



T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü



TERAPÖTİK AMAÇLI EKSOZOMLARIN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Yüksek Lisans Tezi

Elif DURAN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

***TERAPÖTİK AMAÇLI EKSOZOMLARIN ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU***

Elif DURAN

Danışman : Prof. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

İzmir
2022

Elif DURAN tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “*Terapötik Amaçlı Eksozomların Üretimi ve Karakterizasyonu*” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 13/06/2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

.....

Raportör Üye : Doç. Dr. Sait SARGIN

.....

Üye : Prof. Dr. L. Arzu ARAL

.....



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÖZET

TERAPÖTİK AMAÇLI EKSOZOMLARIN ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU

DURAN, Elif

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Haziran.2022, 51 sayfa

Bu tez çalışmasında, terapötik etkisi olduğu bilinen kemik iliği kökenli kök hücrelerden izole edilen karakterize eksozomlar meme kanseri sferoid modelinde terapötik amaçlı uygulanmıştır. Eksozomların maksimum izolasyonu için farklı pasaj numarası, başlangıç hücre konsantrasyonu ve FBS'siz ortamda bekleme süresi olmak üzere farklı hücre kültürü parametreleriyle çalışılmış ve optimum izolasyonun pasaj 6, 5×10^5 hücre/flask başlangıç konsantrasyonu ve 24 saat FBS'siz ortamda bekleme süresiyle gerçekleştiği görülmüştür. Ardında izole edilen eksozomların morfolojik olan STEM analizi, boyut ve zeta potansiyeli analizi, BCA testi, CD9 pozitiflik açısından Western blot ve FACS analizi ile karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Multiselüler meme kanseri modeli için MCF-7 ve HUVEC hücreleri kullanılarak statik yöntemle sferoid oluşumu sağlanmış ve karakterize eksozomlar meme kanseri sferoid modelinde test edilmiştir. Böylece kemik iliği kökenli kök hücrelerden izole edilen karakterize eksozomların meme kanseri sferoid modelinde hücre canlılığına etkisi ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar sözcükler: Eksozom, meme kanseri, sferoid modeli, terapötik etki, askıda kalma yöntemi



ABSTRACT

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF EXOSOMES FOR THERAPEUTIC PURPOSE

DURAN, Elif

MSc Thesis, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Ozlem YESIL-CELIK TAS

June.2022, 51 pages

In this thesis, characterized exosomes isolated from bone marrow derived stem cells, which are known to have therapeutic effects, were applied for therapeutic purposes in a breast cancer spheroid model. For maximum isolation of exosomes, different cell culture parameters such as different passage number, initial cell concentration and depletion time in FBS-free medium were studied, and optimum isolation was achieved with a passage 6, 5×10^5 cells/flask initial concentration and 24 hours in FBS-free medium has been found to occur. Afterwards, morphological STEM analysis, size and zeta potential analysis, BCA assay, Western blotting and FACS analysis for CD9 positivity of the isolated exosomes were performed. For the multicellular breast cancer model, spheroid formation was achieved by using MCF-7 and HUVEC cells by the hanging drop method and the characterized exosomes were tested in the breast cancer spheroid model. Thus, the effect of characterized exosomes isolated from bone marrow-derived stem cells in the breast cancer spheroid model on cell viability was revealed.

Keywords: Exosome, breast cancer, spheroid model, therapeutic effect, hanging drop method



ÖNSÖZ

Günümüzde Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre en sık görülen kanser türü olan meme kanseri dünya çapındaki tüm yeni yıllık kanser vakalarının %12'sini oluşturmaktadır. Meme kanserinde ölümlere yol açan asıl zorluğun ikincil bölgelere metastazın kontrol edilememesidir. Metastazın hücre-hücre etkileşimlerinden kaynaklandığı bilinse de metastazın altında yer alan moleküler mekanizmalar günümüzde tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Bu tez kapsamında temel amacım meme kanserinde eksozomların terapötik etkisinin incelenmesi için meme kanseri sferoid modelinde BMSC'lerden izole edilen eksozomların hücre canlılığına etkisinin incelenmesidir. Bu süreçte yaptığım çalışmanın sağlık alanı ile birlikte bilimsel literatüre faydası olacağını bilmek ve hücre-hücre etkileşimlerinden sorumlu olduğu bilinen eksozomların metastazın altında yatan karmaşık mekanizmaları aydınlayabileceği düşüncesi en büyük motivasyon kaynağım olmuştur.

İZMİR

13/06/2022

Elif DURAN



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ.....	11
İÇİNDEKİLER.....	13
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	17
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	19i
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Ekstraselüler Veziküller ve Eksozomlar	3
2.2 Eksozom Biyogenezi ve Bileşimi.....	4
2.3 Eksozomların Hücre Dışına Salım ve Hedef Hücreye Alım Mekanizmaları.....	6
2.4 Mezenkimal Kök Hücre Kökenli Eksozomlar	9
2.5 Meme Kanseri	11
2.6 Eksozomların Meme Kanserindeki Rolü	12
2.7 Tezin Amacı	13

İÇİNDEKİLER(devam)

	Sayfa
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Gereç.....	18
3.1.1. Sarf malzemeleri	18
3.1.2. Kullanılan cihazlar.....	19
3.2. Yöntem	20
3.2.1 Hücre kültürü ve BMSC'den eksozomların izolasyonu	20
3.2.2 İzole edilen eksozomların karakterizasyon çalışmaları	21
3.2.3 Meme kanseri sferoid modelinin oluşturulması ve karakterizasyonu	23
3.2.4 Eksozomların meme kanseri sferoid modelinde test edilmesi.....	28
3.2.5 İstatistiksel analiz.....	28
4. BULGULAR.....	29
4.1 BMSC'den eksozomların izolasyonu....	29
4.1.1 Hücre kültürü parametrelerinin Design Expert programı ile optimizasyonu	29
4.1.2 Işık mikroskobu görüntüleri.....	31
4.2 Eksozomların Karakterizasyon Çalışmaları	32
4.2.1 BCA testi	32
4.2.2 STEM Analizi.....	34

İÇİNDEKİLER(devam)

Sayfa

4.2.3 Boyut dağılımı ve zeta potansiyel analizi.....	34
4.2.4 Western blot analizi.....	35
4.2.5 FACS analizi.....	35
4.3 Meme Kanseri Sferoid Modelinin Oluşturulması ve Karakterizasyonu.....	36
4.3.1 Meme kanseri sferoidlerinin fiziksel karakterizasyonu.....	36
4.3.2 Meme kanseri sferoidlerinin biyokimyasal karakterizasyonu.....	39
4.4 Eksozomların Meme Kanseri Sferoid Modelinde Test Edilmesi.....	44
4.4.1 Işık ve floresan mikroskopu görüntüleri	44
4.4.2 WST-1 analizi.....	44
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	46
5.1 BMSC'den Eksozomların İzolasyonu	46
5.2 Eksozomların Karakterizasyon Çalışmaları	46
5.3 Meme kanseri sferoid modelinin oluşturulması ve Karakterizasyonu	47
5.4 Eksozomların meme kanseri sferoid modelinde test edilmesi	49
6. ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR DİZİNİ	51

İÇİNDEKİLER(devam)

	Sayfa
TEŞEKKÜR	63
ÖZGEÇMİŞ	64



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3. 1. Design Expert programında Box Benchen ile oluşturulan deney tasarımları	20
Şekil 4. 1. Box-Benchen tasarımında protein miktarının optimize edildiği tasarım ..	30
Şekil 4. 2. Optimizasyon sonrası tasarımın desirability ve maksimum protein miktarını veren parametre değerleri	31
Şekil 4. 3. Pasaj 4,5 ve 6 BMSC hücrelerinin FBS'siz ortamla muamele öncesi ve sonrası ışık görüntüleri	32
Şekil 4. 4. BCA standart eğrisi	33
Şekil 4. 5. Eksozomların STEM görüntüleri	34
Şekil 4. 6. Eksozomların boyut dağılımı, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.....	34
Şekil 4. 7. Eksozomların Western blot analizi	35
Şekil 4. 8 Eksozomların CD9 immüno işaretlemesi ile FACS analizi sonuçları	36
Şekil 4. 9. Sferoidlerin ışık mikroskobu görüntüleri (5X büyütmede, bar skalası 100 µm).....	37
Şekil 4. 10. Sferoidlerin ortalama boyut ve hacim analizleri	38
Şekil 4. 11. Sferoidlerin 4. gündeki SEM görüntüleri.....	38
Şekil 4. 12. Sferoidlerin hücre izleme analizi (5X büyütmede, bar skalası 200 µm).....	39
Şekil 4. 13. Sferoidlerin canlı/ölü analizi (5X büyütmede, bar skalası 200 µm).....	40

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4. 14. Sferoidlerin WST-1 analizi.....	41
Şekil 4. 15. Sferoidlerin qRT-PCR analizinin ısı haritası. *Statik yöntemle üretilen sferoidlerin 4. gün örneklerindeki kat regülasyonlarının 1. günlere göre kıyaslanması.....	42
Şekil 4. 16. Sferoidlerin Western blot analizi. *1: MCF-7 1. gün, 2: MCF-7 4. gün, 3: MCF-7/HUVEC 1. gün, 4: MCF-7/HUVEC 4. Gün.....	43
Şekil 4. 17. Sferoidlerin 4. günde ki immunofloresan görüntüleri (20X büyütmede, bar skalası 200 µm).....	43
Şekil 4. 18. Eksozom ve Dox uygulaması sonrası sferoidlerin 48. saat ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri (10X büyütmede, bar skalası 200 µm).....	44
Şekil 4. 19. Eksozom ve Dox uygulaması sonrası sferoidlerin 48. saat WST-1 analizi.....	45

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 3. 1. Sferoid karakterizasyonu için yapılan qRT-PCR çalışmalarında kullanılan primer tasarımları	25
Tablo 4. 1. Design Expert programında Box-Benchen tasarımıyla elde edilen deney setleri	29
Tablo 4. 2. BCA testi sonucu elde edilen eksozomal protein miktarları.....	32
Tablo 4. 3. Sferoidlerin qRT-PCR analizinin kat regülasyonu verileri.....	41



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
g	Gram
mg	Miligram
ng	Nanogram
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
µM	Mikromolar
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
sn	Saniye
dk	Dakika
rpm	Dakikada devir
mV	milivolt

Kısaltmalar

EV	Ekstraselüler veziküller
MVB	Multiveziküler cisim
ESCRT kompleksleri	Taşıma makineleri için gerekli endozomal ayırma
STEM	Taramalı transmisyon elektron mikroskobu
FACS	Floresan aktivite hücre ayırma
BMSC	Kemik iliği kökenli kök hücre
PLP	Protein proteolipid
MSC	Mezenkimal kök hücre
TME	Tümör mikroçevresi
IL	İnterlökin

1. GİRİŞ

Hücre-hücre iletişimi, hücrelerin, organların ve sağlam sistemlerin biyolojik işlevlerini ve mikroçevresel homeostazını sürdüren kritik bir süreçtir. Hücre-hücre iletişiminin karmaşıklığı onlarca yıldır araştırılmış olup şu anda gelişim biyolojisi, karsinogenez ve organ işlev bozukluğunun moleküler mekanizmalarının bir parçası olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalar, eksozomların alıcı hücreler ile etkileşime girdiğini ve iletişim kurduğunu doğrulamaktadır (Gajos-Michniewicz vd., 2014). Hücre dışı veziküller (EV) olarak tanımlanan eksozomlar (Trams vd., 1981), boyut olarak 30 ila 100 nm arasında değişen en küçük EV alt grubunu temsil etmektedir. Çeşitli çalışmalar, eksozomların BMSC'nin sağladığı terapötik etkide önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Katsuda vd., 2016). Bir zamanlar hücrenin 'çöpçü'sü olarak kabul edilen eksozomlara olan ilgi 2013 yılında tıp alanında Nobel Ödülü'nün "hücrenin taşıma sistemini nasıl organize ettiğinin gizemini" çözdükleri için James E. Rothman, Randy W. Schekman ve Thomas C. Sudhof'a verilmesiyle artmaya başlamıştır (Raposo vd., 1996).

Yapılan çalışmalardan yola çıkılarak eksozomlar için; üzerlerinde bulunan adhezyon molekülleri yoluyla bir alıcı hücrenin yüzeyine bağlanması, plazma membranı ile yapışmadan sonra vezikülün füzyonu, reseptör aracılı endositoz ve vezikülleri endositik bölmelere içselleştirerek gerçekleşen fagositoz gibi etkileşim mekanizmaları belirlenmiştir (Jella vd., 2018). Hedef hücreler ve eksozomlar arasındaki bu etkileşimler, membran reseptörlerinin transferine, eksozomların yüzeyine bağlı büyüme faktörlerine, spesifik proteinlerin hedef hücrelere verilmesine ve genetik materyalin transferine yol açabilir. Son birkaç on yılda yapılan araştırmalar, EV'lerin serbest bırakılmasının aynı zamanda normal fizyolojik süreçlerde olduğu kadar patolojik ilerlemede de yer alan hücreler arası iletişim için önemli bir aracı olduğunu göstermiştir. Hücre-hücre iletişiminin tümör mikroçevresinin karmaşıklığına, heterojenliğine ve tümör nüksü ve metastazına aracılık etmedeki rolü büyük önem taşımaktadır (McGranahan ve Swanton, 2017; EI Rayes vd., 2015). Hücreler arası iletişimin önemli ve köklü aracıları olarak eksozomlar (Raposo vd., 2013), meme kanserinde başlangıç, ilerleme ve metastatik süreçlerde temel oyuncular olarak göründüklerinden beri artan bir ilgi görmektedirler (Jabbari vd., 2020). Eksozomların hücreler arası iletişimdeki rolü ve

potansiyel bir terapötik ajan olarak vaadi, son on yılda EV araştırmalarına bilimsel ilgiyi artırmıştır. Eksozomların gizli potansiyelini ortaya çıkarmak için hala ayrıntılı ve odaklanmış bilimsel araştırmalara ihtiyaç vardır. Bununla birlikte, bir dizi önemli soru cevapsız kalmaktadır: EV biyogenezi ve salım hızı nasıl düzenlenir? Kargoları nasıl düzenlenmektedir? EV araştırma alanının teknik yönlerini ilerletmek için kullanılabilecek farklı EV alt tipine özgü işaretçileri nelerdir? EV araştırma alanının ilerlemesi ve kliniğe geçiş için bu soruların yanıtlarının bulunması çok önemlidir (Jadli vd., 2020).



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Ekstraselüler Veziküller ve Eksozomlar

Ekstraselüler veziküller (EV) biyogenez, boyut ve bileşimdeki farklılıklara dayalı apoptotik cisimler, mikro veziküller ve eksozomlar olarak üç ana kategoride sınıflandırılır. Apoptotik cisimler (500-2000 nm çapında), EV'lerin en büyük alt popülasyonudur ve apoptotik hücre temizliği geçiren hücreler tarafından salınır. Mikroveziküller (200-2000 nm çapında) ve eksozomlar (30-200 nm çapında) EV'lerin biraz daha küçük alt popülasyonlarıdır ve neredeyse tüm sağlıklı canlı hücreler tarafından üretilir (Shao vd., 2018; Gurunathan vd., 2019). Apoptotik cisimler ve mikro veziküller, plazma zarından doğrudan dışa doğru zar tomurcuklanma şeklinde üretilir. Eksozomlar, multiveziküler cisimlerin (MVB'ler) plazma zarı ile füzyonundan salınır (Kalra vd., 2016; Kalluri vd., 2019). Mikroveziküllerin oluşumu, hücre zarı çift tabakasındaki fosfolipitlerin asimetric dağılımı ile ilgilidir. Dış zarın fosfatidilkolin ve sfingomyelin içeriği daha yüksektir, intima ise esas olarak fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin'den oluşur. Üç tip protein, flippazlar, floppazlar ve fosfolipid sürünen enzim tarafından korunur. Flippazlar, lipidlerin içe doğru kaymasında rol oynar. Floppazlar, lipidlerin dışa doğru kaymasında rol oynar. Fosfolipid tarama enzimi, fosfolipid karıştırmada yer alır ve sitozolik kalsiyum akışı, fosfolipid tarama enzimini aktive ederek fosfolipidlerin asimetrisini yok eder. Bu aktivasyon, hücre zarı çift tabakasındaki fosfolipidlerin yeniden dağılımına yol açarak hücre zarının tomurcuklanmasını teşvik eder. Kalsiyum bağımlı proteoliz, zara bağlı hücre iskeletini bozar ve hücre zarlarının tomurcuklanmasına yardımcı olur (Hugel vd., 2005). Mikrovezikül oluşumunda yer alan moleküler mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır. Çalışmalar, bir adaptör protein olan arrestin alanı içeren protein 1'in (ARRDC1), hücre zarı filizlenmesini teşvik etmek için hücre zarına taşınması (ESCRT) proteinleri TSG101 ve VPS4 için gerekli endozomal sıralama komplekslerini aldığını göstermektedir. Vezikül tomurcuklanmasının da hasarlı plazma membranlarını onarmak için bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (Maas vd., 2017). Eksozom oluşumu, endositoz, endozom ve MVB oluşumu ve eksozom salınımını içeren son derece karmaşık bir süreçtir. İlk olarak, plazma zarının lipid sal alanları, bir endositoz yolu yoluyla erken endozomlar oluşturur. Erken endozomlar daha sonra Golgi kompleksinin yardımıyla geç endozomlara

olgunlaşır, bu sırada geç endozomların çift katmanlı membranı lümenlerinde birikmiş intraluminal vezikülleri meydana getirir. Kargonun MVB ve intraluminal veziküllere ayrılmasının altında yatan mekanizmalar henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır, ancak son çalışmalar hem ESCRT'ye bağımlı hem de ESCRT'den bağımsız mekanizmaların MVB'lerin oluşumunda rol oynadığını göstermektedir. Son olarak, MVB'lerde bulunan intraluminal veziküller, plazma zarı ile birleşir ve daha sonra hücre dışı ortama salınarak eksozomları oluşturur (He vd., 2018).

2.2 Eksozom Biyogenezi ve Bileşimi

Eksozomlar, erken endozomlar oluşturmak için plazma zarının içe doğru tomurcuklanmasıyla ortaya çıkar, zarları daha sonra kısmen istila eder ve ILV'leri oluşturmak için sitoplazmik içerikli çevreleyen lümen içine tomurcuklanır (McAndrews vd., 2019). Düzinelerce ILV içeren geç endozomal yapılar, sonunda endozom geri dönüşümü için trans-Golgi ağına (TGN) taşınan, taşınan tüm materyalin bozunması için lizozomlara teslim edilen veya plazma membranı ile kaynaşan multiveziküler cisimler (MVB'ler) olarak bilinir ve eksozomları hücre dışı boşluğa bırakılır (Williams vd., 2007). Eksozom biyogenezi ve salgılanması, taşıma için gerekli olan bir endozomal sıralama kompleksinin (ESCRT) oluşumunu gerektirir, ESCRT dört kompleksten (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II ve ESCRT-III) ve ilişkili proteinlerden (VPS4, VPS4) oluşur. Tsg101 ve ALIX). ESCRT-0, her yerde bulunan kargo proteinlerini lipid alanına ayırır, ESCRT-I ve ESCRT-II, stabil membran boynunu oluşturmak için membran deformasyonunu indükler ve Vps4 kompleksinin ESCRT-III'e alınması vezikül boynunun kesilmesini ve ayrışma ve geri dönüşümü sağlar (Janas vd., 2015).

