



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BEYİN KANSER HÜCRELERİNDEN SALINAN EKSTRASELÜLER
VEZİKÜL İÇERİKLERİ ÜZERİNE TEMOZOLOMİDİN ETKİLERİ**

Ezgi KIYGA

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR**

**II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Zelal ADIGÜZEL**

Ocak, 2021

İSTANBUL

Bu çalışma, 25.01.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Betül KARADEMİR
Marmara Üniversite
Tıp Fakülte

Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ
İstanbul Üniversite
Fen Fakülte

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 33460 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Uzun soluklu olmasını düşlediğim akademik hayatımın, ilk basamağını tamamlamak adına yaptığım yüksek lisans eğitimim boyunca öğrendiklerim, yaşadıklarım ve hayatıma dahil olan insanlar bana farklı bir pencereden bakma yetisini kazandırdığı için şükranlarımı sunmak isterim.

Önce lisans tez döneminde sonrasında yüksek lisans eğitimim sürecinde benden yardımını, bilgisini ve anlayışını esirgemeyen, deneyimleriyle yol gösteren, hayatımın en zor kararını alırken dik durmamı sağlayan ve beni cesaretlendiren, bana bu zorlu süreçte danışmanlıktan çok annelik yapan ve her zaman öğrencisi olmaktan gurur duyduğum birinci danışmanım Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR'a; bu süreçte bilimin şüphe duymak olduğunu bana öğreten, çalışmalarım esnasında takıldığım her noktada çıkış yolunu bulmamı sağlayan, keyifli sohbetleri ve söylemleriyle her zaman hayatıma neşe katan ve karakterini kendime örnek aldığım çok sevgili ikinci danışmanım Doç. Dr. Zelal ADIGÜZEL'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Her zaman bir parçası olmaktan mutluluk duyduğum TÜBİTAK, Moleküler Hücre Biyolojisi laboratuvarının değerli hocaları Dr. Yüksel ÇETİN'e ve Dr. Yasemin YILDIZHAN'a hayata ve bilime dair öğrettikleri, benim bu yolda ilerlememi teşvik ettikleri ve keyifli hücre kültürü sohbetleri için; karşılaştığım zorlu süreçlerde benden bilgisini esirgemeyen ve deneyimlerini her zaman benimle paylaşan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ'e; birlikte eğlenerek çalıştığım ve benden arkadaşlığını esirgemeyen kıymetli hocam Arş. Gör. Dr. Elif MERTOĞLU'na; beni bu süreçte destekleriyle hiç yalnız bırakmayan, birçok defa evlerinin kapılarını açan, tüm dertlerimi kendi sıkıntıları bilen ama yaptığım hataları yüzüme vurma cesaretini de gösterebilen, gün geldiğinde dünyanın öteki ucunda bile bir arada olacağım, güzel yemeklerin ve sohbetlerin mimarları Ayşen GÜNGÖR'e, Melike OYUNCAKÇI'ya, Elif ULUTAŞ'a, Ozan TEKİN'e ve çok değerli proje arkadaşım Gamze GÜNGÖR TOPÇU'ya; deney sürecinde yaşadığım zorlukların üstesinden gelmemi sağlayan ve sorularımı bıkmadan yanıtlayan sevgili arkadaşım Aslıhan ŞENGELEN'e ve Yunus AKSÜT'e hayatıma kattıkları tüm değerler için teşekkür ederim.

Arkamda her zaman maddi ve manevi desteklerini hissettiğim, kilometrelerce uzakta olmalarına rağmen yanımda olmayı her daim başarabilen, aldığım her kararda arkamda duran ama tavsiyeleriyle de yol gösteren ve bu süreçte belki de en çok kırdığım en değerlilerimden babam Rasim KIYGA'dan ve annem Nuray KIYGA'dan; hayatımın her zaman vazgeçilmezleri olan ablam Çağla KIYGA'dan ve yeğenim Demir KIYGA'dan hem özür dilerim hem de onlara sonsuz teşekkür ederim.

