBetween | What is the Difference Between Migration and Invasion Assay [Internet]. [cited 2022 Jan 14]. Available from: https://en.differbetween.com/article/what_is_the_difference_between_migration_and_invasion_assay

251. GDC [Internet]. [cited 2021 Dec 6]. Available from: https://portal.gdc.cancer.gov/

252. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology [Internet]. 2014 Dec 5 [cited 2021 Dec 6];15(12):1–21. Available from: https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-014-0550-8

253. Zhao M, Liu Y, Zheng C, Qu H. dbEMT 2.0: An updated database for epithelial-mesenchymal transition genes with experimentally verified information and precalculated regulation information for cancer metastasis. Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao [Internet]. 2019 Dec 20 [cited 2021 Dec 6];46(12):595–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31941584/

254. Heberle H, Meirelles VG, da Silva FR, Telles GP, Minghim R. InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. BMC Bioinformatics. 2015 May 22;16(1).

255. Danese E, Minicozzi AM, Benati M, Paviati E, Lima-Oliveira G, Gusella M, et al. Reference miRNAs for colorectal cancer: analysis and verification of current data. Scientific Reports [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2021 Dec 7];7(1). Available from: /pmc/articles/PMC5567181/

256. Vermani L, Kumar R, Kumar NS. GAPDH and PUM1: Optimal Housekeeping Genes for Quantitative Polymerase Chain Reaction-Based Analysis of Cancer Stem Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition Gene Expression in Rectal Tumors. Cureus [Internet]. 2020 Dec 11 [cited 2021 Dec 7];12(12). Available from: /pmc/articles/PMC7797410/

257. Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: A technical review. PeerJ [Internet]. 2021 Apr 21 [cited 2021 Dec 7];9. Available from: /pmc/articles/PMC8067914/

258. Jin HY, Gonzalez-Martin A, Miletic A v., Lai M, Knight S, Sabouri-Ghomi M, et al. Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution. Frontiers in Genetics

[Internet]. 2015 [cited 2021 Dec 7];6(DEC). Available from: /pmc/articles/PMC4667072/

259. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, et al. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. Nucleic Acids Research [Internet]. 2015 [cited 2022 Jan 13];43(Web Server issue):W460. Available from: /pmc/articles/PMC4489228/

260. Liang X, Zhang L, Wang S, Han Q, Zhao RC. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a. Journal of Cell Science. 2016 Jun 1;129(11):2182–9.

261. Yin J, Bai Z, Song J, Yang Y, Wang J, Han W, et al. Differential expression of serum miR-126, miR-141 and miR-21 as novel biomarkers for early detection of liver metastasis in colorectal cancer. Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu [Internet]. 2014 [cited 2021 Nov 29];26(1):95–103. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24653631/

262. Huang W, Lin J, Zhang H. miR-126: A novel regulator in colon cancer. Biomedical reports [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2021 Nov 29];4(2):131–4. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26893826/

263. C G, JF S, L B, JK W, SD M, K G. The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers. Genes, chromosomes & cancer [Internet]. 2008 Nov [cited 2021 Aug 3];47(11):939–46. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18663744/

264. Zhou Y, Feng X, Liu Y, Ye S, Wang H, Tan W, et al. Down-Regulation of miR-126 Is Associated with Colorectal Cancer Cells Proliferation, Migration and Invasion by Targeting IRS-1 via the AKT and ERK1/2 Signaling Pathways. PLOS ONE [Internet]. 2013 Nov 29 [cited 2021 Aug 3];8(11):e81203. Available from: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0081203

265. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods (San Diego, Calif)

[Internet]. 2001 [cited 2021 Dec 8];25(4):402–8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/

266. Lopatina T, Gai C, Deregibus MC, Kholia S, Camussi G. Cross talk between cancer and mesenchymal stem cells through extracellular vesicles carrying nucleic acids [Internet]. Vol. 6, Frontiers in Oncology. Frontiers Media S.A.; 2016 [cited 2020 Nov 3]. p. 1. Available from: /pmc/articles/PMC4876347/?report=abstract

267. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, et al. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. International Journal of Cancer [Internet]. 2010 Nov 15 [cited 2020 Nov 3];127(10):2323–33. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.25440

268. Wang M, Zhao C, Shi H, Zhang B, Zhang L, Zhang X, et al. Deregulated microRNAs in gastric cancer tissue-derived mesenchymal stem cells: Novel biomarkers and a mechanism for gastric cancer. British Journal of Cancer [Internet]. 2014 Mar 4 [cited 2020 Nov 3];110(5):1199–210. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24473397/

269. Liu K, Li G, Fan C, Diao Y, Wu B, Li J. Increased expression of microRNA-221 in gastric cancer and its clinical significance. Journal of International Medical Research [Internet]. 2012 [cited 2020 Nov 3];40(2):467–74. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22613407/

270. Katakowski M, Buller B, Zheng X, Lu Y, Rogers T, Osobamiro O, et al. Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. Cancer Letters [Internet]. 2013 Jul 10 [cited 2020 Nov 5];335(1):201–4. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23419525/

271. Ono M, Kosaka N, Tominaga N, Yoshioka Y, Takeshita F, Takahashi RU, et al. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. Science Signaling [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2020 Nov 5];7(332). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24985346/

272. Xu Y, Shen L, Li F, Yang J, Wan X, Ouyang M. microRNA-16-5p-containing exosomes derived from bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit proliferation, migration, and invasion, while promoting apoptosis of colorectal cancer cells by downregulating ITGA2. Journal of Cellular Physiology [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2021 Nov 9];234(11):21380–94. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.28747

273. Flier JS, Underhill LH, Dvorak HF. Tumors: Wounds That Do Not Heal. New England Journal of Medicine [Internet]. 1986 Dec 25 [cited 2021 Mar 30];315(26):1650–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3537791/

274. Kaneko Y, Tajiri N, Staples M, Reyes S, Lozano D, Sanberg PR, et al. Bone marrow-derived stem cell therapy for metastatic brain cancers [Internet]. Vol. 24, Cell Transplantation. Cognizant Communication Corporation; 2015 [cited 2021 Mar 30]. p. 625–30. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25310691/

275. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation [Internet]. Vol. 144, Cell. Cell; 2011 [cited 2021 Mar 30]. p. 646–74. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21376230/

276. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: Do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? [Internet]. Vol. 29, Stem Cells. Stem Cells; 2011 [cited 2021 Mar 30]. p. 11–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21280155/

277. Zhang Y, Daquinag A, Traktuev DO, Amaya-Manzanares F, Simmons PJ, March KL, et al. White adipose tissue cells are recruited by experimental tumors and promote cancer progression in mouse models. Cancer Research [Internet]. 2009 Jun 15 [cited 2021 Mar 30];69(12):5259–66. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19491274/

278. Pinilla S, Alt E, Abdul Khalek FJ, Jotzu C, Muehlberg F, Beckmann C, et al. Tissue resident stem cells produce CCL5 under the influence of cancer cells and thereby promote breast cancer cell invasion. Cancer Letters [Internet]. 2009 Oct 18 [cited 2021 Mar 30];284(1):80–5. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19427114/

279. Jotzu C, Alt E, Welte G, Li J, Hennessy BT, Devarajan E, et al. Adipose tissue derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor derived factors. Cellular Oncology [Internet]. 2011 Feb [cited 2021 Mar 30];34(1):55–67. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21327615/

280. Krohn A, Song YH, Muehlberg F, Droll L, Beckmann C, Alt E. CXCR4 receptor positive spheroid forming cells are responsible for tumor invasion in vitro. Cancer Letters [Internet]. 2009 Jul 18 [cited 2021 Mar 30];280(1):65–71. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19286309/

281. Marycz K, Weiss C, Śmieszek A, Kornicka K. Evaluation of oxidative stress and mitophagy during adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells isolated from equine metabolic syndrome (EMS) horses. Stem Cells International [Internet]. 2018 [cited 2021 Mar 30];2018. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29977307/

282. Silva LHA, Antunes MA, dos Santos CC, Weiss DJ, Cruz FF, Rocco PRM. Strategies to improve the therapeutic effects of mesenchymal stromal cells in respiratory diseases [Internet]. Vol. 9, Stem Cell Research and Therapy. BioMed Central Ltd.; 2018 [cited 2021 Mar 30]. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29482654/

283. Moya A, Larochette N, Paquet J, Deschepper M, Bensidhoum M, Izzo V, et al. Quiescence Preconditioned Human Multipotent Stromal Cells Adopt a Metabolic Profile Favorable for Enhanced Survival under Ischemia. Stem Cells [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2021 Mar 30];35(1):181–96. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27578059/

284. Shinmura D, Togashi I, Miyoshi S, Nishiyama N, Hida N, Tsuji H, et al. Pretreatment of human mesenchymal stem cells with pioglitazone improved efficiency of cardiomyogenic transdifferentiation and cardiac function. Stem Cells [Internet]. 2011 Feb [cited 2021 Mar 30];29(2):357–66. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21732492/

285. Sanchez CG, Penfornis P, Oskowitz AZ, Boonjindasup AG, Cai DZ, Dhule SS, et al. Activation of autophagy in mesenchymal stem cells provides tumor stromal support.