Geniş bir dizi çalışma, lipidleri ve tetraspanin gibi ilişkili proteinleri içeren eksozom biyogenezinde ve kargo yüklemeinde ESCRT'den bağımsız bir yol önerdi (Babst vd., 2011). ESCRT tarafından sıralanan proteinlerin aksine, eksozomlara RNA yüklenmesi, kendi kendini organize eden lipid ve kargo alanlarına bağlı bir süreçte lipid aracılı görünmektedir. Spesifik nükleotid dizileri, rafted membranlarda fizyolojik bir konsantrasyonda lipid yapısı (lipid salları), hidrofobik modifikasyonlar ve sfingosin gibi faktörlere bağlı olan fosfolipid çift tabakası için gelişmiş afinite sergiler (Janas vd., 2015). Lipid salları, kolesterol,

sflngolipidler ve glikosil-fosfatidilinositol (GPI) bağlantılı proteinler açısından zengin, proteinler veya moleküller ile ilişkileri eksozomlar yoluyla salgılanmalarını kolaylaştırabilen plazma zarının alt alanlarıdır (Svensson vd., 2013). Sınırlayıcı membran üzerinde seramid, lizo-fosfolipid ve glikosflngolipid moleküllerinin varlığı, ILV'ler üretmek için kendiliğinden tomurcuklanma sürecini indükler (Phuyal vd., 2014). Seramid, seramidaz ve sfingosin kinaz varlığında sfingosin ve sfingosin1-fosfata (S1P) dönüşür ve sınırlayıcı zar üzerindeki sfingosin 1-fosfat reseptörlerinin sürekli aktivasyonu, tetraspaninin ILV'lere ayrılmasına aracılık eder (Elsherbini vd., 2018). Tetraspanin, dört transmembran alanı ile karakterize edilen hücre yüzeyi ile ilişkili membran proteinlerinin bir protein süper ailesidir. Tetraspaninler, çok çeşitli transmembran ve sitozolik sinyal proteinleri ile tetraspanin ile zenginleştirilmiş mikro alanlar (TEM'ler) adı verilen membran mikro alanları düzenler (Hemler vd., 2003). İlk karakterize edilen tetraspanin olarak CD63, ESCRT'den bağımsız ILV oluşumunda işlev görür (Pols vd., 2009). İlginç bir şekilde, memeli hücrelerinde yapılan bir alışma, ESCRT mekanizmasının yokluğunun MVB veziküllerinin oluşumunu engellemediğini, ancak kargonun ILV'lere ayrılmasına ve ILV sayısı ve boyutundaki varyasyonlara neden olduğunu bulmuştur, bu da eksozom biyogenezinin aşağıdakileri içeren koordineli bir süreç olabileceğini düşündürmektedir (Stuffers vd., 2009).

Eksozomlar zara bağlı taşıyıcılarıdır. Yükleri, donör hücrenin yapısını ve fizyolojik durumunu yansıtan proteinler, nükleik asitler ve metabolitleri içerebilir (Zamani vd., 2019). Eksozomlar  zeltide küresel bir şekle sahiptir ancak hazırlama sırasında yapay kurutma ile üretildiğinde iki içbükey veya fincan şeklinde g r n rl r (Yellon ve Davidson, 2014). Eksozomlara dahil edilen ana membrana bağlı ve sitozolik proteinler, tetraspanin ailesinin  yeleri (CD9, CD63 ve CD81), taşıma (ESCRT) proteinleri (Alix, TSG101), integrinler, ısı şoku proteinleri (Hsp) ve flotillinler aktin için gerekli endozomal sıralama kompleksidir. (Zhang vd., 2019; Garcia vd., 2015). Isı şoku proteinleri, CD63, ESCRT ve hücre iskeleti bileşenleri gibi proteinler tüm eksozomlar arasında yaygın iken, MHC Sınıf I ve II gibi diğer proteinler donör hücre tipine özgüdür (Mashouri vd., 2019). Eksozomların katı çift katmanlı membranı ayrıca kargo sınıflandırmasını, eksozom salgılanmasını, yapısını ve sinyalleşmeyi etkileyen sfingomiyelin, kolesterol ve seramidler gibi lipid bileşenlerinden oluşur (Skotland vd., 2019; Skryabin vd.,

2020). DNA, mRNA ve kodlamayan RNA türleri gibi bir nükleik asit kompleksi de eksozom bileşiminin bir parçasını oluşturur (Doyle ve Wang, 2019). MikroRNA'lar (miR'ler), eksozomlarda en bol bulunan RNA türlerinden biridir (Huang vd., 2013). Ekzositoz, hematopoez ve anjiyogenez gibi çoklu biyolojik süreçlerde rol oynayan MiR'ler, eksozom aracılı hücrel iletişime katılır. Diğer eksozomal RNA türleri arasında ribozomal RNA (rRNA), uzun kodlayıcı olmayan RNA (lncRNA), transfer RNA (tRNA), küçük nükleer RNA (snRNA), küçük nükleolar RNA ve p-element kaynaklı wimpy testis (piwi)-etkileşimli RNA bulunur. Hepsi biyolojik süreçleri, özellikle tümör gelişimini etkiler (Ge vd., 2020).

2.3 Eksozomların Hücre Dışına Salım ve Hedef Hücreye Alım Mekanizmaları

Eksozom salgılanması açısından, GTPazların Ras süper ailesinde en bol bulunan protein ailesi olan Rab GTPazlar, endozom geri dönüşümü ve lizozomlara MVB ticareti dahil olmak üzere hücre içi vezikül taşınmasında çok önemli bir rol oynar (Blanc vd., 2018). Eksozom salgısının Rab GTPaz modülasyonu, hücre tipine ve kargolara bağlı olarak heterojendir. Rab GTPazlar ve SNARE proteinleri, eksozom salgılanmasını indüklemek için etkileşime girer (Pegtel vd., 2019). Rab27a, Hela hücrelerinde (Ostrowski vd., 2010), nöronlarda ve podositlerde (Song vd., 2019) plazma zarına MVB kenetlenmesinde ve karsinom hücrelerinin eksozom aracılı istilasında (Hoshino vd., 2013) yer alır. Rab27a ayrıca eksozom boyutunu belirlerken, endozomal ticarete Rab27a ile ortak işlevi paylaşan Rab27b, bunun yerine eksozom ticaretinde MVB'lerin hücre içi dağılımını etkiler (Ostrowski vd., 2010). Tipik olarak endozom geri dönüşüm yolunda hareket eden Rab11 ve Rab35 (Savina vd., 2002; Sato vd., 2008), eksozom kargo salgısını da etkiler (Sato vd., 2008). Rab11, sinaptik gelişimi ve plastisiteyi kolaylaştıran, drosophila'nın nöromüsküler kavşağı içinde kesintiye uğramış (Evi) düzgünlüğün eksozomal salgılanması için gereklidir (Koles vd., 2012). MVB'leri plazma membranına kenetleyerek oligodendrositlerde (Hsu vd., 2010; Frühbeis vd., 2013) miyelin protein proteolipidinin (PLP) eksozomal salgılanması için Rab35 gereklidir. Hem Rab11 hem de Rab35'in kaybı, endozomal kargoların hücre içi birikiminin artmasıyla sonuçlanır, kargo sekresyonunda ve ayrıca geç endozomal kompartmanların geri dönüşümündeki önemli rollerini vurgular (Savina vd., 2002).

MVB'lerin lizozomlara (Hsu vd., 2010) endozomal ticaretini düzenleyen Rab7, hücre tipine (Baietti vd., 2012; Song vd., 2016) bağılı olarak eksozom salınımında zıt bir rol gösterir. Ek olarak Rab2b, Rab5a ve Rab9a eksozom salgısını artırır (Ostrowski vd., 2010). Bu nedenle, Rab GTPazlar tarafından eksozom salgılanmasının modülasyonu, hem ayırt edici ticaret işlevlerine hem de hücre tipine bağılıdır. RAL1 (Ras ile ilgili GTPaz homologu) ayrıca meme kanseri hücrelerinde ve *Candida elegans*'ta ILV tomurcuklanmasına ve MVB'nin plazma zarına bağlanmasına aracılık eder. RAL1, T-SNARE sözdizimi 5 ve tanımlanamayan bir V-SNARE (Hyenne vd., 2015) ile koordinasyon içinde eksozom salgılanmasını düzenler. R-SNARE Ytk6, *Drosophila* ve omurgalı hücrelerinde aktif Wnt ve kirpi sinyal proteinlerinin ESCRT'ye bağılı eksozom salgılanması ile etkileşime girer (Gradilla vd., 2014; Gross vd., 2012). HeLa hücrelerinde yapılan çalışma ayrıca plazma zarına MVB füzyonunu ve ardından T-SNARE SNAP23 ve sintaksin-4 tarafından düzenlenen eksozomların salgılandığını gösterir (Verweij vd., 2018). Açıkça görüldüğü gibi, eksozom biyogenezi ve salgılama mekanizmaları, ana ESCRT yolunun lipid salları ve tetraspaninleri içeren diğer mekanizmalar tarafından ikincilleştirilmesiyle heterojendir. Rab proteinleri ayrıca kargo sınıflandırmasına ve eksozom salgılanmasına yardımcı olur.

Son olarak, otofaji ile ilgili protein-5 (Atg5) ve otofaji ile ilgili-16 benzeri-1 (Atg16L1) ayrıca meme kanseri hücrelerinde eksozom biyogenezini düzenler (Guo vd., 2017) ve merkezi ve periferik nöronal hücrelerde (Abdulrahman vd., 2018) prion proteinlerinin eksozom salgılanmasına aracılık eder. Otofaji, geri dönüşüm için gereksiz ve işlevsiz hücresel bileşenleri ortadan kaldıran, düzenlenmiş kendi kendini parçalayan bir süreçtir (Zou vd., 2019). Yüksek oranda korunmuş bir Ser/Thr kinaz ve otofajinin ana düzenleyicisi olan rapamisin kompleksi 1'in (mTORC1) ilginç bir şekilde mekanik hedefi, aynı zamanda, otofajiye benzer bir şekilde besin ve büyüme faktörlerindeki değişikliklere yanıt olarak eksozom salınımını negatif olarak düzenler (Joshi vd., 2020). Bu iki sürecin aynı anda düzenlenmesi, özellikle stres koşulları altında hücresel atık yönetimine ve geri dönüşüme izin verir. Eksozom salınımının bu şekilde düzenlenmesi muhtemelen stresli glikoz açlığı ve hipoksi ortamında meydana gelir (Garcia vd., 2015).

Verici hücrelerden salınmaları üzerine, EV'ler, hücre içi sinyalleşmeyi ve moleküler süreçlerde değişiklikleri indüklemek için alıcı hücrelerle etkileşime girebilir, bu da yüzey reseptörleri ile bağlanma veya içselleştirme ve kargo içeriklerinin serbest bırakılması yoluyla fizyolojik veya patolojik durumlarında değişikliklere yol açabilecek moleküler süreçlerde değişikliklere neden olabilir. EV içselleştirmesi için kanıt, fare RNA'larının doğrudan transferini ve bunun sonucunda insan mast hücrelerinde fare proteinlerinin saptanmasını gösteren bir çalışma da dahil olmak üzere birçok çalışmada sağlanmıştır (Valadi vd., 2007). EV alımı, sırasıyla küçük RNA'ların (siRNA'lar) ve lusiferin substratlarının EV aracılı dağıtımı yoluyla hedef gen ekspresyonunun ve biyoluminesans üretiminin başarılı bir şekilde yıkıldığını gösteren çalışmalarla daha da doğrulandı (Alvarez-Erviti vd., 2011; Montecalvo vd., 2012). Bugüne kadar, deneysel kanıtların çoğu, EV'lerin tipik olarak endositoz yoluyla endozomal bölmeye içselleştirildiğini göstermektedir (Joshi vd., 2020). Bununla birlikte, EV'lerin endositozunu yöneten kesin mekanizmalar oldukça tartışmalıdır. Klatrin aracılı endositoz (CME), caveolin bağımlı endositoz (CDE), mikropinositoz ve fagositoz dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Ek olarak, lipid sal proteinlerinin alaka düzeyi ve EV içselleştirmede spesifik protein-protein etkileşimleri de gösterilmiştir. Genel olarak, EV'lerin kenetlenmesi ve ardından endositozu, membran reseptörleri, ligandlar veya alıcı hücrelerin temas proteinleri ile protein-protein etkileşimleri ile kolaylaştırılır. Tetraspaninler, lektinler, proteoglikanlar ve integrinler gibi proteinler ve bunların PTM'leri, EV alımını etkilemek için bu spesifik etkileşimlerde yer almıştır. EV'ler ve hedef hücreler arasındaki etkileşimler, EV'lerin tanınması, bağlanması, hücresel alımı ve hücre içi taşınması ile ilgili olanlar da dahil olmak üzere bir dizi son derece karmaşık düzenleyici süreci içerir. Alıcı hücreler ve EV'ler arasındaki etkileşimler, alıcı hücrelerin spesifik özelliklerine bağlı olabilir ve EV'lerin reseptör hücrelerini tanıma ve bunlara bağlanma mekanizmaları, farklı hücre tipleri arasında büyük farklılıklar gösterir. Bu nedenle, EV'lerin belirli hücre soylarını hedeflediği mekanizmaların düzenlenmesi ve hücre yüzeyine bağlı EV'lerin kaderi, EV'lerin alıcı hücreler üzerindeki biyolojik etkilerini belirleyebilir. EV'lerin alıcı hücrelerle tercihli etkileşimi ve bunların belirli doku veya organlarda seçici birikimi, EV'lerin belirli hücre soylarına hedeflendiğini gösterir.

EV'ler ve hedef hücreler arasındaki etkileşimler, EV'lerin tanınması, bağlanması, hücre alımı ve hücre içi taşınması ile ilgili olanlar da dahil olmak üzere bir dizi son derece karmaşık düzenleyici süreci içerir. Alıcı hücreler ve EV'ler arasındaki etkileşimler, alıcı hücrelerin spesifik özelliklerine bağlı olabilir ve EV'lerin reseptör hücrelerini tanıma ve bunlara bağlanma mekanizmaları, farklı hücre tipleri arasında büyük farklılıklar gösterir. Bu nedenle, EV'lerin belirli hücre soylarını hedeflediği mekanizmaların düzenlenmesi ve hücre yüzeyine bağlı EV'lerin kaderi, EV'lerin alıcı hücreler üzerindeki biyolojik etkilerini belirleyebilir. EV'lerin alıcı hücrelerle tercihli etkileşimi ve bunların belirli doku veya organlarda seçici birikimi, EV'lerin belirli hücre soylarına hedeflendiğini gösterir (Wu vd., 2021).

EV'ler genetik bilgiyi reseptör hücrelere üç ana süreç yoluyla aktarır: endositoz, reseptör-ligand etkileşimi ve plazma zarı ile doğrudan füzyon. Endositoz esas olarak klatrin bağımlı ve klatrin bağımsız endositoz işlemlerini içerir. Klatrin bağımsız yollar, caveolin aracılı ve lipid sal aracılı endositoz, fagositoz ve mikropinositoz olarak ikiye ayrılır. Bu alana artan bir ilgi olmasına rağmen, EV'lerin biyolojik etkilerini düzenleyen hücrel ve moleküler mekanizmaların mevcut anlayışı sınırlıdır (Mulcahy vd., 2014; Kalluri vd., 2020).

2.4 Mezenkimal Kök Hücre Kökenli Eksozomlar

Mezenkimal kök/stromal hücreler (MSC'ler), başlangıçta Alexander Friedenstein tarafından kemik iliği üzerinde çalışırken keşfedilen multipotent hematopoietik olmayan yetişkin hücrelerdir. Muhtemelen mezodermden kaynaklanan MSC'lerin CD73, CD90 ve CD105 plazma membran belirteçlerini ifade ederken CD14, CD34 ve CD45 moleküllerini ifade etmedikleri rapor edilmiştir (Teixeira vd., 2013; Akbari vd., 2020). Kemik iliğine ek olarak, MSC'ler yağ dokusu, amniyotik sıvı, diş özü, plasenta, göbek kordonu kanı, Wharton jeli ve hatta beyin, böbrek, karaciğer, akciğer, dalak, pankreas ve timus dahil olmak üzere diğer yetişkin dokulardan izole edilebilir (Lai vd., 2015). MSC'ler farklılaşma, kendini yenileme ve koloni oluşturma yetenekleriyle bilinir (Smirnov vd., 2007). MSC'lerin in vitro çoğalma ve çeşitli hücrel fenotiplere farklılaşma konusundaki benzersiz kapasitesi, bağ dokusunun nekrotik veya apoptotik hücrelerini

iyileştirmek için terapötik ajanlar olarak işe alınmaları için büyük bir fırsat temsil etti. Aslında, MSC'ler, adipositler, endotelyal hücreler, kardiyomiyositler, kondrositler ve osteoblastların yanı sıra hepatositler ve nöron benzeri hücreler gibi çok sayıda mezenkimal olmayan soylar dahil olmak üzere farklı mezenkimal kökenli soylara farklılaşabilir (Crapnell vd., 2013; Krause vd., 2001). MSC'lerin fonksiyonel mezodermal olmayan hücrelere farklılaşması, yetişkin kök hücrelerin yalnızca karşılık gelen germ katmanlarından farklılaştığı geleneksel paradigma üzerinde şüphe uyandırdı (Wagers vd., 2004). Sonraki araştırmalar, bu çapraz-germ hattı farklılaşmasını hücre füzyonu olaylarına veya metodoloji sınırlamalarına bağlarken (Prockop vd., 2012; Theise vd., 2005), MSC'ler tarafından özellikle mezodermal olmayan dokularda doku onarımının mekanizması çözülmeye devam etti.

Başlangıçta, *in vivo* enjeksiyon üzerine, MSC'lerin ilgili yerlere seyahat ederek, aşılama ve ardından olgun fonksiyonel hücrelere farklılaşma yoluyla hasarlı/hastalıklı bölgeleri yeniden oluşturmaya başladığı varsayılmıştır. Bununla birlikte, bu klasik hipotez, daha sonra, son on yılda gerçekleştirilen çok sayıda hayvan ve insan çalışmasından elde edilen bulgularla sorgulandı. Sürprizimize göre, MSC'lerin ne büyük miktarlarda ne de doku değiştirme sürecini açıklamaya yetecek kadar uzun süre aşılama yapmadığı gösterildi (Iso vd., 2007). Daha çağdaş bir hipoteze göre, MSC'ler alternatif doku onarım modları kullanır ve hücre canlılığını, çoğalmasını ve farklılaşmasını indükleyerek, hücre apoptozunu ve fibrozu azaltarak, hücre dışı matris yeniden şekillenmesini uyararak ve bazen yerel bağışıklık sistemi yanıtlarını inflamasyonu inhibe etmek için ayarlayarak komşu hücreleri etkiler. Bu alternatif stratejiler, belirli trofik faktörlerin, sitokinlerin, kemokinlerin ve hormonların üretilmesi ve salınması, nanotüplerin tünellenmesiyle kolaylaştırılan hücreler arası etkileşimler ve eksozomlar gibi hücre dışı veziküllerin (EV'ler) salgılanmasıyla kolaylaştırılan, MSC'ler ve bitişik hücreler arasındaki parakrin sinyalleşmeyi içerir (Lai vd., 2015). MSC'lerden türetilen eksozomlar, peptitler, proteinler ve RNA türleri gibi aktif biyomolekülleri çevreleyerek ve hastalıklı hücrelere/dokulara taşıyarak doku rejenerasyonuna katkıda bulunarak bu hücrelere benzer biyolojik işlevleri temsil eder (Rani vd., 2015).

2.5 Meme Kanseri

Meme kanseri, toplam kanser insidans yükünün %11,6'sını ve dünya çapında kansere bağlı ölüm yükünün %6,6'sını oluşturmaktadır. Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde 2 milyondan fazla (%24,2) yeni teşhis edilen vaka ile kadınlar arasında en sık görülen kanserdir ve kanser ölümlerinin önde gelen nedenini temsil eder; GLOBOCAN veri tabanında bildirildiği üzere 2018'de 0,6 milyondan fazla (%15,0) kadın öldü (Bray vd., 2018). Hastalığın erken teşhis oranının artması ve hastaların klinik yönetimindeki iyileşmeye rağmen, bu hastalıktan ölen kadınların sayısı, tedavi başarısızlığı ve ölümcül metastatik hastalığın gelişmesi nedeniyle hala çok yüksek olmaya devam etmektedir (Cardoso vd., 2012; Mariotto vd., 2017). Gerçekten de, meme kanserli kadınların %20 ila %30'u metastatik hastalık geliştirecektir. Moleküler alt tipe bağlı olarak, metastatik meme kanseri için tedavi seçenekleri büyük ölçüde şunlara odaklanır: insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)-negatif luminal metastatik tümörleri olan hastalar için endokrin tedavisi; HER2-pozitif metastatik tümörleri olan hastalar için anti-HER2 tedavisi; sistemik kemoterapiler, üçlü negatif meme kanserinde veya yüksek derecede semptomatik hastalarda (Nagini vd., 2017). Bu nedenle meme kanseri tedavisindeki ana zorluk, esas olarak hasta ölümlerinden sorumlu olan ikincil bölgelerde metastaz oluşumunu kontrol etmektir. Şu anda çok sayıda araştırmanın meme kanserinde metastatik süreçlerin altında yatan biyolojik ve moleküler mekanizmalar hakkındaki bilgileri geliştirmeye odaklanmasının nedeni budur.

Son yıllarda çok sayıda kanıt, hücreden hücreye iletişimin, kanser de dahil olmak üzere hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda hücresel fonksiyonların ve doku homeostazının kilit bir itici gücü olduğunu vurguladı. Hücreler arası iletişimin önemli ve yerleşik aracılığı olarak, zardan türetilen veziküller ve özellikle eksozomlar (Raposo ve Soorvogel., 2013), meme kanserinde başlangıç, ilerleme ve metastatik süreçlerde temel oyuncular olarak göründükleri için artan bir ilgi görmüştür (Yu vd., 2015; Adem vd., 2020). Birkaç bulgu, genetik ve moleküler yüklerini alıcı hücrelere bırakarak hem kısa hem de uzun mesafelerde iletişim kurabilen eksozomların, metastatik kaskadın birçok yönünü derinden etkilediğini göstermiştir (Giordano vd., 2020).