Ocak 2021

Ezgi KIYGA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	5
2.1. KANSER.....	5
2.1.1. Glioma.....	6
2.1.2. Kanser Çalışmalarında Kullanılan Glioma Modelleri	9
2.1.3. Glioma Tedavisinde Temozolomid.....	9
2.2. HÜCRE DIŞI VEZİKÜLLER	11
2.2.1. Eksozom ve Kanser.....	14
2.3. STRES (ISI ŞOKU) PROTEİNLERİ	18
2.3.1. Stres Proteinlerinin Sınıflandırılması ve İşlevleri.....	18
2.3.2. Ekstrasellüler Hsp'ler.....	20
2.3.3. Stres Proteinleri ve Kanser.....	20
2.4. GLİOMA HÜCRELERİNDE İLAÇ YANITI.....	23
3. MALZEME VE YÖNTEM	26
3.1. GLİOMA HÜCRELERİ VE KÜLTÜRLEME KOŞULLARI	26
3.2. GLİOMA HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİLERİNİN OLUŞTURULMASI.....	28
3.3. SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ.....	28
3.4. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI	29
3.5. HÜCRELERİN TOPLANMASI.....	30
3.6. EKSOZOM İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI.....	31
3.6.1. Eksozom İzolasyonu	31
3.6.2. Eksozomların Kalitatif Olarak Belirlenmesi.....	32
3.6.3. Eksozomların Kantitatif Olarak Belirlenmesi.....	32

3.7. RNA ANALİZLERİ.....	33
3.7.1. Hücresel RNA İzolasyonları	33
3.7.2. Hücresel RNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	34
3.7.3. Eksozomal RNA İzolasyonu	35
3.7.4. Eksozomal RNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	36
3.8. HÜCRESEL VE EKSOZOMAL RNA’LARDAN CDNA SENTEZİ	37
3.9. TEMOZOLOMİD UYGULAMASININ HÜCRELERDEKİ İLAÇ YANITI İLE İLİŞKİLİ GENLERİN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİ.....	38
3.9.1. Analizde Kullanılan Primerlerin Seçimi ve Kontrolü.....	39
3.9.2. Standart Grafik Oluşturulması	40
3.10. PROTEİN ANALİZLERİ.....	41
3.10.1. Hücresel Protein İzolasyonu	41
3.10.2. Eksozomal Proteinlerin İzolasyonu ve Konsantre Edilmesi.....	41
3.10.3. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	42
3.11. ELEKTROFORETİK ANALİZLER	42
3.12. İMMÜNOLOJİK ANALİZLER	44
3.13. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	47
4. BULGULAR.....	48
4.1. U87-MG VE LN229 HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİLERİ	48
4.2. TEMOZOLOMİDİN U87-MG VE LN229 HÜCRE HATLARI ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİSİ.....	49
4.3. EKSOZOM KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI.....	51
4.4. TEMOZOLOMİD UYGULAMASININ İLAÇ YANITI İLE İLGİLİ GENLERİN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİ.....	54
4.5. TEMOZOLOMİD UYGULAMASININ EKSOZOMAL MDM2 VE RAD51 GENLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ.....	56
4.6. HÜCRESEL VE EKSOZOMAL PROTEİN ÖRNEKLERİNİN KONSANTRASYONLARI	61
4.7. İMMUNOLOJİK ANALİZLER	61
4.7.1. Temozolomid Uygulamasının Hücresel Stres Proteinleri Üzerindeki Etkileri.....	62
4.7.2. Temozolomid Uygulamasının Eksozomal Stres Proteinleri Üzerindeki Etkileri	64
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	66
KAYNAKLAR.....	75
EKLER	92
EK 1	92

