

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KORELATİF MİKROSKOP İLE VEZİKÜLER
YAPILARIN GÖRÜNTÜLENMESİ**

ŞEYDA DEMİR

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR – 2018

TEZ KODU: DEU. HSI. MSc – 2015970099

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KORELATİF MİKROSKOP İLE VEZİKÜLER
YAPILARIN GÖRÜNTÜLENMESİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ŞEYDA DEMİR

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Hüsnü Alper BAĞRIYANIK

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2018.KB.SAG. sayı ile desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU. HSI. MSc – 2015970099

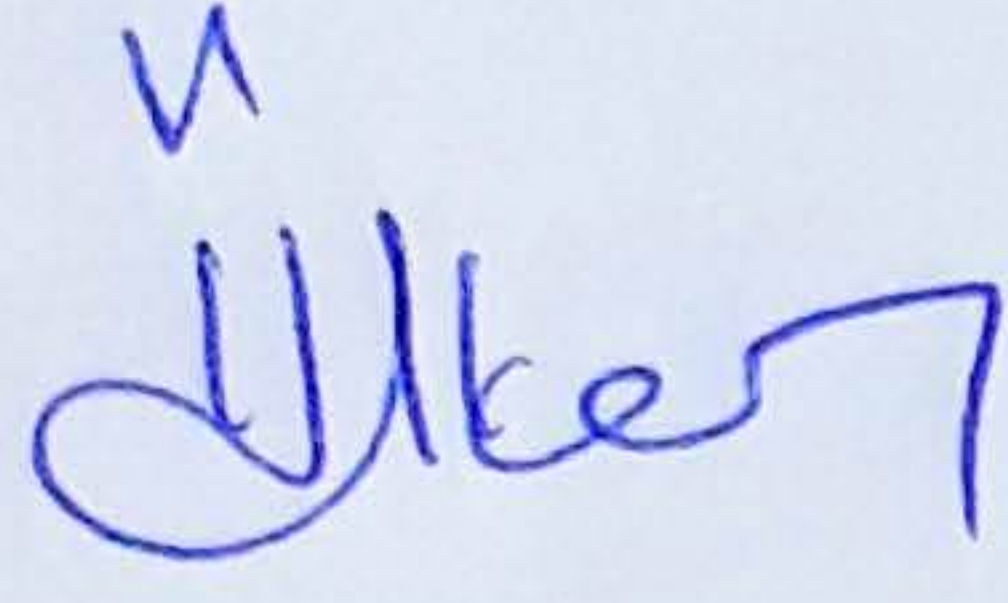
"Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalı, Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Şeyda DEMİR'in "**Korelatif Mikroskop ile Veziküler Yapıların Görüntülenmesi**" konulu Yüksek Lisans tezini (12/09/2018) tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr.Hüsnü Alper BAĞRIYANIK

BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

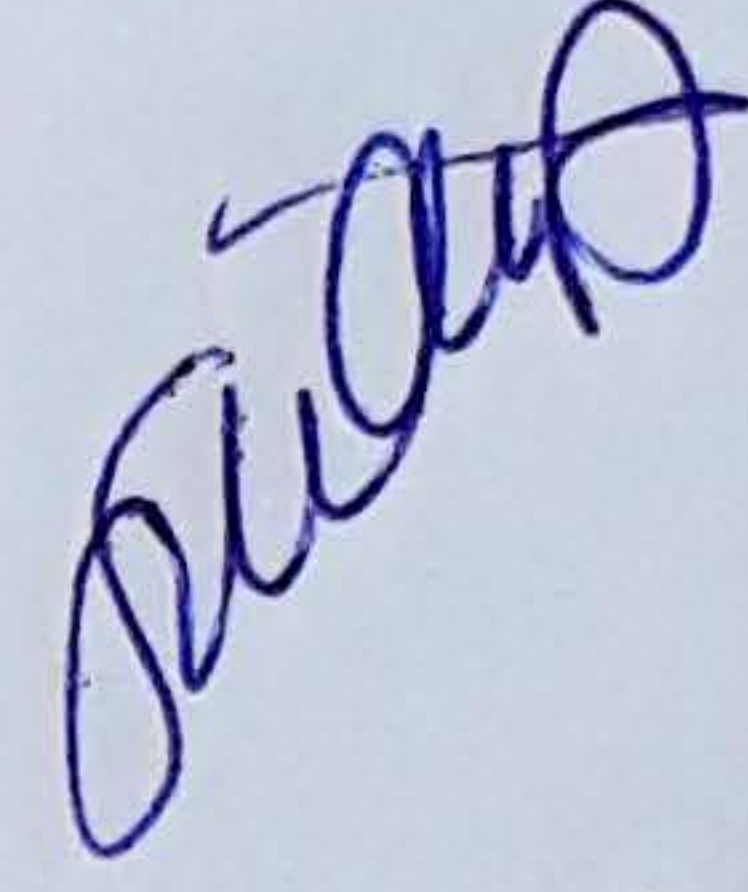
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Prof.Dr. Ülker CANKURT

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi



Prof.Dr. Gülperi ÖKTEM

ÜYE

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof.Dr.Bekir Uğur ERGÜR

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof.Dr. Meltem KURUŞ

YEDEK ÜYE

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
ŞEKİL DİZİNİ	iv
TABLO DİZİNİ	vi
KISALTMALAR	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Membran Vezikülleri	6
2.1.1. Hücre Membranından Salgılanan Veziküllerin Sınıflandırılması.....	6
2.1.2. Ekzozomlar	8
2.1.2.1.Ekzozom Keşfinin Tarihi	8
2.1.2.2.Ekzozomların Özellikleri	8
2.1.2.3.Ekzozomların Biyogenezi	10
2.1.2.4.Ekzozomların İzolasyonu.....	11
2.1.2.5.Ekzozomların Yüzey Belirteçleri.....	11
2.1.2.6.Ekzozom Bileşenleri	12
2.1.2.7.Literatür Bilgileri ile Günümüzdeki Ekzozom Çalışmaları.....	13
2.1.2.8.Tanı ve Terapide Ekzozomlar	15
2.1.2.9.Günümüzde Ekzozom Varlığının Tespiti İçin Kullanılan Yöntemler	17
2.1.2.10. Ekzozomların Görüntülenmesi.....	17
2.2. Korelatif Mikroskopi.....	18
2.2.1. Korelatif Işık ve Elektron Mikroskopi (CLEM).....	19

2.2.2.Korelatif Mikroskopik Görüntüleme için Günümüze Kadar Kullanılan Yöntemler.....	21
2.2.3.Korelatif Mikroskopi için Örnek Hazırlanmasındaki Önemli Basamaklar	22
2.2.3.1.Fiksatif Seçimi	22
2.2.3.2.Gömme Materyalinin Seçimi ve Optimizasyonu	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Araştırmanın Tipi	26
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	26
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örnekleme/Çalışma Grupları	26
3.4. Çalışma Materyali	26
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	26
3.6. Veri Toplama Araçları.....	26
3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler.....	26
3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler	27
3.6.2.1.Hela Hücre Kültürü	27
3.6.2.2.Hücre Dondurma ve Çözme	27
3.6.2.3.Ekzozom İzolasyonu	27
3.6.2.3.1. Ultrasantrifüj ile İzolasyon.....	27
3.6.2.3.2. Ekzozomların Kit ile İzolasyonu	29
3.6.2.4.Ekzozomların TEM'de Görüntülenmesi.....	29
3.6.2.5.Nano-zetasizer ile Dinamik Işık Saçılımının Ölçülmesi (DLS).....	30
3.6.2.6.Korelatif Mikroskopi Kullanımı	30
3.6.2.6.1. Korelatif Mikroskop Tutucuları	30
3.6.2.6.3. Korelatif Mikroskop Tutucularına Örnek Yerleştirilmesi	32
3.6.2.7.Ekzozomların Konfokal – TEM Korelasyonu için Hazırlanması	33

3.6.2.7.1.	Konfokal Mikroskopta Ekzozomların Görüntülenmesi	34
3.6.2.7.3.	İki farklı mikroskoptan alınan görüntülerin korelasyonu.....	36
3.7.	Araştırma Planı ve Takvimi.....	39
3.8.	Verilerin Değerlendirilmesi.....	39
3.9.	Araştırmanın Sınırlılıkları	39
3.10.	Etik Kurul Onayı	40
4.	BULGULAR	41
4.1.	Hela Hücre Kültürü.....	41
4.2.	Hela Hücrelerinden Ekzozom İzolasyonu	41
4.3.	İzole Edilen Ekzozomların Nano-zetasizer ile Değerlendirilmesi	42
4.4.	İzole Edilen Ekzozomların TEM Görüntüsü	43
4.5.	İzole Edilen Ekzozomların Konfokal Görüntüsü	45
4.6.	Ekzozomların Konfokal-TEM Korelasyonu	48
4.7.	Ekzozomların Konfokal – SEM Korelasyonu	52
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	57
6.	TARTIŞMA.....	58
7.	KAYNAKÇA	63
8.	EKLER.....	69
8.1.	<i>EK-1 Etik Kurul Belgesi</i>	70
8.2.	<i>EK-2 Özgeçmiş</i>	73

SEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Membran Veziküllerinin Sınıflandırılması.....	7
Şekil 2. Ekzozom bileşenleri.....	12
Şekil 3. Ekzozom İzolasyonu için Farklı Hızlardaki Santrifüj Basamakları.....	28
Şekil 4. SEM Tutucusu.....	31
Şekil 5. TEM Tutucusu.....	31
Şekil 6. SEM ve TEM tutucularına örnek yerleştirilmesi.....	32
Şekil 7. SEM ve TEM tutucu için elektron mikroskop adaptörü.....	36
Şekil 8. Shuttle&Find Penceresinde 3 Adet Korelasyon Noktasının Belirlenmesi.	37
Şekil 9. Korelasyon Görüntüsünün Oluşturulması.....	38
Şekil 10. Kültür Ortamında Hela Hücreleri.....	41
Şekil 11. Kit ile Hela Hücrelerinden Elde Edilen Ekzozom Pelet.....	41
Şekil 12. Solüsyon İçindeki Ekzozomların Nano-Zetasizer ile Değerlendirilmesi	42
Şekil 13. Kit ile Hela Hücrelerinden Elde Edilen Ekzozomların TEM Görüntüsü. (150.000X).....	43
Şekil 14. Ultrasantrifüj ile HeLa Hücrelerinden Elde Edilen Ekzozomların TEM Görüntüsü.....	43
Şekil 15. Kit ile İzole Edilen Ekzozom Topluğunun TEM Görüntüsü (260.000x).	44
Şekil 16. İzole Edilen Ekzozomların TEM Görüntüsü. (24.000x).....	44
Şekil 17. İzole Edilen Ekzozomların TEM Görüntüsü (250.000x).....	45
Şekil 18. İzole Edilen Ekzozomların Konfokal Mikroskop Görüntüsü (63x).	46
Şekil 19. İzole Edilen Ekzozomların Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x).	46
Şekil 20. İzole Edilen Ekzozomların Konfokal Mikroskop Görüntüsü (63x).	47
Şekil 21. İzole Edilen Ekzozomların Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x).	47
Şekil 22. TEM Gridi Üzerine Fikse Edilen Ekzozomların Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x).....	48
Şekil 23. Konfokal Mikroskop Görüntüsünde Belirlenen Referans Nokta	49
Şekil 24. Ekzozomların TEM Görüntüsü.....	50
Şekil 25. Ekzozomların Konfokal Görüntüsü.	50

Şekil 26. Ekzozomların Korelatif Mikroskopi Görüntüsü	51
Şekil 27. Ekzozomların Korelatif Mikroskop Görüntüsü	51
Şekil 28. Ekzozomların SEM Görüntüsü (3000x).....	52
Şekil 29. İzole Edilen Ekzozomların SEM Görüntüsü.....	53
Şekil 30. İzole Edilen Ekzozomların SEM Görüntüsü (16.000x).....	53
Şekil 31. SEM ve Konfokal Mikroskop Görüntüsünde İşaretlenen Korelasyon Noktaları.....	54
Şekil 32. Ekzozomların Korelatif Mikroskop Görüntüsü	54
Şekil 33. Ekzozomların Konfokal-SEM Kombinasyonlu Korelatif Mikroskopi görüntüleri.....	55
Şekil 34. Bir Ekzozom Topluluğunun 80.000x Büyütmedeki SEM Görüntüsü ...	56

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Hücre Membranından Salınan Farklı Tip Veziküllerin Fizikokimyasal Karakterizasyonu	7
Tablo 2. Ekstrasellüler Veziküllerin (EV) Potansiyel Yüzey Belirteçleri.	12
Tablo 3. Ekzozom bileşenleri için örnekler	13



KISALTMALAR

CLEM:Korelatif Işık ve Elektron Mikroskopisi

FM: Floresan Mikroskop

EM:Elektron Mikroskop

TEM:Geçirimli (Transmission) Elektron Mikroskobu

SEM:Taramalı (Scanning) Elektron Mikroskobu

PFA: Paraformaldehit

BSA: Bovine Serum Albumin

EV:Ekstrasellüler Veziküller

ILV: İntra-Luminal Veziküller

MVB: Multi Veziküler Body

ESCRT:Endosomal Sorting Complex Required for Transport

DAB: 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahidroklorit

MHC: Majör doku uyumluluğu kompleksi

ATM: Atomik Güç Mikroskobu

GFP: Green Fluorescent Protein

GMA: Glikol Metakrilat

FBS: Fetal Bovine Serum

PBS: Phosphate Buffer Saline

DLS: Dinamik Işık Saçılımı

CZİ: Carl Zeiss Image

T-PMT: Transmisyon Işık Dedektörü

EBV: Epstein-Barr Virüs

TEŞEKKÜR

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında eğitim almaya başladığım günden beri her konuda bana destek olan, yol gösteren, tecrübelerini paylaşan değerli danışman hocam Prof.Dr.H. Alper Bağrıyanık' a

Bu projenin yazılmasında, başarıya ulaşmasında çok büyük desteği olan projenin başından sonuna kadar yanımda olan değerli hocam Prof.Dr. Esra Erdal' a

Sağladığı yüksek teknolojik imkanlarla projemizi başarıya ulaştırmada büyük katkısı olan İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi' ne , özellikle İBG Elektron Mikroskopik görüntüleme ve Optik görüntüleme birimine,

Katılım ve katkıları için değerli jüri üyemiz Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM'e

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalının değerli hocalarından Prof.Dr. Ülker CANKURT, Prof.Dr. Güven ERBİL, Prof.Dr. Çetin PEKÇETİN, Prof.Dr.Bekir ERGÜR, Prof.Dr. Işıl TEKMEK, Prof.Dr. Kazım TUĞYAN, Doç. Dr. Seda ÖZBAL, Doç. Dr. Başak BAYKARA, Doç. Dr. Serap CİLAKER MICİLİ ' ya

Sevgili arkadaşlarım Gökçen BİLİCİ, Pınar AKOKAY, Filiz YILMAZ, Feyyaz ÖZEL, Merve TATLI, Umut DEMİRDELEN, Nevin ERSOY, Betül SARI' ya

Her koşulda, her zaman yanımda olan sevgili ailem' e sonsuz teşekkür ederim.

KORELATİF MİKROSKOP İLE VEZİKÜLER YAPILARIN GÖRÜNTÜLENMESİ

ŞEYDA DEMİR

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Narlidere, İzmir, seyda.demir@deu.edu.tr

ÖZET

Korelatif mikroskop, optik mikroskoplar ile elektron mikroskoplarının birleştirildiği bir görüntüleme tekniğidir. En sık kullanılan kombinasyonu ışık mikroskopları ile elektron mikroskoplarının birleştirildiği sistemlerdir. Bu sistemlere kısaca CLEM (*Correlative Light and Electron Microscopy*) adı verilir. Işık mikroskobu olarak genellikle floresan mikroskoplar kullanılır. Floresan ile işaretli molekülleri görüntüleme özgünlüğüne sahip Floresan Mikroskop (FM) ile benzersiz yüksek çözünürlüğe sahip Elektron Mikroskobu (EM) nun birleştirilmesi ile biyolojik örneklerin yapı ve işlevini bir arada ve en yüksek çözünürlükte incelenmesini sağlar.

Korelatif mikroskopi sisteminin geliştirilmesi ile, yapı ve fonksiyonda rol alan protein ve/veya RNAlar gibi moleküllerin, veziküllerin içinde veya yüzeyinde, yüksek çözünürlükte gösterilmesi mümkün olmuştur. Ancak halen bu sistemin metodolojik olarak geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Çünkü korelatif mikroskopi benzersiz özellikleri yanında ciddi zorluklar da barındırır. Bunun en önemli nedeni FM ile EM için örnek hazırlama basamaklarının birbiri ile uyumlu olmamasıdır. Bu nedenle korelatif mikroskopi ile çalışmanın en büyük zorluğu örnek hazırlama sürecidir. Örnek hazırlama sürecinde hem floresan sinyalin kaybedilmemesi hem de ultra detaylı yapının korunması gereklidir. İki prosedür arasındaki denge en iyi şekilde kurulmalıdır. Diğer neden ise FM de işaretlenen ve görüntülenen alanın TEM de izinin sürülmesinin zor ve zaman alıcı bir işlem hatta bazen imkansız olmasıdır.

Günümüzde yapılmakta olan çalışmalarda da Korelatif Mikroskopide görüntüleme için protokol geliştirme çalışmaları devam etmektedir.

Ekzozomlar çift lipid tabakalı membran ile çevrili 30-150 nm çapında nano veziküllerdir. Eritrositler, lenfositler, dendritik hücreler ayrıca kanser hücreleri gibi birçok farklı hücre tipinden salınırlar. Tükürük, plazma, idrar, amniyotik sıvı, bronşiyal lavaj sıvısı, sinovyal sıvı, anne sütü gibi vücut sıvılarında bulunur ve bu sıvılardan izole edilebilirler.

Hücreler arası haberleşmede yeni bir mekanizma olarak tarif edilen, yüksek biyobelirteç potansiyelleri nedeniyle özellikle hastalıkların tanısında ve yüklenebilir oldukları için tedavisinde kullanılabileceğine dair bir çok kanıt olan ekzozomların bilinmeyenleri de bir hayli fazladır. Bu nedenle, ekzozomların yüksek çözünürlükte işaretlenerek görüntülenmesi morfolojilerini ve fonksiyonlarını anlamak için oldukça önemli bir yöntemdir. İndirekt yöntemlerin aksine varlıkları, lokasyonları ve davranışları için kesin bir kanıttır.

Amaç:

Bu çalışmada, ekzozomlar kültür ortamındaki HeLa hücrelerden izole edilerek korelatif mikroskopi yöntemi ile görüntülenecektir. Şu anki literatür bilgimize göre daha önce ekzozomlar bu metot ile gösterilmemiştir.

Yöntem:

Hücre kültüründen izole ettiğimiz nano-boyutta veziküller olan ekzozomları, yüzey belirteci olan CD63 proteinini floresan konjuge antikolar ile işaretleyerek konfokal mikroskopta görüntülenip, görüntülenen alanın koordinasyonları özel bir tutucu sayesinde, Zeiss ZEN Blue yazılım programı kullanılarak kaydedildikten sonra aynı örnek tutucuda ki pozisyonu hiç değiştirilmeden, elektron mikroskobik görüntüleme için kontrastlanarak EM de görüntülenir. Daha sonra bu iki görüntü arasında 3 tane korelasyon noktası belirlenir ve konfokalde işaretlenen alan bilgileri, ultra-detaylı elektron mikroskop görüntüsü üzerine, kaydedilen koordinasyonlar kullanılarak bire bir Zeiss Shuttle&Find programı ile yerleştirilir. Böylece korelasyon görüntüsü oluşturulur.

Bulgular:

Ekzozomlar yüzey belirteci olan CD63 proteininden floresan konjuge antikolar ile işaretlenerek Konfokal-SEM ve Konfokal-TEM kombinasyonundan oluşan Korelatif Mikroskopi yöntemi ile görüntülenmiştir.

Sonuçlar:

Bu çalışma ile, hücrelerden izole edilen ekzozomlar ilk defa Korelatif Mikroskopi yöntemi ile görüntülenmiştir

Anahtar Kelimeler: Ekzozom, Korelatif mikroskopi, Görüntüleme, Elektron mikroskobu

IMAGING OF VESICULAR STRUCTURE BY CORRELATIVE MICROSCOPY

ŞEYDA DEMİR

Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Histology and
Embryology,
Narlidere, Izmir, seyda.demir@deu.edu.tr

ABSTRACT

Correlative microscopy is an imaging technique in which optical microscopes and electron microscopes are combined. The most commonly used type of correlative microscopy is the combination of light and electron microscopes. The systems are called Correlative Light and Electron Microscopy (CLEM). Fluorescent microscope is generally used as an optic microscope, in this combination. FM that provides view from a large area of the specimen and gives a general information about localization of interested molecule is fluorescently labelled but FM has no ability to provide high-resolution image as electron microscopy therefore cannot give information about ultra-structure of molecules. Correlative microscopy in which combination of FM that provides imaging of fluorescently labelled molecules and EM that has the unique high resolution capacity, together enables the study of the structure and function of biological specimens at the highest resolution.

With development of correlative microscopy, it becomes possible to image proteins and RNAs that are located in or surface of vesicles at high resolution. However, the system still needs to be developed methodologically.

Although CLEM have unique properties, it has serious challenges. The most challenging thing is preparation of the specimen. Because steps of sample preparation for FM and TEM are not proper each other.

The other challenge is region of interest that is fluorescently labelled for FM, which is hard to trace in the TEM. It is time consuming and also sometimes impossible. Therefore studies of developing protocols for correlative microscopy imaging is ongoing.

Exosomes are Nano-sized vesicles of 30-150 nm in size which are enclosed with lipid bilayer. They are released from most type of cells like Erythrocytes, lymphocytes,

dendritic cells, epithelial cell, cancer cells and they can be isolated from body fluids like Saliva, plasma, urine, amniotic fluid, bronchial lavage fluid, synovial fluid, breast milk.

Exosomes which are identified new mechanism for cell-cell communication, have high potential of biomarker and can be loaded of interested molecules like drugs so they can be used as a biomarker for diagnosis of diseases and as a carrier for therapy of diseases. Although all the known facts about exosomes, there are the unknowns of exosomes are quite a lot.

For this reason, visualization of exosomes in high resolution is a very important method to understand their morphology and functions. Contrary to indirect methods, it is a definite proof for assets, locations and behaviors of exosomes.

Aim:

In this study, exosomes are isolated from HeLa cells and visualize by correlative microscopy. Based on our current literature knowledge, exosomes are not visualized by correlative microscopy before.

Method:

Exosomes are isolated from HeLa cells and they are labelled with fluorescent conjugated anti-CD63 antibody which is binds surface marker of exosome. Exosome sample is put into special holder. So fluorescent labelled exosomes are visualized by confocal microscope and coordinates of visualized area are saved using Zeiss ZEN Blue software programme. After that exosomes are contrasted for EM imaging. After EM imaging are completed, 3 correlation points are determined between images which come from different microscope system. Then fluorescence image and the ultra-detail image are superimposed by using Zeiss Shuttle & Find software programme. So correlation image is created.

Results:

Exosomes were labelled with fluorescently conjugated antibodies from the surface marker CD63 protein was visualized by Confocal-SEM and Confocal-TEM combination of Correlative microscopy

Conclusion:

With this study, exosomes that were isolated from cells were visualized for the first time by correlative microscopy.

Keywords: Exosome, Correlative microscopy, Imaging, Electron microscopy

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ekzozomlar hücreler arasındaki haberleşmeyi sağladığı bilinen ve hücre-hücre iletişimde yeni bir mekanizmanın tanımlanmasına yol açan nano-veziküllerdir.

Günümüzde genetik materyali, regülasyonda rol oynayan RNA'ları, proteinleri, lipidleri hücreler arasında taşıdığı bilinen ve potansiyel ilaç taşıyıcı olarak kullanılabilen, tanı ve tedavide rol alan ekzozomlarla ilgili beklenti yüksektir. Buna karşın salgılanma mekanizmaları, regülasyonları, fonksiyonları, fizyolojileri ile ilgili bilinmeyenlerde bir hayli fazladır (1). Ekzozomların yüksek çözünürlükte görüntüleyebilmek ise varlıkları, lokasyonları ve fonksiyonları için kesin bir kanıttır.

Nanoteknolojideki, fizikteki, biyokimyada ki son gelişmeler ile birlikte veziküler yapıların görüntülenebilmesi daha uygulanabilir bir hale gelmiştir. Veziküllerin kompozisyonu, biyolojisi, hastalık ve sağlık durumunda klinik ile ilişkisi gibi bilgilerimizi daha ileriye taşıyabilmek için, yeni teknolojileri kombine ederek vezikülleri görüntülemek oldukça önemlidir (2)

Korelatif mikroskopi tekniğide son yılların görüntüleme alanındaki en büyük gelişmelerinden biridir. Bu mikroskopi tekniğinde, farklı mikroskop kombinasyonları kullanarak çok yönlü bir bilgi eldesi sağlanır. Örneğin Optik mikroskoplar ile Elektron Mikroskopların kombinasyonu gibi. Bu kombinasyonlara, FM-TEM, FM-SEM, FM-Cryo-EM, Atomic Force Mikroskopi (AFM)-EM örnekleri verilebilir. En yaygın kullanılan ise ışık mikroskopları ile elektron mikroskoplarının kombine edildiği kısaca CLEM (*Correlative Light Electron Microscopy*) denilen Korelatif Mikroskopi çeşididir (2).