2.6 Eksozomların Meme Kanserindeki Rolü

Tümör hücreleri ile tümör mikroçevresinin (TME) stroma ve immün hücreleri arasındaki eksozom aracılı hücreden hücreye çapraz karışma, kanserin patofizyolojisi için kritik öneme sahiptir (Ji vd., 2004; Whiteside vd., 2018). Örneğin, EV'ler, tümör oluşumunu teşvik etmek için glioblastoma tümörünün TME'sini bir tümör teşvik sistemine modüle edebilir (Ridge vd., 2017); ayrıca EV'ler, kanserin ilerlemesini düzenlemek için mide kanserindeki mikro çevre ile iletişim kurabilir (Karnoub vd., 2007). TME'nin önemli bir bileşeni olarak mezenkimal kök hücreler (MSC'ler), çoğu kanserde bulunan multipotent stromal kök hücrelerdir ve TME oluşumunu ve tümör ilerlemesini etkilemede önemli bir rol oynar (Whiteside vd., 2018). Meme, yumurtalık, akciğer ve kolon karsinomları gibi birçok kanserde, MSC'ler tümör homing fonksiyonları ile TME'ye alınabilir (El-Haibi vd., 2010; Ljubic vd., 2013; Zhang vd., 2014). TME'ye ev sahipliği yapan tümör, bağışıklık hücreleri ile etkileşim ve TME'de daha fazla polarizasyon yoluyla, MSC'ler farklı kanser türlerinde dinamik bir rol oynama yeteneği elde eder (Green, 2017).

Farklı doku kaynaklarına göre, MSC'ler temel olarak kemik iliği kaynaklı MSC'ler (BMSC'ler), adipoz doku kaynaklı MSC'ler (AT-MSC'ler), göbek kordonu kaynaklı MSC'ler (UC-MSC'ler), dış özü kaynaklı MSC'ler (DPSC) ve plasentadan türetilen MSC'ler olarak sınıflandırılır (Dostert vd., 2017). Kendini yenileme ve multipotent farklılaşma için yüksek bir kapasite sergilerler. Multipotent hücreler olarak, MSC'ler doku onarımı için yaralanma ve iltihaplanma bölgelerine alınabilir (Ben-David ve Benvenisty., 2011). Yaralanma bölgesine benzer şekilde, tümör bölgesi “hiç iyileşmeyen bir yara”ya benzetilmiştir, bu da MSC'lerin TME'nin önemli bir unsuru olarak tümör stromasına göç edebileceği ve tümörün ilerlemesine katkıda bulunabileceği anlamına gelir (Gutierrez-Aranda vd., 2010; Kalluri ve LeBleu, 2020; Atiya vd., 2020). MSC'lerin yakın zamanda tümörle ilişkili stromaya entegre oldukları meme kanserine lokalize oldukları tarif edilmiştir (Gutierrez-Aranda vd., 2010). Monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1), siklofilin B, hepatomdan türetilmiş büyüme faktörü (HDGF), ürokinaz plazminojen aktivatörü ve interlökin (IL) gibi çoklu kemokinler, sitokinler ve büyüme faktörlerinin olduğu bildirilmektedir. Daha sonra, MSC'lerin ya doğrudan meme kanseri hücreleri

üzerinde ya da dolaylı olarak TME üzerinde etki ederek tümör oluşumunu ve ilerlemesini desteklediği görülmektedir (Kalluri ve LeBleu, 2020). Bir yandan, MSC'ler, bağışıklık düzenleme ve bağ dokusu proliferasyonu mekanizmaları altında TME'yi düzenleyerek meme kanseri hücrelerinin tümörjenik yeteneğini destekleyen çeşitli biyoaktif molekülleri ve parakrin faktörlerini doğrudan salgılayarak jukstakrin, parakrin ve endokrin mekanizmalar yoluyla tümör ilerlemesini düzenler (Kalluri ve LeBleu, 2020; Atiya vd., 2020). Öte yandan, MSC'ler, EV'lerin dolaylı salgılanması yoluyla tümör ilerlemesini modüle eder.

TME'de, MSC'ler, komşu hücrelere yatay olarak bilgi aktarmak için EV'ler yaparak ve serbest bırakarak, TME'yi tümörün hayatta kalması veya baskılanması için tümörü destekleyici veya engelleyici bir ortama kaydırmak için tümörle etkileşime girer (Maacha vd., 2019; Goldstein vd., 2010). EV'lerin ana hücrelerin özelliklerini yansıtması nedeniyle, MSC'den türetilen EV'ler (MSC-EV'ler) (MSC'den türetilen eksozomlar (MSC-exos) ve MSC'den türetilen MV'ler (MSC-MV'ler)), yaşamsal bir rol sergiler. BC'nin farklı aşamalarında hücreler arası iletişime aracılık eder ve farklı fenotiplerdeki MSC'lerden türetilen EV'lerde farklılıklar olabilir. MSC'ler, in vitro olarak kolay izolasyon ve güçlü genişleme kabiliyeti avantajlarına sahiptir ve rejeneratif özelliklere sahip çok sayıda daha kararlı EV'ler üretebilir. Embriyonik kök hücrelerin (ESC'ler) aksine, MSC'ler yasal ve etik kaygılardan (Komarova vd., 2010) ve teratom oluşturma endişelerinden muaftır. Bu nedenle, MSC'ler üzerine araştırma, daha deneysel öneme ve klinik uygulama değerine sahiptir (Shojaei vd., 2019; Gubert vd., 2021).

2.7 Tezin Amacı

Hücre-hücre iletişimi, hücrelerin, organların ve sağlam sistemlerin biyolojik işlevlerini ve mikroçevresel homeostazını sürdüren kritik bir süreçtir. Hücre-hücre iletişiminin karmaşıklığı onlarca yıldır araştırılmış olup şu anda gelişim biyolojisi, karsinogenez ve organ işlev bozukluğunun moleküler mekanizmalarının bir parçası olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalar, eksozomların alıcı hücreler ile etkileşime girdiğini ve iletişim kurduğunu doğrulamaktadır (Gajos-Michniewicz vd., 2014). Ekstraselüler veziküller (EV) olarak tanımlanan eksozomlar (Kajimoto vd., 1981), boyut olarak 30 ila 150 nm arasında değişen en küçük EV alt grubunu

temsil etmektedir. Çeşitli çalışmalar, eksozomların BMSC'nin sağladığı terapötik etkide önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Katsuda vd., 2016). Bir zamanlar hücrenin 'çöpçü'sü olarak kabul edilen eksozomlara olan ilgi 2013 yılında tıp alanında Nobel Ödülü'nün hücrenin taşıma sistemini nasıl organize ettiğinin gizemini çözdükleri için James E. Rothman, Randy W. Schekman ve Thomas C. Sudhof'a verilmesiyle artmaya başlamıştır (Raposo vd., 1996).

Yapılan çalışmalardan yola çıkılarak eksozomlar için; üzerlerinde bulunan adhezyon molekülleri yoluyla bir alıcı hücrenin yüzeyine bağlanması, plazma membranı ile yapışmadan sonra vezikülün füzyonu, reseptör aracılı endositoz ve vezikülleri endositik bölmelere içselleştirerek gerçekleşen fagositoz gibi etkileşim mekanizmaları belirlenmiştir (Jella vd., 2018). Hedef hücreler ve eksozomlar arasındaki bu etkileşimler, membran reseptörlerinin transferine, eksozomların yüzeyine bağlı büyüme faktörlerine, spesifik proteinlerin hedef hücrelere verilmesine ve genetik materyalin transferine yol açabilir. Son birkaç on yılda yapılan araştırmalar, EV'lerin serbest bırakılmasının aynı zamanda normal fizyolojik süreçlerde olduğu kadar patolojik ilerlemede de yer alan hücreler arası iletişim için önemli bir aracı olduğunu göstermiştir. Hücre-hücre iletişiminin tümör mikroçevresinin karmaşıklığına, heterojenliğine ve tümör nüksü ve metastazına aracılık etmedeki rolü büyük önem taşımaktadır (Menck vd., 2013). Hücreler arası iletişimin önemli ve köklü araçları olarak eksozomlar (Raposo vd., 2013), meme kanserinde başlangıç, ilerleme ve metastatik süreçlerde temel oyuncular olarak göründüklerinden beri artan bir ilgi görmektedirler (Jabbari vd., 2020). Eksozomların hücreler arası iletişimdeki rolü ve potansiyel bir terapötik ajan olarak vaadi, son on yılda EV araştırmalarına bilimsel ilgiyi artırmıştır. Eksozomların gizli potansiyelini ortaya çıkarmak için hala ayrıntılı ve odaklanmış bilimsel araştırmalara ihtiyaç vardır. Bununla birlikte, bir dizi önemli soru cevapsız kalmaktadır: EV biyogenezi ve salım hızı nasıl düzenlenir? Kargoları nasıl düzenlenmektedir? EV araştırma alanının teknik yönlerini ilerletmek için kullanılabilecek farklı EV alt tipine özgü işaretçileri nelerdir? EV araştırma alanının ilerlemesi ve kliniğe geçiş için bu soruların yanıtlarının bulunması çok önemlidir (Jadli vd., 2020).

Bu tez çalışmasında ise; terapötik etkisi olduğu bilinen kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden (BMSC) eksozomların izolasyonunun ve karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi amaçlanmaktadır. İzole edilen ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş eksozomlar meme kanseri sferoid modeline aktarılmıştır. Çalışma süresince karakterize eksozomlar meme kanseri sferoid modelinde test edilerek tümör hücrelerine etkileri incelenecektir. Tez süresince izlenen yöntem ise sırasıyla; BMSC'den eksozomların izolasyonu, izole edilen eksozomların karakterizasyon çalışmaları, eksozomların meme kanseri sferoid modelinde test edilmesi ve istatistiksel analizlerin gerçekleştirilmesi şeklindedir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Sarf malzemeleri

- Penisilin/Streptomisin (Biosera XCA4122/100, ABD)
- L-glutamin (Biosera XC-T1755/100, ABD)
- 2-merkapttoetanol
- Minimum Essential Medium Eagle (alphaMEM, M8042, Merck)
- Dulbecco'nun fosfat tampon solüsyonu (D-PBS) (Merck, p.n; P4417)
- RPMI-1640 (RPMI-1640 medium, Merck, R6504-50L)
- 6 gözlü plaka (TPP® tissue culture plates, Sigma, Z707759)
- 24 gözlü plaka (Corning® Costar® Ultra-Low Attachment Multiple Well Plate, Sigma, CLS3473)
- Paraformaldehit (Merck, P6148-500G)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich CAS No.9002-93-1)
- BSA (Bovine Serum Albumin, Merck, A7030-10G)
- TBS (Tris Buffered Saline, Merck, T5912)
- DAPI (Sigma-Aldrich, D9542-1MG)
- NaHCO₃ (Sodium bicarbonate, Merck, S5761)
- Gliserol (Merck, G5516-100ML)
- CD9 (abcam,223052, 1:1000)
- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, Merck, E9884)
- Qiagen RNeasy Mini Kit
- Absolute etanol (Merck)
- Qiagen RT First strand kiti
- PDGF-AA (Recombinant Human PDGF-AA, Peprotech, 100-13A)
- Fetal sığır serum (FBS) (Capricorn, FBS-11A, Almanya)
- Cell Proliferation Reagent (WST-1, ref: 05015944401)
- 48 gözlü plaka (SPL, Kore)
- Serolojik pipet (1,2,5,10,25 ml) (SPL, Kore)
- Pastör pipet (LPitaliano, L136030, İtalya)

3.1.2. Kullanılan cihazlar

- Floresans mikroskop, (fotoğraf makinesi aparatlı), Zeiss Axio
- Floresans mikroskop, (fotoğraf makinesi aparatlı) Zeiss Axio Observer, A1
- Laminar akışlı kabin, Heraus Sınıf II
- Hassas terazi (Radwag, AS 220 R.2, Polonya)
- Manyetik karıştırıcı (Wisd laboratuvar ekipmanları, Wise Stir, MSH-20A)
- CO₂'li inkübatör (Thermo Scientific, ABD)
- Soğutmalı santrifüj (Eppendorf, 5810R, Almanya)
- Lightcycler 480 II gerçek zamanlı PCR cihazı/ RocheIşık/Florasan ters faz mikroskop (Zeiss Axio Vert.A1, Almanya)
- Su banyosu (Memmert, Almanya)
- FACS (floresan aktive hücre ayırım cihazı)(BD FACSARIA III, BD Bioscience)
- Aydınlık alan mikroskobu (Leica DM6, Leica, Germany)
- RT-PCR cihazı (LightCycler 480 Instrument II, Roche)
- MTT (SPECTRAmax 340PC)
- GraphPad istatistiksel analiz programı (San Diego, CA, USA)
- Malvern Zetasizer Nano-ZS (Malvern Inst. Ltd., UK)
- Design Expert Version 13 analiz programı

3.2. Yöntem

3.2.1 Hücre kültürü ve BMSC'den eksozomların izolasyonu

Yapılan literatür çalışmalarında eksozom salımının bazı hücre kültürü parametrelerine bağlı değiştiği görülmektedir (Lobb vd., 2015). Bu parametreler pasaj numarası, başlangıç hücre konsantrasyonu ve FBS'siz ortamda bekleme süresi olarak belirlenmiş ve bu parametrelerin değişimine bağlı olarak eksozomal protein miktarının değişeceği öngörülmüştür. Bu nedenle Design Expert 13 programında Box-Behnken tasarımı kullanılarak 15 farklı deney seti elde edilmiş ve optimizasyon tasarımı planlanmıştır. Tasarım parametreleri literatür bilgilerine dayanarak pasaj numarası için 4-6, başlangıç hücre konsantrasyonu için $3-5 \times 10^5$ hücre/flask ve FBS'siz ortamda bekleme süresi 12-36 saat aralıkları olarak belirlenmiş (Patel vd., 2017) ve response olarak eksozomal protein miktarı ug/mL olarak tasarımda yer almıştır.

	Std	Run	Block	Factor 1 A: Depletion time h	Factor 2 B: Passage number	Factor 3 C: Cell seeding cells/flask	Response 1 Protein content ug/mL
	1	1	Block 1	12.00	4.00	400000.00	
	7	2	Block 1	12.00	5.00	500000.00	
	10	3	Block 1	24.00	6.00	300000.00	
	12	4	Block 1	24.00	6.00	500000.00	
	2	5	Block 1	36.00	4.00	400000.00	
	15	6	Block 1	24.00	5.00	400000.00	
	14	7	Block 1	24.00	5.00	400000.00	
	3	8	Block 1	12.00	6.00	400000.00	
	8	9	Block 1	36.00	5.00	500000.00	
	13	10	Block 1	24.00	5.00	400000.00	
	9	11	Block 1	24.00	4.00	300000.00	
	6	12	Block 1	36.00	5.00	300000.00	
	11	13	Block 1	24.00	4.00	500000.00	
	5	14	Block 1	12.00	5.00	300000.00	
	4	15	Block 1	36.00	6.00	400000.00	

Şekil 3.1 Design Expert programında Box Benchen ile oluşturulan deney tasarımları

Çalışma süresince kullanılacak olan BMSC hücreleri α -MEM ortamında, filtreli kapaklı T-flasklarda 37°C ve %5 CO₂, %95 nemli hava içeren inkübatörde

kültürlenmiştir. Ortam 10% fetal bovin serum (FBS), 1% L-glutamin (200 mM), 0.5% gentamisin (10 mg/mL) ve 0.5% penisilin/streptomisin (10.000U-10 mg/mL) ile desteklenmiştir. Ardından oluşturulan 15 farklı deney setinden eksozomları izole etmek için ticari bir kit olan Total Exosome Isolation Reagent (from cell culture media)- Thermo Fisher Scientific (Cat No: 4478359) kiti kullanılmıştır. Deney setlerine uygun olarak hücreler flasklara ekilmiş, nemli koşullarda 37°C'de %5 CO₂ inkübe edilmiştir. Hücrelerin ortamı iki günde bir değiştirilerek, yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştıklarında ortam santrifüj tüpüne toplanarak +4 °C'de 2000* g'de 30 dk boyunca santrifüjlenerek hücre ve hücre debrislerinin çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrası eksozomların bulunduğu süpernatant dikkatli bir şekilde steril başka bir santrifüj tüpüne alınmadan 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek üzerine kit içerisinde yer alan reaktif solüsyondan yarı hacmi kadar eklenerek homojenize edilmiş ve +4°C'de gece boyu bırakılmıştır. Bir sonraki aşamadan reaktif içinde yer alan eksozomlar +4°C'de 14400 rpm'de 1 saat boyunca santrifüjlenmiş. Bu aşamada eksozomlar çöktüğünden süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet yaklaşık 100 µL steril PBS ile süspanse edilerek sonraki çalışmalar için +4°C'de saklanmıştır.

3.2.2 İzole edilen eksozomların karakterizasyon çalışmaları

İzole edilen eksozomların morfolojik olarak incelenmesi için STEM analizi gerçekleştirilmiştir. Biyolojik örneklerin STEM görüntülemesinin avantajı, biyolojik örneklerin boyamaya gerek kalmadan görüntülenmesine izin verebilen halka şeklindeki karanlık alan görüntülerinin yüksek kontrastıdır. Membranında çift lipidik tabakaya sahip olan eksozomların morfolojik görüntülenmesi için de STEM analizi tercih edilmektedir (Jung ve Mun, 2018). Eksozomların polidispersite indeksleri (PDI) ve zeta potansiyeli, Malvern Zetasizer Nano-ZS (Malvern Inst. Ltd., UK) tarafından dinamik ışık saçılması (DLS) kullanılarak belirlenmiş ve ortalama boyut ortalama $\pm$ standart olarak sunulmuştur. Bunun için eksozomlar yaklaşık 1 ml PBS içinde seyreltilerek Malvern kuvvetlerine alınmış ve +4°C'de 3 tekrarlı ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ardından toplam protein miktarının belirlenmesi için BCA testi gerçekleştirilmiştir. Eksozomlar üzerine PBS eklenerek 6000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş, PBS uzaklaştırılarak pelletlere 100'er µl RIPA tamponu ve proteaz/fosfataz inhibitörü karışımı (100:1

oranda) eklenerek 30 saniye sonike edilmiştir. 15 dakika boyunca buz üzerinde orbital çalkalayıcıda bekletildikten sonra ~14500 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiş ve üst sıvıda bulunan proteinlerin kantitatif ölçümü için BCA analizi gerçekleştirilmiştir. BCA analizi için UP su ve stok BSA kullanılarak 0-2000 µg/µl konsantrasyon aralığında standart çözeltileri hazırlanmış, örnek ve tekrar sayısı ile 9 standart çözeltisine uygulanacak reaktif madde miktarı hesaplanmıştır. Toplam reaktif madde belirlenip 96 gözlü pleyte 25'er µl örnek ve 100 µl reaktif madde eklenerek 30 dakika boyunca karanlıkta ve 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 570 nm'de mikropleyt okuyucuda absorbans değerleri elde edilmiştir. Elde edilen absorbans değerlerinden standart eğrisi çıkarılmış ve her bir örnek için protein miktarı standart eğrisinin denkleminde belirlenmiştir.

Eksozomal proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrıştırılması SDS-PAGE ile yapılmıştır. 8%'lik ayırma jeli, hazırlanarak iki cam arasına dökülmüş, üzeri izopropil alkol ile kaplanarak havayla teması önlenmiştir. Proteinlerin yükleneceği kuyuların oluşması için jele tarak takılmış ve kuyular oluşunca tarak çıkarılarak tank yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Protein lizatları 20 µg'a karşılık gelen hacimde UP su ile tamamlanmış ve 4X yükleme tamponuyla son hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır. Bu sırada proteinler 95°C'de 5 dakika denatüre edilip hemen buz üzerine alınmış ve sonrasında da jelde oluşan kuyulara yüklenmiştir. Yükleme tamamlandığında yürütme tamponu içerisinde 80V'ta elektroforez başlatılarak proteinlerin jel üzerinde yürütmesi sağlanmış, proteinler jelde istenilen konuma geldiğinde elektroforez durdurulmuştur. Western blotlama için, proteinlerin membrana transferi adına öncelikle blotlama sandviç aparatının içine sırasıyla sünger, whatmann kağıdı, SDS-PAGE jel, metanolde ıslatılmış PVDF membran, whatmann kağıdı ve yine sünger yerleştirilerek sıkıştırılmıştır. Tank 1X transfer tamponuyla doldurulup gece boyu 4°C'de 90 mA koşullarında membrana transferi gerçekleştirilmiştir. Ardından, sandviç sisteminden dikkatlice çıkarılan PVDF membran, spesifik olmayan protein bağlanmasını önlemek için %5 süt tozu içeren PBS-T bloklama tamponuyla 1 saat boyunca bloklanmıştır. Antikor solüsyonu (%10 bloklama tamponu ve %0.1 sodyum azid içeren PBS-T) içerisinde 1:500 oranlarında hazırlanan b-actin ve CD9 primer antikorları ile gece boyunca 4°C'de işaretlenmiştir. Sekonder antikorlarla işaretlemeden önce PVDF membran yıkama tamponuyla 5 kez 5 dakika boyunca yıkanmış, sonrasında antikor solüsyonunda

1:2000 oranında seyreltilen HRP enzimi bağlı sekonder antikorlar oda sıcaklığında 1 saat boyunca orbital çalkalayıcı üzerinde işaretlenmiştir. Süre sonunda sekonder antikorlar uzaklaştırılmış 5 kez 5 dakika yıkandıktan sonra 1:1 oranda karıştırılan ECL substratları membrana uygulanıp ChemiDoc cihazında membranda oluşan bantlar görüntülenmiştir.