EK 2	97
EK 3	98
EK 4	99
ÖZGEÇMİŞ	100



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Birincil ve ikincil GBM'nin başlangıcında ve ileri aşamalarında meydana gelen genetik değişiklikler (Kanu ve diğ., 2009).	8
Şekil 2.2: TMZ'nin kimyasal formülü.	10
Şekil 2.3: TMZ'nin direnç mekanizması (Lee, 2016).	11
Şekil 2.4: Hücre dışı veziküllerin sınıflandırılması (Önay-Uçar ve diğ., basımda).	12
Şekil 2.5: Eksozomların moleküler içeriği ve sınıflandırılması (Önay-Uçar ve diğ., basımda).	14
Şekil 3.1: A) U87-MG (Başlangıç hücre sayısı 5×10^3) ve B) LN229 (Başlangıç hücre sayısı 1×10^4) hücre hatlarına ait 24 saatlik kültürlerin invert mikroskop altındaki görüntüleri (100X).	27
Şekil 4.1: Başlangıç hücre sayıları 0.5×10^5 hücre/mL ve 1×10^5 hücre/mL olan U-87 MG (A) ve LN229 (B) insan glioma hücrelerine ait çoğalma eğrileri.	49
Şekil 4.2: TMZ'nin U87-MG(A) ve LN229(B) hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde uygulanmasının, hücre canlılığı üzerine etkileri (24, 48 ve 72 saatlik uygulama için R^2 değerleri sırasıyla U87- MG için 0.808, 0.955, 0.971 ve LN229 için 0.834, 0.945, 0.963).	50
Şekil 4.3: U87-MG (A) ve LN229(B) hücrelerinden kökenlenen eksozomlara ait markır görüntüleri (Kontrol: Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, TMZ 100: 100 μ M TMZ uygulanan hücre grubu, TMZ 200: 200 μ M TMZ uygulanan hücre grubu).	51
Şekil 4.4: Eksozomal proteinlerdeki CD63 proteinleri (0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 ng/mL) kullanılarak oluşturulan standart grafik (R^2 değeri 0.998).	53
Şekil 4.5: U87-MG (A) ve LN229 (B) hücrelerine farklı konsantrasyonlarında uygulanan TMZ'nin, hücrelerden salınan eksozom miktarları üzerindeki etkileri (Kontrol: Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, TMZ 100: 100 μ M TMZ uygulanan hücre grubu, TMZ 200: 200 μ M TMZ uygulanan hücre grubu).	53
Şekil 4.6: U87-MG hücrelerine TMZ uygulanmasının RAD51 gen ekspresyonu üzerindeki etkileri (** $p < 0.01$, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir.) (Kontrol: Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, TMZ 100: 100 μ M TMZ uygulanan hücre grubu, TMZ 200: 200 μ M TMZ uygulanan hücre grubu).	55

Şekil 4.7: LN229 hücrelerine TMZ uygulanmasının MDM2 gen ekspresyonu üzerindeki etkileri (** $p < 0.001$ ve **** $p < 0.0001$, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir.) (Kontrol: Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, TMZ 100: 100 μM TMZ uygulanan hücre grubu, TMZ 200: 200 μM TMZ uygulanan hücre grubu).....	56
Şekil 4.8: U87-MG ve LN229 hücrelerinden izole edilen eksozomal RNA'ların Agilent Bioanalyzer görüntüsü (Kontrol: Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, TMZ 100: 100 μM TMZ uygulanan hücre grubu, TMZ 200: 200 μM TMZ uygulanan hücre grubu).....	57
Şekil 4.9: Hücresele RAD51 ve MDM2 genlerinin PZR ürünlerinin spesifitesi ile ilgili görüntüler A) Erime Eğrisi Analizi Grafiği B) Gen Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.	58
Şekil 4.10: A) Eksozomal RAD51 genine ait ekspresyonal değişimi hesaplamak için oluşturulan hücresele RAD51 standart grafiği (R^2 değeri 0.994). B) Eksozomal MDM2 genine ait ekspresyonal değişimi hesaplamak için oluşturulan hücresele MDM2 standart grafiği (R^2 değeri 0.985).	59
Şekil 4.11: Eksozomal MDM2'nin belirlenmesine yönelik yapılan PZR analizinde tek ürün olduğunu gösteren erime eğrisi grafiği.	60
Şekil 4.12: LN229 hücrelerine uygulanan TMZ'nin hücrelerden salınan eksozomlardaki MDM2 gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri (** $p < 0.001$ ve **** $p < 0.0001$, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir.) (Kontrol: Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, TMZ 100: 100 μM TMZ uygulanan hücre grubu, TMZ 200: 200 μM TMZ uygulanan hücre grubu).	60
Şekil 4.13: Sığır serum albumini (BSA) standartları (25, 125, 250, 500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g/mL}$) kullanılarak oluşturulan standart grafik (R^2 değeri 0.995).	61
Şekil 4.14: U87-MG (A) ve LN229 (B) hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan TMZ'nin Hsp60 ve GAPDH proteinleri üzerine etkisi (Kontrol: Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, TMZ 100: 100 μM TMZ uygulanan hücre grubu, TMZ 200: 200 μM TMZ uygulanan hücre grubu).	62
Şekil 4.15: U87-MG (A) ve LN229 (B) hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan TMZ'nin Hsp70 ve GAPDH proteinleri üzerine etkisi ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$ ve $***p < 0.001$, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir.) (Kontrol: Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, TMZ 100: 100 μM TMZ uygulanan hücre grubu, TMZ 200: 200 μM TMZ uygulanan hücre grubu).	63
Şekil 4.16: LN229 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan TMZ'nin Hsp27 ve GAPDH proteinleri üzerine etkisi ($**p < 0.01$, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir.) (Kontrol: Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, TMZ 100: 100 μM TMZ uygulanan hücre grubu, TMZ 200: 200 μM TMZ uygulanan hücre grubu).	64