Carcinogenesis [Internet]. 2011 Jul 1 [cited 2021 Mar 30];32(7):964–72. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21317300/

286. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira II, et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. Journal of Experimental Medicine [Internet]. 2006 May 15 [cited 2021 Mar 30];203(5):1235–47. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16636132/

287. Qiao L, Xu Z li, Zhao T jun, Ye L hong, Zhang X dong. Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. Cancer Letters [Internet]. 2008 Sep 28 [cited 2021 Mar 30];269(1):67–77. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18571836/

288. Qiao L, Xu Z, Zhao T, Zhao Z, Shi M, Zhao RC, et al. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. Cell Research [Internet]. 2008 Apr [cited 2021 Mar 30];18(4):500–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18364678/

289. Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, Bian C, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. Leukemia [Internet]. 2009 [cited 2021 Mar 30];23(5):925–33. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19148141/

290. Dasari VR, Velpula KK, Kaur K, Fassett D, Klopfenstein JD, Dinh DH, et al. Cord blood stem cell-mediated induction of apoptosis in glioma downregulates X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). PLoS ONE [Internet]. 2010 [cited 2021 Mar 30];5(7). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20676365/

291. Otsu K, Das S, Houser SD, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J. Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. Blood [Internet]. 2009 [cited 2021 Mar 30];113(18):4197–205. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19036701/

292. Costa LA, Eiro N, Fraile M, Gonzalez LO, Saá J, Garcia-Portabella P, et al. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions:

implications for further clinical uses [Internet]. Vol. 1, Cellular and Molecular Life Sciences. Springer; 2020 [cited 2021 Mar 30]. p. 1. Available from: /pmc/articles/PMC7375036/

293. Arufe MC, de La Fuente A, Fuentes I, de Toro FJ, Blanco FJ. Chondrogenic potential of subpopulations of cells expressing mesenchymal stem cell markers derived from human synovial membranes. Journal of Cellular Biochemistry [Internet]. 2010 Nov [cited 2021 Mar 30];111(4):834–45. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20665538/

294. Dominici M, le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy [Internet]. 2006 Aug [cited 2021 Mar 30];8(4):315–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16923606/

295. Phinney DG. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: Implications for cell therapy [Internet]. Vol. 113, Journal of Cellular Biochemistry. J Cell Biochem; 2012 [cited 2021 Mar 30]. p. 2806–12. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22511358/

296. Tormin A, Brune JC, Olsson E, Valcich J, Neuman U, Olofsson T, et al. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSC) based on gene expression profiling of functionally defined MSC subsets. Cytotherapy [Internet]. 2009 [cited 2021 Mar 30];11(2):114–28. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19242838/

297. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: A simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. British Journal of Haematology [Internet]. 1999 [cited 2021 Mar 30];107(2):275–81. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10583212/

298. Schellenberg A, Lin Q, Schüler H, Koch CM, Joussen S, Denecke B, et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells causes DNA-methylation changes which correlate with repressive histone marks. Aging [Internet]. 2011 [cited 2021 Mar 30];3(9):873–88. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22025769/

299. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [Internet]. 2001 [cited 2021 Mar 30];98(14):7841–5. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11427725/

300. Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. Cytotherapy [Internet]. 2001 [cited 2021 Mar 30];3(5):393–6. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11953019/

301. Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. Stem Cells [Internet]. 2010 Apr [cited 2021 Mar 30];28(4):788–98. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20127798/

302. Mareddy S, Broadbent J, Crawford R, Xiao Y. Proteomic profiling of distinct clonal populations of bone marrow Mesenchymal stem cells. Journal of Cellular Biochemistry [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2021 Mar 30];106(5):776–86. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19229859/

303. Amable PR, Teixeira MVT, Carias RBV, Granjeiro JM, Borojevic R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. Stem Cell Research and Therapy [Internet]. 2014 Apr 16 [cited 2021 Mar 31];5(2). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24739658/

304. Hsiao STF, Asgari A, Lokmic Z, Sinclair R, Dusting GJ, Lim SY, et al. Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. Stem Cells and Development [Internet]. 2012 Aug 10 [cited 2021 Mar 31];21(12):2189–203. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22188562/

305. Vallabhaneni KC, Penfornis P, Dhule S, Guillonneau F, Adams K v., Mo YY, et al. Extracellular vesicles from bone marrow mesenchymal stem/stromal cells transport

tumor regulatory microRNA, proteins, and metabolites. Oncotarget [Internet]. 2015 [cited 2020 Nov 5];6(7):4953–67. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25669974/

306. W Z, L H, Y L, X Z, J G, Y Y, et al. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo. Cancer letters [Internet]. 2012 Feb 1 [cited 2021 Aug 18];315(1):28–37. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22055459/

307. Munoz JL, Bliss SA, Greco SJ, Ramkissoon SH, Ligon KL, Rameshwar P. Delivery of functional anti-miR-9 by mesenchymal stem cell-derived exosomes to glioblastoma multiforme cells conferred chemosensitivity. Molecular Therapy - Nucleic Acids [Internet]. 2013 [cited 2021 Apr 12];2(OCT). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24084846/

308. Wu S, Ju GQ, Du T, Zhu YJ, Liu GH. Microvesicles Derived from Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Attenuate Bladder Tumor Cell Growth In Vitro and In Vivo. PLoS ONE [Internet]. 2013 Apr 12 [cited 2021 Apr 12];8(4). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23593475/

309. Fonsato V, Collino F, Herrera MB, Cavallari C, Deregibus MC, Cisterna B, et al. Human liver stem cell-derived microvesicles inhibit hepatoma growth in SCID mice by delivering antitumor microRNAs. Stem Cells [Internet]. 2012 Sep [cited 2021 Apr 12];30(9):1985–98. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22736596/

310. Figueroa J, Phillips LM, Shahar T, Hossain A, Gumin J, Kim H, et al. Exosomes from glioma-associated mesenchymal stem cells increase the tumorigenicity of glioma stem-like cells via transfer of miR-1587. Cancer Research [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2021 Apr 12];77(21):5808–19. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28855213/

311. Wen S, Dooner M, Cheng Y, Papa E, del Tatto M, Pereira M, et al. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles rescue radiation damage to murine marrow hematopoietic cells. Leukemia [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2021 Apr 12];30(11):2221–31. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27150009/

312. Kaszak I, Witkowska-Piłaszewicz O, Niewiadomska Z, Dworecka-Kaszak B, Toka FN, Jurka P. Role of Cadherins in Cancer—A Review. International Journal of Molecular Sciences [Internet]. 2020 Oct 2 [cited 2021 Dec 13];21(20):1–17. Available from: /pmc/articles/PMC7589192/

313. Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. Cadherin Switch in Tumor Progression. Annals of the New York Academy of Sciences [Internet]. 2004 Apr 1 [cited 2021 Dec 13];1014(1):155–63. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1196/annals.1294.016

314. Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, Vandyke K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. BMC cancer [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2021 Dec 13];18(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30285678/

315. Miyamoto Y, Sakane F, Hashimoto K. N-cadherin-based adherens junction regulates the maintenance, proliferation, and differentiation of neural progenitor cells during development. Cell adhesion & migration [Internet]. 2015 [cited 2021 Dec 13];9(3):183–92. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25869655/

316. Williams EJ, Furness J, Walsh FS, Doherty P. Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. Neuron [Internet]. 1994 [cited 2021 Dec 13];13(3):583–94. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7917292/

317. van Roy F. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. Nature reviews Cancer [Internet]. 2014 Feb [cited 2021 Dec 13];14(2):121–34. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24442140/

318. Blaschuk OW. N-cadherin antagonists as oncology therapeutics. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences [Internet]. 2015 Jan 5 [cited 2021 Dec 13];370(1661). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25533096/

319. Yan X, Yan L, Liu S, Shan Z, Tian Y, Jin Z. N-cadherin, a novel prognostic biomarker, drives malignant progression of colorectal cancer. Molecular medicine reports [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2021 Dec 13];12(2):2999–3006. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25936636/

320. Hui L, Zhang S, Dong X, Tian D, Cui Z, Qiu X. Prognostic significance of twist and N-cadherin expression in NSCLC. PloS one [Internet]. 2013 Apr 23 [cited 2021 Dec 13];8(4). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23626784/

321. Drivalos A, Chrisofos M, Efstathiou E, Kapranou A, Kollaitis G, Koutlis G, et al. Expression of α5-integrin, α7-integrin, E-cadherin, and N-cadherin in localized prostate cancer. Urologic oncology [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2021 Dec 13];34(4):165.e11-165.e18. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26652134/

322. Saadatmand S, de Kruijf EM, Sajet A, Dekker-Ensink NG, van Nes JGH, Putter H, et al. Expression of cell adhesion molecules and prognosis in breast cancer. The British journal of surgery [Internet]. 2013 Jan [cited 2021 Dec 13];100(2):252–60. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23175431/

323. Cao ZQ, Wang Z, Leng P. Aberrant N-cadherin expression in cancer. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2021 Dec 13];118. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31545265/

324. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. Journal of Cell Science. 2008 Mar 15;121(6):727–35.

325. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. Developmental Cell. 2008 Jun 10;14(6):818–29.

326. Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling, epithelial-to-mesenchymal transition and miRNA (review). International Journal of Molecular Medicine [Internet]. 2008 Sep 1 [cited 2021 Dec 13];22(3):271–5. Available from: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm_00000019/abstract

327. Toiyama Y, Yasuda H, Saigusa S, Tanaka K, Inoue Y, Goel A, et al. Increased expression of Slug and Vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor

prognosis in colorectal cancer. Carcinogenesis [Internet]. 2013 Nov 1 [cited 2021 Dec 13];34(11):2548–57. Available from: https://academic.oup.com/carcin/article/34/11/2548/2464095

328. Kurrey NK, Amit K, Bapat SA. Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level. Gynecologic oncology [Internet]. 2005 [cited 2021 Dec 13];97(1):155–65. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15790452/

329. Sivertsen S, Hadar R, Elloul S, Vintman L, Bedrossian C, Reich R, et al. Expression of Snail, Slug and Sip1 in malignant mesothelioma effusions is associated with matrix metalloproteinase, but not with cadherin expression. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands) [Internet]. 2006 Dec [cited 2021 Dec 13];54(3):309–17. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16996643/

330. Uchikado Y, Okumura H, Ishigami S, Setoyama T, Matsumoto M, Owaki T, et al. Increased Slug and decreased E-cadherin expression is related to poor prognosis in patients with gastric cancer. Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association [Internet]. 2011 Mar [cited 2021 Dec 13];14(1):41–9. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21274735/

331. Mikami S, Katsube KI, Oya M, Ishida M, Kosaka T, Mizuno R, et al. Expression of Snail and Slug in renal cell carcinoma: E-cadherin repressor Snail is associated with cancer invasion and prognosis. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology [Internet]. 2011 Oct [cited 2021 Dec 13];91(10):1443–58. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21808237/

332. Jin H, Yu Y, Zhang T, Zhou X, Zhou J, Jia L, et al. Snail is critical for tumor growth and metastasis of ovarian carcinoma. International journal of cancer [Internet]. 2010 May 1 [cited 2021 Dec 13];126(9):2102–11. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19795442/

333. Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J, et al. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast

carcinomas. Oncogene [Internet]. 2002 May 9 [cited 2021 Dec 13];21(20):3241–6. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12082640/

334. Shioiri M, Shida T, Koda K, Oda K, Seike K, Nishimura M, et al. Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. British Journal of Cancer [Internet]. 2006 Jun 19 [cited 2021 Dec 13];94(12):1816. Available from: /pmc/articles/PMC2361350/

335. Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. Cancer research [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2021 Dec 14];76(13):3666–70. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27325641/

336. Sekuklu SD, Donoghue MTA, Spillane C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. Biochemical Society transactions [Internet]. 2009 [cited 2021 Dec 13];37(Pt 4):918–25. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19614619/

337. Feng YH, Wu CL, Tsao CJ, Chang JG, Lu PJ, Yeh KT, et al. Deregulated expression of sprouty2 and microRNA-21 in human colon cancer: Correlation with the clinical stage of the disease. Cancer biology & therapy [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2021 Dec 13];11(1):111–21. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21099344/

338. Sun LH, Tian D, Yang ZC, Li JL. Exosomal miR-21 promotes proliferation, invasion and therapy resistance of colon adenocarcinoma cells through its target PDCD4. Scientific Reports 2020 10:1 [Internet]. 2020 May 19 [cited 2021 Dec 13];10(1):1–8. Available from: https://www.nature.com/articles/s41598-020-65207-6

339. You C, Jin L, Xu QI, Shen BO, Jiao X, Huang X. Expression of miR-21 and miR-138 in colon cancer and its effect on cell proliferation and prognosis. Oncology Letters [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2021 Dec 13];17(2):2271. Available from: /pmc/articles/PMC6341732/

340. Wu Y, Song Y, Xiong Y, Wang X, Xu K, Han B, et al. MicroRNA-21 (Mir-21) Promotes Cell Growth and Invasion by Repressing Tumor Suppressor PTEN in Colorectal Cancer. Cellular Physiology and Biochemistry [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2021 Dec 13];43(3):945–58. Available from: https://www.karger.com/Article/FullText/481648

341. Li C, Zhao L, Chen Y, He T, Chen X, Mao J, et al. MicroRNA-21 promotes proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer, and tumor growth associated with down-regulation of sec23a expression. BMC Cancer [Internet]. 2016 Aug 5 [cited 2021 Dec 13];16(1):1–11. Available from: https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-016-2628-z

342. Jiang R, Chen X, Ge S, Wang Q, Liu Y, Chen H, et al. MiR-21-5p Induces Pyroptosis in Colorectal Cancer via TGFBI. Frontiers in Oncology. 2021 Feb 5;10:3342.

343. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. Nature reviews Microbiology [Internet]. 2009 [cited 2021 Dec 13];7(2):99–109. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19148178/

344. Fang Y, Tian S, Pan Y, Li W, Wang Q, Tang Y, et al. Pyroptosis: A new frontier in cancer. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2021 Dec 13];121. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31710896/

345. Liu W, Qian K, Wei X, Deng H, Zhao B, Chen Q, et al. miR-27a promotes proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer by targeting FAM172A and acts as a diagnostic and prognostic biomarker. Oncology Reports [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2021 Jul 8];37(6):3554–64. Available from: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2017.5592/abstract

346. Barisciano G, Colangelo T, Rosato V, Muccillo L, Taddei ML, Ippolito L, et al. miR-27a is a master regulator of metabolic reprogramming and chemoresistance in colorectal cancer. British Journal of Cancer 2020 122:9 [Internet]. 2020 Mar 5 [cited 2021 Aug 2];122(9):1354–66. Available from: https://www.nature.com/articles/s41416-020-0773-2

347. Su C, Huang DP, Liu JW, Liu WY, Cao YO. miR-27a-3p regulates proliferation and apoptosis of colon cancer cells by potentially targeting BTG1. Oncology Letters [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2021 Dec 14];18(3):2825. Available from: /pmc/articles/PMC6676402/

348. Takahashi M, Cuatrecasas M, Balaguer F, Hur K, Toiyama Y, Castells A, et al. The Clinical Significance of MiR-148a as a Predictive Biomarker in Patients with Advanced Colorectal Cancer. PLOS ONE [Internet]. 2012 Oct 3 [cited 2021 Dec 14];7(10):e46684. Available from: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0046684

349. Chen Y, Song Y, Wang Z, Yue Z, Xu H, Xing C, et al. Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. Journal of Gastrointestinal Surgery [Internet]. 2010 Apr 27 [cited 2021 Dec 14];14(7):1170–9. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s11605-010-1202-2

350. Tsai HL, Yang IP, Huang CW, Ma CJ, Kuo CH, Lu CY, et al. Clinical significance of microRNA-148a in patients with early relapse of stage II stage and III colorectal cancer after curative resection. Translational Research. 2013 Oct 1;162(4):258–68.

351. Hibino Y, Sakamoto N, Naito Y, Goto K, Oo HZ, Sentani K, et al. Significance of miR-148a in Colorectal Neoplasia: Downregulation of miR-148a Contributes to the Carcinogenesis and Cell Invasion of Colorectal Cancer. Pathobiology [Internet]. 2015 Oct 9 [cited 2021 Dec 14];82(5):233–41. Available from: https://www.karger.com/Article/FullText/438826

352. H Z, Y L, Q H, X R, H H, H S, et al. MiR-148a promotes apoptosis by targeting Bcl-2 in colorectal cancer. Cell death and differentiation [Internet]. 2011 Nov [cited 2021 Aug 2];18(11):1702–10. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21455217/

353. Baltruskeviciene E, Schveigert D, Stankevicius V, Mickys U, Zvirblis T, Bublevic J, et al. Down-regulation of miRNA-148a and miRNA-625-3p in colorectal cancer is associated with tumor budding. BMC Cancer [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2021 Dec 14];17(1):1–10. Available from: https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3575-z

354. Nersisyan S, Galatenko A, Chekova M, Tonevitsky A. Hypoxia-Induced miR-148a Downregulation Contributes to Poor Survival in Colorectal Cancer. Frontiers in Genetics. 2021 May 31;12:778.

355. Zhu Y, Gu L, Li Y, Lin X, Shen H, Cui K, et al. miR-148a inhibits colitis and colitis-associated tumorigenesis in mice. Cell Death & Differentiation 2017 24:12 [Internet]. 2017 Sep 29 [cited 2021 Dec 14];24(12):2199–209. Available from: https://www.nature.com/articles/cdd2017151

356. Sur D, Burz C, Sabarimurugan S, Irimie A. Diagnostic and Prognostic Significance of MiR-150 in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Journal of Personalized Medicine [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Dec 14];10(3):1–12. Available from: /pmc/articles/PMC7563128/

357. Zhao YJ, Song X, Niu L, Tang Y, Song X, Xie L. Circulating exosomal mir-150-5p and mir-99b-5p as diagnostic biomarkers for colorectal cancer. Frontiers in Oncology. 2019;9(OCT):1129.

358. Wang WH, Chen J, Zhao F, Zhang BR, Yu HS, Jin HY, et al. MiR-150-5p suppresses colorectal cancer cell migration and invasion through targeting MUC4. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP [Internet]. 2014 [cited 2021 Dec 14];15(15):6269–73. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25124610/

359. Wang B, Shen ZL, Gao ZD, Zhao G, Wang CY, Yang Y, et al. MiR-194, commonly repressed in colorectal cancer, suppresses tumor growth by regulating the MAP4K4/c-Jun/MDM2 signaling pathway. Cell cycle (Georgetown, Tex) [Internet]. 2015 [cited 2021 Dec 14];14(7):1046–58. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25602366/

360. Li CF, Li YC, Wang Y, Sun LB. The Effect of LncRNA H19/miR-194-5p Axis on the Epithelial-Mesenchymal Transition of Colorectal Adenocarcinoma. Cellular Physiology and Biochemistry [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2021 Dec 14];50(1):196–213. Available from: https://www.karger.com/Article/FullText/493968

361. Ebrahimi F, Gopalan V, Wahab R, Lu CT, Anthony Smith R, Lam AKY. Deregulation of miR-126 expression in colorectal cancer pathogenesis and its clinical significance. Experimental Cell Research. 2015 Dec 10;339(2):333–41.