Eksozomların hem CD9 pozitifliği açısından hem de boyut açısından belirlenip izole edilebilmesi için FACS analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için eksozomlar FACS tamponu (%2 BSA, 0.05 mM EDTA içeren steril PBS) içerisinde BD polistren FACS tüplerinde toplanmıştır. 14400 rpm'de 1 saat santrifüj ardından iki kere FACS tamponu ile yıkanmış, CD9 birincil antikorlar ve FITC ile 1 saat +4 C'de işaretlenmiş, iki kere FACS tamponu ile yıkandıktan sonra ikincil antikor ile 1 saat oda sıcaklığında işaretlenmiştir. İşaretlenmeyen antikorların giderilmesi için iki kere FACS tamponu ile yıkandıktan sonra, 3 mL FACS tamponu içerisinde homojenize edilen eksozomlar, buz üzerinde taşınarak İBG'de FACS cihazında CD9+ ve boyut açısından izole edilmiştir.

3.2.3. Meme kanseri sferoid modelinin oluşturulması ve karakterizasyonu

Tez kapsamında, sferoid oluşumu için östrojen bağımlı MCF-7 hücreleri kullanılmış ve multiselüler sferoid oluşumunu desteklemek ve vaskülarizasyonu sağlamak amacıyla meme kanseri hücreleri insan göbek kordonu endotel hücreleri olan HUVEC'ler ile birlikte kültürlenmiştir (Bouis vd., 2001). MCF-7 ve HUVEC hücreleri RPMI-1640 ortamında, filtreli kapaklı T-flasklarda 37°C ve %5 CO₂, %95 nemli hava içeren inkübatörde kültürlenmiştir. Ortam 10% fetal bovin serum (FBS), 1% L-glutamin (200 mM), 1% non-esansiyel amino asit, 0.5% gentamisin (10 mg/mL) ve 0.5% penisilin/streptomisin (10.000U-10 mg/mL) ile desteklenmiştir. Hücreler yoğunluğa ulaştığında haftada bir 0.05% tripsin-EDTA ile pasajlanmıştır. Sferoid oluşumu için askıda kalma (hanging drop) tekniği kullanılmıştır. Sferoid oluşumunu başlatmak için hücreler tripsin/EDTA ile kaldırıp sayıldıktan sonra steril petrinin kapağına 2*10⁵ h/ml konsantrasyonunda olacak şekilde 30'ar µL damlacıklar halinde bırakılmış ve kapak hızlıca ters çevrilecek petri kapatılmış ve 37°C ve %5 CO₂, %95 nemli hava içeren inkübatörde kültürlenmiştir. Herhangi bir buharlaşma olmaması adına petri içine steril PBS

eklenmiştir. Sferoidler 7 gün boyunca kültürlenmiş ve 1., 4. ve 7. günlerde örnekler alınarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Karakterizasyon çalışmaları, temelde fiziksel ve biyokimyasal analizler olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Sferoidlerin fiziksel karakterizasyonu için ilk olarak belirlenen aralıklarda ışık mikroskopunda sferoidlerin morfolojisi incelenmiştir. Sonrasında ışık mikroskopundan elde edilen görüntüler ile ImageJ yazılımı kullanılarak sferoidlerin boyut analizi yapılmıştır. Boyut ölçümü için yazılıma aktarılan görüntülerden sferoidlerin farklı boyuttaki kısımlarının çapları ölçülmüştür. Örneğin iki farklı ölçüm için $(axb)^{1/2}$, üç farklı ölçüm için $(axbxc)^{1/3}$ şeklinde bir hesaplama ile sferoidlerin ortalama çap değerleri (L) hesaplanmıştır. Boyut analizinde elde edilen ortalama çap değerleri ile $V=4\pi x[(12)^{3/3}]$ formülü kullanılarak ortalama sferoid hacmi hesaplanmıştır (Nashimoto vd., 2020). Bununla birlikte, sferoidlerin fiziksel karakterizasyonu kapsamında detaylı yüzey morfolojisini incelemek amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Bu teknik nano ölçek seviyesinde yüksek çözünürlük olanağı sağladığından sferoidlerin fiziksel karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Özellikle sferoid yüzeyinin yüksek çözünürlüklü görüntüleri SEM ile analiz edilmekte olup, yüksek çözünürlüklü SEM tekniği ile hücre-hücre etkileşimlerinin bütünlüğü, hücre zarı bütünlüğü ve hücrel çıkıntıları da analiz edilmektedir (Carvalho vd., 2017). SEM analizi için sferoidler ULA pleytlerden kesik uçlu pipetler aracılığıyla farklı bir pleyte alınarak fazla ortam dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Sferoidlerin fiksasyonu için 2.5% glutaraldehit çözeltisi eklenerek 4°C’de analiz zamanına kadar bekletilmiştir. Sonrasında glutaraldehit çözeltisi dikkatlice uzaklaştırılarak önce distile su ile, ardından 50%, 70%, 90%, 100% ve 100% etanol serileri ile yıkama yapılmıştır. Son yıkama basamağında sferoidler kesik pipet uçlarıyla karbon film üzerine transfer edilerek etanolün uçmasıyla kuruma sağlanmıştır. Sferoidlerin tamamen kurumasını sağlamak için hekzametildisilazan (HMDS) eklenerek gece boyunca çeker ocakta bekletilmiştir. Sferoidler kritik nokta kurutucusuna yerleştirilerek nemi uzaklaştırılmış, ardından 10 nm altın ile kaplanarak SEM cihazında analiz edilmiştir.

Sferoidlerin biyokimyasal karakterizasyonu için öncelikle, sferoidlerdeki hücre lokalizasyonunu incelemek için bir set hücre grubunda, MCF-7 kanser

hücreleri 20 uM yeşil CellTracker boyasıyla, HUVEC'ler ise 15 uM kırmızı CellTracker boyasıyla boyanarak 30 dakika inkübe edildikten sonra, PBS ile yıkanarak fazla boya uzaklaştırılmış, sferoid oluşumu için taze ortam içerisinde belirlenmiş konsantrasyonlarda pleytlere ekilmiş ve 1., 4. ve 7. günlerde floresan mikroskopta görüntülenmiştir. Biyokimyasal analizler kapsamında kalitatif canlılık analizi kapsamında canlı/ölü boyaması yapılmıştır. Canlı/ölü boyaması için sferoidler kesik pipet uçlarıyla başka bir pleyte aktarıldıktan sonra fazla ortam dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Fosfat tamponlu tuzlu çözeltiye (PBS) canlı hücreleri belirlemek için 2 µmol/L kalsein, ölü hücreleri belirlemek için 4 µmol/L etidyum homodimeri eklenerek homojenize edilmiş, bu boya karışımı sferoidlerin üzerine eklenmiştir. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 45 dakika inkübasyonun ardından sferoidlere dikkat ederek boya uzaklaştırılmış, fazla boyayı gidermek için 3 kez PBS yıkaması yapılmıştır. Canlı ve ölü hücreler floresan mikroskopta incelenmiş, canlılar yeşil, ölüler kırmızı filtrede görüntülenmiştir. Sferoidlerin kantitatif canlılık analizi için ise suda çözünen tetrazolyum tuzları (WST-1) analizi yapılmıştır. Sferoidler kesik pipet uçlarıyla farklı bir 96 gözlü pleyte aktarılmıştır. 3 tekrarlı olacak şekilde 3 farklı göze yaklaşık 10 adet sferoid aktarıldıktan sonra her bir göze 100 µL ortam ve 10 µL WST-1 solüsyonu eklenmiştir. Boş bir göze 100 µL ortam ve 10 µL WST-1 solüsyonu eklenerek kör olarak kullanılmıştır. Işıktan etkilenen bir boya olduğu için 3 saat boyunca karanlıkta ve 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi dolduğunda 450 nm dalga boyunda kalorimetrik absorbans değeri mikropleyt okuyucu ile okunmuştur.

Biyokimyasal analizlerden olan qRT-PCR analizinde, sferoidlerdeki zamana bağlı Ki-67 ve HIF-1α seviyesinin gen düzeyinde incelenmesi için kantitatif olarak qRT-PCR çalışması yürütülmüş, kontrol olarak HPRT1, GAPDH ve ACTB genleri çalışılmıştır. Ek olarak, bu iş paketinde yer almıyor olsa da ileriki çalışmalara kontrol olması amacıyla söz konusu bu ara rapor dahilinde ilave olarak, TNF-a, MMP-2, MMP-9, ZO1, B-catenin, Vinculin, E-cadherin ve PCNA genlerinin incelenmesi de yapılmıştır. Analiz için kullanılan primer tasarımları **Tablo 3.1**'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Sferoid karakterizasyonu için yapılan qRT-PCR çalışmalarında kullanılan primer tasarımları

Gen listesi	f_pr	r_pr
<i>KI67</i>	CTGACCCTGATGAGAGTGAGGGA	ACTCTGTAGGGTCGAGCAGG
<i>HIF1A</i>	AGAGGTTGAGGGACGGAGAT	GCACCAAGCAGGTCATAGGT
<i>TNFALPHA-TNF</i>	CTGGGCAGGTCTACTTTGGG	CTGGAGGCCCCAGTTTGAAT
<i>MMP-2</i>	TAGCTGCTGGCTCACTGTGT	CTTCAGCACAAACAGGTTGC
<i>MMP-9</i>	GAACCAATCTCACCGACAGG	GCCACCCGAGTGTAAACATA
<i>ZO1-TJP1</i>	TGGTCTGTTTGCCCACTGTT	TCTGTACATGCTGGCCAAGG
<i>β-catenin</i>	TGTTAAATTCTTGGCTATTACGACA	CCACCACTAGCCAGTATGATGA
<i>VINCULIN-VCL</i>	GTTTAATGGCAAGGCAGCCC	AAACAAAGGAGAAACCTGACCT
<i>E-cadherin</i>	TGCTCTCCAGGAACCTCTG	GCGGCATTGTAGGTGTTCA
<i>PCNA</i>	GCCAGAGCTCTTCCCTTACG	TAGCTGGTTTCGGCTTCAGG
<i>HPRT1</i>	GACCAGTCAACAGGGGACAT	GTGTCAATTATATCTTCCACAATCAAG
<i>GAPDH</i>	CGTAGCTCAGGCCTCAAGAC	GCTGCGGGCTCAATTTATAG
<i>ACTB</i>	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	CGTGGATGCCACAGGACT

Analiz için, örnek günlerindeki sferoidler kesik uçlu pipet yardımıyla hasat edilmiş, santrifüj sonrası sferoidlerdeki hücre pelletlerinden taze şekilde Qiagen RNeasy Mini Kit kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk olarak örnekler, RNA'nın bütünlüğünü korumak için RNaz'ı hemen inaktive edebilen, denatüre edici guanidin tiyosiyanat bileşeni içeren 350 μ L RTL tamponu kullanılarak lize edilmiştir. Ardından, uygun bağlanma koşullarını sağlamak için homojen hale getirilmiş lizata 350 μ L %70 etanol ilave edilmiştir. RNA moleküllerini bağlamak amacıyla kit içerisinde bulunan Rneasy mini spin kolonları kullanılmış ve 3 kere yapılan yıkama işleminin ardından saf, konsantre RNA, 25 μ L nükleaz içermeyen su içerisine ayrıştırılmıştır. Örneklerdeki toplam RNA miktarı NanoDrop cihazı kullanılarak 260 nm'de ölçülmüştür. Daha sonra, örneklerden ekstrakte edilen RNA'lar ile Qiagen RT First strand kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, kıyaslama yapılacak tüm örnekler için RNA miktarları eşitlenmiş, her bir RNA örneğinden genomik DNA'yı uzaklaştırmak için örnekler GE (genomic elimination) tamponu eklenmiş ve örnekler 42°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra RNA örneklerine ters-transkriptaz karışımı (rastgele heksamerler, oligo-dT, deoksiriboz nükleosit trifosfatlar ve ters transkriptaz enzimi) eklenmiş ve örnekler 42°C'de 20dk inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyon hazırlığında; Spin edilen liyoflize primerlere 1250 μ L nükleaz içermeyen H₂O eklenerek stok konsantrasyonu 20uM olarak ayarlanmış, porsiyonlanarak -20°C'de saklanmıştır. Çalışma esnasında 1:2 oranında dilüe edilerek son konsantrasyon 10 μ M olarak kullanılmıştır. SYBR Green kit protokolüne göre (ABT 2X qPCR SYBR-Green MasterMix) reaksiyon miksi hazırlanmış [SYBR Green (5x), F-primer (10 μ M-1x),

R-primer (10 μ M-1x), cDNA (2x), H₂O (1x)], yine kit protokolüne ve primerlerin T_M değerine göre cihaz döngüleri ayarlanmıştır (Denatürasyon; 1 döngü, 95°C, 6dk – Amplifikasyon; 40 döngü, 95°C, 15 sn ve 58°C, 30sn* floresan toplama, single). Her bir gen ve örnek için 96 gözlü plakada 4 göz çalışılmıştır. Gen ekspresyon analizleri için cihazdan Ct değerleri alınmış, CT değerleri kullanılarak, <https://dataanalysis2.qiagen.com/pcr> sistemi üzerinden $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi aracılığıyla kat değişimleri ve kat regülasyon değerleri hesaplanmıştır. Değerlerini ± 2.00 'nin üzerinde ve p değeri <0.05 olanların değişimleri anlamlı kabul edilmiştir. Isı haritaları Excel programında gerçekleştirilmiştir.

Bir diğer biyokimyasal analiz olan Western blot için, sferoidler için yukarıda eksozomlara uygulanan benzer bir prosedür izlenmiştir. Son olarak kalitatif biyokimyasal analizlerinden olan immunofloresan boyama için ise, kesik pipet uçlarıyla farklı bir pleyte aktarılan sferoidler fazla ortam uzaklaştırıldıktan sonra 4% paraformaldehit ile 4°C'de yarım saat boyunca fikse edilmiş, sonrasında 3 kez PBS ile yıkanarak analiz zamanına kadar 4°C'de PBS içinde bekletilmiştir. Fikse edilen sferoidler, sferoidlerin dipte toplanmasını sağlayacak V-bottom pleytlere aktarılmıştır. 0.1% Triton-X (PBS içinde) ile 15 dakika oda sıcaklığında sferoidlerin permeabilizasyonu sağlanmıştır. Sonrasında Triton-X uzaklaştırılarak 1% BSA (bovin serum albumin) (PBS içinde) eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Ki-67 ve HIF-1 α antikorları 1:200 oranında 0.025% M Triton-X, 3% BSA içeren TBS içinde seyreltilmiştir. Hazırlanan Ki-67 ve HIF-1 α primer antikorları sferoidlere uygulanarak 4°C'de gece boyu rocker çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda primer antikorlar uzaklaştırılıp 3 kez PBS ile yıkama yapılmıştır. Sekonder antikorlar (ms 594, rb 488) 1:1000 oranında TBS ile seyreltilerek sferoidlerin üzerine eklenmiş, ışıktan etkilenmemesi için alüminyum folyo ile kapatılarak 1 saat oda sıcaklığında rocker çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Sonrasında sekonder antikorlar uzaklaştırılarak tekrar 3 kez PBS ile yıkama yapılmış, 1.5 μ g/ml DAPI solüsyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. DAPI solüsyonu uzaklaştırılıp tekrar PBS yıkaması yapıldıktan sonra sferoidler kesik pipet uçları yardımıyla lamaların üzerine yerleştirilip kapatma solüsyonu eklenerek üzerleri lamla kapatılmıştır. Floresan mikroskopta DAPI, Ki-67 ve HIF-1 α 10X ve 20X büyütmelede görüntülenmiştir.

3.2.4. Eksozomların meme kanseri sferoid modelinde test edilmesi

Statik yöntemle oluşturulan sferoidler 4. günde toplanmış ve 96 gözlü pleytin her bir gözüne 10 sferoid olacak şekilde toplam 6 göze 2 tekrarlı 3 farklı grup için kesik uçlu pipetle alınmıştır. 3 farklı grup sırasıyla kontrol, CD9+ ve DOX uygulanmış gruplardır. Sferoidler gözlere alındıktan sonra üzerlerindeki fazla sıvı sferlere zarar vermeden uzaklaştırılmış. Sferoidlerin üzerine 100'er μ L besin ortamı içinde sırasıyla 7×10^4 CD9+ eksozom/göz, 20 μ M DOX/göz eklenmiş ve kontrol grubuna yalnızca besin ortamı eklenmiştir. 48 saat sonra sferlerin ışık ve floresan görüntüleri alınmış, ardından hücre canlılığının belirlenmesi için WST-1 analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için yukarıda bahsedilen aynı prosedür izlenmiştir.

3.2.5 İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz GraphPad Prism 7.0 kullanılarak yapılmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Veriler, Bonferroni son testleri ile İki Yönlü ANOVA, Dunnett Çoklu Karşılaştırma Testi ile Tek Yönlü ANOVA ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi ile analiz edilmiştir. ns:anlamlı olmayan $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ Önem, $< 0,05$ p değeri olarak tanımlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1 BMSC'den eksozomların izolasyonu

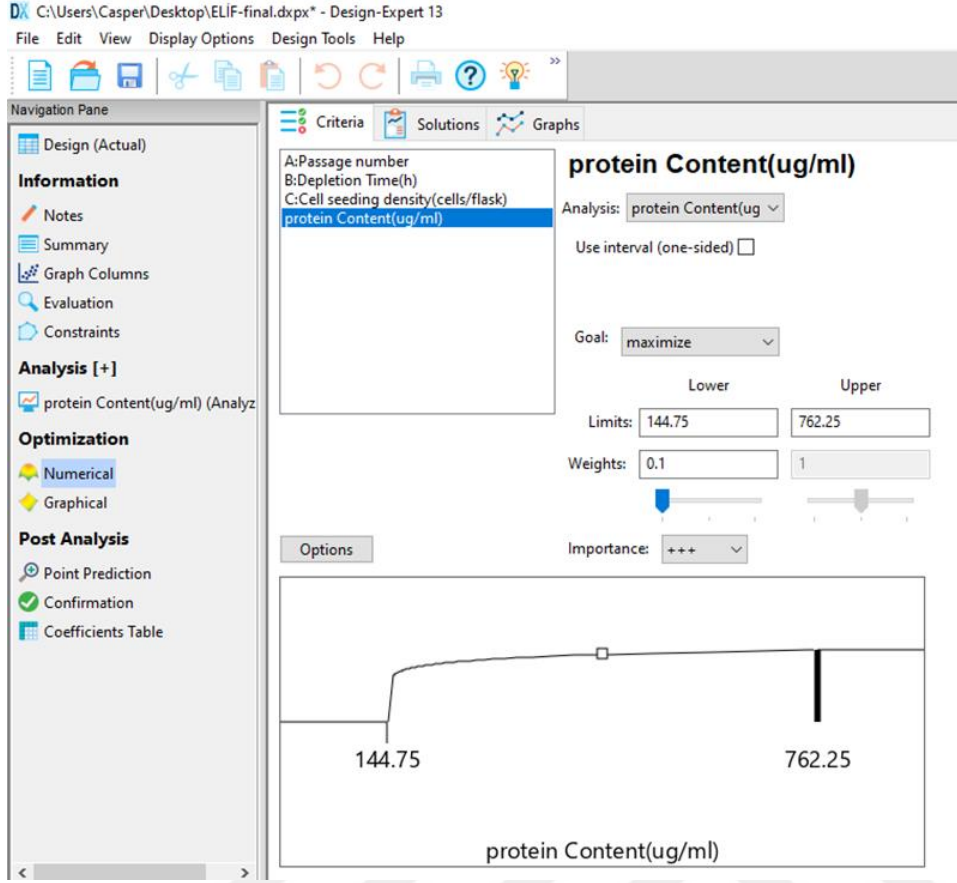
4.1.1 Hücre kültürü parametrelerinin Design Expert programı ile optimizasyonu