Bu çalışmadaki amacımız; ekzozomları floresan konjuge antikor ile işaretleyerek, öncelikle ileri teknoloji floresan mikroskop çeşidi olan Konfokal mikroskopta görüntüledikten sonra aldığımız görüntüyü, eşsiz çözünürlüğe sahip Elektron Mikroskobuna taşıyarak, nano boyuttaki bu veziküllerin ultra detaylı yapılarını Korelatif Mikroskopi tekniği ile görüntüleyebilmektir.

Şuan ki literatür bilgilerine göre, hücrelerden izole edilen ekzozomlar daha önce korelatif mikroskop tekniği ile daha önce görüntülenmemiştir. İlk defa bu çalışma ile görüntülenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Membran Vezikülleri

Hücreler arası iletişim, hücre gelişimi ve çok hücreli organizmalarda homeostasinin devamı için önemlidir. Hücreler arasındaki bu iletişim lokal ya da daha uzak mesafelere olabilir. Lokal iletişim hücrelerin direkt iletişim halinde olmasıyla gerçekleşir. Burada gap junctionlar rol oynar. Vücudun daha uzak bir mesafesindeki hücrelere bir sinyal iletilecekse buna uygun moleküller devreye girer. Örneğin Hormonlar gibi. Uzak mesafedeki hücreler arası iletişime bir örnek de ekstrasellüler veziküllerdir. Bu veziküller kargo gibi hareket ederek birden fazla çeşit molekülü taşıdıkları gösterilmiştir. Lipidler, proteinler, nükleik asitler gibi. Bu veziküller hücre membranından salındıkları için genel olarak membran vezikülleri olarak tanımlanmaktadır. Hücre dışında ekstrasellüler ortama verildikleri için de Ekstrasellüler Veziküller (EV) olarak da isimlendirilir. Hücre membranından farklı orijinlere sahip, çeşitli yapı ve büyüklükte veziküller salgılanır (3).

2.1.1. Hücre Membranından Salgılanan Veziküllerin Sınıflandırılması

Membran vezikülleri sferik yapılardır ve çift lipid tabaka ile sınırlıdırlar. Sahip oldukları membran hücre membranı ile benzer yapıdadır. Hücre membranından salgılanan, farklı tipte bir çok vezikül vardır. Bu veziküller farklı yapısal, biyokimyasal özelliklerine göre birbirinden ayrılırlar. Köken aldıkları bölgenin, fonksiyonları üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Yani intrasellüler ya da membrandan köken alan veziküllerinde fonksiyonu birbirinden farklı olmaktadır.

Membran vezikülleri yaşayan hücrelerden salgılandığı gibi, ölmek üzere olan hücreler ya da apoptotik hücrelerden de salgılanmaktadır. Aşağıda verilen Tablo 1' de membran veziküllerinin fizikokimyasal özelliklerine göre sınıflandırılması gösterilmektedir.(4)

Tablo 1. Hücre Membranından Salınan Farklı Tip Veziküllerin Fizikokimyasal Karakterizasyonu (4)

Özellikler	Ekzozomlar	Mikro Veziküller	Ektozomlar	Membran Partikülleri	Ekzozom Benzeri Veziküller	Apoptotik Veziküller
Boyut	50–100 nm	100–1,000 nm	50–200 nm	50–80 nm	20–50 nm	50–500 nm
Sükrözdeki Yoğunluk	1.13–1.19 g/ml	Tanımsız	Tanımsız	1.04–1.07 g/ml	1.1 g/ml	1.16–1.28 g/ml
EM deki Görünüşü	Fincan şeklinde	Düzensiz ve elektron yoğun	İki yapraklı yuvarlak yapılar	Yuvarlak	Düzensiz	Heterojen
Sedimentasyon	100,000 g	10,000 g	160,000–200,000 g	100,000–200,000 g	175,000 g	1,200g , 10,000 g yada 100,000 g
Lipid Kompozisyonu	Kolesterol,sfingomiyelin,seramidce zengin. Lipid raft lar içerir. Fosfotidil serin sergiler	Fosfotidil serin sergiler	Kolesterol ve diaçilgliserol den zengin. Fosfotidil serin sergiler	Tanımsız	Lipid Raft içermez	Tanımsız
Ana Protein Belirteçleri	Tetraspaninler, (CD63, CD9), Alix and TSG101	Integrinler, selektinler ve CD40 ligand	CR1 ve proteolitik enzim CD63 yok	CD133 CD63 yok	TNFRI	Histon Proteinleri
Orijini	Endozom	Plazma membranı	Plazma membranı	Plazma membranı	Hücre içi komponentler ?	Tanımsız
Alınan Referans Sayısı	142	3	143	8	17	144

Membran vezikülleri köken aldıkları yere göre 3 tipe ayrılır. Apototik veziküller, Mikroveziküller ve Ekzozomlar olmak üzere;



Şekil 1. Membran Veziküllerinin Sınıflandırılması

- 1- Apoptotik veziküller: 50-500nm boyuta sahiptirler. Elektron Mikroskopik görüntüsü heterojendir. DNA, RNA ve histon proteinlerini içerir. Taşıdığı ana protein histonlardır. Apoptoz sırasında apoptotik veziküller makrofajlar tarafından ortadan kaldırılır.

- 2- Mikroveziküller: Hücre membranının dışarı doğru tomurcuklanması ile membrandan ayrılarak oluşurlar. 100-1000nm boyutundadırlar. Bazı kaynaklarda ekzozom, membran partikülleri, ekzozom benzeri veziküller olarakta isimlendirilirler.
- 3- Ekzozomlar: 30-150 nm boyutunda nano veziküllerdir. Kökenleri diğer veziküllerden farklıdır. Endozomlardan köken alırlar. (3)

2.1.2. Ekzozomlar

2.1.2.1. Ekzozom Keşfinin Tarihi

1970 yılında Rose Johnstone ve arkadaşları retikülositlerin maturasyonunu çalışırken hücre içinde oluşan bir vezikülün membranla kaplı daha küçük veziküller ile dolu olduğunu görmüşler. Elektron mikroskobu incelemelerinde bu vezikülün hücre membranı ile birleşerek içerdiği küçük vezikülleri hücre dışına saldırdığını gözlemlemişler. Bu veziküller için ekzozom tanımını kullanmışlar. Ayrıca bu veziküllerin endozomdan köken aldığı da rapor etmişler.(3) Bu araştırma sonuçları o yıllarda büyük tartışmalara yol açmış. Çünkü o zamana kadar geç endozomların lizozomlarla birleşerek içeriklerinin sindirildiği biliniyordu ancak içeriklerinin hücre dışına salındığı bilinmiyordu. Daha sonra çalışmalar hız kazandı ve 1989 yılında Peters ve arkadaşları sitotoksit T hücrelerinde geç endozomların plazma membranı ile birleşerek sitotoksik granüllerini salgılama mekanizmasını gösterdiler (5). Daha sonra ekzozom çalışmaları genişleyerek B ve T hücrelerinden ve sonra dendritik hücrelerden salındığı gösterildi. Bunlara ek olarak ekzozomların kanser, virüslerin neden olduğu bulaşıcı hastalıklar, Alzheimer hastalığı gibi birçok patolojik koşulda yer aldığı gösterilmiş. Bütün bu sonuçlar, araştırmacıları bu esrarengiz veziküller hakkında daha fazla araştırmaya teşvik etmiştir.(4)

2.1.2.2. Ekzozomların Özellikleri

Ekzozomlar çift lipid tabakalı membran ile çevrili 30-150 nm çapında nano veziküllerdir (6). Endozomlardan kaynaklanırlar. Ekzozomların çift katlı membranı olduğu hücreden kaynaklanan çeşitli lipid ve proteinler içerir. Bu proteinlerin bazıları transporter proteinleri, heat shock, tetraspaninler gibi proteinlerdir. Membranında bulundurduğu lipidler ise kolesterol, seramid, sfingomyelin, fosfogliserid, doymuş yağ asitleridir. Ekzozomları oluşturan moleküllerin çeşitleri ve miktarları ekzozomların fonksiyonlarını belirlemede önemlidir. (3)

Eritrositler, lenfositler, dendritik hücreler ayrıca kanser hücreleri gibi birçok farklı hücre tipinden salınırlar (7). Sağlıklı hücreler ile karşılaştırıldığında kanser hücrelerinden çok daha fazla salındığı yapılan çalışmalarda görülmüştür. Bu sonuçlar ekzozomların, kanser türlerinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır (8,9). Ayrıca ekzozomlar tükürük, plazma, idrar, amniyotik sıvı, bronşiyal lavaj sıvısı, sinovyal sıvı, anne sütü gibi vücut sıvılarında bulunmaktadır ve bu sıvılardan elde edilebilmektedir. (10)

Ekzozomlar protein, lipid, mRNA, miRNA ayrıca genomik DNA ve mitokondriyal DNA nın yanında viral parçacıklarında taşıdığı gösterilmiştir. (11,12). Yani ekzozomlar, hücreler arası iletişimin yeni bir mekanizmasını temsil etmektedir. Taşıdıkları “kargo” şeklinde ifade edilen içeriklerini, bir hücreden diğerine iletmektedirler. Kargonun iletildiği hedef hücredeki fizyolojik sürecin etkilendiği gösterilmiştir. Bu etki hedef hücre için iyi yönde olabileceği gibi, negatif yönde de bir etki söz konusu olabilir. Örneğin kanser hücresinden ekzozom ile taşınan bir kargo hedef hücrenin kontrolsüz çoğalmasına neden olabilir.

İlk zamanlar ekzozomların sadece hücredeki gereksiz proteinleri ve RNA ları uzaklaştırdığı düşünülmüş. Bunun lizozom aktivesi düşük hücreler için önemli olduğu ya da boşaltım sistemi boyunca böbrek tübülleri gibi sık kullanılan bir mekanizma olduğu düşünülmüştür. Fakat sonrasında günümüze kadar yapılan çalışmalarda bundan çok daha fazlası olduğu görülmüştür. Ekzozomlar köken aldığı hücre tipine bağlı olarak farklı fonksiyonlar gösterebilir. Örneğin immün hücrelerden salınan ekzozomların immün yanıtı kolaylaştırdığı bir çok çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca apoptoz, anjiyogenez, inflamasyon, koagülasyon süreçlerinde rol oynadığı rapor edilmiştir. Ayrıca ekzozomların bir hücreden diğerine transferinin, hedef hücreler tarafından ekzozomların alınmasıyla veya membran reseptörleri aracılığıyla yapıldığı söylenmektedir. Fakat hedef hücre tarafından kabul mekanizmaları henüz tüm ayrıntıları ile aydınlatılamamıştır. (6)

2.1.2.3. Ekzozomların Biyogenezi

Ekzozomlar, erken endozomun membranından içeriye doğru tomurcuklanarak oluşurlar. Daha sonra endozomun içinde bu küçük veziküller birikir. Bu veziküllere İntra-Luminal Veziküller (ILV) denilir. Endozoma ise artık Multi Veziküler Body (MVB) denir. Bundan sonra MVB 2 yol izleyebilir. Biri degradasyon yoludur. Lizozom ile birleşerek degrades olur. Yani sindirilir. İkincisi ise hücre membranı ile birleşerek içeriğini ekstrasellüler boşluğa salar. Boşluğa salınan bu ILV' ler artık ekzozom olarak isimlendirilirler.(13)

Ekzozomların biyogenezi ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) bağımlı ya da bağımsız olarak gerçekleşir.

ESCRT, 4 ana proteinden oluşan bir protein kompleksi ve bunlarla ilişkili yardımcı proteinlerden oluşur. ESCRT0, kargo içeriğinin toplanmasından sorumludur bunu ubiquitin-bağımlı mekanizma ile gerçekleştirir. ESCRT1 ve ESCRT2 içeri tomurcuklanmadan sorumlu iken ESCRT3, veziküllerin endozom membranından lümene serbestleşmesinden sorumludur. Yardımcı proteinler ise bu ayrılmaya ve daha sonra ESCRT proteinlerinin hücreye geri kazandırılmasından sorumludur.

ESCRT proteinlerinin fonksiyonları anlamak için yapılan ESCRT susturma çalışmalarda, birçok hücre tipinde ekzozom salınımının ciddi oranda azaldığı görülmüştür. HeLa, HEK293, fare Dendritik hücreleri gibi. Fakat oligodendroglial hücrelerde ESCRT proteinlerinin susturulmasının ekzozom salınmasında bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Bu sonuç, ESCRT bağımsız bir ekzozom salınma mekanizmasının varlığını ortaya çıkarmıştır.(14)

Ekzozomların boyutları köken aldıkları hücre ile ilişkilidir. Bu keseciklerin en küçük boyutu membranın özelliğine bağlıdır. Membranın kalınlığı yaklaşık 5nm dir ve küçük bir vezikülü oluşturacak sertliğe sahiptir. Yani bu da veziküllerin en küçük boyutunun 30nm kadar olabileceğini göstermektedir. 200-500nm boyuttaki endozomlardan oluşan bu veziküllerin en büyük boyutu ise 100nm-150nm kadar olmalıdır.

Ekzozomal kargonun golgiden endozoma yada ekzozom olgunlaşması sırasında hücre membranından alınarak endozoma ulaştığı görülmüştür (15).

Ekzozomların içeriğini belirleyen nedir ve bu içerik ekzozomlara nasıl yüklenir? Bunlar henüz net olarak aydınlatılabilmemiş mekanizmalar değildir (16). Ekzozomların hücreler arası iletişim, fonksiyonu dışında erken tanıda kullanılabilecek biyobelirteçler olduğu düşünülmüştür. Yapılan çalışmalar da, ekzozomal kargoların kaynaklandıkları hücre tipleri ve koşullarıyla ilişkili moleküller taşıdığı ve bu moleküllerin çeşitli patolojik koşullar için biyolojik belirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir (12).

2.1.2.4. Ekzozomların İzolasyonu

En sık kullanılan yöntem farklı hızlarda yapılan ultrasantrifüj yöntemidir. Bu ekzozomların boyutlarına dayanan bir izolasyon tekniğidir. Düşük hızla başlanarak önce hücre ve hücre debrilerinden arındırılan örnek daha sonra 100.000 x g hıza çıkarılarak ekzozomların pelet halinde çökmesi tekniğine dayanır.

Bunun dışında araştırmacılar sükroz gradient yöntemini kullanmaktadır. Çünkü tek başına ultrasantrifüj yönteminin kullanılmasının protein kontaminasyonuna sebep olduğu söylenmektedir. Buna engel olmak için sükroz gradienti kullanılır. Çünkü bu yöntemde hücre proteinleri sükroz içine çökerken, membran ile kaplı veziküller kendi yoğunluğuna uygun ($1.12 - 1.08 \text{ g/cm}^3$) sükroz fraksiyonu içinde asılı kalır. Bu yöntemle klinik uygulamalar için yüksek derecede saf ekzozomlar izole edilebilir (17)(18).

Bunların dışında artık ekzozom izolasyonu yapabilen, ultrasantrifüj kullanımı gerektirmeyen, hızlı ve basit kullanımlı çeşitli ticari kitlerde mevcuttur. Bu kitler polimer tabanlı çöktürme ya da antikor kaplı bilyelerle izolasyon işlemini yapmaktadır. Fakat bu kitlerin doğrulanmaya ve ne tür vezikülleri çöktürdüğünü belirlemek için kapsamlı bir karşılaştırma süreci gereklidir (18).

2.1.2.5. Ekzozomların Yüzey Belirteçleri

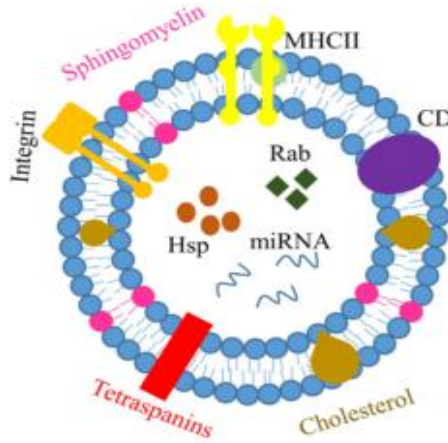
Ekzozomları diğer veziküllerden ayırt edebilmek için boyutu dışında yüzey belirteçlerinden yararlanır. Ekzozomun en iyi bilinen yüzey belirteci CD63 olarak kabul edilmiştir.(19) Bunun dışında CD9, CD81, TSG101 ve Alix te diğer yüzey belirteçleri olarak kullanılmaktadır. ESCRT bağımsız oluşan ekzozomlar TSG101 ve Alix bulundurmamalarına rağmen CD63 proteinini yüzeylerinde bulundurmaya devam ederler(15). Bu nedenle şuan için en güvenilir ekzozom yüzey belirteci CD63 olarak kabul edilmiştir. (20)

Tablo 2. Ekstrasellüler Veziküllerin Potansiyel Yüzey Belirteçleri (20).

Ekstrasellüler Veziküller	Yüzey Belirteçleri
Ekzozomlar	CD63, CD9
Mikroveziküller	ARF6, VCAMP3
Apoptotik cisimler	Tsp, C3b

2.1.2.6. Ekzozom Bileşenleri

Ekzozomlar çift lipid tabakalı membran ile çevrili nano veziküllerdir. Çeşitli lipid ve proteinler içerir (Tablo 3). Bir ekzozom database programı olan ExoCarta programına göre 2018 yılı verilerine bakıldığında ekzozom ile ilişkili protein sayısı 9769, lipidlerin sayısının ise 1116 olarak rapor edilmektedir.



Şekil 2. Ekzozom bileşenleri (3)

Transmembran proteinleri ve çeşitli sitoplazmik proteinleri içerirler. Lipid içeriği ise sfingomyelin, fosfatidilserin ve kolesterolce zengindir. Hücre membranından köken alan EV lerle karşılaştırıldığında ekzozomlar daha az fosfatidilserin içerirler. Ekzozomlar köken aldıkları hücrelerle ortak protein ve lipidlere sahip oldukları gibi farklı protein ve lipidlere içerirler (18). Yapılan çalışmalarda ekzozomların köken aldıkları hücrenin, plasma membranında normal olarak bulunan proteinlerden farklı olan çeşitli hücresel proteinleri içerdiği gösterilmiştir. Bunlardan bazıları MHC molekülleri, tetraspaninler, adhezyon proteinleri, metalloproteinazlardır. (21)

Tablo 3. Ekzozom bileşenleri için örnekler (3).

Ekzozom Kompozisyonu	Örnek
Proteinler	Isı-Şok Proteinleri:Hsp70, Hsp90 Membran transport ve füzyon proteinleri: GTPaz, annexins, flotillin Tetraspaninler: CD9, CD63, CD81, CD82 Thrombospondin ALIX TSG101
Lipidler	Sfingomyelin, Fosfotidilkolin,Fosfotidilethanolamin, Fosfotidilserin, GM3, Fosfotidilinizatol
Nükleik Asitler	mRNA,miRNA,Non-coding RNA

2.1.2.7. Literatür Bilgileri ile Günümüzdeki Ekzozom Çalışmaları

Ekzozomların bilinmeyenlerini çözebilmek için, ekzozomların çeşitli biyolojik kaynaklardan izolasyonu ve karakterizasyonu ekzozomları anlamak için oldukça önemlidir(12). Ekzozomların patolojik ve normal koşullarda ki fonksiyonlarını anlamak için birçok çalışma yapılmaktadır.

Atsushi ve arkadaşlarının 2013' de yayınladığı çalışmada ekzozomların yüzey belirteci olan CD63 proteini GFP ile işaretlenerek, ekzozomların hücreler arasındaki hareketleri in vitro ve in vivo olarak takip edilmiştir. Yapılan çalışmada kanserli hücre hattı ve sağlıklı hücreler kullanılmıştır. Kanserli hücrelerden salınan, işaretlenmiş ekzozomların sağlıklı hücrelere transfer olduğu gözlemlenmiştir. Çalışma in vivo olarak meme kanserli fare modellerinde de denenmiş ve sonuçlar kanserli hücrelerden salınan ekzozomların, metastazı ve tümör büyümesini arttırabileceğini göstermiştir. Bu nedenle ekzozomları görüntüleyebilmenin gelecekte kanser hücrelerinin metastaz yapacağı bölgeler hakkında önemli bilgiler vereceği söylenmiştir (22).

Yu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise meme kanseri hücrelerinden kaynaklanan ekzozomların immün yanıtı baskıladığı gösterilmiştir (23).

Yapılan başka bir çalışmada ise ekzozomların teröpatik ilaç taşıyıcılar olarak kullanabileceği gösterilmiş. Bunun için ekzozomun yüzey biyobelirteçlerini karakterize etmek önemlidir. Böylece iletilmesi istenen moleküller ile yüklenen ekzozomlar hedef hücreye yönlendirilebilirler (3).

EV'lerin salgılanması ilginç bir şekilde birçok tür arasında korunmuştur. Bu nedenle bir türden alınan ekstrasellüler vezikül bir diğer türdeki hücrel prosesini regüle edebileceği rapor edilmiştir (13).

Bir başka çalışmada, endometriyumdaki salgılanan ekzozomlarca taşınan hsa-mir-30d' nin pre-implantasyon evresindeki embriyonun transkriptomunu modifiye ederek implantasyon sırasındaki adhezyonu arttırdığı gösterilmiştir (24). Du ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada mezenkimal kök hücrelerden izole edilen ekzozomların, astım hastalarında regülatör T hücrelerinin immüno-supresör özelliklerini artırarak, astım tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir (25).

Peinado ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışmada, metastatik melanoma hastalarının plazmalarından izole edilen ekzozomlarda, melanomaya ait proteinlerin varlığını tespit etmişler. Tespit ettikleri proteinlerden özellikle MET and TYRP2 metastaz ile ilişkili proteinler olduğunu göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada, metastatik melanoma hücre hattından elde edilen ekzozomlar, melanoma hastalık modeli oluşturulmak istenen farelere intravenöz olarak verilmiştir. Ekzozomların bu farelerde melanoma hücrelerinin metastaz yaptığı bölgelere (akciğer ve lenf nodlarına) yerleştiği gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın öncüsü olan çalışmalara da dayanarak şu sonuca varılmıştır; Ekzozomlar bu bölgelerdeki mikro çevreyi değiştirerek, bu bölgelere hücre göçünü arttırmaktadır.(26).

Kim ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada, kanser hücrelerinden izole edilen ekzozomların, kanser hücrelerine istenilen moleküllerin taşınması için en iyi taşıyıcılar olduğunu göstermişlerdir. Bunun nedeni hücre tropizmasıdır. Bu çalışma ile CRISPR/Cas9 sistemini yükledikleri ekzozomlar, ovaryum kanserli farelere verildiğinde tümör hücrelerine ulaşarak PARP-1 genini uzaklaştırıp kanserli hücrelerin apoptoza gitmesini sağlamışlardır. Çalışmacılar bu sonuca dayanarak kanser hücrelerinden izole edilen ekzozomların, gelecekte kanser tedavileri için umut verici olduğunu söylemişlerdir (27) .

Biyobelirteç potansiyeli gösteren ekzozomların, diagnostik amaçla kullanılabildiği gibi terapi içinde kullanabilecekleri bu çalışmalarda gösterilmiştir. Terapi amacıyla kullanılacak ekzozomlar, uygun hücrelerden izole edildikten sonra istenilen kargo ile yüklenerek ve genetik bazı modifikasyonlar yapılarak, hedef hücreye yönlendirilebilmektedir. Bu aşamada ekzozomların hangi mekanizma ile hedef hücreye

alındığı önem kazanmaktadır. Çalışmalar birçok mekanizmanın varlığını göstermişlerdir. Bunlar tetraspaninler, integrinler, immunoglobulinler ya da proteoglikanlar ile tutunma daha sonra hücre içine alınım ile gerçekleşmektedir. Bu da klathrin ve kaveolin bağımlı, makropinositoz, fagositoz, lipid raft bağımlı hücre içine alma gibi mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Fakat bu mekanizmaların hala aydınlatılması gerekmektedir. (12,28)

2.1.2.8. Tanı ve Terapide Ekzozomlar

Ekzozomlar bütün vücut sıvılarında bulunan ve izole edilebilen veziküllerdir. Ekzozomlar taşıdıkları spesifik moleküller (protein, lipid, RNA) sayesinde bir çok hastalığın erken tanısında kullanabilecek potansiyele sahiptirler.

Chen ve arkadaşları akciğer, kolon kanseri ve diyabet hastalarının, serumlarından izole edilen ekzozomların taşıdığı miRNA' ların, sağlıklı bireylerden farklı olduğunu gösteren bir çalışma yaparak bu miRNA ların çeşitli hastalıklar için spesifik olduğunu göstermişlerdir. Mitchell ve arkadaşları ise prostat kanserli hastalardan izole edilen ekzozomlarda miR-141' in ekspresyon seviyesinin arttığını rapor etmişlerdir.