362. Li N, Li X, Huang S, Shen S, Wang X. [miR-126 inhibits colon cancer proliferation and invasion through targeting IRS1, SLC7A5 and TOM1 gene]. Zhong nan da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Central South University Medical sciences [Internet]. 2013 Aug [cited 2021 Dec 14];38(8):809–17. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23981989/

363. Wei L, Chen Z, Cheng N, Li X, Chen J, Wu D, et al. MicroRNA-126 Inhibit Viability of Colorectal Cancer Cell by Repressing mTOR Induced Apoptosis and Autophagy . OncoTargets and Therapy [Internet]. 2020 Mar 24 [cited 2021 Dec 14];13:2459–68. Available from: https://www.dovepress.com/microrna-126-inhibit-viability-of-colorectal-cancer-cell-by-repressing-peer-reviewed-fulltext-article-OTT

EKLER

EK2: KULLANILAN HÜCRE HATLARININ ÖZELLİKLERİ

Cell Line-1	**HT29 (HTB-38™)**
Species	Human (*Homo sapiens*)
Morphology	Epithelial
Tissue	Colon
Disease	Adenocarcinoma, colorectal
Growth properties	Adherent
Derivation	The HT-29 line was isolated from a primary tumor in 1964 by J. Fogh using the explant culture method.
Age	44 years
Ethnicity	White
Gender	Female
Karyotype	modal number = 71; range = 68 to 72. The stemline chromosome number is hypertriploid with the 2S component occurring at 2.4%. Seventeen marker chromosomes are found in most metaphases, generally in single copy per chromosome. The marker designations are: M1p-(=t(3p-;?) with a deleted short arm), t(7q;?), t(10q;?), i(13q), 19q+a; M6, ?t(8q;9q-), ?Xp, M9, 6q+, t(13;?)a, t(13;?)b, 19q+b, M14, M15, 15p+, and Xq-. Chromosome 13 is nullisomic and chromosomes 8 and 14 are generally

	monosomic. No Y chromosome was detected by QM band analysis.
Tumorigenic	Yes; Yes, in nude mice; forms well differentiated adenocarcinoma consistent with colonic primary (grade I); tumors also form in steroid treated hamsters ; myc+; ras+; myb+; fos+; sis+; p53+; abl-; ros-; src-
Antigen expression	Blood Type A; Rh+; HLA A1, A3, B12, B17, Cw5
Genes expressed	ecretory component of IgA; carcinoembryonic antigen (CEA); transforming growth factor beta binding protein; mucin; myc+; ras+; myb+; fos+; sis+; p53+; abl-; ros-; src-; blood type A; Rh+; (HLA: A1; A3; B12; B17; Cw5); cells CD4 negative; cell surface expression of galactose ceramide (a possible alternative receptor for HIV)
Isoenzymes	AK-1, 1 ES-D, 1 G6PD, B GLO-I, 1-2 Me-2, 1 PGM1, 1-2 PGM3, 1-2

Cell Line-2	Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells; Normal, Human (PCS-500-012™)
Species	Human (*Homo sapiens*)
Morphology	spindle shaped, fibroblast-like
Tissue	Bone
Disease	Normal
Growth properties	Adherent
Cell Type	Mesenchymal stem cell
Age	Adult
Gender	Lot-spesific

ÖZGEÇMİŞ

GENEL:

Adı Soyadı: Öznur Coşkun

Düzenlenme Tarihi: 10/01/2022

EĞİTİM:

ÜNİVERSİTE	**FAKÜLTE /ENSTİTÜ**	**ÖĞRENİM ALANI**	**DERECE**	**MEZUNİYET YILI**
Ankara Üniversitesi	Biyoteknoloji Enstitüsü	Temel Biyoteknoloji	**Doktora** Akademik Ortalama: 3,96 (95,55)	**2012- 2022**
Gazi Üniversitesi	Eğitim Fakültesi	Biyoloji Öğretmenliği	**Pedogojik Formasyon**	**2014**
Ankara Üniversitesi	Biyoteknoloji Enstitüsü	Temel Biyoteknoloji	**Yüksek Lisans** Akademik Ortalama: 3,74 (93,18)	**2008-2011**
Hacettepe Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	**Lisans** Akademik Ortalama: 3,29 (83,43)	**2003-2008**

MESLEKİ DENEYİM:

KURUM/KURULUŞ	BÖLÜM/BİRİM	GÖREV	GÖREV DÖNEMİ
Ankara Üniversitesi	Kök Hücre Enstitüsü	Biyolog	05/2016-devam ediyor
Ankara Üniversitesi	İbni Sina Hastanesi Merkez Laboratuvar Moleküler Mikrobiyoloji Birimi	Biyolog	03/2016 - 05/2016
Ankara Üniversitesi	Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji ABD Moleküler Patoloji Birimi	Biyolog	07/2011 - 03/2016
Ankara Üniversitesi	Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji ABD Moleküler Patoloji Birimi	Proje Asistanı	01/2010 - 07/2011
Ankara Üniversitesi	Biyoteknoloji Enstitüsü Genombilim Laboratuarı	Proje Asistanı	09/2008 - 01/2010
Hacettepe Üniversitesi	Çocuk Sağlığı Enstitüsü Metabolizma Araştırma Lab.	Stajyer	01/2008 - 03/2008
Ankara Üniversitesi	Biyoteknoloji Enstitüsü Genombilim Laboratuarı	Stajyer	07/2007 - 08/2007
Hacettepe Üniversitesi	Biyoloji Bölümü DNA Araştırma Laboratuarı	Özel Çalışma Öğrencisi	09/2006 - 06/2007
Hacettepe Üniversitesi	Biyoloji Bölümü Toksikoloji Laboratuarı	Özel Çalışma Öğrencisi	10/2005 - 09/2006

İLGİ ve UZMANLIK ALANLARI

Moleküler Biyoloji, Biyoteknoloji, Kanser Biyolojisi, Kök Hücre, DNA Dizileme Teknolojileri, Yeni Nesil Sekanslama, Real Time PCR,

AKADEMİK FAALİYETLER:

YAYINLAR

SCI, SSCI, AHCI İNDEKSLERİNE GİREN DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER
Utility investigation of automated techniques in hematopoietic progenitor cell count and viability assessment in the Good Manufacturing Practice (GMP) setting *P. Kılıç, M. Bay, P. Baydın S. Seker, **O. Coskun**, O. L. Ulker, M. Parmaksız, V.C. Bitirim, O. Cevheroğlu, G.C. Deniz, A. Ozturk, Ş. İpek, K. Dalva, A.E. Elçin, A. Yılmazer, G. Gürman* Experımental Bıomedıcal Research, 3(4), 231-238. 2020 Sept https://doi.org/https://doi.org/10.30714/j-ebr.2020463606
A CD34+Cell Enrichment Protocol of Hematopoietic Stem Cells in a Well-Established Quality Management System *P. Kılıç, M. Bay, Y. Yıldırım, **O. Coskun**, S. Seker, P. Baydın, O. L. Ulker, M. Parmaksız, G.C. Deniz, A. Yılmazer, K. Dalva, A.E. Elçin, K.C. Akçalı, O. İlhan, G. Gürman* Cells Tissues Organs, 2019, 1422-6405, 207, 1, 15-20
Evaluation Of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations And Thyroid Transcription Factor-1 Status In Turkish Non-Small Cell Lung Carcinoma Patients: A Study Of 600 Cases From A Single Center *Malahat Musayeva, Serpil Dizbay Sak, Hilal Özakinci, Şenay Boyacigil, **Öznur Coşkun***

Turk Gogus Kalp Damar Cerrahisi Derg. 2020 Jan 23;28(1):143-150.doi: 10.5606/tgkdc.dergisi.2020.18196. eCollection 2020 Jan.

Clinical and pathological characteristics of gastrointestinal stromal tumor (GIST) metastatic to bone.

Kosemehmetoglu K, Kaygusuz G, Fritchie K, Aydin O, Yapicier O, ***Coskun O****, Karatayli E, Boyacigil S, Guler G, Dervisoglu S, Kuzu I.*

Virchows Arch. 2017 Jul;471(1):77-90. doi: 10.1007/s00428-017-2138-7.

Optimization of gene expression microarray protocol for formalin-fixed paraffin-embedded tissues.

Belder N, ***Coşkun Ö****, Erdoğan BD, Savaş B, Ensari A, Özdağ H.*

Genom Data. 2016 Feb 6;7:303-6. doi: 10.1016/j.gdata.2016.02.006.

From RNA isolation to microarray analysis: Comparison of methods in FFPE tissues.

Belder N, ***Coskun Ö****, Doganay Erdogan B, Ilk O, Savas B, Ensari A, Özdağ H.*

Pathol Res Pract. 2016 Feb 12. pii: S0344-0338(15)30038-8. doi:10.1016/j.prp.2015.11.008.

Prevalence of K-Ras mutations in hepatocellular carcinoma: A Turkish Oncology Group pilot study.

Turhal NS, Savaş B, ***Çoşkun Ö****, Baş E, Karabulut B, Nart D, Korkmaz T, Yavuzer D, Demir G, Doğusoy G, Artaç M.*

Mol Clin Oncol. 2015 Nov;3(6):1275-1279.