Eksozom salımının birden fazla hücre kültürü parametresine bağlı olduğu bilindiğinden optimizasyon çalışması için Design Expert Version 13 programı kullanılmıştır. Buna bağlı olarak Box-Benchen tasarımıyla farklı pasaj numarası, başlangıç hücre konsantrasyonu ve FBS'siz ortamda bekleme süresine sahip 15 deney seti aşağıdaki gibi elde edilmiştir:

Tablo 4.1. Design Expert programında Box-Benchen tasarımıyla elde edilen deney setleri

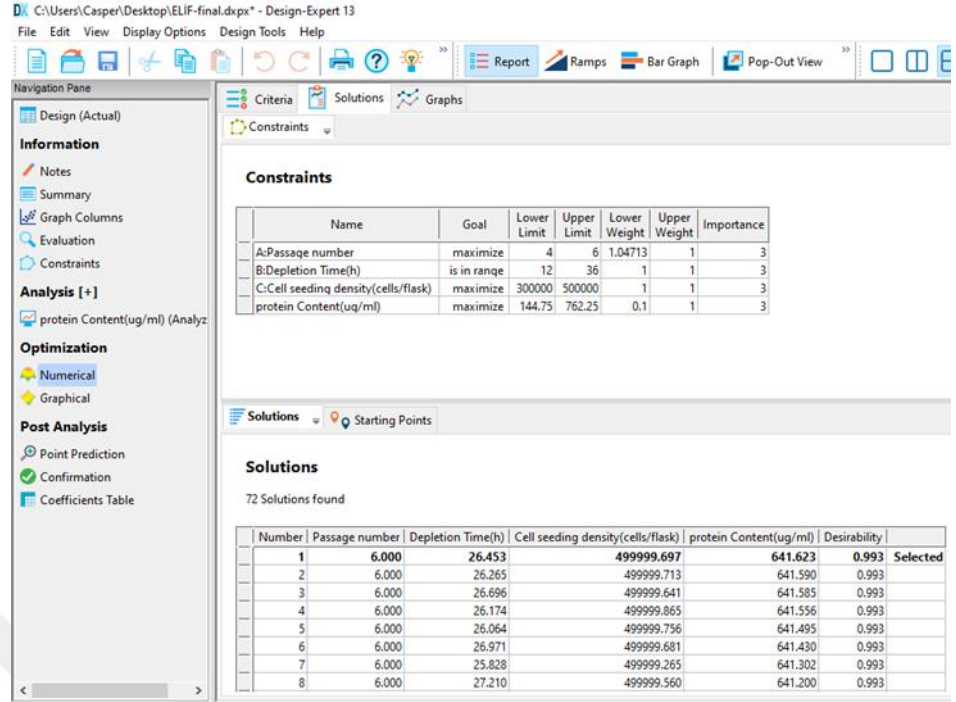
Pasaj numarası	Örnek	FBS'siz ortamda bekleme süresi (saat)	Başlangıç hücre konsantrasyonu*10 ⁵ (hücre/flask)
4	P4-1	24	3
	P4-2	12	4
	P4-3	36	4
	P4-4	24	5
5	P5-1	12	3
	P5-2	36	3
	P5-3	24	4
	P5-4	24	4
	P5-5	24	4
	P5-6	12	5
	P5-7	36	5
6	P6-1	24	3
	P6-2	12	4
	P6-3	36	4
	P6-4	24	5

Ardından programda yapılan optimizasyon çalışması sonucu eksozomal protein miktarını maksimize edecek koşullar belirlenmiştir.



Şekil 4. 1. Box-Benchen tasarımında protein miktarının optimize edildiği tasarım

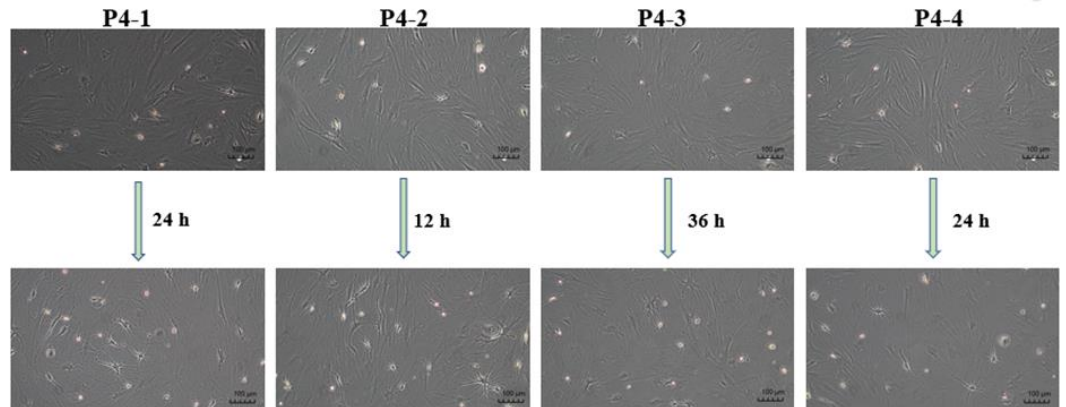
Optimizasyon çalışması sonucu eksozomal protein miktarını maksimize eden koşullar pasaj 6, başlangıç hücre konsantrasyonu yaklaşık 5×10^5 hücre/flask ve FBS'siz ortamda bekleme süresi yaklaşık 24 saat olarak belirlenmiştir. Bu koşullar sonucu protein miktarı yine yaklaşık 641 ug/ml olarak belirlenmiştir.

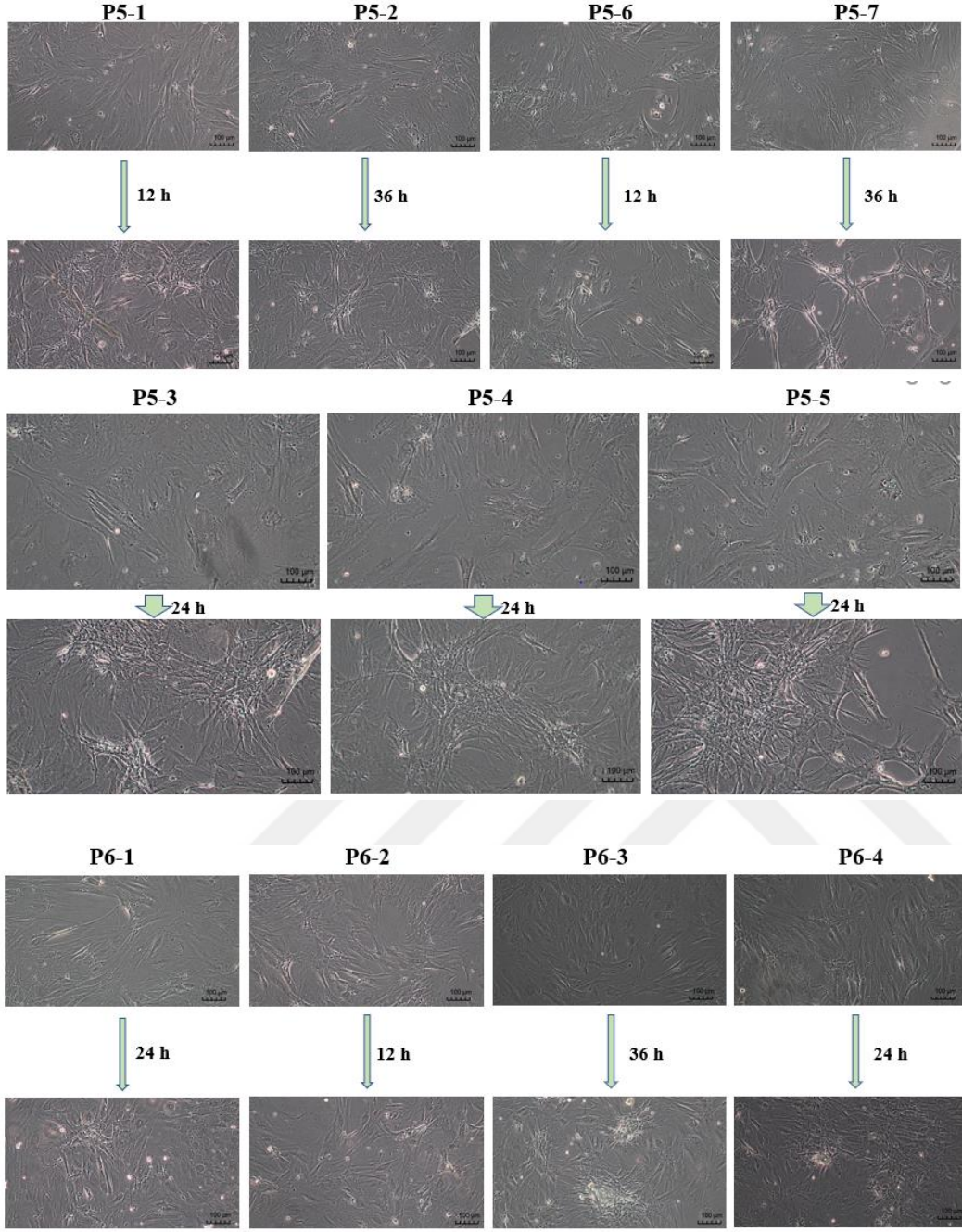


Şekil 4. 2. Optimizasyon sonrası tasarımın desirability ve maksimum protein miktarını veren parametre değerleri

4.1.2 Işık mikroskobu görüntüleri

Optimizasyon aşamasında her bir deney seti için T25 flask ile çalışılmıştır. BMSC'ler belirlenen koşullarda ekilip kültürlendikten sonra %80 yoğunluğa geldikten sonra ışık mikroskobu ile görüntülenmiş, ardından FBS'te bulunan eksozomların uzaklaştırılması için belirli zaman aralıklarında FBS'siz ortama maruz bırakılmışlardır. FBS'siz ortam ile muamele sonrası tekrar ışık mikroskobu ile görüntülenmişlerdir.





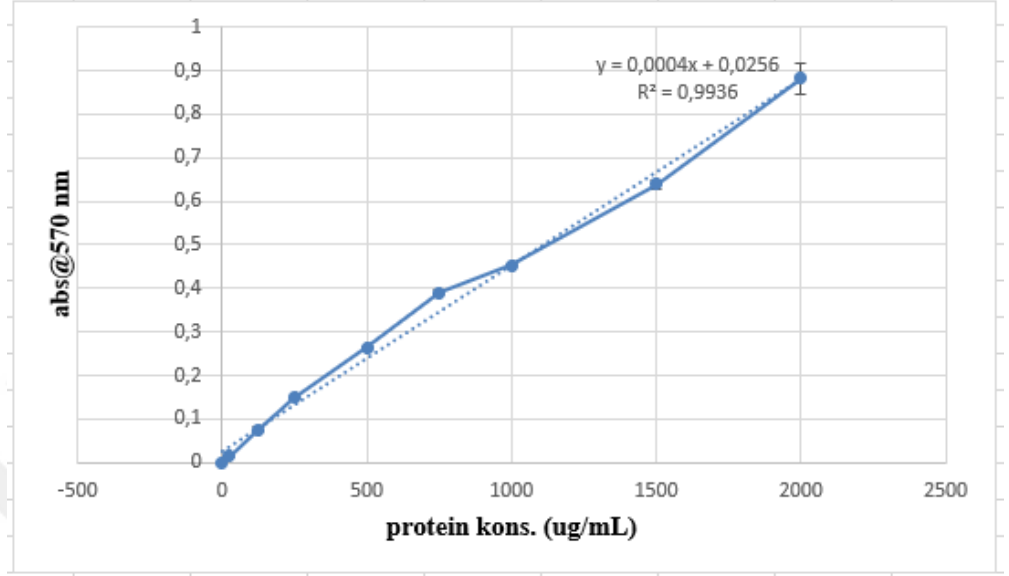
Şekil 4.3. Pasaj 4, 5 ve 6 BMSC hücrelerinin FBS'siz ortamla muamele öncesi ve sonrası ışık görüntüleri

4.2 Eksozomların Karakterizasyon Çalışmaları

4.2.1 BCA testi

İzole edilen toplam eksozomal protein konsantrasyonunun belirlenmesi için BCA testi uygulanmıştır. Öncelikle standart eğrisi oluşturulması için bilinen

konsantrasyonlarda proteinlere karşılık gelen absorbans değerleri okunmuş ve aşağıdaki standart eğrisi oluşturulmuştur. Daha sonra maksimize edilen koşullarda eksozomal protein konsantrasyonu ilgili denklemde yerine konularak yaklaşık 762 µg/ml olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 1. BCA standart eğrisi

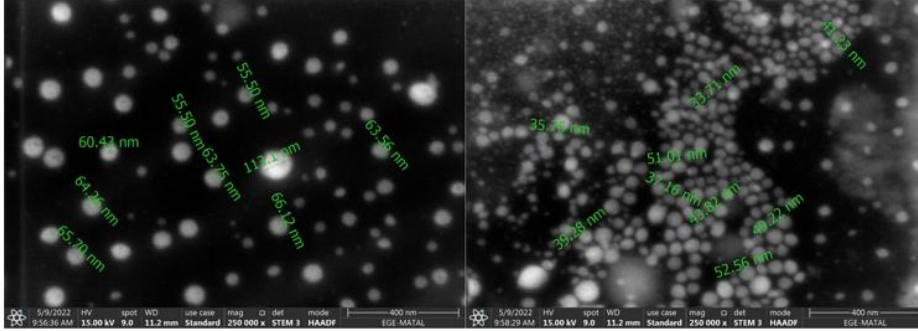
Tüm deney setleri sonucu yapılan BCA testi sonucu elde edilen protein miktarları ise aşağıdaki tablodaki gibidir:

Tablo 4.2 BCA testi sonucu elde edilen eksozomal protein miktarları

Örnek	Protein kons. (µg/mL)
P4-1-24h	345.17
P4-2-12h	281.83
P4-3-36h	316.00
P4-4-24h	385.17
P5-1-12h	307.25
P5-2-36h	385.50
P5-3-24h	193.50
P5-4-24h	381.00
P5-5-24h	346.00
P5-6-12h	144.75
P5-7-36h	308.50
P6-1-24h	706.00
P6-2-12h	309.75
P6-3-36h	324.75
P6-4-24h	762.25

4.2.2 STEM Analizi

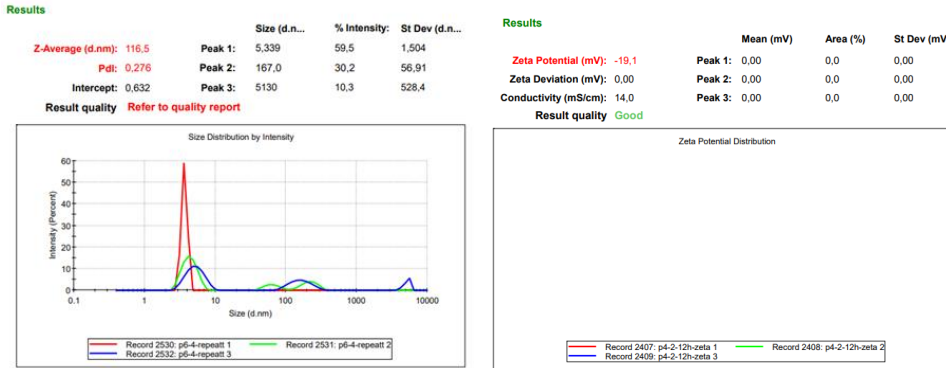
Eksozomların yüzey morfolojilerinin incelenmesi için STEM analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda eksozomların düzgün yuvarlak yapılaraya sahip oldukları ve literatürde yer alan 30-150 nm (Dolye vd., 2019) boyut aralıklarına sahip oldukları görülmüştür.



Şekil 4.5. Eksozomların STEM görüntüleri

4.2.3 Boyut dağılımı ve zeta potansiyel analizi

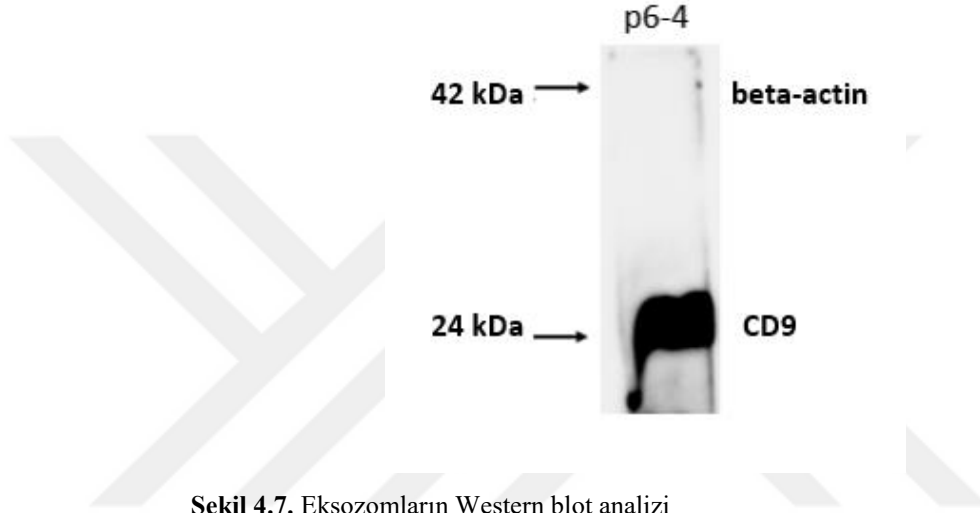
Optimize edilen koşullarda izole edilen eksozomların boyut dağılımları, polidispersite indeksleri (PDI) ve zeta potansiyelleri Malvern Zetasizer cihazı ile analiz edilmiştir. Ortalama boyutları yaklaşık 116.5 ± 9.59 nm, PDI değeri 0.276 ± 0.07 ve zeta potansiyeli -19.1 mV olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 6. Eksozomların boyut dağılımı, PDI ve zeta potansiyeli değerleri

4.2.4 Western blot analizi

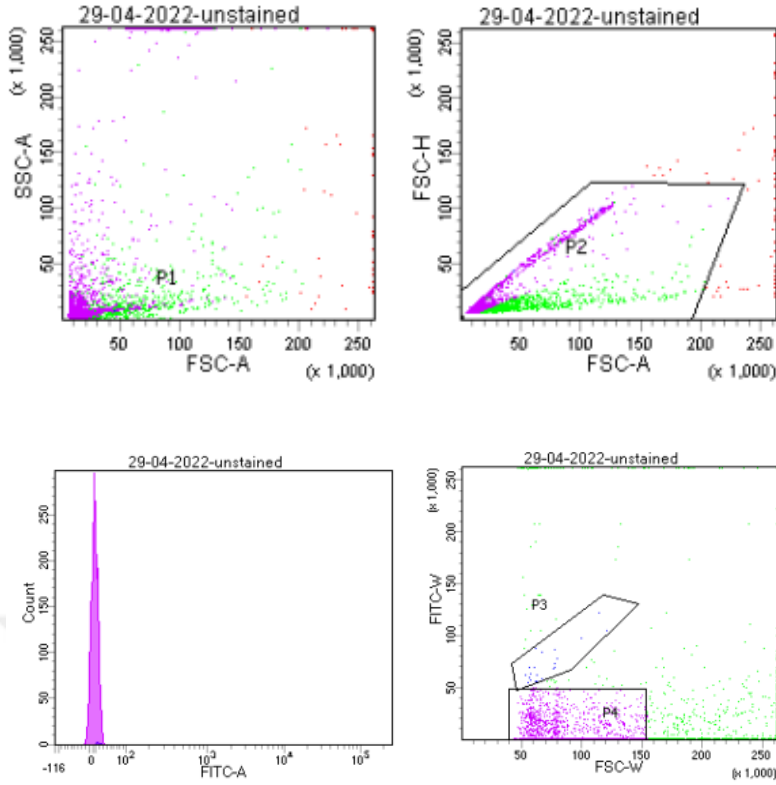
Eksozom izolasyonunun başarılı olduğunu görebilmek için optimize koşullarda izole edilen eksozomlara Western blot analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz için evrensel eksozom markırlarından CD9 ve hücresel protein markırı olan beta-aktin kullanılmıştır. İzolasyonun başarılı olduğunu doğrular nitelikte analiz sonucu eksozomal protein markırı olan CD9’da bant görüntüsü elde edilmişken hücresel protein markırı beta-aktinde herhangi bir bant görüntüsü elde edilmemiştir.



Şekil 4.7. Eksozomların Western blot analizi

4.2.5 FACS analizi

Hem FITC ve CD9 immüno işaretli hem de literatürde yer alan 30-150 nm boyutuna sahip (Doyle vd., 2019) eksozomların izole edilerek eksozom konsantrasyonu belirlenmiştir. Analiz süresince kontrol grubu olarak boyanmamış eksozomlar kullanılmıştır. Analiz sonucunda; CD9+ ve 30-150 nm boyutlarına sahip eksozom yüzdesi %42’lik bir oranda başarılı bir şekilde ayrılmıştır.