Bunun dışında tükürük ve idrarda farklı ekspresyona sahip ekzozomlarca taşınan miRNA ların hastalıklarla ilişkileri gösterilmiştir. İdrar ekzozom eldesi için oldukça uygun ve tanı için invaziv olmayan bir yöntemdir. İdrardan elde edilen ekzozomların ürogenital hastalıkların markörlerini taşıdığı gösterilmiştir. Bu markörlerden biri prostat kanserinde ekspresyon seviyesi artan PCA3 proteininin mRNA' sıdır.

Tükürük ise invaziv yöntem kullanılmadan elde edilebilecek bir diğer vücut salgısıdır. Tükürükten elde edilen ekzozomların taşıdıkları nükleik asit, protein gibi hastalık biyo-belirteçlerinin, birçoğunun kanda bulunanlarla aynı olduğu gösterilmiştir. Bu da invaziv olmayan tanı yöntemleri geliştirebilmek için oldukça önemlidir.

Son 10 yıldır bir çok şirket ekzozom tabanlı tanı yöntemleri geliştirme çalışmalarını yapmaktadır. Caris Life Sciences, şu anda başta ekzozomlar olmak üzere kan bazlı dolaşımdaki mikroveziküllerin izolasyonu ve analiz edilmesi için yeni yaklaşımlar geliştirmektedir. 2010 yılının sonlarında, "Carisome® Prostate cMV 1.0 test" isimli ekzozom bazlı prostat kanser tanı testini piyasaya sürmüşlerdir (6). Bunun dışında bir çok şirkette ekzozom bazlı tanı yöntemlere geliştirmeye başlamıştır ve sonuçlar oldukça umut vericidir (6).

Terapide de kullanılan ekzozomların, birçok faz 1 çalışması 2000 yılı içinde tamamlanmıştır. Bunlardan ilki Fransada metastatik melanomaya karşı geliştirilen aşı olmuştur. Bu çalışmada dendritik hücrelerden izole edilen ekzozomlarda, fonksiyonel MHC peptit ekspresyonu artırılarak T hücre immün cevabının artırılması hedeflenmiştir. Daha sonra GMP (Good Manufacturing Practice) koşullarında bu ekzozomlar ilaç standartında çoğaltılmaya başlanmıştır (29).

Ekzozomlar tümöre karşı immün yanıt oluşturmak için tümör antijenleri ile yüklenerek de kullanılabilir. Böylece ekzozomlar yeni teröpatik yaklaşım olarak immünoterapide oldukça etkili olacağı düşünülmektedir. Ekzozomlar terapide, hücrelere göre daha kullanışlıdır. Çünkü hücreler gibi yaşatmak ve çoğaltılmak zorunda değildirler. Bir diğer özellikleri, metabolik olarak inaktif oldukları için hücrelerden daha stabildirler. Örneğin bir lenf düğümü içindeki antijen sunumunu, antijen sunan bir hücreden iki kat daha uzun süre yapabilirler. Daha stabil olmaları nedeni ile hücrelere göre uzun süre saklanması daha kolaydır (6).

Son zamanlarda kanser tedavisinde farklı bir yaklaşım kullanılmıştır. Tümörlerden salgılanan ekzozomların immün yanıtı baskıladığı rapor edilmiştir. Bu yaklaşımla Aethlon Medikal, *Hemopurifier* adında dolaşım sisteminden kanser hücrelerinden salgılanan ekzozomları da içeren ekzozomları uzaklaştıracak bir cihaz üretmiştir. Bu yaklaşımın kanser hastalarının bağışıklık sistemini eski haline getirebileceğini düşünmüşlerdir (30).

Bunlar dışında bir diğer yaklaşım, ekzozomlar dağıtım aracı olarak kullanılmasıdır. Bunun için ekzozomlar spesifik nükleik asit, protein, küçük moleküllü ilaçlar ile yüklenmektedir. Ekzozomların siRNA ile yüklenerek fare beyine taşınmasını sağlayan başarılı bir çalışma rapor edilmiştir. Bu çalışmada Alzheimer hastalıklı fare modellerinin beyin dokusuna BACE1 enzimini susturmak için siRNA ekzozom içinde gönderilmiştir. Ekzozomları beyin dokusuna yönlendirebilmek için, bu ekzozomlar genetik olarak modifiye edilip Lamp2b ekspresyon eden Dendritik hücrelerden izole edilmiştir. Lamp2b ekzozomlarda bulunan bir membran proteindir. Lamp2b nöron spesifik RVG peptid 3 ile birleşir. Böylece siRNA spesifik olarak beyin dokusundaki nöron, mikroglia ve oligodendrositlere ekzozomlar ile taşınıp ve BACE1 geni spesifik bir şekilde *knockdown* edilmiştir (31)

Son on yılda birçok terapötik yaklaşımda, ekzozomların kullanılması önerilmiş ve test edilmiştir. Bunlardan bazıları Faz II klinik çalışmalarını bile tamamlamak üzeredir. Belirli zorluklara rağmen çalışmalar hızlı bir şekilde ilerlemekte ve GMP prosedürleri takip edilerek büyük ölçekli üretim aşamasına geçilmektedir. Terapatide ekzozomal yaklaşımın önemli bir yer alacağı düşünülmektedir (6).

2.1.2.9. Günümüzde Ekzozom Varlığının Tespiti İçin Kullanılan Yöntemler

Ekzozom varlığının tespiti için kullanılan yöntemleri özetlersek. Kullanılan tekniklerden biri Western blot tekniğidir. Bu teknik ile ekzozom proteinlerinin varlığını tespit edilerek ekzozomların varlığı için bir çıkarım yapılır. Bir diğer yöntem Flow sitometri yöntemidir. Bu yöntem için ekzozomların yüzey belirteçlerinin floresan moleküller ile işaretlenerek floresan sinyal alınan veziküller saptanır.

Çok sık kullanılan yöntemlerden biri ise Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) sistemidir. İncelenecek örneğe çarpıp yansıyan ışığın verdiği bilgileri toplayan bir sistemdir. Bu şekilde bir solüyon içindeki partiküllerin boyut ve konsantrasyonunu hızlı bir şekilde belirleyebilir. Ucuz bir yöntemdir. Fakat spesifitesi düşüktür. Boyutları aynı olan bir vezikül ile bir protein agregatını birbirinden ayıramaz (32).

Yukarıda anlatılan methodların hepsi indirekt yöntemlerdir. İzole edilen veziküllerin ekzozom olduğunu doğrulamak için birden fazla yöntemi kombine etmek gerekir. Tek bir yöntem yeterli değildir. Doğrulamanın en kesin yollarından biri direk görüntülemektir. Bu da yaygın olarak TEM ile yapılmaktadır. (18)

2.1.2.10. Ekzozomların Görüntülenmesi

Ekzozomlar nano boyutları nedeniyle süper çözünürlüklüler hariç olmak üzere diğer tüm optik mikroskopların çözünürlük değerlerinin altında kaldıkları için, boyut ve morfolojilerini direkt görüntülenmesi TEM ile yapılabilmektedir. Bunun için ekzozomlar bakır gridlere emdirilir, fikse edilir ve uranil asetat ya da uranil asetat ve metil selüloz karışımı ile kontrastlanarak TEM de görüntülenirler. Bu şekilde hazırlanan ekzozomlar TEM' de "cup shaped" denilen fincan şeklinde görüntülenirler fakat artık bu görüntünün fiksatiflerin bir artefakt olduğu bilinmektedir. Çünkü ekzozomların kimyasal fiksatiflerle muamele edilmek zorunda olunmadığı cryo-TEM yöntemi ile görüntülendiklerinde yuvarlak şekilli küreler olduğu görülmüştür.

Ekzozomları çözünürlüğü iyi olan floresan mikroskoplar ile de görüntülemek mümkündür. Örneğin Konfokal mikroskop çözünürlüğü en iyi olan floresan

mikroskoplardan biridir. Konfokal mikroskopların çözünürlüğü 200nm kadardır bu nedenle ekzozomları belki tek tek görüntülemek mümkün değildir fakat daha yoğunken kümeler halinde görüntülemek mümkündür. Bu çözünürlükteki bir mikroskopla tek tek görüntüleyebilmenin tek yolu ise vezikülleri ayrı ayrı düşürebilmektir. Floresan mikroskopi ile ilgili son teknolojik gelişmeler süper çözünürlüklü mikroskopları bilime kazandırmıştır. Bu mikroskopların çözünürlüğü 20nm' ye kadar düşmüştür. Nano vezikülleri bu mikroskoplar ile görüntülemek artık çok kolaydır. Fakat bu mikroskoplar henüz çok yaygın ve ulaşılabilir değildirler (18).

Sonuç olarak TEM, Ekzozomları göstermenin direkt ve kesin yoludur fakat yeterli değildir. TEM ile sadece boyut ve morfolojisine göre tanımladığınız vezikülleri daha spesifik bir işaretleme yapabildiğiniz bir yöntem ile birleştirmek en tartışmasız sonucu verecektir. Bu imkânı iki farklı çalışma prensibine sahip olan mikroskopları kombine eden Korelatif Mikroskopi yöntemi sunmaktadır.

2.2. Korelatif Mikroskopi

Korelatif Mikroskopi terimi biyomedikal literatürde bir biyolojik örneğin aynı bölgesini incelemek için kullanılan birden fazla mikroskopik tekniğin kombinasyonu anlamına gelmektedir. Böylece tek bir hücre ya da kesitten birden fazla bilgi edinmeyi sağlar. Bu kombinasyonlara örnek ışık, elektron mikroskopları, X-ray, Atomik Güç Mikroskobu (ATM) olabilir. Her mikroskop sisteminin avantajları ve dezavantajları vardır. Bir mikroskopun limitleri başka bir mikroskop ile kombine edilerek aşılabilir. Korelatif Mikroskopi de bunu yapmaktadır. Böylece her bir görüntüleme yöntemi, incelenecek örnekten birden fazla veri eldesi sağlayarak tamamlayıcı bir bilgi sunar.

Korelatif ışık ve elektron mikroskopi kısaca CLEM, son zamanlarda kullanılan en yaygın korelatif mikroskopi yöntemidir. Bu kombinasyonun oluşturulması görüntüleme alanında büyük bir adım olmuştur (33). CLEM için ışık mikroskobu olarak genelde floresan mikroskoplar kullanılır. Böylece floresan mikroskopları floresan işaretleme özelliği, Elektron Mikroskobunun yüksek çözünürlüğü ile birleşerek hücre ya da doku içindeki bir olayı aydınlatan ideal bir sistem haline gelir.

Ayrıca Korelatif mikroskopi, sadece bir mikroskop kombinasyonunu kullanarak görüntü alabilmek değildir, bundan daha fazla olarak bir yazılım programının kullanılmasıdır. Bu nedenle, farklı mikroskoplardan ayrı ayrı görüntü alabilmek ve bu

görüntüleri korele edebilmek için, yani her basamakta, yazılım programını çok iyi bilmeyi ve iyi kullanmayı gerektirir (33).

2.2.1. Korelatif Işık ve Elektron Mikroskopisi (CLEM)

CLEM 'i oluşturan Floresan ve Elektron Mikroskopun avantajlarına ve dezavantajları şu şekildedir.

Floresan ışık mikroskobu (FM) ve Elektron Mikroskobu (EM), hücresel yapıyı, fonksiyonu anlayabilmek için sıklıkla kullanılan görüntüleme tekniklerindedir. Bu mikroskopi tekniklerinin farklı güçlü ve zayıf yönleri vardır.

Floresan mikroskop işaretlenen biyo-moleküllerin (proteinler ve nükleik asitler gibi yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip moleküllerin) lokalizasyonunu görüntülememize olanak sağlar. Floresan Mikroskop çeşitli moleküler hedefleri, spektral olarak farklı floresan etiketleri kullanarak çok renkli görüntülemeye izin verir. Böylece birden fazla hedefi aynı anda görüntüleyebiliriz. Son yıllarda, floresan mikroskoplar geliştirilerek süper-çözünürlüklü floresan mikroskoplar kullanılmaya başlanmıştır. Bu mikroskopların çözünürlüğü standart floresan mikroskoplardan çok daha fazladır 50nm nin aşağısındadır (34).

Floresan Mikroskoplar ile canlı ya da fikse olmuş doku ya da hücrelerde görüntüleme yapılabilir. Elektron mikroskop ile karşılaştırıldığında oldukça geniş bir alanda görüntüleme şansı tanır. Üç boyutlu görüntüleme yapılabilir. Floresan ajanlar ile işaretlenen yapının, hücre içi lokalizasyonu ve dinamiği hakkında genel bir bilgi verirken yapı ile ilgili nano boyutta detay veremez. Floresan ile işaretlenen alanda sadece floresanın sinyal görüntülenebilir. Arka plan ise karanlıktır. İşaretlenen alan dışında ki diğer yapıları görüntülemek mümkün değildir.

Transmisyon (TEM) ve Taramalı Elektron mikroskopları (SEM) ise ışık mikroskoplarından çok daha fazla çözünürlüğe sahip mikroskoplardır. Çözünürlük 0,1-3 nm arasında olup oldukça yüksektir. Bu çözünürlük diğer mikroskoplarla karşılaştırıldığında emsalsizdir. Elektron Mikroskopunda floresan işaretleme kısıtlaması olmadan, incelediğimiz örneğin bütününün ultra detaylı yapısını görüntülememiz mümkündür. (33)

Standart EM boyama ve kontrastlama teknikleri ile incelemek örneğin sub-sellüler yapılarına kadar ultra detaylı ve yüksek çözünürlükte görüntü alabiliriz. Bu çözünürlük

hücre ya da organellerin mebranını, lipid çift tabakasına kadar görüntüleyebilmemize olanak sağlar (35)

Fakat EM de spesifik bir molekölü belirlemek floresan mikroskop kadar kolay değildir. Çünkü görüntü siyah beyazdır. Burada incelenen örnek hakkında yorum yapabilmek için çok iyi bir hücre ya da doku bilgisine ve morfolojisine hakim olmak gerekir.

Genellikle tespit edilmek istenen molekölün büyüklüğünden ve morfolojik özelliklerinden yararlanılarak görüntü yorumlanmaya çalışılır. Bu yoruma bağlı sonuçları daha kesinleştirebilmek için kullanılan geleneksel immüno-işaretleme yöntemleri vardır. Bu işaretleme Ferritin ya da altın konjuge antikolar kullanılarak yapılır. Fakat bu işaretleme tekniklerinin verimliliği oldukça düşüktür (36,37). Son zamanlarda EM için Tetracysteine, miniSOG, APEX2 gibi birçok genetik olarak kodlanan etiketler geliştirilmiştir. Fakat hiçbiri EM de çoklu renkli görüntüleme sorununu çözememiştir (35). EM için günler süren, zahmetli örnek hazırlama süreci göz önüne alındığında, sadece bir ya da daha zor olarak 2 hedefi görüntüleyebilmek oldukça dezavantajlıdır.

Korelatif mikroskopi yöntemi ise bu iki görüntüleme tekniğinin avantajlarını birleştirip, dezavantajlarını elimine ederek, araştırmacılara istedikleri yapıyı floresan moleküllerle işaretleyip FM de görüntüledikten sonra yüksek çözünürlüğe sahip olan TEM de işaretledikleri spesifik alanların ultra detaylı yapısını inceleme olanağı sağlar.

Böylece FM de işaretlenen molekölün karanlık arka planı TEM de aydınlatılarak eşsiz ve tamamlayıcı bir bilgi sunar (33,38). Bu şekilde siyah beyaz EM görüntülerinin de yanlış yorumlanma ihtimalini ortadan kaldırır.

Yani Korelatif mikroskopla, bir ya da daha fazla molekölün hücre ya da doku içindeki lokasyonları, floresan işaretleme ile görüntülenirken, bu bilgi EM tarafından ortaya çıkarılan ultra detaylı görüntü ile kombine edilir.

Bu teknik sayılan eşsiz özellikleri yanında uygulanması ile ilgili ciddi zorluklar barındırır. Bu zorluklar; FM de işaretlenen ve görüntülenen alanın TEM de izini sürmek zor ve zaman alıcı bir işlemdir hatta bazen imkânsızdır.

Korelatif Mikroskopi tekniğinin en büyük zorluğu ise, incelenecek örneğin hazırlanma sürecidir. Çünkü FM ile TEM için örnek hazırlama işlemleri birbiri ile uyumlu değildir. Birbirinden çok farklıdır. Günümüzde yapılmakta olan çalışmalarda da

Korelatif Mikroskopide görüntüleme için protokol geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Standart bir metot bulunmamaktadır. Görüntülenecek örneğin çeşidine göre protokolün optimize edilmesi gerekmektedir. Bu aşamada birçok sorunun cevaplanması gerekir. Örneğin çalışılacak materyal doku mu, hücre mi ya da bir süspansiyon mu ? Kullanılacak floresan ajan dışarıdan mı verilecek yoksa hücre kendimi ekspresse ediyor? Plastik rezine gömülecekse floresan işaretleme gömme öncesini yoksa sonrasında mı yapılacak? Örneğinize uygun gömme materyali hangisi? Hangi kombinasyonla çalışacaksınız Işık mikroskobu ile SEM mi yoksa TEM mi? Bu ve bunu gibi sayısı çok daha fazla arttırılabilecek soruların cevaplarına göre bir prosedür belirlemek gerekir. Değişken sayısı çok fazla olduğu için standart optimize edilmiş bir prosedür belirlemek zaman alıcıdır.

2.2.2. Korelatif Mikroskopik Görüntüleme için Günümüze Kadar Kullanılan Yöntemler

Korelatif mikroskopide iyi görüntü alabilmek için günümüze kadar pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan başlıcaları aşağıda yer almaktadır (39)

Kullanılan yöntemlerden biri **Kuantum Nano Parçacık** yöntemidir. Bunlar kristalize nano büyüklükte parçacıklardır. Floresan özelliğinde ve elektron yoğun parçacıklardır. Bu nedenle hem FM de hem de EM de görüntülenebilirler. Bununla birlikte stabilitesinin düşük olması, görüntüleme sırasında yanıp sönmeleri ve düşük elektron yoğunluğa sahip olması gibi korelatif mikroskopta kullanılmasını sınırlayan olumsuz özelliklere sahiptir (33).

Bir diğer yöntem ise 10nm çapında kolloidal altın parçalarının ve floresan ile kombine edildiği yöntemdir. Yani sekonder antikör olarak elektrondan yoğun olan altın parçaları ve floresan konjuge antikörler ayrı ayrı uygulanır. Bu yöntemin olumsuz bir özelliği ise bu boyuttaki bir altın parçasının floresan molekülün parlamasını azaltmasıdır (40).

Diğer kullanılan yöntem "**fluoronanogold**" denen hem floresan molekülün hem de 1,4 nm'lik nano boyutta altın parçasının bir antikorda birleştirildiği, direk ince kesit üzerinde işaretleme yapıp aynı kesit üzerinden hem FM ta hem de EM de görüntü almayı sağlayan yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemin kullanımını sınırlayan özelliği ise cryo kesitlerde daha iyi sonuç vermesidir. Yani bu yöntemi verimli bir şekilde kullanabilmek için cryo bir EM ile çalışmak daha doğru sonuç verecektir (41). Çünkü

Cryo-TEM fiksasyon, dehidrasyon, gömme gibi basamakları gerektirmediğinden antijenite kaybı ve kimyasal kaynaklı artefakt oluşumuna neden olmaz (2). Fakat yüksek maliyeti nedeniyle her merkezde bulmak kolay değildir. Bu nedenle pahalı bir yöntemdir.

Bir başka yöntem ise 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB) in kullanıldığı yöntemdir. Bu yöntem foton değişim (photoconversion) yöntemi olarak da adlandırılır. Floresan molekül ile işaretlenen bölge DAP sayesinde elektron yoğun bölge haline getirilip EM de görünür hale getirilir. Fakat birçok floresan prob olmasına rağmen bunlardan çok azı DAB ile uyumlu olarak EM de gösterilebilir. Bu yöntem kimyasal olarak fikse edilmiş hücre ve dokular üzerinde kullanılır cryo kesitler için uygun değildir (42,43).

Gelişen teknoloji ile birlikte korelatif mikroskopi yöntemleri de oldukça gelişmiştir. EM için özel bir işaretleme yapmadan ve aynı örnek üzerinde FM de görüntülediğiniz alan, yazılım programları sayesinde kayıt edilerek elektron mikroskopik görüntü üzerine taşınabilmektedir.

2.2.3. Korelatif Mikroskopi için Örnek Hazırlanmasındaki Önemli Basamaklar

Daha önce belirtildiği gibi, korelatif mikroskopi için standart bir yöntem bulunmamaktadır. Görüntülemek istediğiniz biyolojik örneğin özelliğine göre yöntemin geliştirilmesi gerekir. Bunun için örnek hazırlamanın her basamağı floresan ve elektron mikroskopunda görüntü alabilmek için dengelenmelidir. Klasik EM örnek hazırlama aşamaları fiksasyon, ağır metaller ile kontrastlama, plastik materyale gömme ve kesit alma işlemlerini içerir (44).

2.2.3.1. Fiksatif Seçimi

İlk basamak uygun bir fiksatif seçimidir. Fiksatifler hücresel yapılar ile çapraz bağlantılar yaparak dehidrasyon ve gömme işlemleri sırasında hücresel yapının korunmasını sağlamaktadır. Aldehit bazlı fiksatiflerden özellikle Gluteraldehit proteinler ile oldukça sıkı çapraz bağlar oluşturup hücresel yapıyı iyi bir şekilde koruduğu için elektron mikroskopik yöntemlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Lipidlerin fiksasyonunda ise metalik oksitler kullanılmaktadır. Bunlardan en sık kullanılan, membran yapısındaki doymamış yağ asitleri ile çapraz bağlar yapan osmium tetraoksittir. Ayrıca osmiyum tetraoksit elektronların saçılmasını sağlayarak membrandaki kontrastlığı arttıran bir

reaktif olarak rol oynar. Fakat bu fiksatifler ultrastrüktürel yapıyı korumasının yanında floresan mikroskop için kullanılmak istendiğinde bazı dezavantajlara sahiptir. Gluteraldehit dokularda otofloresansı indüklemektedir. Osmiyum tetraoksit ise çok güçlü bir oksidatifdir, proteinlerin peptid bağlarını kırabilir. Bu nedenle eğer GFP (*Green Fluorescent Protein*) gibi floresan ışığa yapabilen bir protein kullanıyorsanız, GFP nin peptid bağlarını kırarak floresan sinyali soldurabilmektedir. Floresan mikroskopta fiksatiflerin yan etkilerini azaltabilmek için bir çok koşul denenmektedir. Farklı fiksatif karışımları farklı konsantrasyonlarda kullanılarak hem morfoloji hem de floresan sinyal korunmaya çalışılmıştır.

Yapılan çalışmalarda, Aldehit grubu içeren fiksatiflerin oluşturduğu otofloresan sinyal %1 sodyum tetrahidroborat (Sodyum borhidrür, NaBH_4) kullanılarak engellenebilir. Fakat bu fiksatifler membran fiksasyonunda başarılı değildir. Bu nedenle osmiyum tetraoksit kullanmak gereklidir. %0,1'lik düşük konsantrasyonu bile membran yapısını çok iyi şekilde korumaktadır. Fakat bu konsantrasyon bile floresan sinyalin %10 un altına düşmesine neden olmuştur. Bunu engellemek için osmiyum miktarı %0,1 in altına düşürüldüğünde ise doku morfolojisine önemli bir bozulma gözlenmiştir.

Potasyum permanganat ise lipidler için alternatif bir fiksatifdir. Potasyum permanganatta aynı zamanda bir oksidatif ajan olmasına rağmen, membran fiksasyonu için %0,1 osmium kullanımından 30 kat daha fazla floresan sinyal alınmasını sağlamıştır. Nöron fiksasyonunda kullanılan %0,001 osmiyum ve %0,1 potasyum permanganat karışımı nöronlarda oldukça iyi sonuç vermiştir. Fakat farklı dokularda yeni kombinasyonlar ve konsantrasyonlar denemeye ihtiyaç vardır (45).

Ayrıca dehidrasyon basamağında da floresan sinyal kaybı yaşanmaktadır. Fiksatiflerin ve dehidrasyonun sebep olduğu negatif etkiyi elimine etmenin bir yoluda, kimyasal fiksatiflerin ve dehidrasyon basamağının kullanılmadığı, cryo- fiksasyon ve cryo- Elektron mikroskopi yönteminin kullanılmasıdır (44). Bu yöntem Tokuyasu tarafından 1973 yılında tanımlanmıştır. Doku ya da hücreler sükröz solüsyonu içinde süspanse edilir. Daha sonra dondurulur, donmuş bloklardan cryo-ultramikrotom ile kesitler alınarak Floresan ve EM için immuno işaretlemeler yapılır (46).