BİLDİRİLER

SÖZLÜ BİLDİRİLER
“Epidermal Growth Receptor Mutations And Ttf-1 Status In Turkish Non-small Cell Lung Carcinoma Cases” *M. Musayeva, S. Dizbay Sak, Ş. Köm,* ***Ö. Çoşkun,*** Xxxı International Congress Of Iap And 28th Congress Of The Esp, 25 Eylül 2016, 29 Eylül 2016, **Almanya**
“Akciğer Kanserinde EGFR Mutasyonu” *Dizbay Sak S. ,* ***Çoşkun Ö****. , Boyacigil Ş., Ceyhan K.* 23.Ulusal Patoloji Kongresi, 6-10 Kasım 2013, **İzmir**
“**Kolorektal Kanser Öncü Lezyonlarında KRAS ve BRAF Onkogen Mutasyon Profili”** ***Erdoğan Ö****, Savaş B,Belder N, Ensari A.* XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2011, **Antalya**
“Kolorektal Karsinomda Kras Gen Mutasyon Profili Ve Sıklığı: AÜTF Deneyimi” ***Erdoğan Ö****, Savaş B, Özdağ H, Kurşun N, Ensari A.* 20. Ulusal Patoloji Kongresi, 30 Eylül-2 Ekim 2010,**Eskişehir**
POSTER BİLDİRİLERİ
Epidermal growth receptor mutations and TTF-1 status in Turkish non-small cell lung carcinoma cases *M. Musayeva*, S. Dizbay Sak, S. Boyacigil,* ***O. Coskun****, Z. Gencturk* XXXI International Congress of the IAP and 28th Congress of the ESP, 25-29 September 2016 **Germany**

"'Akciger kanserinde EGFR mutasyon profili: AUTF deneyimi" *Boyacıgil S,* ***Coskun O****, Musayeva M, Dizbay Sak S* XIV. Ulusal Tibbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2015, **Muğla**
"Gastrointestinal Stromal Tumor Metastatic to Bone: Clinicopathological and Molecular Features of 29 Cases, Including 8 Previously Unreported Cases" *Kemal Kosemehmetoglu*; Gulsah Kaygusuz; Karen Frithcie; Ovgu Aydin; Ozlem Yapicier;* ***Oznur Coskun MS;*** Ersin *Karatayli PhD; Gulnur Guler; Isinsu Kuzu; Sergulen Dervisoglu* 102nd Annual Meeting of the United States & Canadian Academy of Pathology (USCAP 2013) 2-8 Mart 2013 **Baltimore, MD, USA**
"Differential Mutation Patterns of KRAS and BRAF ın Adenomatous and Serrated Neoplastıc Sequences" ***Erdoğan Coskun O****, Savas B, Ensari A* 24th European Congress of Pathology, 8 - 12 Eylül 2012,**Çek Cumhuriyeti**

VERDİĞİ EĞİTİMLER

Temizlik Validasyon Planlaması Eğitimi, 23/01/2019, **Ankara**

KATILDIĞI KURS ve EĞİTİMLER

BİLİMSEL KURSLAR
Ankara Üniversitesi İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi, 03/04/2019, **Ankara**
Biyoinformatik ' Omik' Veri Analiz Yöntemleri ve Kişisel Tıp Uygulamaları Kursu,26/10/2015,**Muğla**

Proje Hazırlama, Yazma ve Yürütme Eğitimi Eğitimi, 23/02/2015, **Ankara**
Ankara Üniversitesi İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitimi, 06/07/2014, **Ankara**
Qiagen SABioscience Real Time PCR Tabanlı Gen Ekspresyonu, Mutasyon ve Metilasyon Profilleme Semineri, 29/03/2012, **Ankara**
Moleküler Biyolojide Yeni Teknolojiler Kursu, 26/10/2011, **Antalya**
II. Tüba Kök Hücre Kursu ve VI. Kök Hücre Sempozyumu, 24-25/06/2011, **Ankara**
I. Biyoteknoloji Araştırma ve Kariyer Günü, 25/05/2009, **Ankara**
CİHAZ EĞİTİMLERİ (UYGULAMALI)
Pyros Kinetix Flex (Turbidimetrik Metod Bakteriyel Endotoksin Test ve Validasyonu) Cihaz eğitimi, 14/11/2018, **Ankara**
Bactec Fx40 (Sterilite Test Revalidasyonu) Cihaz Eğitimi, 14/11/2018, **Ankara**
Flow Sitometri (Akan Hücre Ölçer) Cihaz Eğitimi, 08/08/2018**, Ankara**
CliniMACS Prodigy Systems (CD34 Seleksiyon İşlemi), 10/2018**, Ankara**
Thermo CO_2 İnkübatörü Cihaz Eğitimi (Cihaz Temizliği ve Kontrakon İşlemi) 13/09/2017, **Ankara**
Bactec Fx40 (Sterilite Testi) Cihaz Eğitimi, 24/08/2017, **Ankara**
Zeiss Axiovision Floresan Mikroskop Cihaz Eğitimi, 07/2017, **Ankara**
CliniMACS (CD34 Seperation) Cihaz Eğitimi, 24-27/10/2016**, Ankara**
Thermo Finesse ME + Mikrotom Cihazı Eğitimi, **Ankara**
Implen P330 Model UV Visible Sistemi ve Software Eğitimi, **Ankara**

Roche Light Cycler 480 II (Real Time PCR Sistemi) Eğitimi, 12-16/10/2009, **Ankara**
BioRad C1000 96 well / 48 Well Dual PCR Cihaz Eğitimi, 2-3/02/2012, **Ankara**
Roche GS Junior (Yeni Nesil Sekanslama Sistemi) Eğitimi, 04-08/07/2012, **Ankara**
ABI 310 /3130 DNA Sekans ve Fragment Eğitimi, 10-14/03/2014, **Ankara**
Bilser Biyogüvenlik Kabini Eğitimi, 14-16/09/2015, **Ankara**
KATILDIĞI EĞİTİMLER (TEORİK)
Temizlik ve GMP Eğitimi, 27/12/2017, **Ankara**
CliniMACS İşlem Hesapları Eğitimi, 17/01/2018, **Ankara**
Güncel Kalite Yönetim Sistemi Eğitimi, 07/02/2018, **Ankara**
Labaratuvar Güvenliği Eğitimi, 30/05/2018, **Ankara**
Kalite Yönetim Sisteminin Ar-Ge Labaratuvarlarına Uyarlanması Eğitimi, 04/07/2018, **Ankara**
Validasyon Süreçlerinde Kullanılan Mikroorganizmaların Özellikleri, 14/11/2018, **Ankara**
Kalite Yönetim Ssitemi DÖF (Düzenleyici Önleyici Faaliyet) Kaideleri Eğitimi, 02/01/2019, **Ankara**
Rejeneratif ve Restoratif Araştırma ve Uygulamarındasn Etik ve Yasal Düzenlemeler Boyutu, 02/01/2019, **Ankara**

KATILDIĞI KONGRELER

1. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30/10/2015, **Muğla**

2. 17th Meeting of The European Association for Haematopathology, 17-22/10/2014, **İstanbul**
3. 23.Ulusal Patoloji Kongresi, 6-10 Kasım 2013, **İzmir**
4. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2011, **Antalya**
5. 20. Ulusal Patoloji Kongresi, 30 Eylül-2 Ekim 2010, **Eskişehir**

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Turkish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 2020;28(1):143-150
http://dx.doi.org/doi: 10.5606/tgkdc.dergisi.2020.18196

Original Article / Özgün Makale

Evaluation of epidermal growth factor receptor mutations and thyroid transcription factor-1 status in Turkish non-small cell lung carcinoma patients: A study of 600 cases from a single center

Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlu Türk hastalarda epidermal büyüme faktör reseptör mutasyonları ve tiroid transkripsiyon faktör-1 durumunun değerlendirilmesi: Tek merkezli 600 hastalık çalışma

Malahat Musayeva, Serpil Dizbay Sak, Hilal Özakıncı, Şenay Boyacıgil, Öznur Coşkun

Department of Medical Pathology, Ankara University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey

ABSTRACT

Background: This study aims to investigate the frequency, distribution, and morphological/immunohistochemical features of epidermal growth factor receptor mutations and to examine the possible relationship between the material type and technical success of mutation analysis in Turkish population with non-small cell lung cancer.

Methods: Between September 2012 and December 2015, a total of 499 consecutive, treatment-naïve patients (437 males, 163 females; mean age 61 years; range, 30 to 84 years) with primary or metastatic non-small cell lung cancer who underwent epidermal growth factor receptor mutation testing using Sanger sequencing method were retrospectively analyzed. Archival records and hematoxylin-eosine and immunohistochemically stained sections were re-examined. The thyroid transcription factor-1 and napsin A immunohistochemical stains were performed on tissue array blocks.

Results: Seventy-five mutations were detected in 70 patients (14%). The success rate of testing and intact deoxyribonucleic acid fragment length were significantly higher in the cytological material, compared to tissue specimens ($p<0.001$). The mutation rate in adenocarcinomas was 33.9% for women and 9.4% for men. The most common mutation was L746-E750del in exon 19 (29.3%), followed by the L858R mutation in exon 21 (28%). The mutation rate was the highest in micropapillary (40%) and lowest in solid (5.4%) adenocarcinomas. All epidermal growth factor receptor mutations, except for one, were positive for the thyroid transcription factor-1. The single nucleotide polymorphism Q787Q in exon 20 was observed in 79.6% of patients.

Conclusion: The frequency and distribution of epidermal growth factor receptor mutations in the Turkish patients with non-small cell lung cancer are similar to the European populations. These results also demonstrate that cytological materials are highly reliable for epidermal growth factor receptor mutation testing, and the probability of detection of wild-type epidermal growth factor receptor is low in cases of thyroid transcription factor-1 negativity.

Keywords: Epidermal growth factor receptor, napsin A, non-small cell lung cancer, thyroid transcription factor-1, Turkish population.

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada küçük hücreli dışı akciğer kanserli Türk topolumunda epidermal büyüme faktör reseptör mutasyonlarının sıklığı, dağılımı ve morfolojik/immünhistokimyasal özellikleri araştırıldı ve materyal tipi ve mutasyon analizinin teknik başarısı arasındaki muhtemel ilişki incelendi.

Çalışma planı: Eylül 2012 - Aralık 2015 tarihleri arasında Sanger sekanslama yöntemi ile epidermal büyüme faktör reseptör mutasyon testi yapılan, daha önce tedavi edilmemiş, primer veya metastatik küçük hücreli dışı akciğer kanserli toplam 499 ardışık hasta (437 erkek, 163 kadın; ort. yaş 61 yıl; dağılım, 30-84 yıl) retrospektif olarak incelendi. Arşiv kayıtları ve hematoksilen-eozin ve immünohistokimya boyalı kesitler yeniden değerlendirildi. Doku array bloklarında tiroid transkripsiyon faktör-1 ve napsin A immünohistokimyasal boyamaları yapıldı.