Şekil 4.8. Eksozomların FITC ve CD9 immüno işaretlemesi ile FACS analizi sonuçları

4.3 Meme Kanseri Sferoid Modelinin Oluşturulması ve Karakterizasyonu

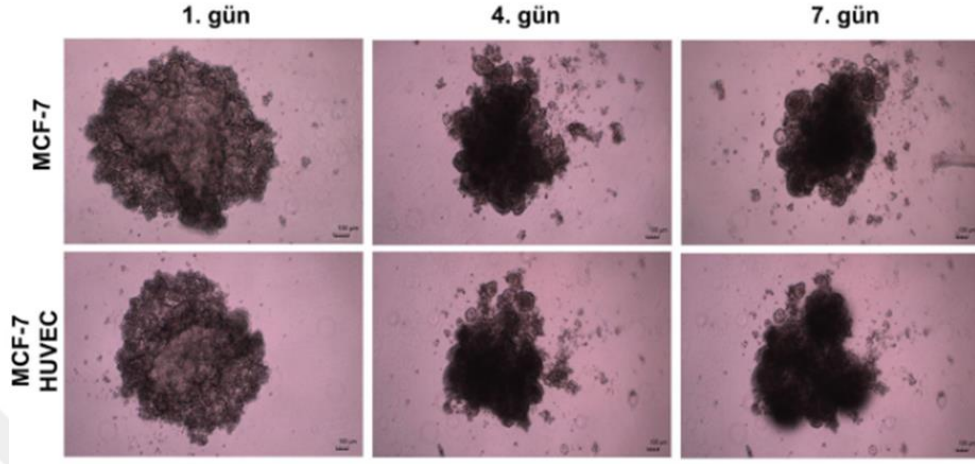
4.3.1 Meme kanseri sferoidlerinin fiziksel karakterizasyonu

Fiziksel karakterizasyon çalışmaları kapsamında sferoidlere ışık mikroskopisi, boyut ve SEM analizleri gerçekleştirilmiştir.

Işık mikroskobu görüntüleri

Sferoidlerin fiziksel karakterizasyonları için 1., 4. ve 7. gün morfolojileri ters faz ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Yapılan ışık mikroskopisi analizi incelendiğinde; MCF-7 sferoidlerinde 1. günde sferoidin çevresinde çok fazla sfer yapısına katılmayan tek hücrelerin bulunduğu, 4. günde ise sferoidin çevresindeki tek hücre sayısının azaldığı ve daha sıkı bir yapının oluştuğu görülmüştür. Fakat 7. güne gelindiğinde, 4. günde elde edilen sıkı sfer yapısının bozulmaya başladığı ve sferoidlerden çevresine tek hücrelerin dağılmaya başladığı görülmüştür. MCF-7/HUVEC sferoidlerine gelindiğinde ise, 1. günde oluşan sferoid yapısının

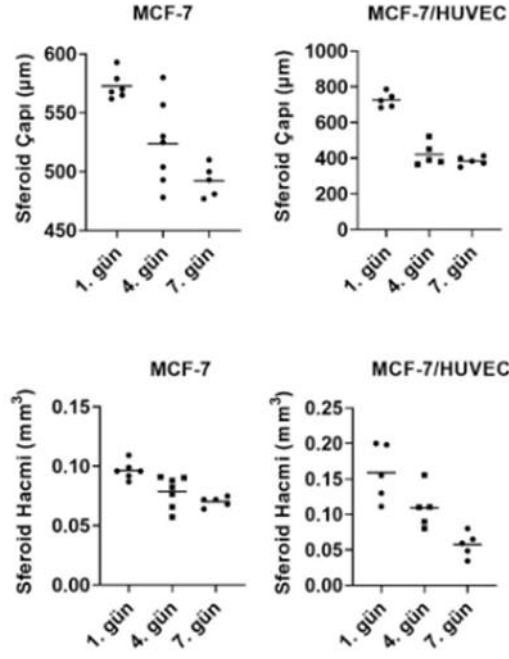
morfolojik olarak MCF-7 setinin 1. gününe göre daha küresel bir yapı aldığı görülmüştür. 4. gün analizleri incelendiğinde sferoidin daha kompakt bir yapıya ulaştığı ve MCF-7 setine benzer şekilde 7. günde bu yapının bozulmaya ve sferoidlerden çevreye tek hücrelerin dağılmaya başladığı görülmüştür.



Şekil 4. 2. Sferoidlerin ışık mikroskobu görüntüleri (5X büyütmede, bar skalası 100 µm)

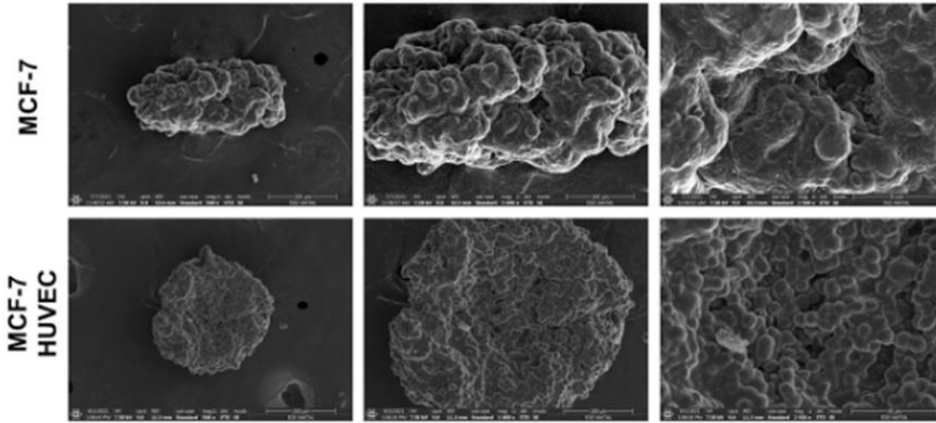
Boyut analizi

Işık mikroskobu ile morfolojik analizleri gerçekleştirilen sferoidlerin ortalama boyut ve hacim analizlerini kantitatif olarak gerçekleştirmek amacıyla ImageJ programı kullanılmıştır. MCF-7 seti için 1. gün ortalama boyut 572 ± 10.45 µm, 4. gün 523 ± 33.18 µm ve 7. gün 492 ± 12.12 µm olarak ölçülmüş ve gittikçe azalan bir profil gözlenmiştir. Analiz edilen boyutların ışık mikroskobu ile paralel olarak 1. günde oluşan sfer yapısının daha boşluklu bir yapıya sahip olduğunu, 4. günde bu yapının daha kompakt hale geldiği ve boyutun azaldığı ve 7. günde ise kompakt yapıdaki sferoidlerin dağılmaya başlayıp hücre ayrımlarının başladığı ve bu nedenle boyutun da bir nevi azaldığı yorumu yapılabilmektedir. MCF-7/HUVEC sferoidlerinde 1., 4. ve 7. günlerde ortalama boyutlar sırasıyla 725 ± 37.50 , 421 ± 57.56 ve 383 ± 21.89 µm olarak ölçülmüştür. 1. günden 4. güne gelindiğinde daha kompakt bir yapının oluşumundan kaynaklı sferoid boyutunun azaldığı ve 7. günde sferoidin dağılmaya başlaması nedeniyle azalışın devam ettiği görülmektedir.



Şekil 4.10. Sferoidlerin ortalama boyut ve hacim analizleri

SEM analizi



Şekil 4.11. Sferoidlerin 4. gündeki SEM görüntüleri

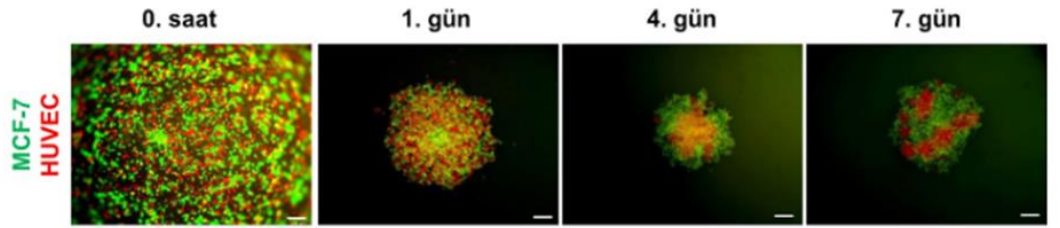
Sferoid setlerinin yüzey morfolojilerini incelemek amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için tüm setler için, en ideal ışık mikroskobu görüntüleri alınan 4. günlerdeki sferoidler incelenmiştir. Aşağıda 500, 1000 ve 2500X büyütmeleri bulunan SEM görüntüleri incelendiğinde, MCF-7 sferoidinin düzgün yuvarlak bir sferoid yapısı sergilemeyip düzensiz bir morfoloji gösterdiği, farklı

büyütmelerde de hücresel yapıların ayrımı net olarak yapılamadığı saptanmıştır. MCF-7/HUVEC sferoidi ise oldukça yuvarlak morfolojise izlenmiş ve MCF-7 sferoidine kıyasla farklı büyütmelerde hücresel yapılarının da gözlenebildiği fark edilmiştir.

4.3.2 Meme kanseri sferoidlerinin biyokimyasal karakterizasyonu

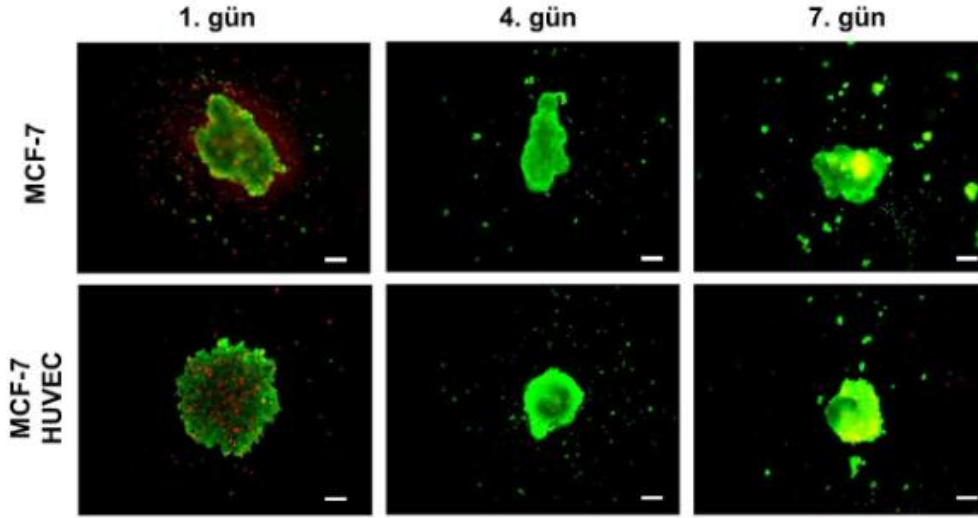
Hücre konumlarının belirlenmesi

HUVEC'lerin sferoid içerisindeki dağılımını incelemek için hücreler farklı renkteki CellTracker boyaları ile boyanarak floresan mikroskopta incelenmiştir. MCF-7 hücreleri yeşil CellTracker ile boyanırken HUVEC'ler kırmızı CellTracker ile boyanmıştır. Hücreler sferoid oluşturmak üzere 1:1 oranda karıştırılıp ekildiklerinde ilk görüntü alınmış (0. saat) ve hücrelerin homojen bir şekilde dağıldığı görülmüştür. Ardından 1. günde sferoid yapısının oluşmaya başladığı ve kanser hücreleriyle HUVEC'lerin homojen bir şekilde dağıldığı görüntülenmiştir. 4. güne gelindiğinde ise MCF-7 sferoidinde HUVEC'ler sferoidin farklı bölgelerinde konumlanırken 7. günde MCF-7 sferoidinde HUVEC'ler sferoidi bir damar gibi sarmıştır. 7. günde sferoidlerden ayrılan hücreler, floresan parlaklığını yitirdiklerinden görsellerde görülememektedirler.



Şekil 4. 12. Sferoidlerin hücre izleme analizi (5X büyütmeye, bar skalası 200 μ m)

Canlı/ölü analizi



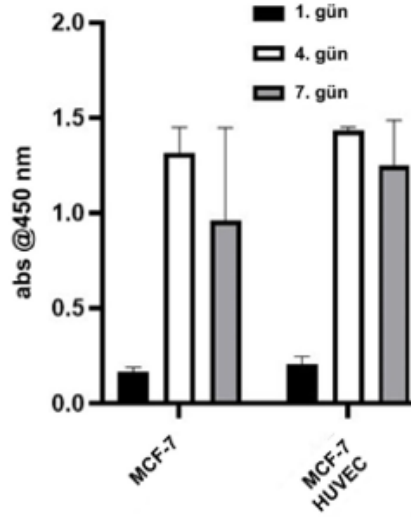
Şekil 4.13. Sferoidlerin canlı/ölü analizi (5X büyütmede, bar skalası 200 μ m)

Sferoidlerin canlılığı canlı/ölü analizi ile belirlenmiştir. Belirlenen aralıklarda (1., 4. ve 7. günlerde) farklı bir pleyte transfer edilen sferoidler kalsein ve etidyum homodimeri ile 45 dakika boyanarak floresan mikroskopunda canlı hücreler yeşil, ölü hücreler kırmızı olarak görüntülenmiştir. Canlı/ölü boyamaları incelendiğinde; MCF-7 sferoidlerinin 1. gününde sferoidin çevresine dağılan ve sferoid oluşumuna katılmayan ölü hücre sayısı oldukça fazla görünürken 4.günde ölü hücre sayısında önemli bir azalma meydana gelmiş, canlılık artışı görülmüştür. 7.günde ise canlılıkla beraber ölü hücre sayısında çok fazla artış görülmezken, sferoid yapısında bariz dağılmalar meydana gelmiştir. MCF-7/HUVEC sferoidlerinin canlılığı incelendiğinde, MCF-7 sferoidlerine benzer bir trend gözlenmiş, 1. günde görülen ölü hücrelerin aksine, 4. ve 7. günlere gelindiğinde ölü hücre sayısının azaldığı, canlılığın arttığı görülmüştür. 1. günde boyutu daha büyük olan sferoid 4. günde kompaktlaşmış, 7. günde sferoid yapısında dağılmalar başlamıştır.

WST-1 analizi

Kantitatif canlılık analizi incelendiğinde; MCF-7 sferoidlerinin 1. günde henüz proliferasyonun az olmasına bağlı olarak düşük absorbansa bağlı canlılığının oldukça düşük olduğu, 4. günde sferoidlerdeki proliferasyonun artmasıyla maksimum canlılığa ulaşarak 7. günde canlılıkta azalma meydana geldiği görülmüştür. Aynı trend MCF-7/HUVEC sferoidlerinde de izlenmiştir. 1. günde

düşük bir canlılığı, HUVEC'lerin katkısıyla proliferasyonun artmasıyla 4. günde maksimum canlılık izleyerek ardından 7. günde canlılıkta azalma meydana gelmiştir. MCF-7 ve MCF-7/HUVEC sferoidlerinin kantitatif canlılıkları karşılaştırıldığında, HUVEC varlığından kaynaklanan canlılık artışı bariz görülmüştür.



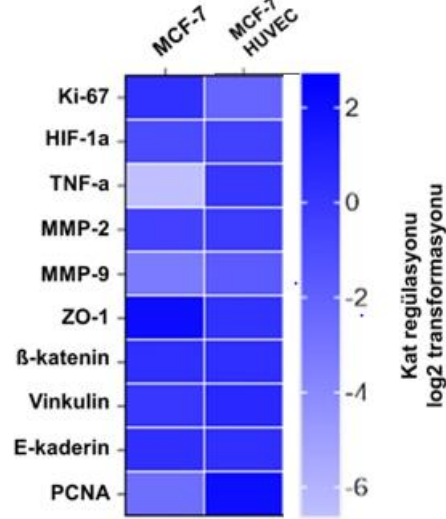
Şekil 4.14. Sferoidlerin WST-1 analizi

qRT-PCR analizi

Sferoidlerin gen ekspresyonlarındaki değişimlerin kantitatif olarak incelenmesi için 1. ve 4. günlerde alınan örneklerle qRT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.3. Sferoidlerin qRT-PCR analizinin kat regülasyonu verileri.

	MCF-7	MCF-7/HUVEC
Ki-67	1.20	-4.72
HIF-1α	-1.97	-1.38
TNF-α	-132.21	1.01
MMP-2	-1.46	-1.17
MMP-9	-10.46	-3.29
ZO-1	4.27	1.16
β-katenin	1.34	1.32
Vinkulin	-1357.43	1.60
E-kaderin	1.24	1.27
PCNA	-6.35	3.97
ACTBC	1.00	1.05
GAPDH	-2.88	-1.09
HPRT1	2.87	1.04

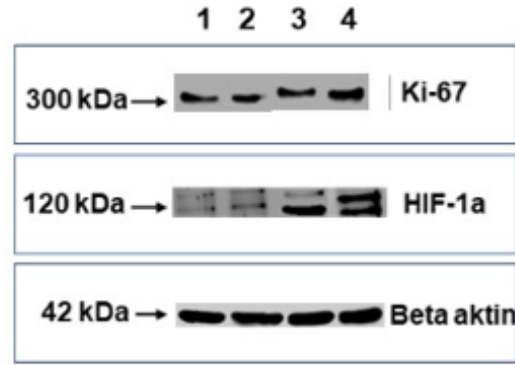


Şekil 4.15. Sferoidlerin qRT-PCR analizinin ısı haritası. *Statik yöntemle üretilen sferoidlerin 4. gün örneklerindeki kat regülasyonlarının 1. günlere göre kıyaslanması

qRT-PCR analizi sonucunda sferoidlerin gen ekspresyon düzeyinde meydana gelen değişikliklerin incelenmesi için, her bir sferoid grubu kendi içlerinde 1.gün örneklerine göre kıyaslanmış, kat regülasyonu tablosu ve heat map olarak gösterilmiştir. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde; invazyonla direkt ilişkili olmayan genlerden Ki-67'nin sferoidlerdeki çoğalmakta olan hücre sayısı ile doğru orantılı olduğu düşünülmekte, MCF-7'de ekspresyonunun arttığı, MCF-7/HUVEC'te azaldığı dikkat çekmektedir. Bir diğer proliferasyon markırı olan PCNA geninin ise ekspresyon seviyesi MCF-7'da azalmış. İnvazyonla ekspresyon seviyesinin artması beklenen genler incelendiğinde; MMP-2 ve MMP-9'un ekspresyon seviyelerinin azaldığı, HIF-1a'nın azalırken TNF-a'nın yalnızca MCF-7 grubunda ekspresyonu azaldığı görülmüştür. Bunların dışında invazyonla anti-korele olan genlerden ZO-1 ve E-kadherin ekspresyonları tüm gruplar için artmışken, vinkülin'in MCF-7 grubunda ekspresyonu artmış. Ayrıca, β-katenin gen ekspresyonu artmıştır. Sonuç olarak, anlık değişen bir süreç olan gen seviyesindeki değişimlerin incelendiği bu kantitatif qRT-PCR analizinin daha iyi doğrulanabilmemesi için tüm grupların kalitatif western blot analizlerinin yapılması gerektiği de belirlenmiştir.

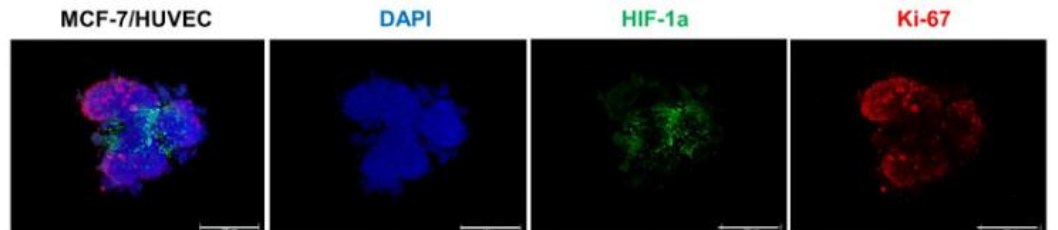
Western blot analizi

MCF-7 sferoidleri için yapılan Western blot sonuçları incelendiğinde, 120 kDa'da bant veren HIF-1a'nın 1. günde (1) az olduğu, 4. günde (2) ise artış gösterdiği, dolayısıyla MCF-7 sferoidleri için 1. günden 4. güne hipoksik koşullarda artış olduğu görülmüştür. HUVEC varlığındaki MCF-7/HUVEC sferoidlerinde ise, HIF-1a için 1. günde (3) yoğun bir bant gözlenmişken 4. günde (4) her iki ilişkili bant da yoğun bir şekilde görünür hale gelmiştir. Aynı grup için 300 kDa'nın üzerinde bant veren Ki-67'nin bant profilleri incelendiğinde MCF-7 sferoidlerinde 1. günde ve 4. günde benzer Ki-67 seviyeleri kaydedilmiştir. MCF-7/HUVEC sferoidlerinde ise 1. günden 4. güne geçildiğinde Ki-67'nin arttığı görülmüştür. Genel olarak değerlendirildiğinde 1. günlerde 4. günlere göre, MCF-7/HUVEC sferoidlerinde MCF-7 sferoidlerine göre hem HIF-1a hem de Ki-67 için daha yoğun bantlar elde edilmiştir.