2.2.3.2. Gömme Materyalinin Seçimi ve Optimizasyonu

Bir sonraki basamak ise, eğer incelemek istediğiniz örnek bir solüsyon değil de hücre ya da doku ise gömme materyaline gömülüp kesit alınması gerekmektedir. Bu durumda uygun gömme materyalini seçmeniz gerekmektedir. Ultra ince kesitler için plastik resinler kullanılmaktadır. Kullandığınız resinin özellikleri floresan görüntüleme için önemlidir. Klasik kullanılan araldit ve epon gömme ortamları floresan konjuge antikolar ile işaretleme yapmak için uygun değildir. Proteinlerin antijenite özelliklerini maskeleyerek antikoların bağlanmasını engellerler. Bunun dışında eğer incelenecek örnek genetik olarak floresan özellikte bir protein kodluyorsa, bu gömme ortamları 60°C gibi yüksek ısılarda polimerize olduklarından bu proteinleri denatüre edebilmektedir. Bunun sonucunda da floresan sinyal kaybolmaktadır. Bu nedenle korelatif mikroskopi için Lowicryl K4M, LR Gold, LR White ve GMA (Glikol metakrilat) gibi, düşük ısıda polimerize olan ve proteinlerin antijenitesini maskeleyemeyen gömme ortamları tercih edilmektedir. İncelenecek örneğin özelliklerine göre gömme protokolü de optimize edilmelidir (45).

K4M, en hidrofilik rezindir. Ağırlıkça %10 ' a kadar suyu tolere edebildiği rapor edilmiştir. Fakat yapılan çalışmalarda dokuda %5 ten fazla su kaldığı durumlarda polimerizasyonda sorunlar yaşandığı görülmüştür.

LR Gold ve LR White, kimyasal formül olarak çok benzerler fakat polimerizasyonlarında çok küçük farklılıklar vardır. LR Gold çok hızlı polimerize olur fakat dokuya penetrasyonu çok azdır. LR White in ise, PH sı çoğu floresan protein için çok asidiktir. Fakat etanolamin ile PH in nötralize edilmesi sonucu floresan sinyal ve morfoloji korunabilmektedir. Bu da LR White ı floresan ve EM için iyi bir gömme materyali yapmaktadır.

GMA ise, %3 su ile PH 8 de polimerize olabilmektedir. Böylece floresan ajanların gerektirdiği hidrasyon ve alkali ihtiyaçlarını karşılamaktadır. GMA' ya gömülen örneklerdeki floresan sinyalin LR White ta gömülenlerden biraz daha fazla parlak olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte GMA' ya gömülen hayvan dokularından alınan, ultra-ince kesitlere su uygulanmasının floresan sinyali %30 arttırdığı gösterilmiştir. Bu floresan geri kazanımı, floresan proteinlerinin büyük kısmının dehidrate dönemde floresan özelliğini yansıtmadan korunduğunu göstermektedir. Geri kazanımla birlikte ise fiksasyondan önce gözlemlenen floresanın yaklaşık %70'inin

korunabileceğini göstermektedir. Fakat GMA ile 70nm altında ultra-ince kesit almak oldukça zordur. Doku ile Epoksi kadar güçlü çapraz bağlantılar yapmadığı için, doku genellikle rezinden dökülebilir. Ancak, düşük hızda voltaj kullanarak ve SEM ile geri saçılmış (*back-scattered*) elektronları toplayarak daha kalın bölümlerde bile ultra-altyapı çözümlenebilir (45)



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Deneysel nitelikte bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma için Mart 2017 de literatür taramalarına ve proje yazımına başlanmıştır. Daha sonra etik kurula başvurulmuştur. Projenin girişimsel olmayan araştırmalar etik kuruluna başvuru sonucunda, etik kurulun 15.06.2017 tarih ve 3392-GOA protokol numaralı 2017/16-22 karar numarası ile etik kurul izni alınmıştır. Daha sonra Temmuz 2017 de BAP birimine başvuru yapılmıştır. BAP biriminden alınan destek ile gerçekleştirilmiştir. Aralık 2017 de deneysel çalışmaları yapılan çalışma Eylül 2018 de tamamlanmıştır. Araştırmanın deneysel ayağı İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü'nü de gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

3.4. Çalışma Materyali

HeLa Hücre hattında çalışılmıştır. Hücreler Prof.Dr.Esra Erdal' ın hediyesidir. Aralık 2017 tarihinde alınmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmada değişken kullanılmamaktadır.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Zeiss Shuttle & Find yazılımı, Zeiss Sigma 500 Elektron Mikroskop , Zeiss LSM 880-Confocal Laser Scanning Airyscan Mikroskop, Beckman Coulter Optima L-100XP Ultra-santrifüj, Sigma ve Beckman santrifüjler, Mini santrifüj, Steril C2 kabinet, CO₂ inkübatör, Nano Zetasizer cihazı, Quorum Q150R SEM/TEM Kaplama cihazı, Vakum cihazı, Çeker ocak, Isıtmalı çalkalayıcı, Rotator, Vorteks, Hassas Terazi, Ultrapure su cihazı, Su banyosu, Mikropipet setleri.

3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

3.6.2.1. HeLa Hücre Kültürü

HeLa hücreleri %1 L-glutamin, %10 fetal bovine serum, 100 units/ml penisilin, 100 µg/ml streptomycin içeren RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) içinde %5 CO₂ ve 37°C ortam koşullarında kültüre edildiler. Hücreler 3 günde bir pasajlandılar (3).

3.6.2.2. Hücre Dondurma ve Çözme

Dondurulmuş ve -80°C veya -196°C'da saklanmış stok hücre hattı alınarak 37°C'deki su banyosunda 1-2 dk kadar biraz çözülmesine izin verildi. Daha sonra çözünen stok hücre vialinden zaman kaybetmeden, pipetleme işlemi ile alınarak RPMI ile yıkandı. Bunun için 200 Xg hızında 5 dk oda sıcaklığında santrifüj edilir. Bu işlem 2 kere yapıldı. Yıkama sonunda hücreler uygun besiyerinde, hücre kültürü kaplarında CO₂ inkübatör içinde kültüre edildi.

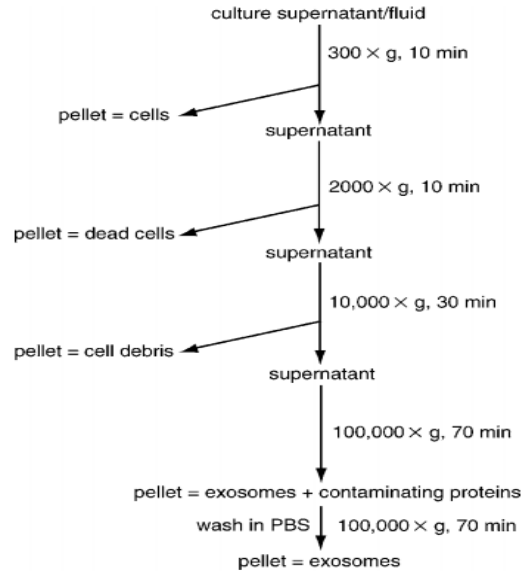
Dondurmak için ise genellikle bir vial içine 3 x 10⁶ hücre /ml de olacak şekilde hücreler dondurma besiyerinin içine bırakıldı. Dondurmak için kullanılan besiyeri ise genelde %5 DMSO %95 FBS içerir. Bu işlem buz üzerinde yapıldı. Hücreler aşamalı bir şekilde donduruldu. Bunun için vialler önce -20C⁰ daha sonra -80C⁰ alındıktan sonra sıvı azot tanklarına yerleştirildi. Bu şekilde hücreler yıllarca saklanabilir (47).

3.6.2.3. Ekzozom İzolasyonu

Ekzozom eldesi için HeLa hücreleri 75cm² lik flasklarda ortamının yaklaşık %70-%80 ini kaplayana kadar pasajlandı. Bu orana ulaştıklarında FBS içeren besiyeri uzaklaştırıldı ve fosfatlı ve tuz içeren tampon çözelti (PBS) ile 3 defa yıkandı. Daha sonra yerine FBS içermeyen besiyeri konularak hücreler 24 saat CO₂ inkübatörde ekzozom üretmeleri ve besiyerine salgılamaları için bırakıldı. FBS içermeyen besiyeri kullanılmasının sebebi FBS' de bir serum olduğu için kendi ekzozomlarını içeriyor olmasıdır. Bu şekilde dışarıdan başka ekzozom kontaminasyonu engellenmiş olur. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda besiyeri ortamı alındı. Daha sonra ekzozom izolasyonu için santrifüj işlemleri başlatıldı (48).

3.6.2.3.1. Ultrasantrifüj ile İzolasyon

Ultrasantrifüj ile ekzozomlar büyüklüklerine göre diğer moleküllerden ayrılırlar. Ekzozomlar ultrasantrifüj ile aşamalı olarak farklı hızlar kullanılarak çöktürülürler.



Şekil 3. Ekzozom İzolasyonu için Farklı Hızlardaki Santrifüj Basamakları (48).

- 1- 24 saatlik HeLa hücre kültüründen elde edilen besiyeri ortamı 50ml lik santrifüj tüpüne alındı ve 300×g de +4⁰C de 10 dk santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Burada pelet hücrelerdir ve bu şekilde besiyerine karışan hücreler bu basamakta elimine edildiler.
- 2- Supernatant ise yeni bir tüpe alınarak 2000xg +4⁰C te 10dk santrifüj edilir. Burada pelet hücre debrsidir ve bu şekilde elimine edilirler.
- 3- Supernatant 0,2 µm lik filtreden geçirelerek 200nm den büyük partiküller uzaklaştırıldı.
- 4- Daha sonra bu supernatant ultrasantrifüj tüpüne alınır (Beckman Coulter, 355631). Tüpün 4/3 ü dolu olmak zorundadır. Eğer dolu değilse PBS ile boş kısım tamamlanmalıdır.
- 5- Tüp ultrasantrifüj cihazına yerleştirilir. SW32Ti rotoru kullanılarak 10.000xg de +4⁰C 70dk. santrifüj edilir. Santrifüj sonunda elde edilen pelet ekzozomlardır. Supernatant uzaklaştırıldı.
- 6- Ekzozom peleti PBS ile resuspense edilir. Santrifüj tüpü PBS ile doldurularak 10.000xg de +4⁰C 70dk ultrasantrifüj ile yıkama yapıldı.
- 7- Ekzozom peletinin dağılmaması için supernatant çok hızlı bir şekilde uzaklaştırılır. Bundan sonra pelet az hacimde PBS ile resuspense edilerek çözülür ve küçük hacimlere (50µl-100 µl) bölünerek -80⁰C de 1 yıla kadar saklanabilir. Fakat tekrarlanan çözme ve dondurma işlemlerinden kaçınılmalıdır.

8- Ekzozomun içinde çözüldüğü tampon solüsyon sonraki işleminize uygun olmalıdır. Protein, RNA izolasyonu yapılacaksa lizis solüsyonunda, elektron mikroskobu ya da Flow sitometri için kullanılacaksa PBS içinde saklanmalıdır (48,49)

3.6.2.3.2. Ekzozomların Kit ile İzolasyonu

Ekzozomların hücre kültürü ortamından izolasyonu için Hücre Kültüründen Total Exosome İzolasyon kiti kullanıldı (cat no:4478359, invitrogen). Aşağıdaki kit prosedürünü takip ederek Ekzozomlar izole edildi.

- 1- HeLa hücrelerinin kültür ortamı santrifüj tüpüne alındı.
- 2- 2000 xg de 30 dk hücreleri ve hücre debrisini uzaklaştırmak için santrifüj edildi.
- 3- Supernatant yeni bir tüpe alındı.
- 4- Supernatant hacminin ½ si kadar invitrogen reaktif solüsyonu tüpe eklendi.
- 5- Solüsyon pipetlenerek ya da vortekslenerek homojen bir şekilde karıştırıldı.
- 6- 2°C – 4°C arasındaki ısıda inkübe edildi.
- 7- İnkübasyondan sonra 10.000 xg de 1 saat 2°C – 4°C derece arasında santrifüjlendi.
- 8- Supernatant uzaklaştırıldı. Ekzozomları içeren pelet PBS ile uygun hacimde çözülür. Ekzozomlar artık yapmak istediğiniz çalışma için hazırdır.
- 9- 2°C – 8°C derecede 1 haftaya kadar 20°C nin üstünde 1 yıla kadar saklanabilir.

3.6.2.4. Ekzozomların TEM'de Görüntülenmesi

- 1- İzole edilen ekzozom örneğinden 5µl parafilm üzerine damlatılır. Forseps yardımıyla, formvar kaplı bakır grid parlak kısmından ekzozom damlası üzerine bırakılır. 60 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 2- Yıkama : Grid üzerine absorbe olan ekzozomlar, grid ile birlikte parafilm üzerine damlatılan 30µl lik 3 damla PBS de, her bir damlada 2dk bekletilecek şekilde yıkandı.
- 3- Fiksasyon : parafilme bir damla %2 lik paraformaldehit damlatılır. Üzerine ekzozom absorbe edilen grid, parlak yüzünden bu damla üzerine bırakılarak 10 dk inkübe edildi.
- 4- Yıkama : parafilm üzerine 30µl lik 3 damla PBS damlatılarak. Grid her bir damlada 2 dk bekletilerek yıkandı.
- 5- Kontrastlama : parafilme %2 lik ürenil asetat damlatılır. Grid damlanın üzerine bırakılır ve 15dk inkübe edildi.
- 6- Grid 5dk kurutulur. Artık elektron mikroskobik inceleme için hazırdır. Görüntüleme yapılabilir ya da grid kutusuna konularak görüntülenene kadar saklanabilir. (49)

3.6.2.5. Nano-zetasizer ile Dinamik Işık Saçılımının Ölçülmesi (DLS)

Bu yöntem ile solüsyon içindeki parçacıkların/ekzozomların yaptıkları ışık saçılımı ölçülerek tahmini boyutları belirlenir. Bunun için ZetaSizer 3000-HA (Malvern) cihazı kullanılmıştır. İzolasyon sonrası elde edilen ekzozom örneğinden 4µl, 2µl, 1µl ve 0,5µl alınarak PBS ile seyreltilerek 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000 seyreltme oranlarında her seyreltme oranı için ölçüm alınmıştır. Ölçüm için aşağıdaki standart değerler kullanılmıştır. (50).

(Ekzozom Kırılma indisi = 1.331, viskozite = 1 , sıcaklık = 25°C)

3.6.2.6. Korelatif Mikroskopi Kullanımı

CLEM için her zaman önce Floresan Mikroskopik görüntü alınır daha sonra EM görüntüsü alınır. Bunun nedeni EM için kontrastlama yapılırken kullanılan ağır metallerin ve görüntüleme sırasında elektronların floresan sinyali yok etmesidir. Yani EM de görüntülenen örneğin FM de görüntüleme şansı yoktur. Bu nedenle her zaman önce Floresan mikroskopik görüntü alınır (51).

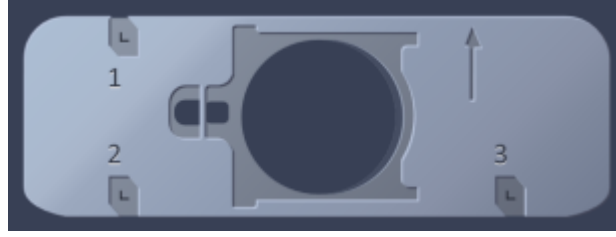
TEM de ekzozomları görüntüleyebilmek için, formvar kaplı bakır gridler kullanılırken, SEM için cam lamlar kullanılır. Örneklerin üstünde olduğu bu gridler ve cam lamlar görüntülenen alanın koordinasyonlarının takibi için iki mikroskop arasında özel tutucular ile taşınır. SEM ve TEM için ayrı tutucular bulunur.

Bu çalışmada bizim kullandığımız korelatif mikroskopi sistemi Shuttle & Find-Zeiss Sigma 500 Electron Microscopy ile Zeiss LSM 880-Confocal Laser Scanning Microscopy with Airyscan kombinasyonundan oluşmaktadır.

Bu sistemde iki mikroskop arasındaki örnek transferini sağlayan tutucular sayesinde aynı örnek üzerinde iki farklı mikroskopta görüntü alınabiliyor. Ancak burada önemli olan, iki mikroskop için de uygun olan örnek hazırlama prosedürünün oluşturulabilmesidir.

3.6.2.6.1. Korelatif Mikroskop Tutucuları

Bu çalışmada örnek transferi için 2 farklı tutucu kullanılacaktır. Bu tutucular SEM ve TEM tutucularıdır. Örnekler hazırlandıktan sonra özel dizayn edilmiş korelatif tutucularına kilitlenirler. Gridler TEM tutucusuna, cam lamlar ise SEM tutucusuna yerleştirilir. Bu tutucular 3 tane 'L' kalibrasyon markörü taşır (51).



Şekil 4. SEM Tutucusu (Life Science cover glass 22x22, ZEISS)

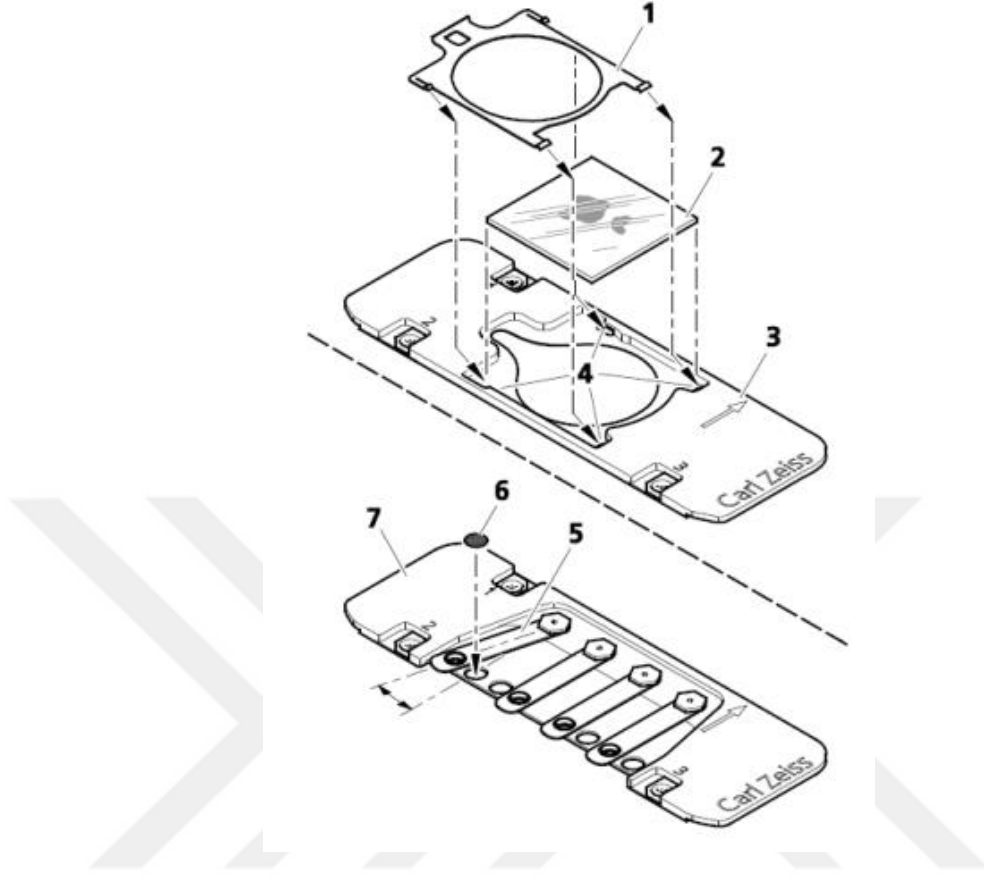


Şekil 5. TEM Tutucusu (Life Science for TEM Grids, ZEISS)

3.6.2.6.2. Korelatif Mikroskop Tutucularının Kalibrasyonu

Kalibrasyon ZEISS ZEN Blue programının kalibrasyon sekmesi kullanılarak yapılır. Tutucuların üzerinde 3 tane " L " markör bulunur. Bu markörler görüntüleme yapılacak mikroskoplara görüntülemeden önce tanıtılır. Böylece markörlerin koordinasyonları kaydedilir. Markörlerin bulunduğu koordinasyonlar sayesinde tutucuya kilitlenen örnek üzerinde görüntülenen alanın koordinasyonları, alınan görüntü ile birlikte kaydedilir. Görüntüler czi (carl zeiss image) formantında kaydedilerek 2 mikroskop arasında kullanılabilir (51).

3.6.2.6.3. Korelatif Mikroskop Tutucularına Örnek Yerleştirilmesi



Şekil 6. SEM ve TEM tutucularına örnek yerleştirilmesi

SEM tutucusu için;

- 1- Forceps yardımı ile klit çerçevesi çıkarılır
- 2- Örneği içeren cam (Life Science Cover Glass 22x22)
- 3- Tutucuya yerleştirilir
- 4- klit çerçevesi cam üzerine konularak click sesi duyulana kadar kaydırılır

TEM tutucusu için;

- 1- Tutucunun klidi açılır. Bunun için gridi koymak istediğiniz yer seçilir ve kilidin yayı yana doğru kaldırılır.
- 2- Grid yerleştirilir.
- 3- Yay grid üzerine kapatılarak tutucuya sabitlenir (51).

3.6.2.7. Ekzozomların Konfokal – TEM Korelasyonu için Hazırlanması

İzole edilen ekzozomlar önce konfokal sonra TEM için hazırlanırlar. Hazırlama aşamaları şu şekildedir.

- Fiksasyon
 - Absorbsiyon
 - Yıkama
 - Bloklama
 - Primer antikor
 - Yıkama
 - Sekonder antikor
 - Konfokal ile görüntüleme
 - Yıkama
 - Kontrastlama
 - TEM görüntüleme
- 1- Öncelikle kullanılacak bütün solüsyonlar 0,2 µm lik filtreden geçirildi.
 - 2- Fiksasyon için, izole edilen ve PBS içinde bulunan ekzozomlar -80°C den çıkarıldı. Buz üzerinde erimesi beklenir. Daha sonra ekzozomları içeren solusyondan 5µl alınıp 5µl %4 lik PFA (Paraformaldehit) ile bir tüp içinde karıştırılarak son konsantrasyonu %2 PFA olacak şekilde fikse edildi. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
 - 3- Nemli bir ortam hazırlanır ve tüm işlem bu ortamda gerçekleştirilir. Bunun için bir petri içine distile su ile ıslatılmış kurutma kağıtları konuldu.
 - 4- Bu 10 µl'lik ekzozom + fiksatif solüsyonu parafilme damlatıldı. Forseps yardımı ile formvar kaplı 100 mesh'lik bakır kaplı grid parlak kısmından damlanın üzerine konuldu. Ekzozomların gride absorpsiyonu için oda sıcaklığında 60 dk inkübe edildi.
 - 5- Parafilme yanyana 3 tane 30µl damla damlatılarak grid bu damlardan geçirildi. Her bir damla üstünde 2 dk bekletilerek yıkama yapıldı.
 - 6- Bloklama işlemi %0,1'lik BSA ile yapılır. 10µl %0,1'lik BSA dan parafilme damlatıldı. Grid üzerinde 10dk inkübe edildi.
 - 7- Bu sırada antikorlar için seyreltme işlemi yapıldı. Primer antikor olarak kullanılacak anti-CD63 antikor (ab59479,abcam) 1/10 oranında %0,1'lik BSA ile seyreltildi.

- Sekonder antikor olarak kullanılacak goat anti-mouse Alexa Fluor 488 için 1/20 seyreltme %0,1'lik BSA ile yapılır ve alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korundu.
- 8- İnkübasyon zamanının bitmesi ile seyreltilen anti-CD63 antikorundan parafilm 10µl konuldu. Üzerine grid koyularak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
 - 9- İnkübasyondan sonra parafilm 6 damla %0,1'lik BSA dan damlatıldı. Grid her bir damlanın üzerinde 2dk bekletilecek şekilde yıkandı.
 - 10- Seyreltilen sekonder antikordan 10µl parafilm konuldu. Grid bu damlanın üzerine konularak oda sıcaklığında t karanlıkta 1 saat inkübe edildi.
 - 11- İnkübasyon sonrası yıkama basamağı tekrar edilir. Parafilm 6 damla %0,1'lik BSA dan damlatıldı. Grid her bir damlanın üzerinde 2dk bekletilecek şekilde yıkandı.
 - 12- İsteğe bağlı olarak postfiksasyon yapılabilir. Bunun için %2'lik Gluteraldehit ile grid 5 dk inkübe edildi (49,52)(53).