Bulgular: Yetmiş hastada (%14) 75 mutasyon saptandı. Sitolojik materyallerde analizin başarı oranı ve intakt deoksiribonükleik asit parça uzunluğu, doku materyallerine kıyasla, anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0.001$). Kadınlarda mutasyon oranı %33.9 ve erkeklerde %9.4 idi. En sık görülen mutasyon ekzon 19'da L746-E750del (%29.3) olup, bunu ekzon 21'de L858R (%28) mutasyonu izledi. Mutasyon oranı en yüksek mikropapillerde (%40) ve en düşük solid adenokarsinomalarda (%5.4) izlendi. Biri hariç, epidermal büyüme faktör reseptör mutasyonlarının tümünde tiroid transkripsiyon faktör-1 pozitifliği mevcut idi. Hastaların %79.6'sında ekzon 20'de tekli nükleotid polimorfizmi (Q787Q) izlendi.

Sonuç: Küçük hücreli dışı akciğer kanserli Türk hastalarda epidermal büyüme faktör reseptör mutasyonlarının görülme sıklığı ve dağılımı Avrupa toplumları ile benzerdir. Ayrıca bu sonuçlar, epidermal büyüme faktör reseptör mutasyon analizi için sitolojik materyallerin son derece güvenilir olduğunu göstermekle birlikte, tiroid transkripsiyon faktör-1 negatif olgularda mutasyona rastlama ihtimali çok düşüktür.

Anahtar sözcükler: Epidermal büyüme faktör reseptörü, napsin A, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, tiroid transkripsiyon faktör-1, Türk toplumu.

Received: April 27, 2019 *Accepted:* September 17, 2019 *Published online:* January 23, 2020

Correspondence: Serpil Dizbay Sak, MD. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, 06590 Çankaya, Ankara, Türkiye.
Tel: +90 532 - 620 03 23 e-mail: serpil.d.sak@medicine.ankara.edu.tr

Cite this article as:
Musayeva M, Dizbay Sak S, Özakıncı H, Boyacıgil Ş, Coşkun Ö. Evaluation of epidermal growth factor receptor mutations and thyroid transcription factor-1 status in Turkish non-small cell lung carcinoma patients: A study of 600 cases from a single center. Turk Gogus Kalp Dama 2020;28(1):143-150

Lung carcinoma is the leading cause of cancer deaths worldwide.[1,2] The majority of lung carcinomas are non-small cell lung carcinomas (NSCLC), and adenocarcinoma is the most frequent type.[3,4] An important proportion of NSCLC cases is diagnosed at advanced stage and a candidate for chemotherapy and/or personalized therapies.[3,5] The epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are important tools in the treatment of NSCLC patients whose tumors show mutations in the EGFR gene.[1,5] Therefore, molecular testing for EGFR mutation has become an essential part of pathological examination in the last decade. The EGFR mutation is more frequent in female and non-smoker patients.[3,6] The mutation rate also shows variation between different ethnic groups, being higher in Asians[1,2,7] and lower in Europeans.[3,5,8] Although there are some reports regarding EGFR mutations from Turkey, most of these are smaller series, and targeted methods are used in larger series.[4,9-18] As a result, little is known about the exact profile of EGFR mutations in the Turkish NSCLC patients.

Thyroid transcription factor-1 (TTF-1), a transcription factor involved in normal thyroid and lung development, plays an active role in sustaining lung cancer and has been proved to be a highly specific and sensitive immunohistochemical marker for lung adenocarcinomas.[19] The TTF-1 expression has been shown to be associated with female gender, never-smoking status, and presence of EGFR mutations.[19,20] Napsin A is an aspartic protease presenting in the epithelial cells of the lung and is expressed in type 2 pneumocytes and also in alveolar macrophages.[19] Napsin A staining is associated with TTF-1 expression and presence of EGFR mutations.[19,20]

In the present study, we aimed to investigate the frequency and distribution of EGFR mutations in the Turkish population with NSCLC and to identify relationship between the TTF-1 and napsin A staining and EGFR mutations.

PATIENTS AND METHODS

This single-center, retrospective study was conducted at Ankara University Faculty of Medicine between September 2012 and December 2015. A total of 600 consecutive, treatment-naïve patients (437 males, 163 females; mean age 61 years; range, 30 to 84 years) with primary or metastatic NSCLC who underwent EGFR mutation testing using the Sanger sequencing method in our pathology lab, irrespective of the tumor stage, were retrospectively analyzed. The specimens were obtained by resection (n=212), biopsy (n=196), and cytology (n=192). Of the tumors, 397 were primary and 203 were metastatic tumors. The primary source of the material was one of the two hospitals of our university in 409 patients and specimens were consultation materials sent for EGFR mutation analysis in the remaining 191 patients.

All hematoxylin and eosin (H-E) stained slides of 600 patients were retrieved from archives and reclassified according to the 2015 World Health Organization (WHO) classification of lung tumors. Carcinomas with adequate tumor tissues were reevaluated for the tumor patterns (i.e., acinar, lepidic, papillary, micropapillary or solid) using a cut-off value of 5%.

A written informed consent was obtained from each patient. The study protocol was approved by the Ankara University Medical School Human Research Ethics Committee (20th April 2015). The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

Immunohistochemistry

The TTF-1 and/or napsin A stained slides were reviewed, when available. Tissue array blocks were prepared for 57 cases, which were not evaluated for TTF-1 and/or napsin A at the time of the initial diagnosis. Four-micrometer-thick sections were stained for TTF-1 (8G7G3/1, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) and napsin A (TMU-AD2, Biocare Medical, Pacheco, CA, USA) by streptavidin-biotin peroxidase method using the UltraView Universal DAB Detection Kit on a Ventana (BenchMark XT, Woonsocket, RI, USA) stainer and evaluated on the light microscope (Olympus BX50, Olympus Inc., Tokyo, Japan). For stained cases for TTF-1 and/or napsin A at the time of the initial diagnosis (TTF-1 n=320; napsin A n=293), immunohistochemically stained sections were retrieved and reevaluated with the same criteria. In consultation cases, whose slides and paraffin blocks were not available for tissue array preparation, pathology reports from the external institutions were examined and the TTF-1 and/or napsin A staining results were recorded, if available (TTF-1 n=100; napsin A n=53).

Sequencing

The EGFR mutations in exons 18, 19, 20, and 21 were detected by polymerase chain reaction-based direct Sanger sequencing. Deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted from the formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue obtained from resection or biopsy specimens. For cytological materials, air dried and May Grünwald Giemsa (MGG) stained slides were preferred, when cellularity was adequate; however,

Table 1. Sequences of the primers for EGFR exon 18, 19, 20, and 21

Exon	Forward primer	Reverse primer
18	5'-gctgaggtgaccettgtctc-3'	5'-acagettgcaaggactctgg-3'
19	5'-gctggtaacatccacccaga-3'	5'-gagaaaaggtgggcctgag-3'
20	5'-catgtgcccctccttctg-3'	5'-gatcctggctccttatctcc -3'
21	5'-cctcacagcagggtcttctc-3'	5'-cctggtgtcaggaaaatgct-3'

EGFR: Epidermal growth factor receptor.

sections from the FFPE cell blocks were also used, where applicable. The DNA extraction was performed using a commercial kit (QIAamp DNA FFPE tissue kit, Qiagen, Hilden, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. Sequencing was performed on an automated single-capillary genetic analyzer (ABI 310; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with forward and reverse primers (Table 1) separately, and final nucleotide changes were detected by comparing the sequence with the National Center for Biotechnology Information database (reference sequence: NM_005228.2).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS for Windows version 15.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Descriptive data were expressed in mean ± standard deviation (SD), median (min-max), or number and frequency. The EGFR status and clinicopathologic features were analyzed using the chi-square or Fisher's exact test. Pearson correlation analysis was performed to analyze possible correlations between variables. A p value of <0.05 was considered statistically significant.

Table 2. Clinical characteristics and results of EGFR mutation testing (n=499)

	EGFR wild type (n=429)			EGFR mutated (n=70)			
	n	%	Mean±SD	n	%	Mean±SD	p
Age (year)			62.2±10.6			60.6±10.3	>0.05
Gender							<0.001
Female	98	69.5		43	30.5		
Male	331	92.5		27	7.5		
Histological diagnosis							=0.001
Adenocarcinoma	320	82.9		66	17.1		
NSCLC-NOS	78	95.1		4	4.9		
Others	31	100		0	0		
Material type							>0.05
Biopsy	128	86.5		20	13.5		
Resection	143	84.6		26	15.4		
Cytology	158	86.8		24	13.2		
Site							>0.05
Primary	276	84.4		51	15.6		
Metastatic	152	88.9		19	11.1		
Histological subtype							=0.029
Lepidic	16	64		9	36		
Acinar	64	82.1		14	17.9		
Papillary	4	80		1	20		
Micropapillary	3	60		2	40		
Solid	35	94.6		2	5.4		

EGFR: Epidermal growth factor receptor; SD: Standard deviation; NSCLC-NOS: Non-small cell lung carcinoma-not otherwise specified.

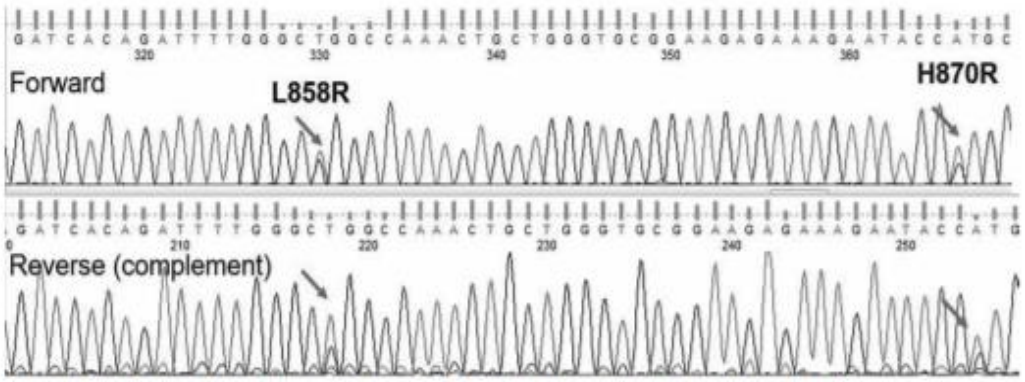


Figure 1. DNA sequencing electropherogram of a doublet mutation (p.H870R+p.L858R) in exon 21 of EGFR gene.
DNA: Deoxyribonucleic acid; EGFR: Epidermal growth factor receptor.