Şekil 4.16. Sferoidlerin Western blot analizi. *1: MCF-7 1. gün, 2: MCF-7 4. gün, 3: MCF-7/HUVEC 1. gün, 4: MCF-7/HUVEC 4. gün

İmmunofloresan boyama

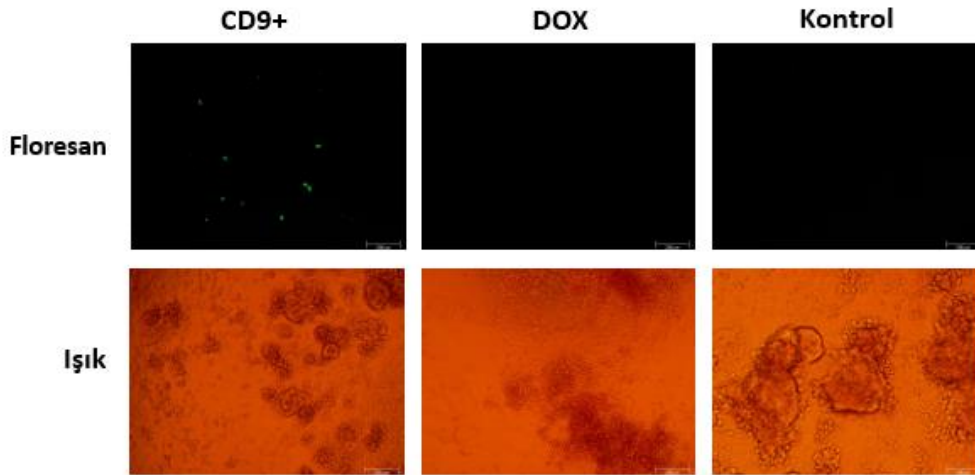


Şekil 4.17. Sferoidlerin 4. gündeki immunofloresan görüntüleri (20X büyütmede, bar skalası 200 µm)

İmmunofloresan boyamanın ardından floresan mikroskopta görüntü alınmış, hücre çekirdekleri DAPI ile maviye, proliferen olan hücreler Ki-67 ile kırmızıya ve hipoksik bölgeler HIF-1a ile yeşile boyanmıştır. MCF-7/HUVEC sferoidi incelendiğinde, yapısal olarak düzensiz şekilli sferoidler gözlenmiştir. Hücre çekirdeklerini boyayan DAPI, tüm sferoid alanında yoğunlaşarak sferoidi çok fazla hücrenin oluşturduğunu ifade etmektedir. Proliferasyonu ifade eden Ki-67'nin ekspresyonu sferoid çevresinde artış gösterirken sferoidin merkezine doğru Ki-67 ekspresyonunda azalış görülmüş, bu durumun tersine, hipoksik koşulları ifade eden HIF-1a ekspresyonu sferoidin çevresinde oldukça düşükken sferoidin merkezinde HIF-1a ekspresyonunda artış görülmüştür.

4.4 Eksozomların Meme Kanseri Sferoid Modelinde Test Edilmesi

4.4.1 Işık ve floresan mikroskobu görüntüleri

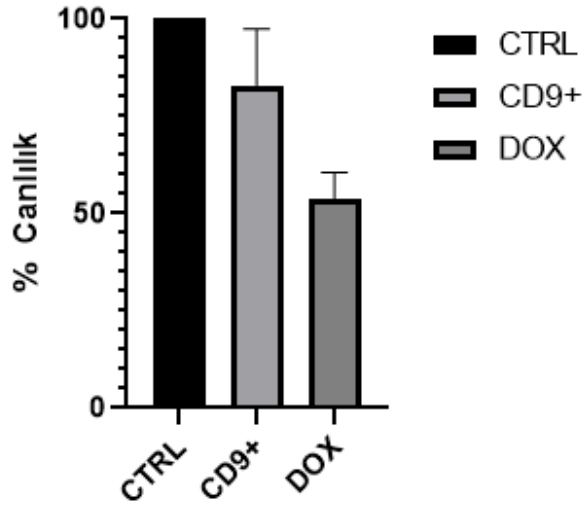


Şekil 4. 18. Eksozom ve Dox uygulaması sonrası sferoidlerin 48. saat ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri (10X büyütmede, bar skalası 200 µm)

Eksozomların uygulanmasından 48 saat sonra alınan görüntüler incelendiğinde FITC işaretli CD9+ eksozomların floresan mikroskobunda bir tek CD9+ grubunda görüntülenmiştir. Diğer gruplarda CD9 markırı bulunmadığından floresanda görüntü alınamamıştır. Işık mikroskobu görüntüleri incelendiğinde; özellikle Dox grubundaki sferlerin diğer gruplara göre daha dağılmış bir yapıya sahip oldukları görülmektedir. Eksozom grubundaki sferoid yapılarında ise kontrole göre dağılmalar görülmektedir.

4.4.2. WST-1 analizi

48 saat sonrası hücre canlılığının kantitatif olarak incelenmesi için gerçekleştirilen WST-1 analizinde kontrol grubuna göre hücre canlılığı CD9+ grubunda %84'e ve IC₅₀ değeri uygulanan Dox grubunda %53 oranlarına düşmüştür. Işık mikroskobu görüntüleri ile WST-1 sonuçları birbirini desteklemektedir.



Şekil 4. 19. Eksozom ve Dox uygulaması sonrası sferoidlerin 48. saat WST-1 analizi

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

5.1 BMSC'den Eksozomların İzolasyonu

BMSC hücrelerinden eksozomların izolasyonları Design Expert programıyla tasarlanan deney setlerinden gerçekleştirilmiş ve toplam protein miktarının belirlenmesi için BCA testi uygulanmıştır. Box-Benchen optimizasyonu sonucunda protein miktarını maksimize eden parametreler pasaj 6, 5×10^5 hücre/flask başlangıç hücre konsantrasyonu ve 24 saat FBS'siz ortamda bekleme süresi olarak belirlenmiş, BCA testi sonucu bu koşullardaki protein konsantrasyonu da diğer deney setleri içinde en yüksek değere sahip ve 762 $\mu\text{g/ml}$ çıkarak deneysel olarak bu koşulları doğrulamıştır. FBS'te yer alan eksozomların uzaklaştırılması için hücreler belirli zaman aralıklarında FBS'siz ortamda bekletilmiş ve FBS'siz ortamla muamele öncesi ve sonrasında hücrelerin ışık mikroskopisi görüntüleri alınmıştır. Görüntüler incelendiğinde FBS'siz ortam ile muamele sonrasında hücrelerde morfolojik olarak değişimler meydana geldiği görülmüştür. Hücrelerin muamele sonrası sitoplazmalarının kaybolmaya başladı çekirdeklerinin ön plana çıktığı görülmüştür. Bu durumun hücreleri strese sokarak eksozom salımını etkileyebileceği bilinmektedir.

5.2 Eksozomların Karakterizasyon Çalışmaları

İzole edilen eksozomların karakterizasyon çalışmaları kapsamında boyut ve zeta potansiyeli, STEM, Western blot ve FACS analizleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikle Malvern Zetasizer ile gerçekleştirilen boyut dağılımı ve zeta potansiyeli analizi incelendiğinde; eksozomların ortalama hidrodinamik çaplarının yaklaşık 116 nm olarak ölçüldüğü görülmüştür. Polidispersite indeksi 0.276 olarak belirlenmiş, bu durum da birbirine yakın boyutlara sahip eksozomların varlığını göstermektedir. Eksozomlar (<200 nm) dahil olmak üzere hücre dışı veziküller (EV'ler), hücreler arası iletişimde hayati bir rol oynar ve fizyolojik koşullar altında net bir negatif yüzey yükü taşır. Zeta potansiyeli, yüzey yükünün ve yüzey kimyası,

biyokonjugasyon ve uygulanan teorik modelden etkilenen kolloidal stabilitenin bir göstergesi olarak kullanılır ve yüzey potansiyelini ölçmek için popüler bir yöntemdir (Midekessa vd., 2020). Büyük bir pozitif veya negatif zeta potansiyeli değeri, tek tek parçacıkların elektrostatik itmesi nedeniyle iyi fiziksel kararlılığı gösterir. -30 mV ila +30 mV dışındaki bir zeta potansiyel değerinin genellikle daha iyi fiziksel kolloidal stabilite elde etmek için yeterli itme kuvvetine sahip olduğu kabul edilir. (Akagi vd., 2016). Analiz sonucu zeta potansiyeli -19.1 mV ölçülerek literatürle paralellik göstermektedir (Keller vd., 2019). Bir diğer analiz olan STEM analizinde eksozomların morfolojik yapıları değerlendirilmiştir. Taramalı transmisyon elektron mikroskobu (STEM) modunda mikroskop lensleri, numune yüzeyinde odaklanmış bir yakınsak elektron ışını veya sonda oluşturacak şekilde ayarlanır. Bu odaklanmış sonda daha sonra numune boyunca taranır ve bir görüntü oluşturmak için çeşitli sinyaller noktadan noktaya toplanır (Muller, 2019). Analiz sonucunda ise boyutlar Malvern Zetasizer ile gerçekleştirilen analiz sonuçları ile tutarlılık göstermektedir. Bir diğer karakterizasyon yöntemi olan Western blot analizi eksozom izolasyonunun başarılı olup olmadığının anlaşılması için CD9 eksozomal protein markırı ve beta-aktin hücresel protein markırı ile gerçekleştirilmiştir. CD9 proteini, eksozomların yüzeyinde en yaygın şekilde eksprese edilen proteinlerden biridir ve bu nedenle bir eksozom belirteci olarak kabul edilir. Önemli olarak, CD9'un katı tümör metastazının baskılanmasına yardımcı olduğu da bilinmektedir (Malla vd., 2018). Analiz sonucunda eksozomların CD9 için bant görüntüsü verdiği fakat hücresel protein markırı beta-aktin için bant olmadığı görülmüştür, bu da izolasyonun başarılı olduğunun kanıtıdır. Son olarak FACS analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz süresince kontrol grubu olarak boyanmamış eksozomlar kullanılmıştır. Analiz sonucunda; CD9+ ve 30-150 nm boyutlarına sahip eksozom yüzdesi %42'lik bir oranda başarılı bir şekilde ayrılmıştır ve hücre denemeleri için konsantrasyonları belirlenmiştir.

5.3 Meme Kanseri Sferoid Modelinin Oluşturulması Ve Karakterizasyonu

Sferoidler için morfolojik olarak genel bir değerlendirme yapıldığında HUVEC varlığında daha kompakt sferoid yapılarının oluştuğu ve çevrede sferoid oluşumuna katılmayan tek hücre sayısının daha az olduğu görülmektedir.

Literatürdeki diğer çalışmalar incelendiğinde genel olarak aynı günlerde morfolojik analizlerin yapıldığı, ve MCF-7 (Boo vd., 2016), MCF-7/HUVEC (Giap vd., 2017) sferoidlerinde benzer görüntüler elde edildiği kaydedilmiştir. Bu açıdan sferoidlerin morfolojik değerlendirmeleri literatür ile paralellik göstermektedir. Boyut analizi incelendiğinde 1. gündeki boşluklu yapının 4. güne gelindiğinde azalmasından dolayı ve 7. gün bu kompakt yapının dağılmaya başlaması gittikçe azalan ortalama boyut profillerini ortaya çıkarmıştır. HUVEC varlığında 4. ve 7. günlerde boyutların daha küçük olmasının nedeninin HUVEC'lerin sferoidlerin yapılarındaki boşlukları doldurarak daha sıkı bir yapının oluşumunu sağlamaları olabilmektedir. Yukarıda belirtildiği gibi, boyut analizinde elde edilen ortalama çap değerleri ile $V=4\pi r^3/3$ formülü kullanılarak ortalama sferoid hacmi hesaplanmış ve ortalama boyutlar ile paralel profiller gözlenmiştir. Sferoid çapı ve hacmi, klinik çalışmalarda uygulanacak terapi yöntemini belirlemede önemli bir parametredir. Bu sebeple üretilen sferoidlerin boyutlarının ve hacimlerinin *in vivo*'ya benzerlik göstermesi, yeni terapötiklerin test edilmesi için daha doğru bir model oluşturacaktır (Piccinini vd., 2015). Geliştirilen sferoidlerin boyut ve hacim analizleri sonucu daha önce yapılan çalışmalara (Keller vd., 2019) benzer şekilde kültürde geçen süre uzadıkça boyutun küçüldüğü, 400-800 µm aralığında değişen sferoidlerin elde edildiği kaydedilmiştir. SEM analizinde büyütmelemlerle birlikte MCF-7 sferoidlerinde hücre yapısı ayırt edilebilirken, HUVEC içeren sferoid setlerinde hücre yapısının yoğun hücreler arası etkileşimler ve daha sıkı oluşum sebebiyle çok net görülebilmiştir. Literatür verilerinde de incelendiği şekilde, HUVEC varlığında kanser hücreleri salgıladığı büyüme faktörleriyle endotel hücrelerle etkileşimi güçlendirmektedir. Bu etkileşim sonucunda ise sferoid içindeki hücreler arası etkileşim yoğunlaşarak daha sıkı bir sferoid yapısı elde edilmektedir (Choi ve Moon, 2018).

MCF-7 ve MCF-7/HUVEC sferoidleri karşılaştırıldığında 1.günde MCF-7/HUVEC sferoidlerinin MCF-7 sferoidlerine göre, sferoid oluşumuna katılan daha fazla canlı hücrenin yanı sıra daha az ölü hücre içerdiği dikkat çekmiştir. Bu durum HUVEC varlığında hücrelerin birbirine daha sıkı tutunarak daha iyi bir sferoid yapısı oluşturduğunu, dolayısıyla sferoid dışında kalan tek hücrelerden kaynaklı ölü hücre sayısında da azalış olduğunu göstermektedir. Tüm setler canlılık açısından kalitatif canlı/ölü analiziyle birlikte değerlendirildiğinde HUVEC varlığında MCF-

7 sferoidlerinde ölü hücrelerin azaldığı, daha kompakt yapılar elde edilerek *in vivo*'yu daha iyi mimikleyen sferoidlerin oluşumuna katkı sağladığı sonucuna varılmıştır. HUVEC varlığında sferoidlerde canlılığın arttığı, en yüksek canlılığın 4. günlerde elde edildiği oldukça açıktır. Ayrıca diğer kantitatif ve kalitatif sonuçlarla karşılaştırıldığında tutarlı veriler elde edilmiştir. 1. günde düşük canlılık elde edilmesinin sebebi, sferoid oluşturmak için yapılan hücre ekimi sırasında, her ne kadar canlı hücre sayımı dikkate alınsa da, enzimatik yöntemle yapılan pasaj sonrası elde edilen hücre süspansiyonunda ayırım yapılmadığı için ölü hücrelerin de bulunmasıdır. Daha sonra yapılan ortam değişimlerinde bu ölü hücreler uzaklaştırılmaktadır. 4.günde ise sferoid yapısı ve canlılığı kalitatif analizde de görüldüğü gibi optimum seviyeye ulaşmış, sferoid yapısındaki hücre proliferasyonu ve hücreler arası sıkı bağlantılar sebebiyle canlılık yükselmiştir. 7.günde ise sferoid yapısının dağılmaya başlamasıyla birlikte ölü hücre sayısında tekrardan artış olmuştur. Ayrıca 7. günde tümörü mimikleyen sferoidlerde hipoksik koşulların olduğu, yeterince oksijen ve besine ulaşamayan sferoidin merkezindeki hücrelerde ölümlerin gerçekleşmesinden kaynaklı canlılıkta azalma olduğu da düşünülmüştür. HIF-1a ve Ki-67'nin artan ekspresyonu invazif kanser yapısını daha iyi mimiklediği için, qRT-PCR sonuçları başta olmak üzere diğer karakterizasyon testleri sonuçları da dikkate alınarak, fonksiyonallite açısından MCF-7/HUVEC sferoidlerinin 4. günleri optimum olarak belirlenmiştir. Daha sonra yapılan immunofloresan boyamalarda optimum olarak belirlenen 4. gün sferoid örnekleri çalışılmıştır.

5.4 Eksozomların Meme Kanseri Sferoid Modelinde Test Edilmesi

Eksozomların yalnızca hücrel enkaz değil, hücreler arasında bir iletişim aracı olduğu kabul edilmektedir. İçeriklerini üç ana mekanizma ile bir hücreden diğerine aktarabilirler; reseptör aracılı alım, plazma zarı ile doğrudan füzyon veya fagositoz yoluyla endositoz. Mekanizmadan bağımsız olarak, eksozomlar uzak hücreler tarafından alınır ve içerikleri alıcıyı etkiler. Eksozomal miRNA kullanan bu tür hücre-hücre iletişiminin ilk örneği Valadi vd., fare mast hücrelerinden türetilen eksozomların insan mast hücrelerine eklenmesinin, insan hücrelerinde fare proteinlerinin saptanmasıyla sonuçlandığını gösterdi. Benzer bir şekilde, eksozomal miRNA'lar alıcı hücreye aktarılır ve protein ekspresyonunu ve hücrel fenotipi etkiler (Vaksman vd., 2014). MSC

eksozomları, tümör mikroçevresindeki meme kanseri hücrelerinde vasküler endotelyal büyüme faktörünü hedefleyerek anjiyogenezi inhibe eden miR-16 ve miR-100 gibi anti-anjiyojenik miRNA'ları içerir. Ek olarak, MSC'den türetilen eksozomlar, doku onarımı ve inflamatuvar yanıtta da önemli bir rol oynar (Dai vd., 2020).

İzole edilen karakterize eksozomlar geliştirilen meme kanseri sferoid modelinde test edilmiştir. Deneme için CD9+, Dox ve kontrol olmak üzere iki tekrarlı 3 set kurulmuştur. Eksozom ve Dox uygulamasından 48 saat sonra sferoidlere hücre canlılığının tayini için WST-1 analizi yapılmıştır. Denemede eksozomlar sferlere 7×10^4 eksozom/göz olarak, Dox ise 20 μ M uygulanmıştır. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde; sferoidler için IC_{50} değeri 20 μ M olarak bulunduğu için bu değer kullanılmıştır (Gong vd., 2015). Hücre canlılığı incelendiğinde; IC_{50} değerinde uygulanan Dox sonrası canlılık %53'e düşmüştür. Literatürde uygulanan eksozom konsantrasyonları 1×10^7 ile 1×10^9 eksozom/ml arasında değişmektedir (Donoso vd., 2020; Kumar vd., 2021). Uygulanan eksozom konsantrasyonu literatüre göre yaklaşık 100 kat daha az olmasına rağmen eksozom uygulamaları sonucu canlılık %84'e düşmüştür. Bu durum eksozomların terapötik amaçlarla kullanılabilme potansiyellerini ortaya koymaktadır.