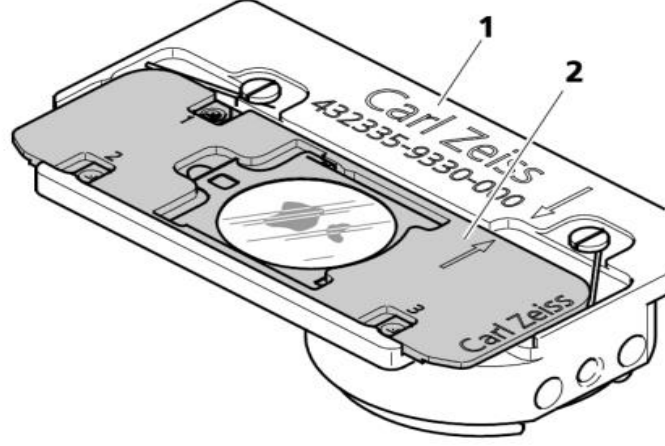
3.6.2.7.1. Konfokal Mikroskopta Ekzozomların Görüntülenmesi

- 1- Tüm bu işlemlerden sonra, konfokal görüntüleme için hazır olan grid, forceps yardımı ile TEM tutucusuna yerleştirildi (Şekil 6).
- 2- Konfokal görüntüleme sırasında örneğin kurumaması gerekmektedir. Bu nedenle grid üzerine bir damla PBS damlatılabilir.
- 3- Tutucu konfokal adaptörüne yerleştirildi. Konfokal görüntüsü alınmadan öncelikle tutucu için kalibrasyon yapıldı. Örnek 40x büyütmede sulu objektif ile görüntülendi. Kullanılan sekonder antikor (alexa flour 488) için uygun olan FITCH kanalında görüntüleme yapıldı. Görüntüler geçirimli ışık dedektörü olan T-PMT (Transmitted Light Detector) ile ve T-PMT' siz olarak alındı.
- 4- Görüntülenen alanların koordinasyonları czi formatında, görüntünün üzerine Zen Blue programı ile kayıt edildi.
- 5- TEM için kontrastlama işlemi yapılır. Bunun için grid TEM tutucusundan hiç çıkarılmadan, üzerine %2 lik uranil asetat damlatıldı ve 15 dk beklendi. Eğer fazla uranil asetat kaldıysa kurutma kağıdı ile gridin ortasına dokunulmadan, gridin kenarına dikkatlice temas edilerek fazlalık alındı.
- 6- Grid 5 dk kurutulur ve TEM ile görüntüleme için TEM adaptörüne yerleştirildi. (Şekil 6)

3.6.2.7.2. Ekzozomların Konfokal-SEM korelasyonu için hazırlanması

- 1- Öncelikle kullanılacak bütün solüsyonlar 0,2 µm lik filtreden geçirildi.
- 2- Ekzozomlar -80°C den çıkarıldı. Buz üzerinde çözünmesi beklendi.
- 3- Çözündükten sonra, son konsantrasyonu %2 PFA olacak şekilde ile bir tüp içinde fikse edildiler.
- 4- Bu sırada SEM için kullanılacak camların (22x22cm) Lizin ile kaplanması gerekir. Bunun için %0,01 poly L-Lysine solüsyonunda camlar 15dk bekletildi. Daha sonra camlar kurutuldu.
- 5- Camların üzerine pap pen ile bir daire çizildi. Ekzozom örneğinden 10µl bu dairenin içine bırakıldı. Petri ile oluşturduğumuz nemli ortamda 20dk ekzozomların lizini cama tutunması için bekletildi.
- 6- Cama tutulan ekzozomlar 150ul %2 PFA damlatılarak ve 20dk daha fikse edildi.
- 7- Süre bitiminde 150 µl PBS ile 3 kere yıkandı.
- 8- 150 µl %0,1 lik BSA koyularak 30dk bloklama yapıldı.
- 9- Bloklama sonrası primer antikor olan anti-CD63 ile 30dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 10- İnkübasyon sonunda 150 µl PBS ile 3 kere yıkandı.
- 11- Sekonder antikor olan Alexa flour 488 ile 30dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 12- Süre bitiminde 150 µl PBS ile 3 kere yıkandı (54).
- 13- Konfokal görüntüye hazır olan ekzozom örnekleri SEM tutucusuna forceps yardımı ile örnek yukarı bakacak şekilde yerleştirildi. Yerleştirildikten sonra klipsler kitlendi.
- 14- Görüntüleme sırasında örneğin üzerine sürekli PBS damlatılarak örneğin kurumaması sağlandı.
- 15- SEM tutucu L-markörleri için 5x büyütmede kalibrasyon yapılır. Böylece koordinatlar tanıtıldı.
- 16- 63x büyütmede yağlı objektifte Zeiss LSM 880-Konfokal mikroskop ile görüntüler alındı. Görüntüler alınırken, Zen-Blue programı ile görüntülerin koordinasyonları kaydedildi.
- 17- Konfokal görüntüleri alınan örnek SEM tutucusundan çıkarılmadan havada kurutuldu. Daha sonra tutucunun örnek dışında kalan kısımları parafilm ile kapatılarak örnek altın ile kaplandı.

- 18- Bu işlemden sonra SEM görüntülemesi için tutucu elektron mikroskobunun adaptörüne yerleştirildi. (şekil 6)

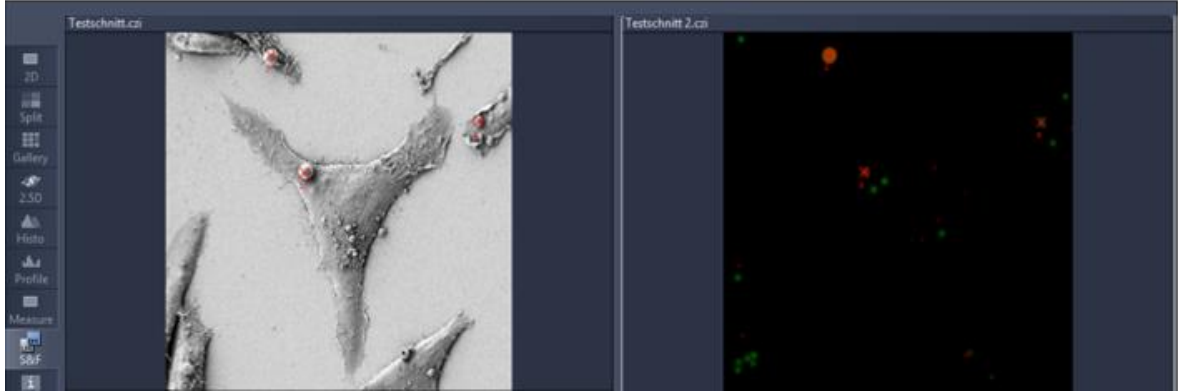


Şekil 7. SEM ve TEM tutucu için elektron mikroskop adaptörü. 1 ile gösterilen adaptör, 2 ile gösterilen tutucudur.

3.6.2.7.3. İki farklı mikroskoptan alınan görüntülerin korelasyonu

- 1- Korelasyon işlemi elektron mikroskop görüntüyü aldıktan sonra ZEN 2 SEM programının shuttle&find menüsü ile yapılmaktadır.
- 2- Konfokal görüntü alındıktan sonra tutucu, elektron mikroskonuna yerleştirilir. Tutucu kalibrasyonu, elektron mikroskop içinde bir kez daha yapılarak L-markörler tanıtıldı.
- 3- Konfokalden czi. formatında ZEN 2 SEM programına taşınan görüntüler shuttle&find penceresinde açıldı. Bu pencerede konfokalden alınan fotoğraf sağda elektron mikroskobik görüntü ise sol taraftadır.
- 4- Sağdaki konfokal fotoğrafından iyi sinyal aldığınız ya da ilgilendiğiniz alana çift tıklayarak, elektron mikroskobik görüntü üzerinde tıkladığınız alana ilerebilirsiniz. Program ilgilendiğiniz alanın koordinatlarını kaba bir şekilde bulur. Birebir detaylı örtüşmeyi sağlamak için, iki mikroskoptan gelen görüntüler ayrıntıları görebilmek için büyütülerek, 3 korelasyon noktası seçilmesi gerekmektedir (Şekil 8).
- 5- Korelasyon noktaları önce solda yer alan elektron mikroskobik görüntü (SEM ya da TEM görüntüsü) üzerinde belirlenir. Noktaların koyulacağı bölgeler büyütülerek en ufak bir sapma bile engellenir. Sol görüntüde 3 korelasyon noktası

belirledikten sonra sağdaki konfokal fotoğrafına geçilerek, soldaki fotoğrafta aynı olduğunu düşünölen bölgeler, aynı sıralama ile sağda da işaretlendi.



Şekil 8. Shuttle&Find Penceresinde 3 Adet Korelasyon Noktasının Belirlenmesi. Soldaki görüntü SEM görüntüsü, sağdaki ise konfokal görüntüsü. Kırmızı ile yazılan 1,2,3 şeklindeki korelasyon numaraları iki görüntü arasındaki noktaların birbirine olan uzaklıklarına ve konumlarına göre belirlenmektedir.

- 6- Toplamda 6 noktayı belirlediğimizde, korelasyonu oluştur (create correlation) butonuna bastığımızda sol alt pencerede korelasyon fotoğrafı oluşmaktadır. (Şekil 9).
- 7- Eğer noktaları doğru belirleyemediysek noktalar üst üste oturmacaktır. Bu durumda, noktalar resetlenir ve başa dönölerek korelasyon noktaları tekrar belirlenir.
- 8- Korelasyonun doğru olması durumunda korelasyon fotoğrafı yine czi. formatında kaydedilir.
- 9- Eğer noktaları doğru belirleyemediysek noktalar üst üste oturmacaktır. Bu durumda, noktalar reset lenir ve başa dönölerek korelasyon noktaları tekrar belirlenir.
- 10- Korelasyonun doğru olması durumunda korelasyon fotoğrafı czi. formatında kaydedilir.



Şekil 9. Korelasyon Görüntüsünün Oluşturulması. Sol alttaki fotoğraf konfokalden ve SEM'den gelen görüntülerin korelasyon görüntüsüdür.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

	Mart 2017	Nisan 2017	Mayıs 2017	Haziran 2017	Temmuz 2017	Ağustos 2017	Eylül 2017	Ekim 2017	Kasım 2017	Aralık 2017	Ocak 2018	Şubat 2018	Mart 2018	Nisan 2018	Mayıs 2018	Haziran 2018	Temmuz 2018	Eylül 2018
Literatür tarama ve proje yazım işlemleri	x	x	x	x														
Etik kurul ve Yönetim kurul onayı				x														
BAP başvuru süreci					x													
Malzeme alım süreci									x	x								
Laboratuvar Çalışmaları										x	x	x	x	x	x	x		
Tez Yazım Süreci															x	x		x

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Verilerin değerlendirilmesi Zeiss ZEN-Black ve ZEN-Blue görüntüleme programları kullanılarak yapılmıştır.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Ekzozom gibi bakteriden küçük yapıların görüntülenmesi oldukça zordur. Floresan mikroskopların en gelişmişlerinden biri olan Konfokal mikroskopun bile çözünürlük limitinin altında kalmaktadırlar. Bu nedenle floresan görüntüleme için son teknoloji olan süper çözünürlüklü mikroskoplara ihtiyaç vardır (55). Fakat bu mikroskoplar henüz Türkiye’de bulunmamaktadırlar. Bu nedenle çalışmamızın floresan görüntüleme kısmında bir çok optimizasyon çalışması yapılmıştır ve bu sorun korelasyon aşamasında da yaşanmıştır.

Bir diğer sınırlama ise ekzozomların grid üzerinde konfokal mikroskofta görüntülenmesinde yaşanmıştır. Çünkü grid yüksek büyütmelelerde yağlı objektifte kullanmak için uygun değildir. Cam yüzeyler bu işlem için daha uygundur fakat cama fikse edilen örnekte elektron mikroskobunda görüntülemek için uygun değildir.

3.10. Etik Kurul Onayı

Araştırmamız için, Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 15.06.2017 tarih ve 3392-GOA protokol numaralı 2017/16-22 karar numarası ile etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesine oy birliği ile karar vermiştir (EK-1).



4. BULGULAR

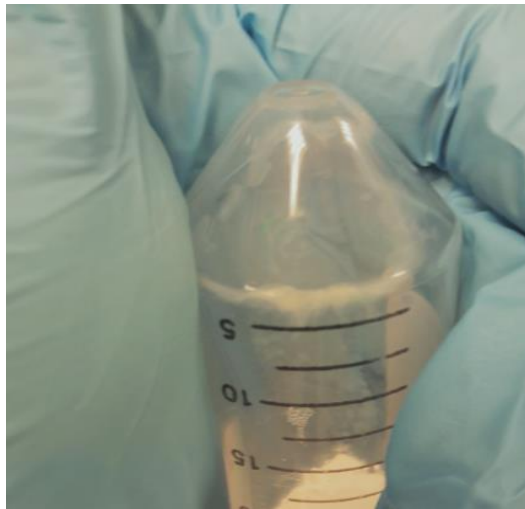
4.1. Hela Hücre Kültürü

%10 FBS ile desteklenen RPMI besiyerindeki HeLa hücreleri %70-80 oranında kültür kabının tabanını kapladıklarında, ekzozom izolasyonu için FBS' siz kültür ortamına alındılar. 24 saat boyunca inkübatörde inkübe edildiler. 24 saat sonunda besiyerine saldıkları ekzozomlar, besiyerinden izolasyon teknikleri ile izole edildi.



Şekil 10. Kültür Ortamında Hela Hücreleri. HeLa hücrelerinin kültür kabının %70-%80' ini kapladıkları görülmektedir (20x).

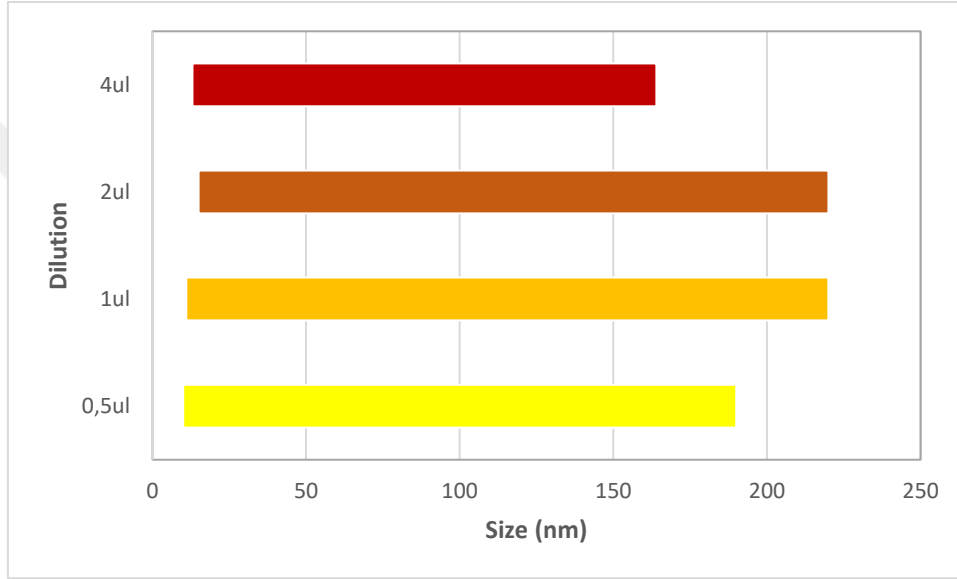
4.2. Hela Hücrelerinden Ekzozom İzolasyonu



Şekil 11. Kit ile Hela Hücrelerinden Elde Edilen Ekzozom Pelet.

4.3. İzole Edilen Ekzozomların Nano-zeta sizer ile Değerlendirilmesi

İzolasyon sonrası elde edilen pelet PBS ile pipetlenerek süspansiyon hale getirildi. Bu süspansiyondaki parçacıkların boyutlarını ölçmek için EM öncesi, süspansiyondaki parçacıkların DLS' si Nano-zetasizer ile değerlendirildi. Bunun için örnekler ışık geçirimli küvetler içinde alete yerleştirilerek ölçümler yapıldı. PBS blank olarak kullanıldı. Böylece PBS in oluşturduğu arka plan sıfırlandı. Ölçüm için ekzozom örneği 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000 oranında PBS ile seyreltilerek her bir seyreltme oranı için ölçüm alındı.

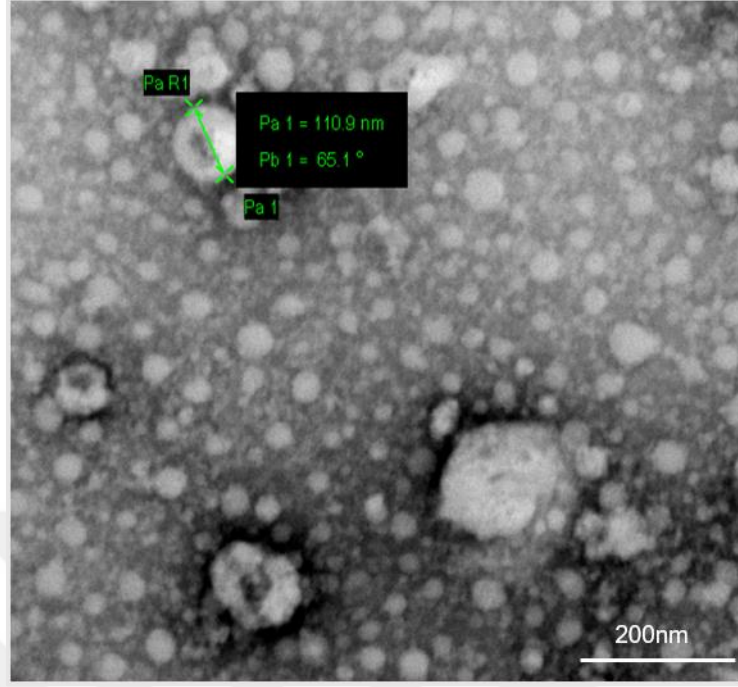


Şekil 12. Solüsyon İçindeki Ekzozomların Nano-Zetasizer ile Değerlendirilmesi. Farklı oranlarda seyreltilen ekzozom örneklerinin ölçüm sonuçları farklı renklerde gösterilmiştir.

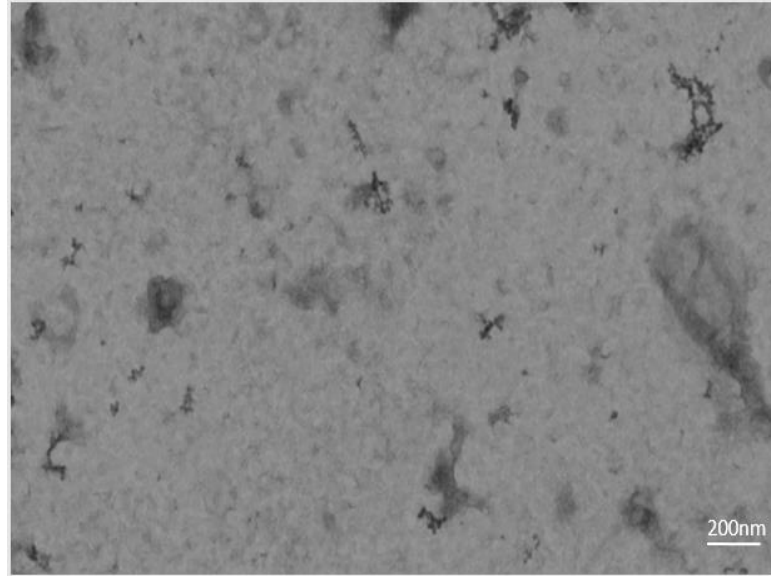
Nano-zetasizer ile yapılan ölçümlerde PBS solüsyonu içindeki partiküllerin ortalamasının 10nm ile 220nm arasında olduğu görülmüştür. Bu ölçümlerden hemen sonra yapılan elektron mikroskopik görüntülemelerde, ekzozom boyutlarının nano-zetasizer ölçümleri ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Fakat ileri çalışmalar için PBS içinde, -80°C de saklanan ekzozom örneklerinin boyutlarının arttığı gözlenmiştir ve tekrarlanan dondurma-çözme işleminde bunda etkili olabileceği düşünülmüştür (56).

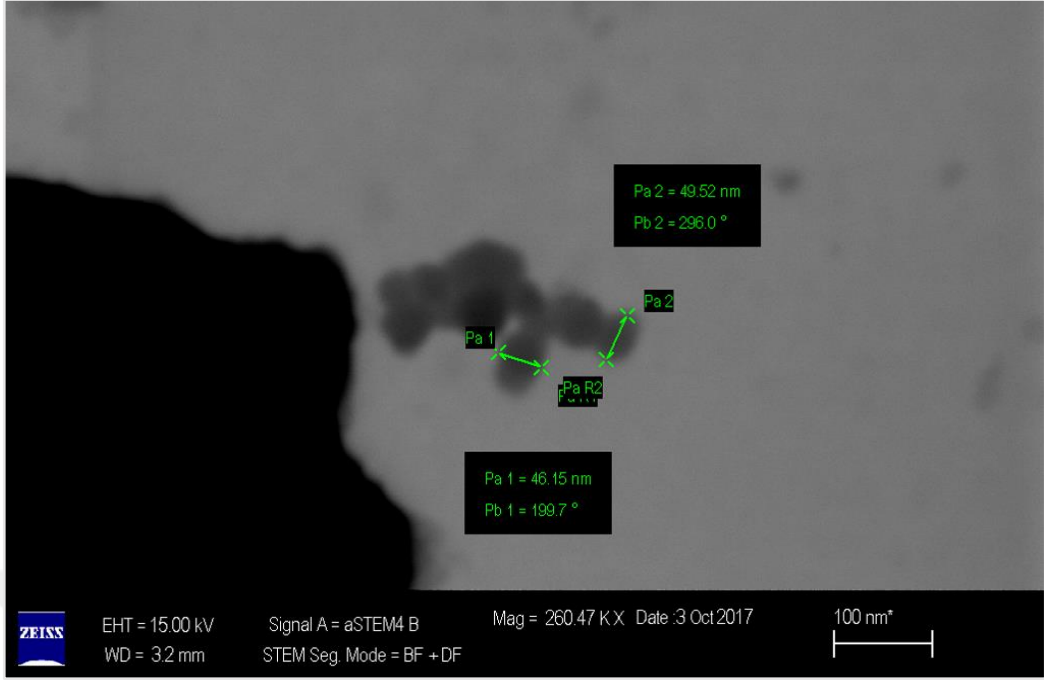
4.4. İzole Edilen Ekzozomların TEM Görüntüsü



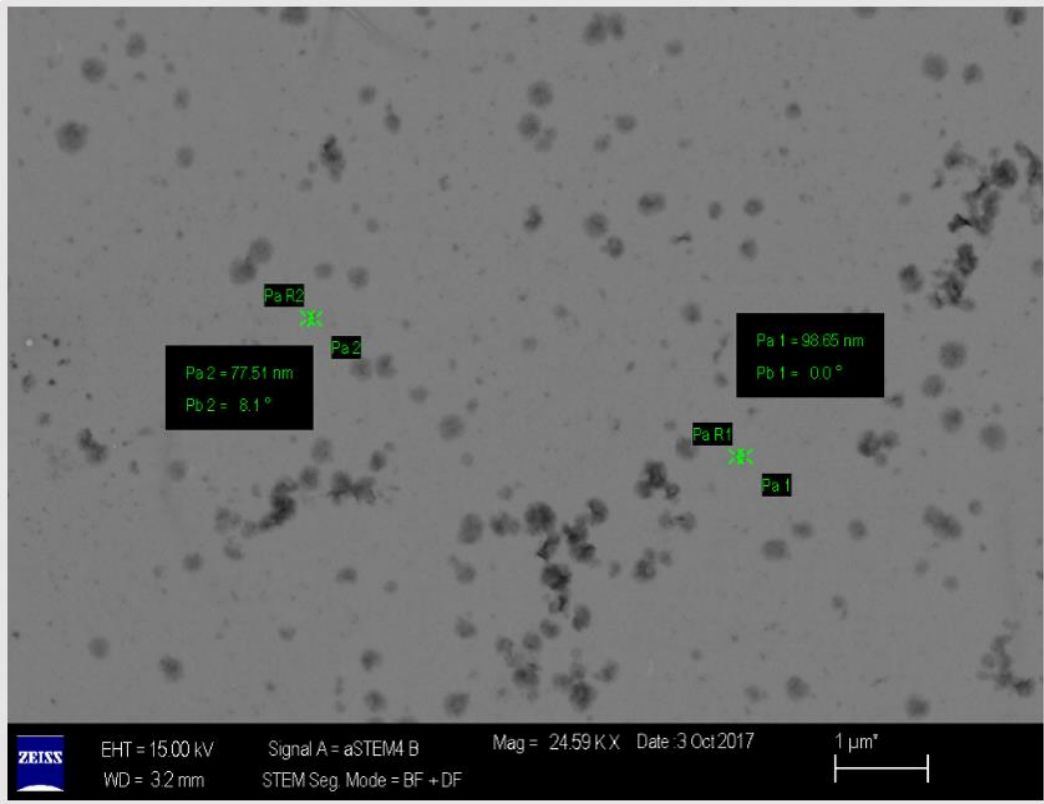
Şekil 13. Kit ile HeLa Hücrelerinden Elde Edilen Ekzozomların TEM Görüntüsü. (150.000X). İşaretlenen ekzozomun çapının 110nm olduğu görülmektedir. Etrafındaki daha küçük ekzozomların ise 50 nm civarında olduğu tespit edilmiştir.