RESULTS

EGFR mutations

Of a total of 600 patients included in the study, the EGFR mutation testing was successful in 499 patients. Clinical characteristics and the outcome of EGFR mutation analysis of successful cases are shown in Table 2. In 495 cases, analyses of all four exons were successful. In additional four cases, an EGFR mutation was detected in one exon, while the analysis of one or more of the remaining exons were unsuccessful. The overall mutation rate was 14% in this series, and of 141 women, 43 (30.5%) showed EGFR mutation, which was more frequent than men (27/358, 7.5%) ($p<0.001$). The EGFR mutations were more frequent in adenocarcinomas (33.9% in women, 9.4% in men), compared to NSCLC-not otherwise specified cases ($p=0.001$). In 67 cases, either DNA extraction was unsuccessful or we were unable to obtain any amplicon. Mutation analysis was able to be performed for only one, two, and three exons; in one, seven, and 30 cases, respectively (n=4 among 38 cases who showed EGFR mutation in one exon and were considered successful per protocol).

Regarding the specimen type, cytological specimens showed the best DNA quality, median DNA fragment length being 600 bp, 400 bp, and 400 bp in cytological, resection and biopsy specimens, respectively ($p<0.001$). Analytical success was higher in cytological specimens ($p<0.001$); 94.8% of cytological specimens, 77.8% of resectional specimens, and 75.5% of biopsy specimens were examined for all four exons. However, analytical success was poor in decalcified specimens ($p<0.001$) and in consultation cases ($p=0.02$).

In this series, a total of 75 mutations were detected in 70 of 499 cases (14%); 5 mutations in exon 18 (6.7%), 40 mutations in exon 19 (53.3%), seven mutations in exon 20 (9.3%), and 23 mutations in exon 21 (30.7%). Of 75 mutations including double mutations in five patients are documented in Table 3 and Figure 1. In addition, 79.6% of our cases showed heterozygous or homozygous single nucleotide polymorphism (SNP) Q787Q in exon 20.

In 179 cases, a predominant adenocarcinoma pattern was evaluated. The most frequent primary pattern was acinar pattern (51.4%), followed by solid (22.9%), lepidic (17.9%), papillary (4.5%), and micropapillary (3.4%) patterns. The EGFR mutations were the most frequently detected in micropapillary adenocarcinomas and rare in solid adenocarcinomas, indicating a significant correlation between the EGFR mutation status and dominant pattern ($p=0.029$). In 11 of 14 (78.6%) EGFR-mutant acinar adenocarcinomas, mutation was located on exon 19; however, it did not reach statistical significance.

TTF-1 and napsin A

The TTF-1 and napsin A expressions were detected in 477 and 403 cases, respectively. In 75.7% and 72.5% of the cases, TTF-1 and napsin A were positive, respectively. Among 57 EGFR-mutant cases, whose TTF-1 expression was also detected, 56 (98.2%) were positive and only one case was negative for TTF-1. Among 48 EGFR-mutant cases, whose napsin A expression was detected, 46 (95.8%) were positive and only two cases were negative for napsin A. The TTF1 positivity and napsin A staining were strongly correlated with the presence of EGFR mutations ($p<0.001$).

Table 3. Genomic alterations in tyrosine kinase domain (exons 18-21) of EGFR gene

Exon	Mutation type	Amino acid change	Diagnosis	Gender	No (%)
18	Missense	p.G719S	ADC	F	1 (1.4)
		p.P699S	ADC	M	
19	Deletion/	p.E746_A750	22ADC	12F/10M	22 (31.6)
	insertion	p.E747_S752	3ADC; 1NSCLC-NOS	2F/2M	4 (5.8)
		p.E747_T751	2ADC	1F/1M	2 (2.9)
		p.E747_P753	2ADC	2F	2 (2.9)
		p.E746_T751>VAins	2ADC	1F/1M	2 (2.9)
		p.K745_E749	ADC	F	1 (1.4)
		p.E746_T751insI	ADC	F	1 (1.4)
		p.L747_A750 insP	ADC	F	1 (1.4)
		p.E746_P753>VSins	ADC	M	1 (1.4)
		p.S752_I759	ADC	F	1 (1.4)
		p.K745_E750	ADC	F	1 (1.4)
		p.746_753insATAT	ADC	M	1 (1.4)
		p.T751_A755insAT	ADC	F	1 (1.4)
20	Missense	p.S768I	NSCLC-NOS	M	1 (1.4)
	Deletion/	p.H773_774 insH	ADC	M	1 (1.4)
	insertion/	p.V769_D770insASV	ADC	F	1 (1.4)
	duplication	p.D770_N771insAWT	ADC	F	1 (1.4)
		p.S768_D770 dupSVD	ADC	F	1 (1.4)
21	Missense	p.L858R	17ADC 1NSCLC-NOS	13F/5M	18 (25.9)
Doublets					
18+18	Missense	p.E709A+p.G719A	ADC	M	1 (1.4)
18+20		p.G719C+p.S768I	ADC	M	1 (1.4)
20+21		p.T790M+p.L858R	NSCLC-NOS	F	1 (1.4)
21+21		p.H870R+p.L858R (Figure 1)	ADC	F	1 (1.4)
21+21		p.V834L+p.L858R	ADC	M	1 (1.4)

A: Alanine; ADC: Adenocarcinoma; D: Aspartic acid; E: Glutamic acid; G: Glycine; H: Histidine; I: Isoleucine; K: Lysine; L: Leucine; N: Asparagine; NSCLC-NOS: Non-small cell lung carcinoma-Not otherwise specified; P: Proline; R: Arginine; S: Serine; T: Threonine; V: Valine; EGFR: Epidermal growth factor receptor.

DISCUSSION

The role of EGFR in carcinogenesis clarified in the 1980s and the first EGFR-TKIs were synthesized in the 1990s. The EGFR somatic mutation frequencies differ among ethnic groups and geographic regions, and Asians show the highest EGFR mutation prevalence worldwide ranging from 33.7 to 59%,[1,2,7] followed by Latin Americans (26%),[21] and it is the lowest in Europeans (5.4 to 15%).[3,5,8]

Our study represents the largest, single-center experience on EGFR mutation status of the Turkish NSCLC patients as assessed by a screening method. We found EGFR mutation in 14% of our patients, which is consistent with the results of other studies from Europe.[8] The results of studies on the Turkish NSCLC patients show a great variation and ranges from 4 to 48.1%.[4,9-18] The number of cases in the series reporting the highest (48.1%, 37.5%, and 44%, respectively) and lowest (4%, 7.1%, 8%, respectively) frequency of EGFR mutations varies between 40 and 52.[9,10,15] Larger series from Turkey including 122, 218, 300, and 959 cases showed an EGFR mutation rate of 14.39%, 28.9%, 15%, and 16.7%, respectively.[4,13,17,18] This discrepancy may be related with small sample size and different methods used in these studies. Even in some of these studies, different methods were used for EGFR mutation testing within the same study,[4,17] and all of four exons were not examined in some others.[9,14,15] In our study, the Sanger sequencing method, which has a low sensitivity, was used, and tumor concentration increased by dissection of tumor from slides. As a result, we believe that 14% EGFR mutation frequency represents the Turkish NSCLC patients successfully. We also believe that using a screening method, which investigate both known and

unknown mutations, is more useful than the targeted methods to detect all mutations present in a newly studied population similar to ours. However, this rate can be expected to increase with a more sensitive analysis method. Similar to previous studies, the most common EGFR mutations were short, in-frame deletions in exon 19, and L858R point mutation in exon 21.[1,3,7] The mutations observed in exon 19 are ranked first in terms of the frequency of EGFR mutations and are reported to be associated with a good response to EGFR-TKIs.[1,7,8] Among all EGFR mutations, the exon 19 mutation rate was found to be 31.55 to 67.8% in European[3,5,8] and 39.4 to 48% in Asian populations.[1,2,7] In this study, EGFR mutations in exon 19 represented 53.3% of all EGFR mutations, and 55% of exon 19 mutations were p.E746_A750del, similar to a previous study.[3] In our study, we detected very rare mutational events in exon 19 (p.746_753insATAT and p.T751_A755insAT), which has not been reported in the literature to date.

Exon 21 mutations are the second most common type of mutations among EGFR mutant cases, p.L858R being the most frequent.[1,5,18] Accordingly, the frequency of exon 21 mutations was 30.7% in this study, while the exon 21 mutation rate was 27.04 to 46.4% in European[3,5,8] and 43 to 49.8% in Asian cohorts.[1,2,7]

Mutations observed in exon 20 are mainly observed as insertion or point mutations and associated with de novo resistance to EGFR-TKIs.[1] The exon 20 mutation rate was reported to be 1.29 to 10.3% in European[3,5,8] and 3.4 to 9.3% in Asian cohorts.[1,2,7] In our study, we observed that EGFR mutations in exon 20 constituted 9.3% of all EGFR mutations.

Mutations in exon 18 are relatively rare and most are point mutations.[7] Frequency of mutations in exon 18 are reported to be 1.29 to 3.2% in European[3,5,8] and 3 to 6.5% in Asian populations.[1,2,7] In our study, EGFR mutations in exon 18 represented 6.7% of all EGFR mutations, and we identified five patients (7.1%) with complex mutations (p.T790M+p.L858R, p.L858R+p.H870R, p.E709A+p.G719A, p.L858R+p.V834L, p.G719C+p.S768I).