6. ÖNERİLER

Tez kapsamında BMSC'den izole edilen karakterize eksozomların terapötik amaçlı meme kanseri sferoid modeline uygulaması gerçekleştirilmiş ve kontrol grubuna göre hücre canlılığında azalma meydana gelmiştir. Eksozomların hücrelere alım ve alındıkları hücrelere etki mekanizmalarının aydınlatılması durumunda başta kanser olmak üzere pek çok hastalığın oluşumu ve sonrasında immün yanıtın gelişmesi süreçlerinde moleküler düzeyde karanlık noktalara ışık tutulması mümkün olacaktır. Özellikle klinikte tanı ve tedavisinde kullanılabilecek potansiyel veziküller olmaları açısından bu durum oldukça önem taşımaktadır.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdulrahman, B. A., Abdelaziz, D. H., & Schatzl, H. M.** (2018). Autophagy regulates exosomal release of prions in neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 293(23), 8956-8968.
- Adem, B., Vieira, P. F., & Melo, S. A.** (2020). Decoding the biology of exosomes in metastasis. *Trends in Cancer*, 6(1), 20-30.
- Akbari, A., Jabbari, N., Sharifi, R., Ahmadi, M., Vahhabi, A., Seyedzadeh, S. J., ... & Rezaie, J.** (2020). Free and hydrogel encapsulated exosome-based therapies in regenerative medicine. *Life sciences*, 249, 117447.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhali, S., & Wood, M. J.** (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature biotechnology*, 29(4), 341-345.
- Atiya, H., Frisbie, L., Pressimone, C., & Coffman, L.** (2020). Mesenchymal stem cells in the tumor microenvironment. *Tumor Microenvironment*, 31-42.
- B. Hugel, M.C. Martinez, C. Kunzelmann, J.M. Freyssinet.** (2005). Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda, Md.)* 20, 22-27.
- Babst, M.** (2011). MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Current opinion in cell biology*, 23(4), 452-457.
- Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., ... & David, G.** (2012). Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature cell biology*, 14(7), 677-685.
- Ben-David, U., & Benvenisty, N.** (2011). The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nature Reviews Cancer*, 11(4), 268-277.
- Blanc, L., & Vidal, M.** (2018). New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion. *Small GTPases*, 9(1-2), 95-106.
- Boo, L., Ho, W. Y., Ali, N. M., Yeap, S. K., Ky, H., Chan, K. G., ... & Cheong, S. K.** (2016). MiRNA transcriptome profiling of spheroid-enriched cells with cancer stem cell properties in human breast MCF-7 cell line. *International journal of biological sciences*, 12(4), 427.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Bouïs, D., Hospers, G. A., Meijer, C., Molema, G., & Mulder, N. H.** (2001). Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis*, 4(2), 91-102.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A.** (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- C. He, S. Zheng, Y. Luo, B. Wang.** (2018). Exosome Theranostics: Biology and Translational Medicine. *Theranostics* 8 (1), 237-255.
- Cardoso, F., Costa, A., Norton, L., Cameron, D., Cufer, T., Fallowfield, L., ... & Winer, E.** (2012). 1st International consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 1). *The Breast*, 21(3), 242-252.
- Carvalho, M. P., Costa, E. C., & Correia, I. J.** (2017). Assembly of breast cancer heterotypic spheroids on hyaluronic acid coated surfaces. *Biotechnology Progress*, 33(5), 1346-1357.
- Choi, H., & Moon, A.** (2018). Crosstalk between cancer cells and endothelial cells: implications for tumor progression and intervention. *Archives of Pharmacal Research*, 41(7), 711-724.
- Crapnell, K., Blaesius, R., Hastings, A., Lennon, D. P., Caplan, A. I., & Bruder, S. P.** (2013). Growth, differentiation capacity, and function of mesenchymal stem cells expanded in serum-free medium developed via combinatorial screening. *Experimental cell research*, 319(10), 1409-1418.
- Dostert, G., Mesure, B., Menu, P., & Velot, É.** (2017). How do mesenchymal stem cells influence or are influenced by microenvironment through extracellular vesicles communication?. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5, 6.
- Doyle, L. M., & Wang, M. Z.** (2019). Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*, 8(7), 727.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- El-Haibi, C. P., & Karnoub, A. E.** (2010). Mesenchymal stem cells in the pathogenesis and therapy of breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 15(4), 399-409.
- Elsherbini, A., & Bieberich, E.** (2018). Ceramide and exosomes: a novel target in cancer biology and therapy. *Advances in cancer research*, 140, 121-154.
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W. P., Amphornrat, J., Thilemann, S., Saab, A. S., ... & Krämer-Albers, E. M.** (2013). Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte–neuron communication. *PLoS biology*, 11(7), e1001604.
- Gajos-Michniewicz, A., Duechler, M., & Czyz, M.** (2014). MiRNA in melanoma-derived exosomes. *Cancer letters*, 347(1), 29-37.
- Garcia, N. A., Ontoria-Oviedo, I., González-King, H., Diez-Juan, A., & Sepúlveda, P.** (2015). Glucose starvation in cardiomyocytes enhances exosome secretion and promotes angiogenesis in endothelial cells. *PloS one*, 10(9), e0138849.
- Ge, L., Zhang, N., Li, D., Wu, Y., Wang, H., & Wang, J.** (2020). Circulating exosomal small RNAs are promising non-invasive diagnostic biomarkers for gastric cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(24), 14502-14513.
- Giap, G. Chiew. Y., Wei, N., Sultania, S., Lim, S., & Luo, K. Q.** (2017). Bioengineered three-dimensional co-culture of cancer cells and endothelial cells: A model system for dual analysis of tumor growth and angiogenesis. *Biotechnology and bioengineering*, 114(8), 1865-1877.
- Giordano, C., La Camera, G., Gelsomino, L., Barone, I., Bonofiglio, D., Andò, S., & Catalano, S.** (2020). The biology of exosomes in breast cancer progression: dissemination, immune evasion and metastatic colonization. *Cancers*, 12(8), 2179.
- Goel, H. L., & Mercurio, A. M.** (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nature Reviews Cancer*, 13(12), 871-882.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Goldstein, R. H., Reagan, M. R., Anderson, K., Kaplan, D. L., & Rosenblatt, M.** (2010). Human bone marrow-derived MSCs can home to orthotopic breast cancer tumors and promote bone metastasis. *Cancer research*, 70(24), 10044-10050.
- Gradilla, A. C., González, E., Seijo, I., Andrés, G., Bischoff, M., González-Mendez, L., ... & Guerrero, I.** (2014). Exosomes as Hedgehog carriers in cytoneme-mediated transport and secretion. *Nature communications*, 5(1), 1-13.
- Green, R. M.** (2007). Can we develop ethically universal embryonic stem-cell lines?. *Nature Reviews Genetics*, 8(6), 480-485.
- Gross, J. C., Chaudhary, V., Bartscherer, K., & Boutros, M.** (2012). Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nature cell biology*, 14(10), 1036-1045.
- Gubert, F., da Silva, J. S., Vasques, J. F., de Jesus Gonçalves, R. G., Martins, R. S., de Sá, M. P. L., ... & Zapata-Sudo, G.** (2021). Mesenchymal Stem Cells Therapies on Fibrotic Heart Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7447.
- Guo, H., Chitiprolu, M., Roncevic, L., Javalet, C., Hemming, F. J., Trung, M. T., ... & Gibbings, D.** (2017). Atg5 disassociates the V1V0-ATPase to promote exosome production and tumor metastasis independent of canonical macroautophagy. *Developmental Cell*, 43(6), 716-730.
- Gutierrez-Aranda, I., Ramos-Mejia, V., Bueno, C., Munoz-Lopez, M., Real, P. J., Mácia, A., ... & Menendez, P.** (2010). Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection. *Stem cells*, 28(9), 1568-1570.
- H. Kalra, G.P. Drummen, S. Mathivanan.** (2016). Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *International journal of molecular sciences*, 17 (2), 170.
- H. Shao, H. Im, C.M. Castro, X. Breakefield, R. Weissleder, H. Lee.** (2018). New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. *Chemical reviews*, 118 (4), 1917-1950.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Han, S. J., Kwon, S., & Kim, K. S.** (2021). Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. *Cancer Cell International*, 21(1), 1-19.
- Hemler, M. E.** (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annual review of cell and developmental biology*, 19(1), 397-422.
- Hoshino, D., Kirkbride, K. C., Costello, K., Clark, E. S., Sinha, S., Grega-Larson, N., ... & Weaver, A. M.** (2013). Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell reports*, 5(5), 1159-1168.
- Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S. I., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M. A., ... & Simons, M.** (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A–C. *Journal of Cell Biology*, 189(2), 223-232.
- Huang, X., Yuan, T., Tschannen, M., Sun, Z., Jacob, H., Du, M., ... & Wang, L.** (2013). Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC genomics*, 14(1), 1-14.
- Hyenne, V., Apaydin, A., Rodriguez, D., Spiegelhalter, C., Hoff-Yoessle, S., Diem, M., ... & Labouesse, M.** (2015). RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion. *Journal of Cell Biology*, 211(1), 27-37.
- Iso, Y., Spees, J. L., Serrano, C., Bakondi, B., Pochampally, R., Song, Y. H., ... & Prockop, D. J.** (2007). Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochemical and biophysical research communications*, 354(3), 700-706.
- Jabbari, N., Akbariazar, E., Feqhhi, M., Rahbarghazi, R., & Rezaie, J.** (2020). Breast cancer-derived exosomes: tumor progression and therapeutic agents. *Journal of cellular physiology*, 235(10), 6345-6356.
- Jadli, A. S., Ballasy, N., Edalat, P., & Patel, V. B.** (2020). Inside (sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake. *Molecular and cellular biochemistry*, 467(1), 77-94.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Janas, T., Janas, M. M., Sapoń, K., & Janas, T.** (2015). Mechanisms of RNA loading into exosomes. *FEBS letters*, 589(13), 1391-1398.
- Jella, K. K., Nasti, T. H., Li, Z., Malla, S. R., Buchwald, Z. S., & Khan, M. K.** (2018). Exosomes, their biogenesis and role in inter-cellular communication, tumor microenvironment and cancer immunotherapy. *Vaccines*, 6(4), 69.
- Ji, J. F., He, B. P., Dheen, S. T., & Tay, S. S. W.** (2004). Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem cells*, 22(3), 415-427.
- Joshi, B. S., de Beer, M. A., Giepmans, B. N., & Zuhorn, I. S.** (2020). Endocytosis of extracellular vesicles and release of their cargo from endosomes. *ACS nano*, 14(4), 4444-4455.
- Jung, M. K., & Mun, J. Y.** (2018). Sample preparation and imaging of exosomes by transmission electron microscopy. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (131), e56482.
- Kajimoto T, Okada T, Miya S, Zhang L, Nakamura S** (2013) Ongoing activation of sphingosine 1- phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nat Commun* 4:2712
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S.** (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478), eaau6977.
- Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W., ... & Weinberg, R. A.** (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 449(7162), 557-563.
- Katsuda T, Ochiya T.** (2015). Molecular signa tures of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle-mediated tissue repair, *Stem Cell Res Ther*, 6:212.
- Keller, F., Rudolf, R., & Hafner, M.** (2019). Towards optimized breast cancer 3D spheroid mono-and co-culture models for pharmacological research and screening. *Journal of Cellular Biotechnology*, 5(2), 89-101.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Koles, K., Nunnari, J., Korkut, C., Barria, R., Brewer, C., Li, Y., ... & Budnik, V.** (2012). Mechanism of evenness interrupted (Evi)-exosome release at synaptic boutons. *Journal of Biological Chemistry*, 287(20), 16820-16834.
- Komarova, S., Roth, J., Alvarez, R., Curiel, D. T., & Pereboeva, L.** (2010). Targeting of mesenchymal stem cells to ovarian tumors via an artificial receptor. *Journal of ovarian research*, 3(1), 1-14.
- Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., ... & Sharkis, S. J.** (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105(3), 369-377.
- Lai, R. C., Yeo, R. W. Y., & Lim, S. K.** (2015). Mesenchymal stem cell exosomes. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 40, pp. 82-88). Academic Press.
- Ljubic, B., Milovanovic, M., Volarevic, V., Murray, B., Bugarski, D., Przyborski, S., ... & Stojkovic, M.** (2013). Human mesenchymal stem cells creating an immunosuppressive environment and promote breast cancer in mice. *Scientific reports*, 3(1), 1-9.
- Lobb, R. J., Becker, M., Wen Wen, S., Wong, C. S., Wiegman, A. P., Leimgruber, A., & Möller, A.** (2015). Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *Journal of extracellular vesicles*, 4(1), 27031.
- Maacha, S., Bhat, A. A., Jimenez, L., Raza, A., Haris, M., Uddin, S., & Grivel, J. C.** (2019). Extracellular vesicles-mediated intercellular communication: roles in the tumor microenvironment and anti-cancer drug resistance. *Molecular cancer*, 18(1), 1-16.
- Mariotto, Angela B., et al.** (2017). Estimation of the number of women living with metastatic breast cancer in the United States. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 26.6: 809-815.
- Keller, F., Rudolf, R., & Hafner, M.** (2019). Towards optimized breast cancer 3D spheroid mono-and co-culture models for pharmacological research and screening. *Journal of Cellular Biotechnology*, 5(2), 89-101.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- McAndrews, K. M., & Kalluri, R.** (2019). Mechanisms associated with biogenesis of exosomes in cancer. *Molecular cancer*, 18(1), 52.
- Menck, K., Klemm, F., Gross, J. C., Pukrop, T., Wenzel, D., & Binder, C.** (2013). Induction and transport of Wnt 5a during macrophage-induced malignant invasion is mediated by two types of extracellular vesicles. *Oncotarget*, 4(11), 2057.
- Montecalvo, A., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Beer Stolz, D., Sullivan, M. L., Karlsson, J. M., ... & Morelli, A. E.** (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 119(3), 756-766.
- Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. F.** (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of extracellular vesicles*, 3(1), 24641.
- Nagini, S.** (2017). Breast cancer: current molecular therapeutic targets and new players. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 17(2), 152-163.
- Nashimoto, Y., Okada, R., Hanada, S., Arima, Y., Nishiyama, K., Miura, T., & Yokokawa, R.** (2020). Vascularized cancer on a chip: The effect of perfusion on growth and drug delivery of tumor spheroid. *Biomaterials*, 229, 119547.
- Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., ... & Thery, C.** (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature cell biology*, 12(1), 19-30.
- Patel, D. B., Gray, K. M., Santharam, Y., Lamichhane, T. N., Stroka, K. M., & Jay, S. M.** (2017). Impact of cell culture parameters on production and vascularization bioactivity of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Bioengineering & translational medicine*, 2(2), 170-179.
- Pegtel, D. M., & Gould, S. J.** (2019). Exosomes. *Annual review of biochemistry*, 88, 487-514.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Phuyal, S., Hessvik, N. P., Skotland, T., Sandvig, K., & Llorente, A.** (2014). Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins. *The FEBS journal*, 281(9), 2214-2227.
- Piccinini, F., Tesei, A., Arienti, C., & Bevilacqua, A.** (2015). Cancer multicellular spheroids: volume assessment from a single 2D projection. *Computer methods and programs in biomedicine*, 118(2), 95-106.
- Pols, M. S., & Klumperman, J.** (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental cell research*, 315(9), 1584-1592.
- Prockop, D. J., & Oh, J. Y.** (2012). Medical therapies with adult stem/progenitor cells (MSCs): a backward journey from dramatic results in vivo to the cellular and molecular explanations. *Journal of cellular biochemistry*, 113(5), 1460-1469.
- R. Kalluri, V.S. LeBleu.** (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367.
- Rani, S., Ryan, A. E., Griffin, M. D., & Ritter, T.** (2015). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications. *Molecular Therapy*, 23(5), 812-823.
- Raposo, G., & Stoorvogel, W.** (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373-383.
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., & Geuze, H. J.** (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine*, 183(3), 1161-1172.
- Ridge, S. M., Sullivan, F. J., & Glynn, S. A.** (2017). Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Molecular cancer*, 16(1), 1-10.
- S. Gurunathan, M.H. Kang, M. Jeyaraj, M. Qasim, J.H. Kim.** (2019). Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells* 8 (4).
- S.L.N. Maas, X.O. Breakefield, A.M. Weaver.** (2017). Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends in cell biology*, 27 (3), 172-188.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Sato, M., Sato, K., Liou, W., Pant, S., Harada, A., & Grant, B. D.** (2008). Regulation of endocytic recycling by *C. elegans* Rab35 and its regulator RME-4, a coated-pit protein. *The EMBO journal*, 27(8), 1183-1196.
- Savina, A., Vidal, M., & Colombo, M. I.** (2002). The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *Journal of cell science*, 115(12), 2505-2515.
- Shojaei, S., Hashemi, S. M., Ghanbarian, H., Salehi, M., & Mohammadi-Yeganeh, S.** (2019). Effect of mesenchymal stem cells-derived exosomes on tumor microenvironment: tumor progression versus tumor suppression. *Journal of Cellular Physiology*, 234(4), 3394-3409.
- Skotland, T., Hessvik, N. P., Sandvig, K., & Llorente, A.** (2019). Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *Journal of Lipid Research*, 60(1), 9-18.
- Skryabin, G. O., Komelkov, A. V., Savelyeva, E. E., & Tchekina, E. M.** (2020). Lipid rafts in exosome biogenesis. *Biochemistry (Moscow)*, 85(2), 177-191.
- Smirnov, S. V., Harbacheuski, R., Lewis-Antes, A., Zhu, H., Rameshwar, P., & Kotenko, S. V.** (2007). Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells as a target for cytomegalovirus infection: implications for hematopoiesis, self-renewal and differentiation potential. *Virology*, 360(1), 6-16.
- Song, L., Tang, S., Han, X., Jiang, Z., Dong, L., Liu, C., ... & Du, Y.** (2019). KIBRA controls exosome secretion via inhibiting the proteasomal degradation of Rab27a. *Nature communications*, 10(1), 1-13.
- Song, P., Trajkovic, K., Tsunemi, T., & Krainc, D.** (2016). Parkin modulates endosomal organization and function of the endo-lysosomal pathway. *Journal of Neuroscience*, 36(8), 2425-2437.
- Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., & Brech, A.** (2009). Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*, 10(7), 925-937.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Svensson, K. J., Christianson, H. C., Wittrup, A., Bourseau-Guilmain, E., Lindqvist, E., Svensson, L. M., ... & Belting, M.** (2013). Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17713-17724.
- Teixeira, F. G., Carvalho, M. M., Sousa, N., & Salgado, A. J.** (2013). Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration?. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(20), 3871-3882.
- Theise, N. D.** (2005). On experimental design and discourse in plasticity research. *Stem Cell Reviews*, 1(1), 9-13.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O.** (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6), 654-659.
- Verweij, F. J., Bebelman, M. P., Jimenez, C. R., Garcia-Vallejo, J. J., Janssen, H., Neefjes, J., ... & Pegtel, D. M.** (2018). Quantifying exosome secretion from single cells reveals a modulatory role for GPCR signaling. *Journal of Cell Biology*, 217(3), 1129-1142.
- Wagers, A. J., & Weissman, I. L.** (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 116(5), 639-648.
- Whiteside, T. L.** (2018). Exosome and mesenchymal stem cell cross-talk in the tumor microenvironment. In *Seminars in immunology* (Vol. 35, pp. 69-79). Academic Press.
- Williams, R. L., & Urbé, S.** (2007). The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(5), 355-368.
- Wu, P., Zhang, B., Ocansey, D. K. W., Xu, W., & Qian, H.** (2021). Extracellular vesicles: a bright star of nanomedicine. *Biomaterials*, 269, 120467.
- Yellon, D. M., & Davidson, S. M.** (2014). Exosomes: nanoparticles involved in cardioprotection? *Circulation research*, 114(2), 325-332.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Yu, D. D., Wu, Y., Shen, H. Y., Lv, M. M., Chen, W. X., Zhang, X. H., ... & Zhao, J. H.** (2015). Exosomes in development, metastasis and drug resistance of breast cancer. *Cancer science*, 106(8), 959-964.
- Zamani, P., Fereydouni, N., Butler, A. E., Navashenag, J. G., & Sahebkar, A.** (2019). The therapeutic and diagnostic role of exosomes in cardiovascular diseases. *Trends in cardiovascular medicine*, 29(6), 313-323.
- Zhang, B., Yin, Y., Lai, R. C., Tan, S. S., Choo, A. B. H., & Lim, S. K.** (2014). Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes. *Stem cells and development*, 23(11), 1233-1244.
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H.** (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & bioscience*, 9(1), 1-18.
- Zou, W., Lai, M., Zhang, Y., Zheng, L., Xing, Z., Li, T., ... & Bai, X.** (2019). Exosome release is regulated by mTORC1. *Advanced Science*, 6(3), 1801313.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemedi, sadece akademik hayatta değil, her konuda yardımcı olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ'a, deneysel süreçlerimde bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli doktora öğrencisi Pelin SAĞLAM METİNER'e, yüksek lisans eğitimim süresince finansal destek sağlayan ve bu süreçte önemli motivasyon kaynaklarımdan biri olan TÜBİTAK UPAG Uluslararası İşbirliği Projeleri Araştırma Destek Grubu Programına (Proje numarası: 120N422) ve TÜBİTAK 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programına, her zaman motivasyonumu arttıran tüm Biyomimetik Mikrosistemler laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma, her sorumu yanıtlayan, bu süreçte beni yalnız bırakmayan laboratuvar arkadaşlarım Sezen Horozoğlu, Yağmur Filiz, Bensu Yağmur Arslan, Sena Yanaşık, Utku Devamoğlu ve Yusuf Odabaşı'na manevi destekçilerim olan sevgili arkadaşlarıma ve canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

13/06/2022

İmzası

Elif DURAN

ÖZGEÇMİŞ

Elif Duran

STAJ DENEYİMİ

Temmuz 2019 • İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi Kök Hücre ve Organoid Laboratuvarı (20 iş günü)

- Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarı (gönüllü staj)

ARAŞTIRMA DENEYİMİ

Lisans bitirme tezi – Mikroakışkan Platformda Nanopartikül Sentezi ve Elektrik Alan Varlığında Aktive Edilerek Hedefli İlaç Salımının Gerçekleştirilmesi