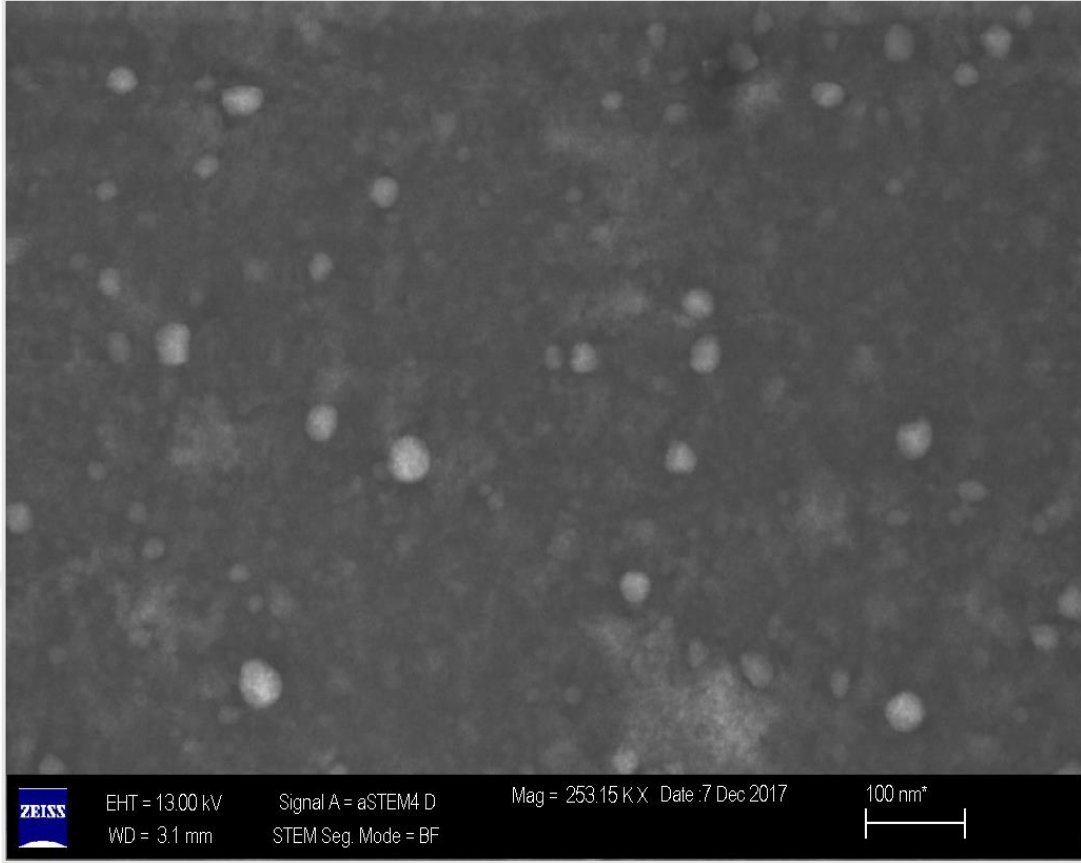
Şekil 14. Ultrasantrifüj ile HeLa Hücrelerinden Elde Edilen Ekzozomların TEM Görüntüsü.



Şekil 15. Kit ile İzole Edilen Ekzozom Topluğunun TEM Görüntüsü (260.000x). Topluluğu oluşturan ekzozomların 49nm ve 46nm çapında olduğu görülmektedir.



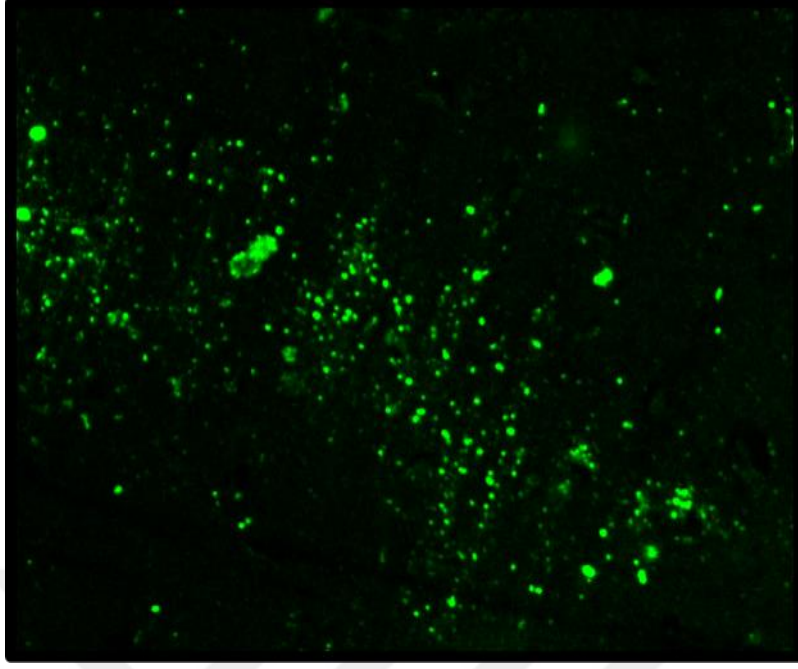
Şekil 16. İzole Edilen Ekzozomların TEM Görüntüsü. Görüntüdeki ekzozom çaplarının 77nm ve 98nm olduğu görülmektedir (24.000x).



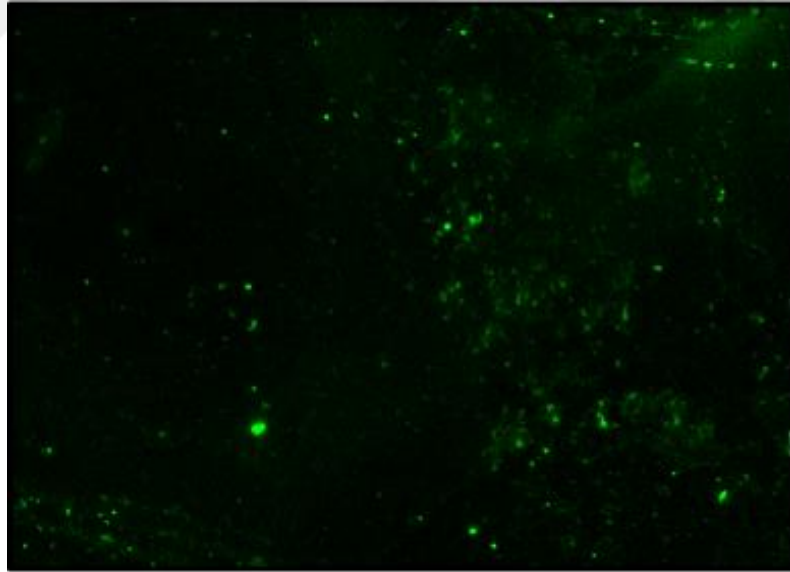
Şekil 17. İzole Edilen Ekzozomların TEM Görüntüsü (250.000x).

4.5. İzole Edilen Ekzozomların Konfokal Görüntüsü

İzole edilen ekzozomların yüzey belirteci olan CD63 proteini, anti-CD63 primer antikor ile işaretlenip sekonder antikor olarakta Alexa flour 488 konjuge antikor kullanılmıştır. Bu sekonder antikor yeşil renkte ışığa yapmaktadır. Bu sayede konfokal görüntüsünde, ekzozomları siyah arka plan üzerinde yeşil spotlar olarak görmekteyiz (Şekil 20,21). Fakat konfokal mikroskobun 200nm çözünürlük limiti nedeniyle 40-150nm çapındaki ekzozomların oluşturduğu yeşil spotlar, tek bir ekzozomdan mı yoksa bir ekzozom topluluğundan mı geliyor? Konfokal görüntü ile bunu anlamak imkansızdır. Bunu anlamanın tek yolu aynı örneğe, çözünürlüğü nano-metreninde altında olan elektron mikroskobu ile bakmaktır. Nokta şeklinde görülen floresan sinyallerin, gerçekte ne olduğu ancak ultra-detaylı yapıları görüntülendiğinde morfolojik detayları ve boyutları incelenerek anlaşılabilir.



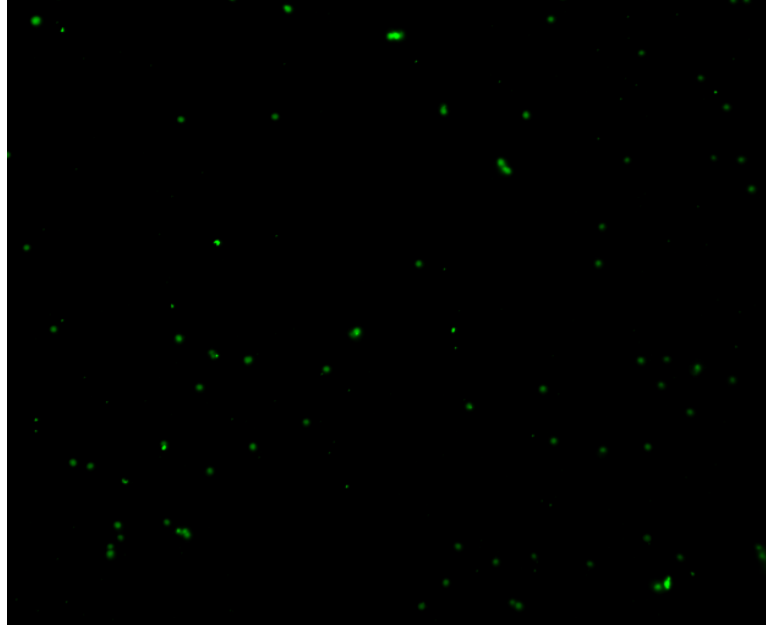
Şekil 18. İzole Edilen Ekzozomların Konfokal Mikroskop Görüntüsü (63x). Yeşil spotlar CD63 yüzey belirteçlerinden işaretlenmiş ekzozomlardır. Bu örnekte dilüsyon oranı $\frac{1}{2}$ dir ve görüntüde ekzozomların çok yoğun olduğunu görmekteyiz.



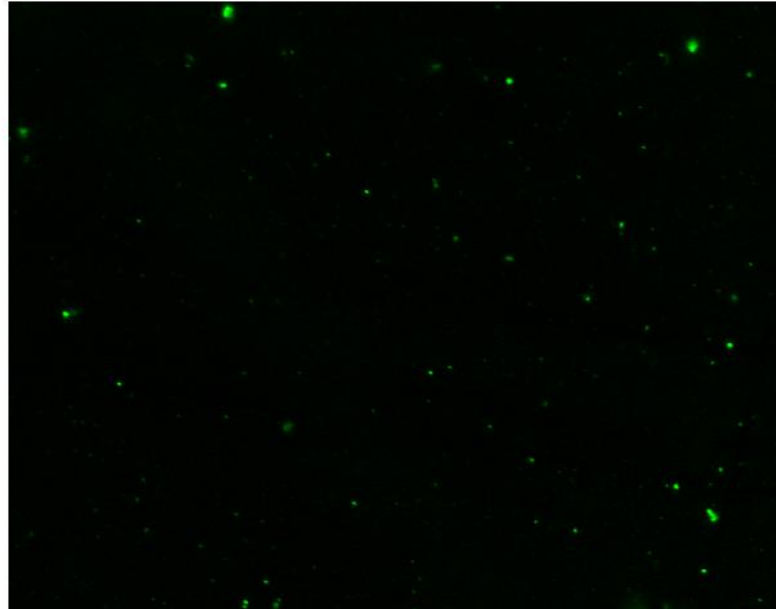
Şekil 19. İzole Edilen Ekzozomların Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x). Dilüsyon oranı $\frac{1}{2}$

Eğer süper çözünürlüklü optik mikroskoplara ulaşma şansınız yok ise, Ekzozomların çapının çok küçük olması ve konfokal mikroskobun çözünürlük limiti nedeniyle, ekzozomları seyrelterek birbirinden ayrı düşürmek önemlidir.

Bu şekilde ekzozomları tek tek olarak görme şansımızı arttırmış oluruz. Biz de çalışmamızda ekzozomları tek tek düşürebilmek için farklı dilüsyon oranları kullandık.



Şekil 20. İzole Edilen Ekzozomların Konfokal Mikroskop Görüntüsü (63x). Burada ekzozomların daha az yoğun olduğunu görmekteyiz (dilüsyon oranı 1/4) . Bu nedenle daha ayrı ayrı görülmektedirler.

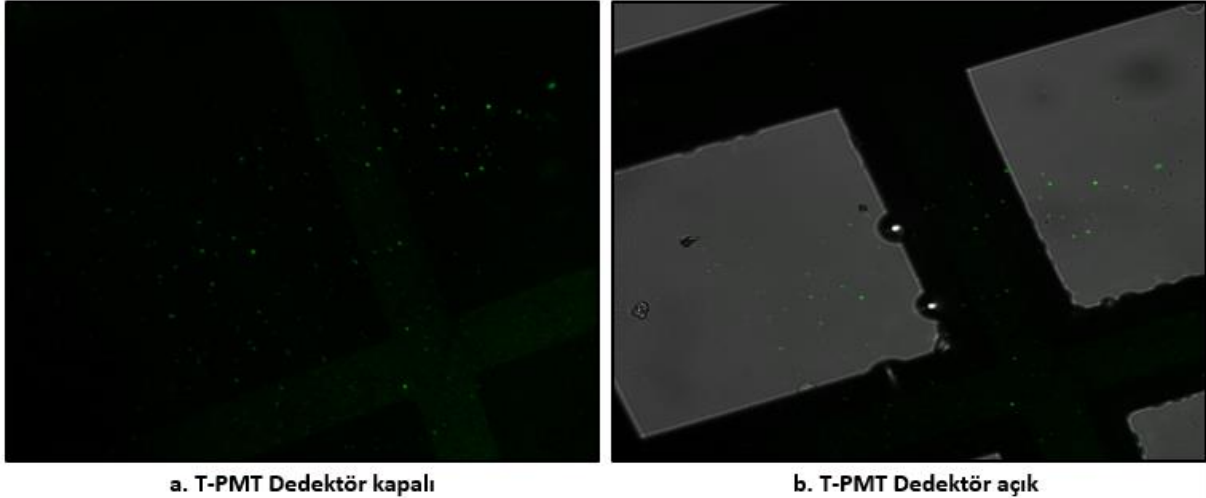


Şekil 21. İzole Edilen Ekzozomların Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x). Dilüsyon oranı 1/4.

4.6. Ekzozomların Konfokal-TEM Korelasyonu

Ekzozomlar konfokal-TEM korelasyonu için grid üzerine fikse edilirler. Grid üzerindeki ekzozomları konfokalde ancak 40x büyütmede, sulu objektif kullanarak görüntülenmiştir. Kullanabileceğimiz maksimum büyütmeye sahip objektif 63x olmasına rağmen, bu objektif yağ ile kullanıldığı için kullanılamamıştır. Çünkü ekzozom gibi küçük molekülleri TEM de görüntülemek için kullanılan karbon kaplı formvarlı bakır gridler yağlama işlemi için uygun değildir. Bu nedenle gridler ile konfokal görüntüleme yapmak oldukça zordur.

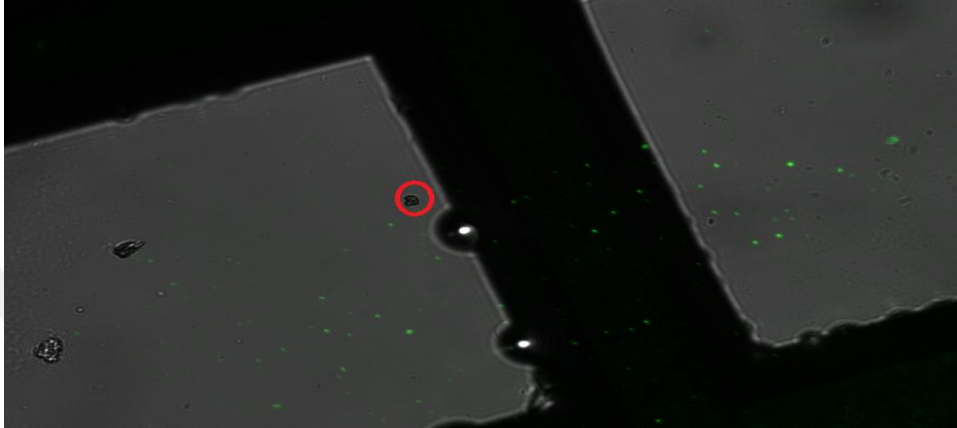
Konfokal-TEM korelasyonu için önce konfokal mikroskop ile görüntüleme yapıldı. Grid üzerindeki ekzozomlar 40x büyütmede, kullanılan sekonder antikor için uygun olan FITCH kanalında görüntülendi. Görüntüler T-PMT dedektörü açık ve kapalı olmak üzere 2 şekilde alındı. Korelasyon yapabilmek için T-PMT dedektörüne ihtiyaç vardır. Bu ışık geçirimli dedektör sayesinde, arka planın kısmen görülmesi ile, arka planda yakalanacak küçük bir detay ile korelasyon noktalarının, iki farklı mikroskoptan gelen görüntü arasında belirlenmesi daha kolay olmaktadır.



Şekil 22. TEM Gridi Üzerine Fikse Edilen Ekzozomların Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x). (a) ekzozomların arka planını siyah olarak gördüğümüz T-PMT dedektörünün kullanılmadığı görüntü (b) karanlık arka planın ortadan kalktığı T-PMT dedektörünün kullanıldığı görüntü.

Konfokalden mikroskoptan alınan görüntüler, görüntülerin alındığı koordinasyonlar ile Blue Zen programı sayesinde kayıt edildikten sonra tutucu üzerinde kilitle grid, TEM için uranil asetat ile kontrastlanarak, iyice kurutulduktan sonra TEM görüntülemesi için adaptöre yerleştirilir. Öncelikle TEM tutucusu için kalibrasyon

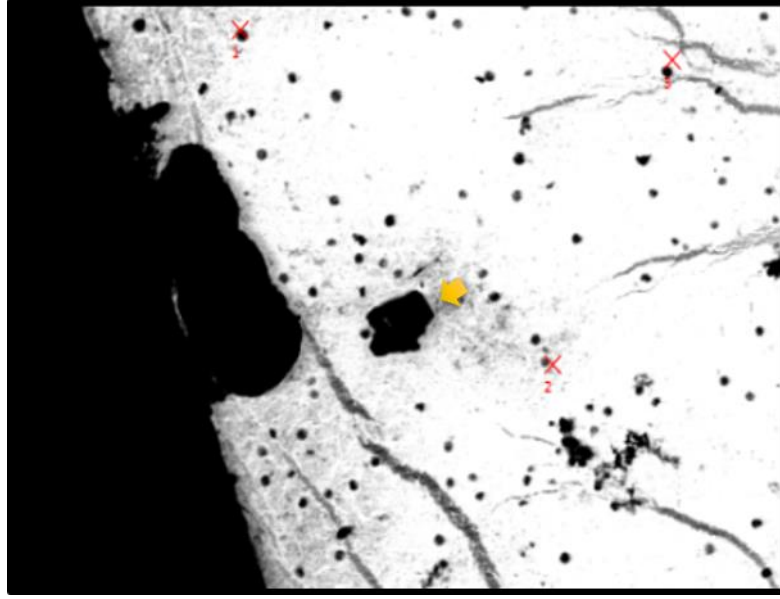
yapılır. Daha sonra örnek TEM de görüntülenir. Daha sonra ZEN 2 SEM progmanından shuttle&find menüsü açılarak konfokalde çekilen görüntü programa aktarılır. Konfokal görüntüsü üzerine tıklanarak TEM görüntüsü üzerinde aynı koordinasyonlara kabaca ulaşılır. Bu aşamadan sonra TEM görüntüsü netleştirilerek iki görüntü arasındaki benzerlikler keşfedilir.



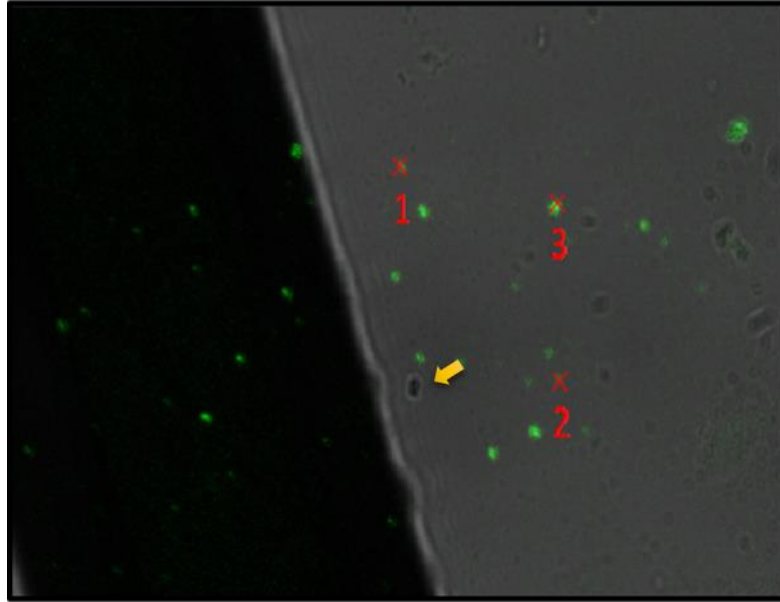
Şekil 23. Konfokal Mikroskop Görüntüsünde Belirlenen Referans Nokta. Kırmızı daire içine alınmıştır.

Bunun için T-PMT ile çekilmiş konfokal görüntüsünde referans bir nokta aranır. Bu iki fotoğrafta da görebildiğiniz herhangi bir kirlilik, PBS ten gelen tuz kristali, fomvar tabakadaki bir yırtık olabilir. Böyle bir nokta konfokal görüntüde bulunduğunda üzerine tıklanarak, program sayesinde TEM görüntüsünde aynı yere ilerlenir. Daha sonra bu referans nokta etrafında, floresan sinyal alınan noktaların konumları baz alınarak aynı noktalar TEM görüntüsünde de belirlenir. Böylece konfokalden alınan floresan sinyaller doğrultusunda, her bir fotoğrafta 3 adet olmak üzere toplamda 6 korelasyon noktası belirlenir. Korelasyon görüntüsünü oluşturabilmek için bu noktaların birbirine çok yakın olmaması gerekir. Bu noktalar birleştirildiğinde içinde kalan alanın dar olmamasına dikkat edilir. Buna dikkat edilmediği durumda korelasyon başarılı olmayacaktır.

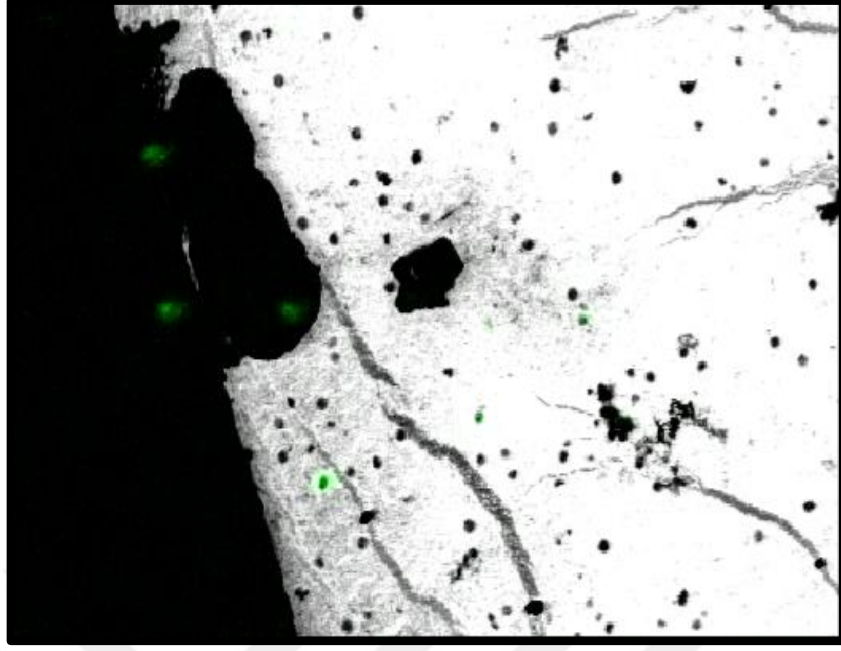
Şekil 23 ve 24' te konfokal fotoğrafı üzerinde belirlenen 3 korelasyon noktasını görüyoruz. Bu noktaların konumlarını kabaca bulabilmek için belirlediğimiz referans noktası olan dikdörtgen şeklindeki yapı, sarı ok ile Konfokal ve TEM görüntüsü üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 24. Ekzozomların TEM Görüntüsü. 1,2,3 ile numaralandırılmış bölgeler belirlenen korelasyon noktaları.

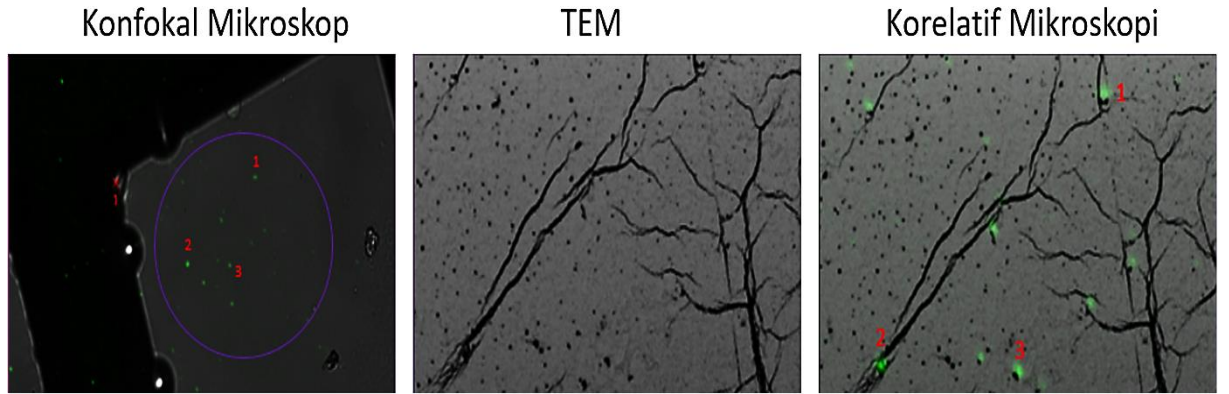


Şekil 25. Ekzozomların Konfokal Görüntüsü. 1,2,3 ile numaralandırılmış bölgeler belirlenen korelasyon noktaları.