In previous studies investigating the relationship between the dominant adenocarcinoma pattern and EGFR mutations, solid adenocarcinomas were mostly associated with the wild-type EGFR.[6,22] Similarly, the lowest EGFR mutation rate was observed in solid adenocarcinomas in the present study. In addition, micropapillary adenocarcinomas showed the highest incidence of EGFR mutations consistent with some previous reports.[6,22]

On the other hand, there is a limited number of studies evaluating the relationship between the mutation types and dominant pattern. As shown in a previous study, reporting exon 19 mutations were more common in acinar adenocarcinomas, and 11 of 14 cases (78.6%) showed mutations in exon 19 with an acinar pattern.[22] This rate is of relevance, when compared to 53.3% overall frequency of exon 19 mutations in this series. Despite this, it did not reach statistical significance ($p>0.05$). However, further studies with larger series may be useful to reveal a significant relationship.

In previous studies, TTF-1 positivity was observed in 89.4 to 99% of EGFR-mutant tumors, whereas TTF-1 was negative in only 1 to 10.6% of cases.[4,20] Our study results showed a significant correlation between the EGFR mutational status and TTF-1 protein expression, indicating that patients with TTF-1-negative adenocarcinomas had at least a 99% chance of being wild-type EGFR. Although TTF-1 status should not be used to include or exclude cases for EGFR testing, it may be used for prioritizing molecular tests in resource-poor settings or when the available tissue is not adequate for all molecular tests.

Lee et al.[19] and Jie-Liu et al.[20] reported that napsin A positivity rate was 94.6%, and 72.3%, respectively in EGFR mutant cases. Our study results demonstrated a significant association between napsin A expression and EGFR mutation, consistent with the results of Lee et al[19] and Jie et al.[20]

Furthermore, in our study we observed a high frequency (79.6%) of SNP Q787Q in the EGFR gene which is more common in Caucasians (23 to 28.3%)[23] than in Asians (70.6 to 82.7%).[24,25] This SNP frequency was 79% in the EGFR-mutant cases and 80% in wild-type cases, probably due to ethnic origin, rather than a disease-related phenomenon.

In the present study, we also showed that cytological materials were highly reliable for EGFR mutation testing. Cytological specimens showed a higher DNA fragment length, compared to surgical and biopsy specimens, showing a higher DNA quality, which can be attributed to the lack of damaging effect of formalin fixation on DNA. Analytical success rate was also higher in cytological specimens.

The main limitation of the study is the low sensitivity of Sanger sequencing. Variants with low allele frequency were unable to be detected in the FFPE blocks or cytological specimens which had limited tumor cells (>20%).

In conclusion, the frequency and distribution of epidermal growth factor receptor mutations in the Turkish patients with non-small cell lung cancer are similar to the European populations. These results also demonstrate that cytological materials are highly reliable for epidermal growth factor receptor mutation testing, and thyroid transcription factor-1 negativity appears to be a good predictor of wild-type mutations. Further large-scale, prospective studies are needed to gain a better understanding of this issue.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

Funding

The authors received no financial support for the research and/or authorship of this article.

REFERENCES

1. Lai Y, Zhang Z, Li J, Sun D, Zhou Y, Jiang T, et al. EGFR mutations in surgically resected fresh specimens from 697 consecutive Chinese patients with non-small cell lung cancer and their relationships with clinical features. Int J Mol Sci 2013;14:24549-59.
2. Sun PL, Seol H, Lee HJ, Yoo SB, Kim H, Xu X, et al. High incidence of EGFR mutations in Korean men smokers with no intratumoral heterogeneity of lung adenocarcinomas: correlation with histologic subtypes, EGFR/TTF-1 expressions, and clinical features. J Thorac Oncol 2012;7:323-30.
3. Papadopoulou E, Tsoulos N, Tsirigoti A, Apessos A, Agiannitopoulos K, Metaxa-Mariatou V, et al. Determination of EGFR and KRAS mutational status in Greek non-small-cell lung cancer patients. Oncol Lett 2015;10:2176-84.
4. Ozluk Y, Firat P, Yegen G, Hocaoglu J, Tas S, Yilmazbayhan D. EGFR mutation testing using archival-stained smears in non-small cell lung carcinoma. Cytopathology 2017;28:35-45.
5. Skov BG, Høgdall E, Clementsen P, Krasnik M, Larsen KR, Sørensen JB, et al. The prevalence of EGFR mutations in non-small cell lung cancer in an unselected Caucasian population. APMIS 2015;123:108-15.
6. Chen Z, Liu X, Zhao J, Yang H, Teng X. Correlation of EGFR mutation and histological subtype according to the IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma. Int J Clin Exp Pathol 2014;7:8039-45.
7. Ninomiya H, Hiramatsu M, Inamura K, Nomura K, Okui M, Miyoshi T, et al. Correlation between morphology and EGFR mutations in lung adenocarcinomas Significance of the micropapillary pattern and the hobnail cell type. Lung Cancer 2009;63:235-40.
8. Szumera-Ciećkiewicz A, Olszewski WT, Tysarowski A, Kowalski DM, Głogowski M, Krzakowski M, et al. EGFR mutation testing on cytological and histological samples in non-small cell lung cancer: a Polish, single institution study and systematic review of European incidence. Int J Clin Exp Pathol 2013;6:2800-12.
9. Cetin Z, Ozbilim G, Erdogan A, Luleci G, Karauzum SB. Evaluation of PTEN and Mcl-1 expressions in NSCLC expressing wild-type or mutated EGFR. Med Oncol 2010;27:853-60.
10. Baykara O, Tansarikaya M, Demirkaya A, Kaynak K, Tanju S, Toker A, et al. Association of epidermal growth factor receptor and K-Ras mutations with smoking history in non-small cell lung cancer patients. Exp Ther Med 2013;5:495-8.
11. Akca H, Demiray A, Yaren A, Bir F, Koseler A, Iwakawa R, et al. Utility of serum DNA and pyrosequencing for the detection of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. Cancer Genet 2013;206:73-80.
12. Unal OU, Oztop I, Calibasi G, Baskin Y, Koca D, Demir N, et al. Relationship between epidermal growth factor receptor gene mutations and clinicopathological features in patients with non-small cell lung cancer in western Turkey. Asian Pac J Cancer Prev 2013;14:3705-9.
13. Sag SO, Gorukmez O, Ture M, Gorukmez O, Deligonul A, Sahinturk S, et al. Spectrum of EGFR gene mutations and ALK rearrangements in lung cancer patients in Turkey. Springerplus 2016;5:482.
14. Bircan S, Baloglu H, Kucukodaci Z, Bircan A. EGFR and KRAS mutations in Turkish non-small cell lung cancer patients: a pilot study. Med Oncol 2014;31:87.
15. Dogan M, Demirkazik A, Tukun A, Sak SD, Ceyhan K, Yalcin B, et al. The Relationship Between Common EGFR, BRAF, KRAS Mutations and Prognosis in Advanced Stage Non-Small Cell Lung Cancer with Response to the Treatment in Turkey. UHOD 2014;24:1-10.
16. Kus T, Aktas G, Sevinc A, Kalender ME, Yilmaz M, Kul S, et al. Prognostic impact of initial maximum standardized uptake value of (18)F-FDG PET/CT on treatment response in patients with metastatic lung adenocarcinoma treated with erlotinib. Onco Targets Ther 2015;8:3749-56.
17. Kanmaz ZD, Aras G, Tuncay E, Bahadır A, Kocatürk C, Yaşar ZA, et al. Contribution of ^{18}Fluorodeoxyglucose positron emission tomography uptake and TTF-1 expression in the evaluation of the EGFR mutation in patients with lung adenocarcinoma. Cancer Biomark 2016;16:489-98.
18. Güler Tezel G, Şener E, Aydın Ç, Önder S. Prevalence of epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer in turkish population. Balkan Med J 2017;34:567-71.
19. Lee JG, Kim S, Shim HS. Napsin A is an independent prognostic factor in surgically resected adenocarcinoma of the lung. Lung Cancer 2012;77:156-61.
20. Jie-Liu, Li XY, Zhao YQ, Liu RQ, Zhang JB, Ma J, et al. Genotype-phenotype correlation in Chinese patients with pulmonary mixed type adenocarcinoma: Relationship between histologic subtypes, TTTF-1/SP-A expressions and EGFR mutations. Pathol Res Pract 2014;210:176-81.
21. Arrieta O, Cardona AF, Martín C, Más-López L, Corrales-Rodríguez L, Bramuglia G, et al. Updated Frequency of EGFR and KRAS Mutations in NonSmall-Cell Lung Cancer in Latin America: The Latin-American Consortium for the

Investigation of Lung Cancer (CLICaP). J Thorac Oncol 2015;10:838–43.

22. Lu F, Li S, Dong B, Zhang S, Lv C, Yang Y. Identification of lung adenocarcinoma mutation status based on histologic subtype: Retrospective analysis of 269 patients. Thorac Cancer 2016;7:17-23.
23. Leichsenring J, Volckmar AL, Magios N, Morais de Oliveira CM, Penzel R, Brandt R, et al. Synonymous EGFR variant p.Q787Q is neither prognostic nor predictive in patients with lung adenocarcinoma. Genes Chromosomes Cancer 2017;56:214-20.
24. Lee GH, Choi YM, Kim JM, Shin JJ, Kim JG, Moon SY. Association of epidermal growth factor receptor gene polymorphisms with advanced endometriosis in a Korean population. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2012;164:196-9.
25. Sasaki H, Endo K, Takada M, Kawahara M, Tanaka H, Kitahara N, et al. EGFR polymorphism of the kinase domain in Japanese lung cancer. J Surg Res 2008;148:260-3.