Şekil 26. Ekzozomların Korelatif Mikroskopi Görüntüsü

Doğru korelasyon noktalarının belirlenebilmesi durumunda korelasyon bire bir örtüşecek şekilde başarılı olmaktadır. Yanlış noktaların belirlendiği durumda ise korelasyon gerçekleşmemektedir. Ancak doğru bölgeleri belirlediğinizde korelasyon görüntüsü oluşmaktadır. Bu da yanlış yoruma bağlı hataları engellemektedir. Şekil 25' te konfokalden alınan sinyallerin TEM görüntüsündeki ekzozomlar ile bire bir örtüştüğünü görmekteyiz. Şekil 26' da ise bir başka alanda yapılan korelasyon görüntüsünü görülmektedir. TEM görüntüsündeki çatlak görüntüleri, formvarlı grid' in kururken çatlaması ile oluşmaktadır.

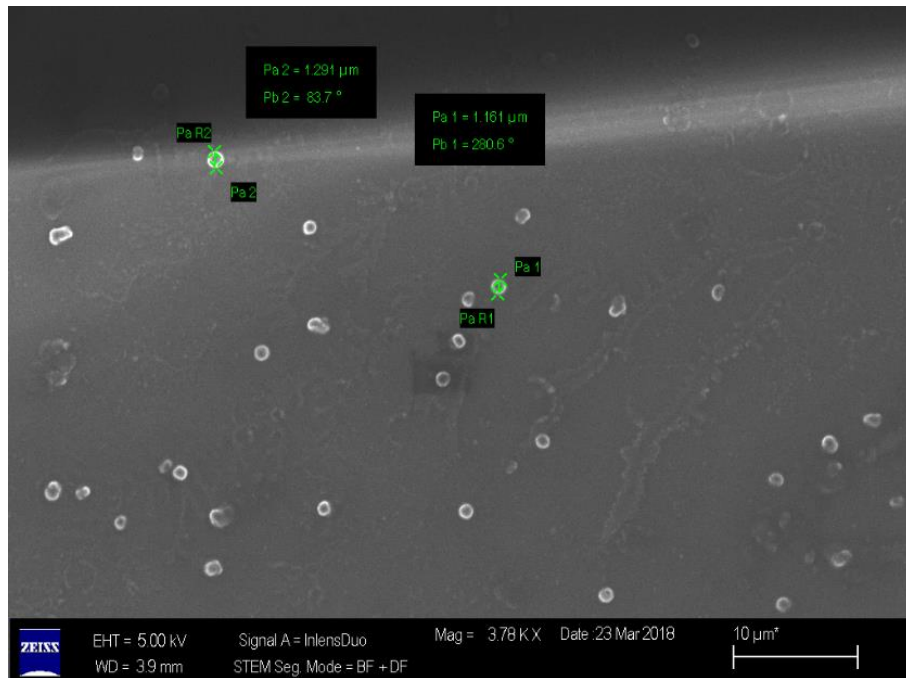


Şekil 27. Ekzozomların Korelatif Mikroskop Görüntüsü. Konfokal Mikroskop görüntüsünde belirlenen 3 korelasyon noktasının TEM görüntüsü ile korelasyonu görülmektedir.

Korelasyon görüntüsü sayesinde, konfokalde yeşil noktalar olarak görülen yapıların, ultra detaylı görüntüde ekzozom morfolojisi ve boyutunda olduğu gözlenmiştir. Böylece bu yeşil noktaların ekzozom olduğu ispat edilmiştir. Bunu sadece konfokal ya da TEM görüntüsüne bakarak söylemek korelasyon görüntüsü kadar kesin ve kabul edilir bir sonuç olmayacaktır.

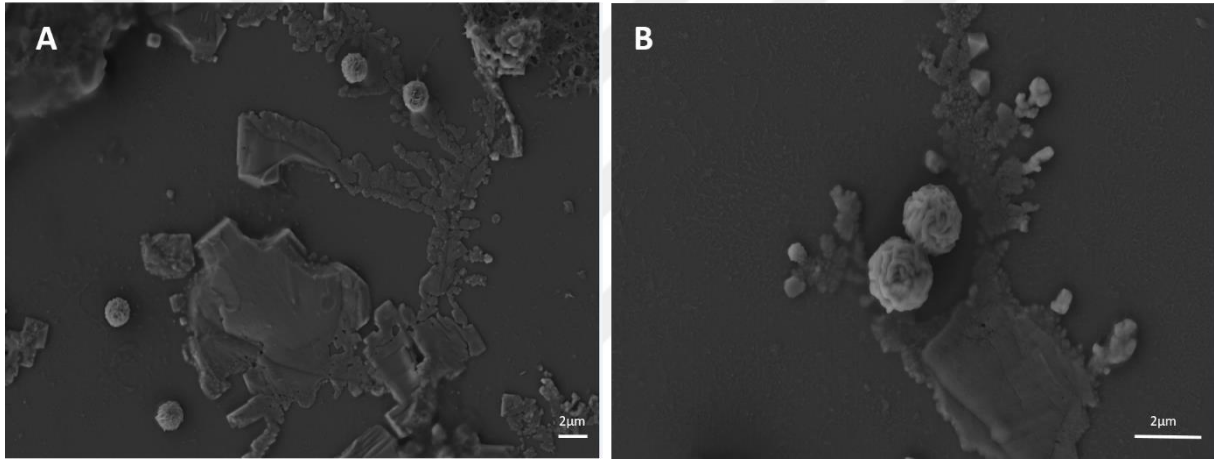
4.7. Ekzozomların Konfokal – SEM Korelasyonu

Ekzozomların Konfokal-SEM korelasyonunun yapılabilmesi için ekzozomlar cama fikse edilirler. Yeşil floresan ile CD63 yüzey belirtecinden işaretlenen ekzozomlar, öncelikle konfokal mikroskopta görüntülenir. Cama fikse oldukları için 63x yağlı objektifte rahatça görüntülenebilirler. Konfokal görüntüsü alınan ekzozomlar SEM için hazırlanır. Bunun için örnek iyice kurutulur ve altın ile kaplanır. Böylece ekzozomların SEM görüntüsü alınır. Daha sonra shuttle&find menüsünden, konfokal görüntüdeki floresan sinyaller rehber olarak kullanılır. Böylece öncelikle, floresan sinyallerin üzerine tıklanarak aynı alan SEM görüntüsü üzerinde kabaca bulunur. Bu işlemden sonra daha ince ayarlamalara geçilir. Bunun için yine 2 farklı mikroskop çeşidinden elde edilen görüntüler arasında, benzer noktalar saptanmaya çalışılarak korelasyon noktaları belirlenir. Noktalar saptanırken hata yapmamak için 2 görüntüde olabildiğince büyütülerek bu noktalar belirlenir

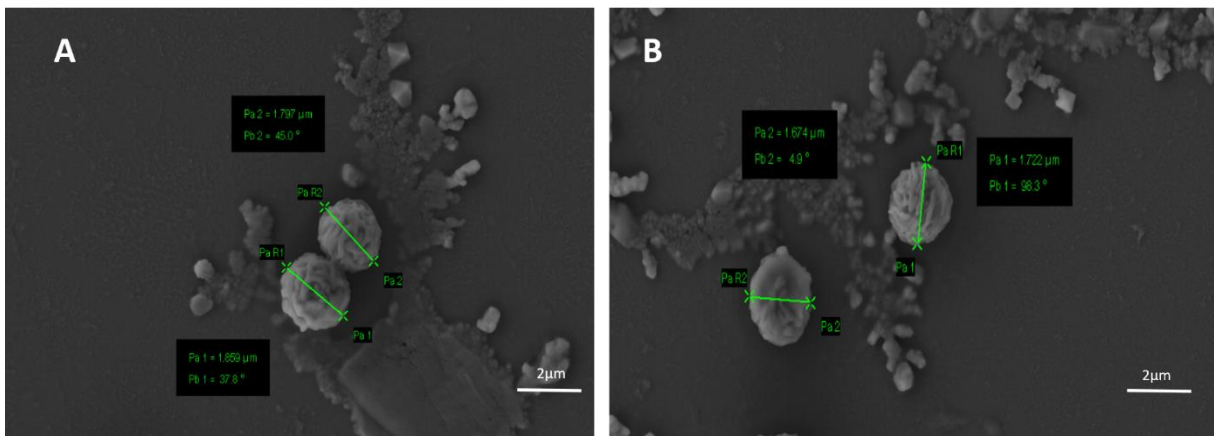


Şekil 28. Ekzozomların SEM Görüntüsü (3000x).

SEM görüntülemesi yapılan ekzozom örneklerine baktığımızda, SEM görüntüsünde spesifik ve belirli bir morfolojiye sahip sferik yapılar olduğu gözlemlendi. Ancak bu yapılar, literatürde tanımlanan 40nm-150nm arasındaki ekzozom çapından oldukça büyüktü (şekil 27). SEM görüntüleme için cama fikse edilen ekzozom örneklerinin, farklı alanlarından yapılan görüntülemelerde benzer şekilde, bu sferik yapıların ortalama aynı çapa sahip olduğunu gözlemledik. Bu büyük sferik yapılar ortalama 1600-1800 nm çapındaydılar. Bununla birlikte, bu patern ilginç bir şekilde tüm bu sferik yapılarda aynıydı (şekil 28 ve 29). Bu yapıların ekzozom olup olmadığını belirlemek için korelatif mikroskobik veri aydınlatıcı olacaktır.

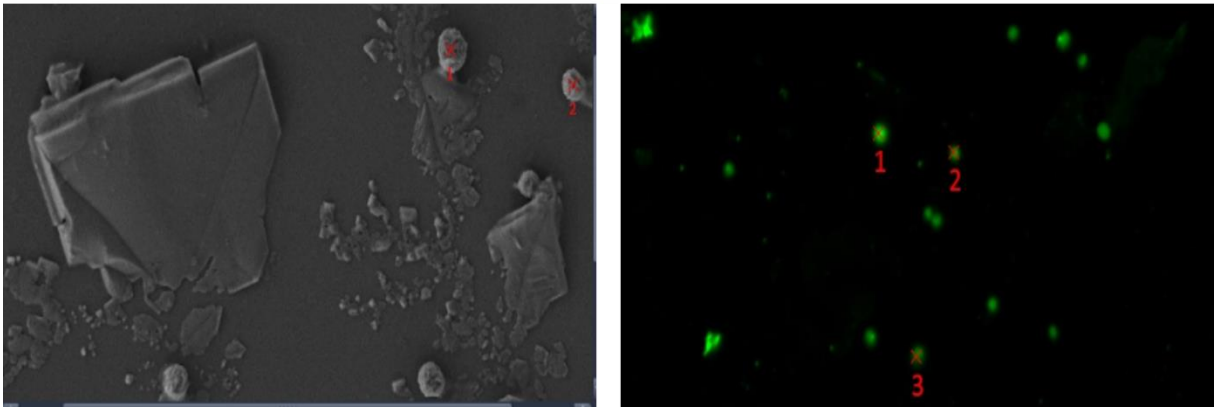


Şekil 29. İzole Edilen Ekzozomların SEM Görüntüsü. (A) 7000x büyütme (B) 16.000x büyütme.

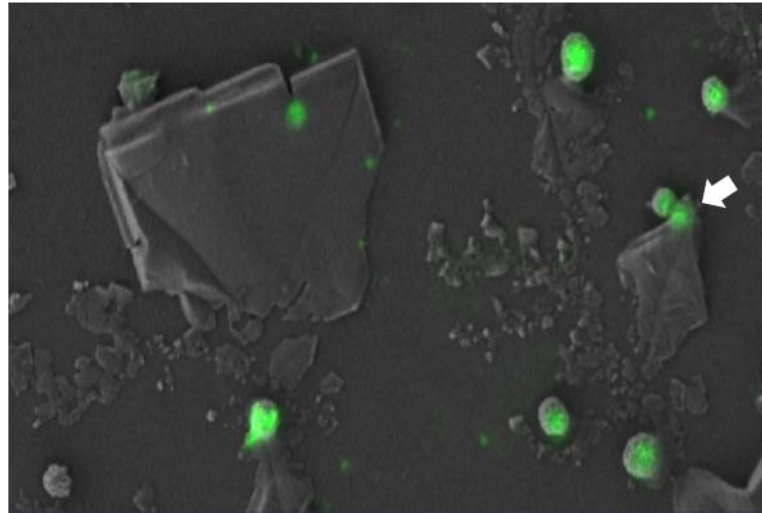


Şekil 30. İzole Edilen Ekzozomların SEM Görüntüsü (16.000x). (A) ve (B) de ekzozom topluluklarının çapı ortalama 1,600 nm olarak ölçülmüştür.

Korelatif Mikroskop görüntüsü için, konfokal mikroskop görüntüsü ile SEM görüntüsü arasında korelasyon noktaları belirlendi. Şekil 31' de görüldüğü gibi sol taraftaki SEM görüntüsündeki sferik yapıların konumu ile sağ taraftaki Konfokal mikroskop görüntüsündeki yeşil noktaların konumu dikkate alınarak ve birbirine olan uzaklıkları göz önünde tutularak, aynı dizilimdeki noktalar belirlendi. Korelasyon noktaları belirlendikten sonra korelasyon oluştur seçeneği aktifleştirilerek korelasyon görüntüsü oluşturuldu.



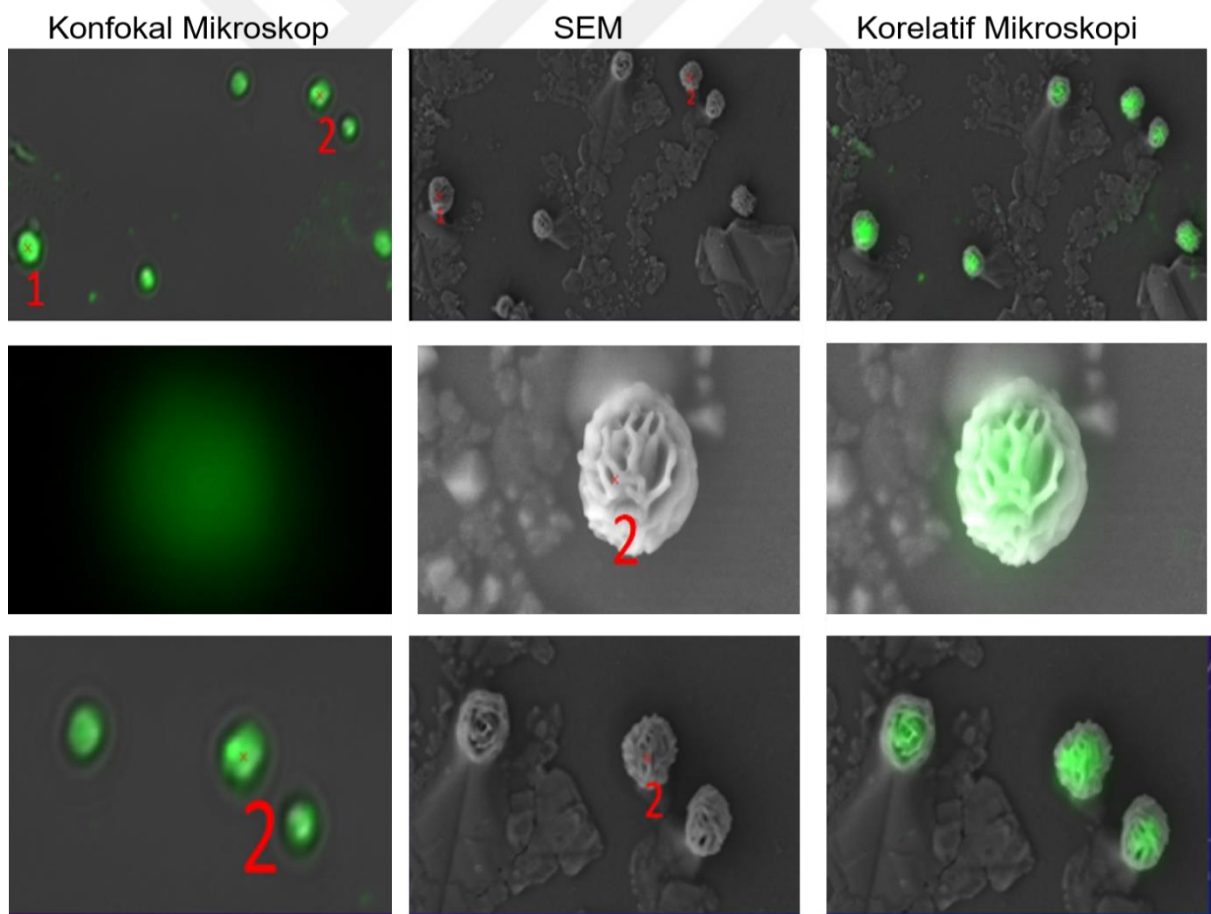
Şekil 31. SEM (solda) ve Konfokal Mikroskop(sağda) Görüntüsünde İşaretlenen Korelasyon Noktaları.



Şekil 32. Ekzozomların Korelatif Mikroskop Görüntüsü. Bu görüntüde sferik yapılarla floresan sinyallerin tam olarak üst üste örtüştüğünü görmekteyiz. SEM görüntüsünde tuz kristali altında kalan ve seçilemeyen, okla işaretlenen sferik yapının, korelasyon görüntüsünde floresan sinyal ile örtüşüp parlamasıyla, ortaya çıktığı görülmektedir.

Korelasyon görüntüsüne baktığımızda, floresan sinyaller ile sferik yapıların bire bir üst üste yerleştiğini gördük. Bu korelasyonun başarılı olduğunu göstermekteydi. Bununla birlikte, bu sonuç bize konfokal mikroskop görüntüsünde gördüğümüz yeşil noktaların, tek bir ekzozomdan değil bir ekzozom topluluğundan geldiğini göstermektedir. Bu sonuç, konfokalde spesifik antikor işaretleme yapılarak alınan floresan sinyallerin, SEM görüntüsündeki sferik yapılar ile bire bir örtüşmesine dayanarak çıkarılmıştır.

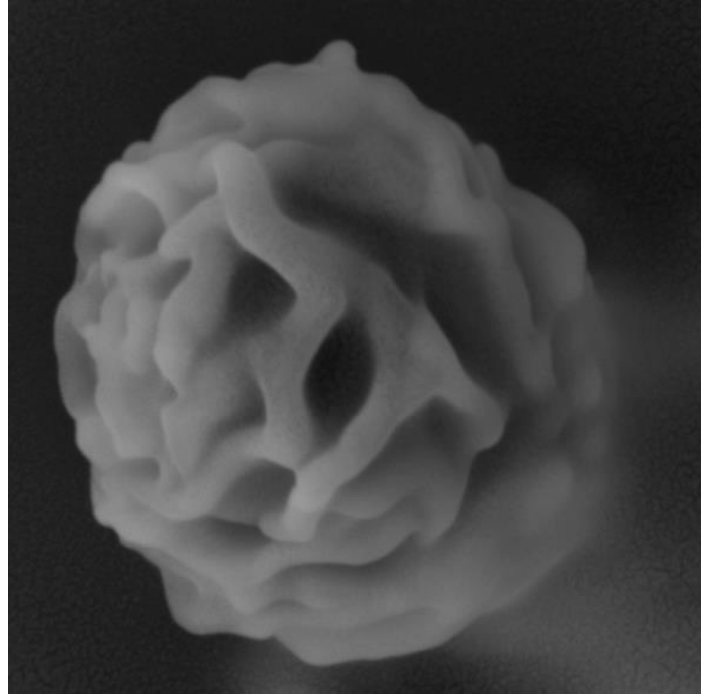
Böylece korelatif mikroskop tekniği sayesinde ultra-detaylı yapıları gözlemlenen yapıları, konfokal mikroskopun sunduğu spesifik işaretleme tekniği ile tanımlamış olduk. Daha sonra cama fikse edilen ekzozom örneklerinin farklı alanlarından farklı büyütme ile korelatif mikroskopik görüntüler alınmaya devam edilmiştir. Şekil 33 ' de bu görüntüler görülmektedir.



Şekil 33. Ekzozomların Konfokal-SEM Kombinasyonlu Korelatif Mikroskopi görüntüleri.

Bu Konfokal-SEM kombinasyonlu korelatif görüntülerin hepsinde, ekzozomları tek tek değil grup halinde gözlemledik. Literatüre baktığımızda da HeLa hücrelerinden izole edilen ekzozomların küme oluşturma eğiliminde olduğunu gösteren bir kaç yayın olduğunu gördük (15,57). Fakat bu yayınlarda ekzozom toplulukları sadece SEM ile görüntülenmişti ve bizim görüntülediğimiz şekilde, aynı çapa sahip ve benzer morfolojide değillerdi.

SEM ile görüntülenen ekzozom topluluklarından bir tanesine odaklanıp büyüterek morfolojisini incelediğimizde, açılmakta olan bir güle benzediğini farkettilik. Aynı şekilde diğer ekzozom topluluklarını incelediğimizde hepsinin benzer morfolojide olduğunu gözlemledik (Şekil 33).



Şekil 34. Bir Ekzozom Topluluğunun 80.000x Büyütmedeki SEM Görüntüsü

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak ekzozomların görüntülenmesinde daha önce kullanılmamış bir teknik olan Korelatif Mikroskop ile ekzozomları görüntüledik. Bu yöntem ile çözünürlüğü sınırlı olan konfokal mikroskopta, floresan işaretleme yöntemi ile görüntülenen noktaların, TEM ve SEM görüntüsünde bu noktaların ultra-detaylı yapıları ile örtüştürülmesi ile konfokalde görüntülenen floresan sinyallerin ekzozom olduğunu gösterdik.

Bu yöntem antikör ile spesifik işaretleme ve yüksek çözünürlükte görüntü alma tekniklerini birleştirerek, konfokalde tek bir nokta gibi gördüğümüz yapıların bazen birden fazla ekzozomu temsil edebileceğini, ve bazı parlayan noktaların ise yanlış sinyal olabileceğini göstermiştir.

Korelatif mikroskopi ile görüntülemenin, siyah-beyaz EM görüntülerinde yoruma dayalı hataları engellediğini ve EM görüntülerinin yorumlanmasında hatasız ve kesin sonuçlar sağladığını deneyimledik.

Ekzozomları korelatif mikroskopta görüntülemek için literatürde bir prosedür bulunmadığı için, konfokal ve elektron mikroskobinin temel örnek hazırlama kurallarını takip ederek kendi prosedürümüzü optimize ettik.

Fakat ekzozom gibi 200nm den küçük yapılar ile çalışıldığında, konfokal mikroskop yerine süper çözünürlüklü mikroskoplar ile görüntü almak korelasyon işlemini kolaylaştırıcı bir yaklaşım olacaktır. Böylece floresan sinyal lokalizasyonu en keskin hatları ile görüntülenebilecektir (58).

İzole ettiğimiz ekzozomların korelatif mikroskobik görüntüleri ile ekzozomların ultra-detaylı yapılarını, antikör işaretleme yöntemi yardımıyla spesifik olarak belirlemiş olduk. Böylece ilk defa HeLa hücrelerinden izole edilen ekzozomları korelatif mikroskopi yöntemi ile görüntüledik.

Bu çalışmanın, veziküller görüntüleme ya da korelatif mikroskopi ile biyolojik yapıların görüntülenmesi çalışmalarına ışık tutarak, veziküler yapıların önemli olduğu tüm biyolojik süreçlerde, araştırmaya, tanı ve tedavi izlemi amacıyla kullanılabilceğini düşünmekteyiz.

6. TARTIŞMA

Günümüzde ekzozomları izole etmek için bir çok metot kullanılmaktadır. Fakat hala ekzozom izolasyonu için standart bir metot bulunmamaktadır. Bu nedenle, tercih edilen yöntem biyolojik soruya dayalı olarak belirlenmelidir.

Ekzozom izolasyonu için kullanılan en yaygın yöntem, ultrasantrifüjdür. Bununla birlikte, ultrasantrifüjleme ile birleştirilmiş bir dizi diferansiyel santrifüj aşamasının kullanılmasının en büyük dezavantajı, EV alt tiplerinin ayrılmasında etkisiz olmasıdır. Bu nedenle 200nm' den büyük molekülleri elemek için 0.2 µm' lik filtreler kullanılmaktadır (56). Her basamakta örnek kaybı olduğu için, çalışmaya fazla sayıda kültürle başlanması gerekmektedir. Ultrasantrifüj yöntemi, EM gibi direkt veziküllerin görüldüğü çalışmalar için kullanılabilir bir yöntem olmasına rağmen indirekt yöntemler için çok uygun değildir. Bu nedenle çoğu çalışma ultrasantrifüj yönteminin diğer izolasyon teknikleri ile birleştirilip kullanılmasının daha doğru olduğunu söylemektedir. Özellikle yoğunluk gradiyent santrifüj yöntemi ile kullanılması önerilmektedir. Yoğunluk gradiyent santrifüj yöntemi, ekzozomları ultrasantrifüjde sükozdaki yoğunluklarına göre ayırarak daha spesifik bir izolasyon yapmaktadır. Buna rağmen çok fazla sayıda örnek gerektiren zahmetli ve zaman alıcı bir yöntemdir. Bir diğer yöntem ise immün afiniteye dayalı yöntemlerdir. Ekzozom yüzey belirteçleri immün bilyeler ile işaretlenerek flow sitometride izole edilirler. Bu yöntemde de non-spesifik protein bağlama sorunları yaşanmaktadır.

Ekzozomların fizyolojik ve patolojik rollerine artan ilgi ile birlikte, çok sayıda "Kolay ve hızlı izolasyon prosedürleri" sağlayan ticari kitler artık rutin olarak geliştirilmiştir ve kullanılmaktadır. Ticari kitler daha stabil, hızlı ve en önemlisi , çok az miktardaki örneklerden izolasyon yapabilmektedirler. Bu nedenle ekzozomla ilişkili hastalık biyobelirteçlerinin tanımlanması için ideal bir seçenek olarak hizmet ederler. Fakat bunun yanında ticari kitlerde diğer veziküllerin ve protein komplekslerinin ekzozomlarla birlikte izolasyonundan muzdariptir. Bu nedenle veriler yorumlanırken hata yapmamak adına bu gerçekler göz önünde tutulmalıdır. Sonuç olarak ekzozom izolasyonu için henüz altın standart bir yöntem bulunmamaktadır (13).

Bir diğer problem ise izole edilen ekzozomların uygun koşullarda saklanmasıdır. Bir çok çalışma izole edilen ekzozomların bir hafta içinde kullanılmayacak olması durumunda -80°C' de saklanmasını önermektedir (49). Yapılan çalışmalarda,

ekzozomların boyutlarının ve bütünlüğünün saklama koşullarına bağlı olduğu gösterilmiştir (59) . Ekzozomların uzun süre saklanması ve özellikle de sürekli dondurulup çözülmesi durumunda ekzozom boyutlarının, ilk izole edildikleri zamana göre değiştiğini gösteren bir çok çalışmalar bulunmaktadır (60). Biz de çalışmamızda -80°C'de PBS içinde saklanan ekzozomların zamanla boyutlarının arttığını gözlemledik.

Ekzozomların morfoloji ve boyutları fizyolojik rollerini, dağılımlarını ve dokularda ki konsantrasyonunu tanımlamak için kritiktir (60). Bunu belirlemenin en kesin yolu direkt görüntüleyebilmektedir. Ekzozomlar nano boyutları nedeni ile optik mikroskopların çözünürlük limitlerinin dışında kaldıkları için elektron mikroskobu ile görüntülenirler.

Ekzozomları görüntülemek için rutin olarak kullanılan teknik TEM dir. Bu yöntem ile ekzozomlar morfolojilerine ve büyüklüklerine bakılarak tespit edilmektedirler. Fakat izole edilen vezikülleri karakterize edebilmek için birden fazla yöntemin kullanıldığı teknikler şüpheye yer vermeden, daha kesin sonuçlar vermektedir. Bunun için spesifik işaretlemeler yapılabilen sistemlerle, ultra çözünürlüğe sahip elektron mikroskoplarını kombine etmek oldukça ileri düzeyde görüntüleme yapabilmek anlamına gelmektedir. Şu an bu teknolojiyi korelatif mikroskoplar sağlamaktadır.

Biz çalışmamızda ekzozomları Korelatif mikroskopi ile görüntülemek için Konfokal-TEM ve SEM olmak üzere 2 farklı kombinasyon kullandık. Konfokal-TEM korelasyonu ise sınırlıkları çok daha fazla olan bir yöntemdir.

TEM de ekzozomları görüntüleyebilmek için, karbon kaplı-formvarlı grid kullanılması gerekmektedir. Formvarlı grid konfokal görüntülemeye bir çok sorun teşkil etmektedir. Çünkü konfokal görüntüleme için uygun bir zemin değildir. Konfokal görüntüleme için genelde cam gibi şeffaf ve düz zeminler kullanılır. Formvar tabaka ise cam gibi stabil ve şeffaf değildir. Cam kadar şeffaf olmaması, görüntüleme sırasında görüntü arka planında kirli bir görüntü oluşmasına neden olmaktadır. Ekzozom gibi küçük yapıları görüntülediğiniz de bu daha büyük bir sorun teşkil etmektedir. Bir diğer dezavantajı stabil olmamasıdır yani esnektir. Konfokal görüntüleme sırasında, çok ince bir tabaka olan formvar, lazerin ısı ile zarar görerek çatlayabilmekte ya da yırtılabilmektedir. Bu görüntülediğiniz alanın kaybına sebep olmaktadır. Bu da örnek kaybı ve dolayısıyla zaman kaybı demektir. Bunun dışında formvar yırtılmasa bile

elektron mikroskobu için kurutulurken, gerginleşmekte ya da çatlamaktadır. Bunun sonucunda konfokalde görüntü aldığınız alanların koordinasyonları bir parça değişmektedir. Bu da korelasyon aşamasında, görüntüleri örtüştürme sırasında ciddi zorluklar oluşturmaktadır.

Grid kullanmanın bir diğer dezavantajı ise yağlı objektif ile kullanılamamasıdır. Ekzozomlar oldukça küçük yapılar olduğu için genellikle 63x büyütmede görüntülenmektedirler. Bizim kullandığımız Zeiss LSM-880 Konfokal mikroskobun 63x objektifi yağ ile kullanılan bir objektif olduğu için cam dışındaki malzemelerde kullanılması zordur. Bizim sistemimizde örnek cam üzerinde değil, grid üzerinde tutucuya kilitli bir şekilde sabitlenmiştir. Bu nedenle sulu yada yağlı objektif kullanıldığında, bunlar gridin objektife bakan kısmına uygulanmaktadır. Yani direk gridin kendisine uygulanırlar. Bu işlemde, gride uygulamak zor olduğu gibi, eğer yağlı objektif kullanılıyorsa, sonrasında TEM e taşınacak grid ten yağın uzaklaştırılması da imkansızdır. Bu nedenle 63x büyütme TEM korelasyonu için bu çalışmada kullanılamamıştır. Bu işlem 40x büyütmede sulu objektif ile yapılmıştır. Bu objektif ile çalışmak için de suyu gridin objektife bakan kısmına uygulamak gerekmektedir. Cam kadar düzgün bir zemine uygulanmadığı için ve bir süre sonra formvar tabaka tarafından su emildiği için objektif ile grid arasında boşluklar kalmaktadır bu da görüntü kalitesini düşürmektedir. Ayrıca görüntüleme sırasında ıslatılan grid, lazerin ısısı ile birlikte kurumaya başlamaktadır. Bu kuruma ile birlikte formvar tabaka çatlamakta ve görüntü kalitesini düşürmektedir. Görüntüleme işlemi bitene kadar gridi ıslatma işlemi devam etmektedir. Tekrarlayan ıslatma ve kuruma işlemleri, görüntüleme kalitesini negatif yönde etkilemektedir. Bu nedenle CLEM için cam üzerinde çalışmak grid ile çalışmaktan çok daha kolay ve örneğe en az zarar veren sistemdir (58). Sonuç olarak tutucu sistemi ile grid üzerinde yapılan TEM korelasyonunun geliştirilmeye ihtiyacı vardır (35).

Korelatif Mikroskopi için örnek hazırlamanın bir diğer zorluğu fikse edilen örneğin, optik mikroskoplarda, bizim çalışmamızda konfokal mikroskopta, görüntü alabilmek için kapatma medyumunu ile kapatılması yani kurumaması gerekmektedir. Fakat bu görüntüleme siteminde örnekler tutucu içine kilitli olduğu için üstü kapatılamamaktadır. Zaten EM görüntülemede, elektronlar örneğin içinden geçeceği için üzerinin açık olması gerekmektedir. Bu nedenle konfokal görüntüleme sırasında örnek üzerine bir

damla PBS ya da ultra-saf su damlatılarak örneğin kuruması engellenmek zorundadır. Fakat örnek üzeri tamamen kapatılmadığı için görüntülemenin başında alınan görüntü ile sonunda alınan görüntüdeki floresan sinyal kalitesi aynı olmamaktadır. Zamanla floresan sinyalin kalitesi düşmektedir. Bu nedenle olabildiğince hızlı görüntü almak gerekmektedir.

Bütün bu sayılan nedenler doğrultusunda, biz bu çalışmada konfokal-SEM korelasyonunun, konfokal-TEM korelasyonundan daha uygulanabilir olduğunu deneyimledik.

Yaptığımız çalışmada, konfokal-SEM korelasyonunda HeLa hücrelerinden izole edilen ekzozomların SEM görüntüsünde, tek tek olarak değil bir küme halinde bulduklarını gözlemledik. Niel ve arkadaşları 2018 de yaptıkları çalışmada, HeLa hücreleri ve Epstein-Barr virüsü (EBV) ile enfekte edilmiş B hücrelerinin, ekzozomlarının SEM görüntüsünde topluluk halinde olduğunu göstermişlerdir (15).

Wu ve arkadaşları ise B16F0 ve SKBR3 hücrelerinden izole edilen ekzozomların tek tek değil kümeler halinde olduğunu gözlemlemişlerdir. SEM görüntüsünde membranlarından çok sıkı bir şekilde tutduklarını hatta nerdeyse tamamen birleşmiş gibi gördüklerini rapor etmişlerdir. Bu kümeleşme olayının, örnek hazırlama süreci ile ilişkili olamayacağını, bunun doğal bir süreç olduğunu belirtmişlerdir. Çünkü SEM ile görüntülenen, apoptotik ve nekrotik cisimler gibi diğer veziküllerde bu kümeleşme gözlemlenmemiştir. Bu nedenle bu kümeleşmenin doğal bir süreç olduğunu rapor etmişlerdir. Özellikle SEM görüntülemeye görünmesinin nedeni ise SEM örnek hazırlama prosedürünün, TEM için örnek hazırlama prosedüründen daha az basamak içermesi bu nedenle, doğal ekzozom kümeleşmesini bozmadığı düşünülmektedir. Ekzozomların bu kümeleşme olayı, ekzozom karakterizasyonu için kullanılan indirekt yöntemleri olumsuz etkilemektedir. Işık saçılması baz alınarak solüsyon içindeki ekzozom çaplarının ölçüldüğü dinamik ışık saçılma yöntemi buna örnektir (60).

James ve arkadaşları ise ekzozomların birbirine *tetherin* denilen protein ile tutunduğu göstermişlerdir. Bu tutunmanın ve sonucunda kümeleşmenin, ekzozomların hedef hücre membranından topluca alınmasını kolaylaştırmak için olduğu düşünülmektedir (61).

Biz de çalışmamızda ekzozomları SEM görüntüsünde tek tek değil kümeler halinde gözlemledik. Fakat literatürdeki çalışmalardan farklı olarak, grntlediğimiz ekzozom kümelerinin hepsinin benzer çaplarda (1600-1800nm) ve morfolojide olduğunu gözlemledik. Ekzozomlarının küme oluşturma fenomeninin aydınlığa kavuşturulması için daha fazla çalışmaya gerek olduğunu düşünmekteyiz.



7. **KAYNAKÇA**

1. Choi H, Lee DS. Illuminating the physiology of extracellular vesicles. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2016;1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-016-0316-1>
2. Sharma S, Gimzewski JK. Nanomedicine & Nanotechnology Exosomes : Nanoscale Packages Contain the Health-state [Status Quo] of the Cells that Secrete them. 2015;6(6):1–3.
3. Ha D, Yang N, Nadithe V, Pharmaceutica Sinica AB. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challengefile:///C:/Users/seydaa/Desktop/shedding light.pdf. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2016;6(4):287–96. Available from: www.elsevier.com/locate/apsb www.sciencedirect.com <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001>
4. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(AugusT):581–93.
5. Peters PJ et al. Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1989;19(22):1469–1475.
6. Alexander V. Vlassov, Susan Magdaleno, Robert Setterquist RC. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*. 2012;
7. Keller S, Rupp C, Stoeck A, Runz S, Fogel M, Lugert S, et al. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney Int* [Internet]. 2007;72(9):1095–102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5002486>
8. Wood, Matthew JA AJO, Samira L. Exosomes and the blood – brain barrier : implications for neurological diseases. *Ther Deliv*. 2011;2(9):1095–9.
9. Keller S, Ridinger J, Rupp A, Janssen JWG, Altevogt P. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *J Transl Med*. 2011;9:1–9.

10. Palanisamy V, Sharma S, Deshpande A, Zhou H, Gimzewski J. Nanostructural and Transcriptomic Analyses of Human Saliva Derived Exosomes. *PLoS One*. 2010;5(1).
11. Alenquer M, Amorim MJ. Exosome biogenesis, regulation, and function in viral infection. Vol. 7, *Viruses*. 2015. p. 5066–83.
12. Kawikova I, Askenase PW. Diagnostic and therapeutic potentials of exosomes in CNS diseases. *Brain Res* [Internet]. 2015;1617:63–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.09.070>
13. Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2).
14. Kowal J, Tkach M TC. Biogenesis and secretion of exosomes, *Current Opinion in Cell Biology*. *j.ceb*. 2014;Volume 29:116–25.
15. Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2018;19(4):213–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
16. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. 2007;9(6).
17. Mikhail A. Livshits, Elena Khomyakova, Evgeniy G. Evtushenko, Vassili N. Lazarev, Nikolay A. Kulemin, Svetlana E. Semina EVG& VMG. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep*. 2015;17319.
18. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2014;30(1):255–89. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
19. Al SJ et. Deficiency of the tetraspanin CD63 associated with kidney pathology but normal lysosomal function. *Mol Cell Biol*. 2009;29(4):1083–1094.

20. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol.* 2013;113(1):1–11.
21. Thery C, Zitvogel L AS. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:569–79.
22. Suetsugu A, Honma K, Saji S, Moriwaki H, Ochiya T, Hoffman RM. Imaging exosome transfer from breast cancer cells to stroma at metastatic sites in orthotopic nude-mouse models ☆. *Adv Drug Deliv Rev [Internet].* 2013;65(3):383–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.007>
23. Shaohua Yu, Cunren Liu, Kaihong Su, Jianhua Wang, Yuelong Liu, Liming Zhang, Chuanyu Li, Yingzi Cong, Robert Kimberly, William E. Grizzle CF and H-GZ. Tumor Exosomes Inhibit Differentiation of Bone Marrow Dendritic Cells. *J Immunol.* 2007;178 (11)(11):6867–75.
24. Vilella F, Moreno-Moya JM, Balaguer N, Grasso A, Herrero M, Martinez S, et al. Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development [Internet].* 2015;142(18):3210–21. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.124289>
25. Du YM, Zhuansun YX, Chen R, Lin L, Lin Y LJ. Mesenchymal stem cell exosomes promote immunosuppression of regulatory T cells in asthma. *Exp Cell Res.* 2018;1(363):114–20.
26. Peinado, H., Aleckovic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., Garcia-Santos, G., Ghajar, C., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B.A., Callahan, M.K., Yuan, J., Martins, V.R D. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med.* 2012;18:883–891.
27. Kim SM, Yang Y, Oh SJ, Hong Y, Seo M JM. Cancer-derived exosomes as a delivery platform of CRISPR/Cas9 confer cancer cell tropism-dependent targeting. *J Control Release.* 2017;28(266):8–16.

28. Mulcahy, L.A., Pink, R.C., Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*. 2014;3.
29. C. Bonnerot, O. Dhellin M, Movassagh, S. Piperno, C. Robert, V. Serra, N. Valente, J.B. Le Pecq, A. Spatz O, Lantz, T. Tursz, E B. Escudier, T. Dorval, N. Chaput, F. Andre, M.P. Caby, S. Novault, C. Flament C, Leboulaire, C. Borg, S. Amigorena, C. Boccaccio, . Angevin LZ. Melanoma, Vaccination of metastatic The, patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of first phase I clinical trial. *J Transl Med*. 2005;3(10).
30. L. Alvarez-Erviti, Y. Seow, H.F. Yin, C. Betts, S. Lakhal MJW. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol*. 2011;29:341–345.
31. Alvarez-erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhal S, Wood MJA. letters Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2011;29(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1807>
32. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJ et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using nanoparticle tracking analysis. *Nanomedicine*. 2011;7:780–880.
33. Fonta CL, Humbel BM. Correlative microscopy. *Arch Biochem Biophys*. 2015;581(581):98–110.
34. Deschout H et al. Precisely and accurately localizing single emitters in fluorescence microscopy. *Nat Methods*. 2014;11:253–266.
35. Kim D, Deerinck TJ, Sigal YM, Babcock HP. Correlative Stochastic Optical Reconstruction Microscopy and Electron Microscopy. *PLoS One*. 2015;10(4):1–20.
36. Griffiths G HH. Quantitation in immunocytochemistry: correlation of immunogold labeling to absolute number of membrane antigens. *J Histochem Cytochem*. 1986;34:1389–1398.
37. Robinson JM, Takizawa T VD. Applications of gold cluster compounds in

- immunocytochemistry and correlative microscopy: comparison with colloidal gold. *J Microsc.* 2000;199:163–179.
38. Polishchuk RS, Polishchuk E V., Marra P, Alberti S, Buccione R, Luini A, et al. Correlative light-electron microscopy reveals the tubular-saccular ultrastructure of carriers operating between Golgi apparatus and plasma membrane. *J Cell Biol.* 2000;148(1):45–58.
 39. Liss V, Hensel M, Mikrobiologie A. Sample preparation for correlative light and electron microscopy (CLEM) analyses in cellular microbiology. *bio-protocol.* 2015;5:1–16.
 40. Kandela IK, Meyer DA, Oshel PE, Rosa-Molinar E AR. Fluorescence quenching by colloidal heavy metals: implications for correlative fluorescence and electron microscopy studies. *Microsc Microanal.* 2003;9(2):1194–1195.
 41. Takizawa T, Powell RD, Hainfeld JF, Robinson JM. FluoroNanogold: an important probe for correlative microscopy. *J Chem Biol.* 2015;8(4):129–42.
 42. Liss V, Barlag B, Nietschke M, Hensel M. Self-labelling enzymes as universal tags for fluorescence microscopy, super-resolution microscopy and electron microscopy. *Sci Rep [Internet].* 2015;5(November):17740. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26643905>
 43. Grecchi S, Malatesta M. Visualizing endocytotic pathways at transmission electron microscopy via diaminobenzidine photo-oxidation by a fluorescent cell-membrane dye. *Eur J Histochem.* 2014;58(4):6–9.
 44. Boer P De, Hoogenboom JP, Giepmans BNG. Correlated light and electron microscopy : ultrastructure lights up ! review. 2015;12(6):503–14.
 45. Watanabe S, Punge A, Hollopeter G, Willig KI, John R, Davis MW, et al. Protein localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy. *Nat Methods.* 2011;8(1):80–4.
 46. Tokuyasu K. A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol.* 1973;5765(2):551–65.

47. Gmbh SC. Protocol for the Cryopreservation of Cell Lines. 2018.
48. They C, Clayton A, Amigorena S, Raposo G. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006;3.22.1-3.22.29.
49. Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and Characterization of RNA-Containing Exosomes. *J Vis Exp* [Internet]. 2012;(59):1–6. Available from: <http://www.jove.com/details.php?id=3037>
50. Rebecca E. Lane, Darren Korbie, Will Anderson RV& MT. Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing. *Sci Rep.* 2015;5.
51. GmbH CZM. Software Guide ZEN 2 (blue edition) The Shuttle & Find Module.
52. Fabig G, Kretschmar S, Weiche S, Eberle D, Ader M, Kurth T. Labeling of Ultrathin Resin Sections for Correlative Light and Electron Microscopy [Internet]. Vol. 111, BS:MCB. Elsevier; 2012. 75-93 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416026-2.00005-4>
53. Winston Patrick Kuo SJ. Extracellular Vesicles. *Methods and Protocols.* 2017. 1660 p.
54. Jaffre J. Athman, Ying Wang, David J. McDonald, W. Henry Boom CVH and PAW. Bacterial Membrane Vesicles Mediate the Release of Mycobacterium tuberculosis Lipoglycans and Lipoproteins from Infected Macrophages. *J Immunol.* 2015;195(3):1044–53.
55. Chen C, Zong S, Wang Z, Lu J, Zhu D, Zhang Y, et al. Imaging and Intracellular Tracking of Cancer-Derived Exosomes Using Single-Molecule Localization-Based Super-Resolution Microscope. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8:25825–25833.
56. Simpson, R.; Mathivanan S. Extracellular microvesicles: The need for internationally recognised nomenclature and stringent purification criteria. *J Proteom Bioinform.* 2012;5.

57. Wu Y, Deng W, Babb M, Cancer R, Virginia W, Biology C. Exosomes: Improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *Analyst*. 2015;140(19):6631–42.
58. Marion J, Bars R Le, Satiat-jeunemaitre B, Boulogne C. Optimizing CLEM protocols for plants cells : GMA embedding and cryosections as alternatives for preservation of GFP fluorescence in Arabidopsis roots. *J Struct Biol* [Internet]. 2017;198(3):196–202. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2017.03.008>
59. Sokolova V, Ludwig A, Hornung S, Rotan O, Horn PA, Epple M, et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2011;87(1):146–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.05.013>
60. Yueting Wu, Wentao Deng and DJKI. Exosomes: Improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *Analyst*. 2015;140(19):6631–6642.
61. Edgar JR, Manna PT, Nishimura S, Banting G, Robinson MS. Tetherin is an exosomal tether. *Elife*. 2016;5(September):1–19.

8. EKLER

8.1. EK-1 Etik Kurul Belgesi

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU


Konu: Karar hk.
Sayı : 1578

16.06.2017

Sayın Prof.Dr.Alper BAĞRIYANIK,

Kurulumuz tarafından 15.06.2017 tarih ve 3392-GOA protokol numaralı 2017/16-22 karar numarası ile görüşülen “Korelatif Mikroskop ile Veziküler Yapıların Görüntülenmesi” konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan 7.

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUNUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	3392-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/>	AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Korelatif Mikroskop ile Veziküler Yapıların Görüntülenmesi	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Alper BAĞRIYANIK Histoloji ve Embriyoloji A.D	
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input checked="" type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2017/16-22	Tarih:15.06.2017
	Prof.Dr.Alper BAĞRIYANIK'ın sorumlusu olduğu "Korelatif Mikroskop ile Veziküler Yapıların Görüntülenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmının gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

8.2. EK-2 Özgeçmiş



ŞEYDA DEMİR

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	29509001196
Doğum Tarihi	10/09/1983
İletişim Adresi	Dokuz Eylül Üniversitesi. Tıp Fak. Dekanlık Binası. Histoloji -embriyoloji Anabilim
Telefon	(535) 863 60 42
E-posta	ciydademir@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri

- 01 Ekim 2015 - Şu Anda (2 yıl 11 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, HISTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (YL)
- 01 Eylül 2012 - Şu Anda (6 yıl)
Doktora, Doktora, İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ, TÜRKİYE
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
(DR)
- 01 Eylül 2009 - 01 Ağustos 2012 (3 yıl)
Yüksek Lisans, Tezli Program, İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ, TÜRKİYE
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
(YL) (TEZLİ)
Tez Başlığı: Camptotesin İle Apoptozu İndüklenen İnsan Hücrelerinde Aday Mirna
Ların Fonksiyonlarının Belirlenmesi
Tez Konusu: Camptotesin İle Apoptozu İndüklenen İnsan Hücrelerinde Belirlenen
Aday Mirna Ların, Apoptozdaki Rollerini Araştırıldı.
Tarih: 03 Eylül 2010
Tez Danışmanı: BÜNYAMİN AKGÜL
- 01 Eylül 2002 - 01 Eylül 2007 (5 yıl 1 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğrenim, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.5 / 4.0

Deneysel / İşyeri Bilgileri

- 01 Ekim 2015 - Şu Anda (2 yıl 11 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
- 01 Eylül 2013 - 01 Eylül 2015 (2 yıl 1 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, İSTANBUL AREL ÜNİVERSİTESİ

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: Orta)

Ar-Ge Yetkinlik

Ödüller

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, Poster Bildirisi, Korelatif Mikroskopi ile Ekzozomların Görüntülenmesi, Ödül Alınan Kurum: TÜRK HISTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ, TÜRKİYE, 13 Mayıs 2018.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

110T412, Naif CD4+T Hücrelerinden Th17 Fenotipinde Efektör T Hücrelerinin Oluşturulması ve Th17 Farklılaşmasında Rol Oynayan MikroRNA'ların Belirlenmesi, 1001 - Araştırma, Burslu, Sonuçlandı, KBAG - Ki?mya Bi?yoloji? Araştırma Destek Grubu, ARDEB, 09.03.2010, 01.03.2013 - 09.07.2013, 01.10.2010 - 01.04.2014.

BİDEB Destekleri

ŞEYDA DEMİR, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı, Başvurusu Reddedildi, 2014 - 2, 01.10.2014 - 30.09.2017.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0