Şekil 4.17: U87-MG (A) ve LN229(B) hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan TMZ'nin eksozomal Hsp60 proteini üzerine etkisi (* $p < 0.05$, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir.) (Kontrol: Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, TMZ 100: 100 μM TMZ uygulanan hücre grubu, TMZ 200: 200 μM TMZ uygulanan hücre grubu).....	65
Şekil 4.18: U87-MG (A) ve LN229(B) hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan TMZ'nin eksozomal Hsp70 proteini üzerine etkisi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir.) (Kontrol: Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, TMZ 100: 100 μM TMZ uygulanan hücre grubu, TMZ 200: 200 μM TMZ uygulanan hücre grubu).	65
Şekil 0.1: RAD51 genine ait çoğaltılan bölge.....	97
Şekil 0.2: MDM2 genine ait çoğaltılan bölge.	97
KŞekil 0.3: U87-MG hücrelerinden izole edilen RNA'ların başarılı bir şekilde cDNA'ya çevrildiğini gösteren gerçek zamanlı PZR sonuçları A) Threshold Cycle grafiği B) Erime Eğrisi Analiz Grafiği.....	98
Şekil 0.4: LN229 hücrelerinden izole edilen RNA'ların başarılı bir şekilde cDNA'ya çevrildiğini gösteren gerçek zamanlı PZR sonuçları A) Threshold Cycle grafiği B) Erime Eğrisi Analiz Grafiği.....	98
Şekil 0.5: Eksozomal RAD51 geninin belirlenmesine yönelik analizlerde primer dimer oluşumunu gösteren grafik.	99

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: 2020 kanser istatistiklerine göre erkeklerde ve kadınlarda en yaygın görülen kanser türleri ve ölüm oranlarına ait veriler.	6
Tablo 3.1: Tez kapsamında kullanılan kültür kapları ve ekilen U87-MG hücre sayıları.	30
Tablo 3.2: Tez kapsamında kullanılan kültür kapları ve ekilen LN229 hücre sayıları.....	30
Tablo 3.3: cDNA sentezi için kullanılan iScript cDNA kitinin içeriği ve reaksiyon başına kullanılan hacimler (Reaksiyon başına toplam hacim 20 µL olmalıdır.).	37
Tablo 3.4: cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon protokolü.	38
Tablo 3.5: Gerçek zamanlı PZR analizinde gerekli reaktifler ve kullanılan hacimler (Toplam hacim 25 µL olmalıdır.).	38
Tablo 3.6: Gerçek zamanlı PZR uygulaması için gerekli koşullar.	39
Tablo 3.7: Glioma hücrelerinde ekspresyon seviyeleri değişen genlerin primer dizileri.	40
Tablo 3.8: SDS-PAGE’de kullanılan çözeltiler ve içerikleri.	43
Tablo 3.9: SDS-PAGE ayırma ve yükleme jeli içerikleri (2 jel için gerekli değerler).....	44
Tablo 3.10: Aktarım işlemi, Western blotlama ve membran “stripping” için kullanılan tampon çözeltileri ve içerikleri.	45
Tablo 3.11: Tez kapsamında kullanılan primer ve sekonder antikorlar.	46
Tablo 4.1: U87-MG ve LN229 hücrelerine uygulanan TMZ’nin IC ₅₀ değerleri.....	51
Tablo 4.2: TMZ uygulaması sonucu U87-MG ve LN229 hücrelerinden izole edilen RNA’ların miktar ve kalite tayini (Kontrol: Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, TMZ 100: 100 µM TMZ uygulanan hücre grubu, TMZ 200: 200 µM TMZ uygulanan hücre grubu).	54
Tablo 4.3: Agilent Bioanalyzer sonuçlarına göre U87-MG ve LN229 hücrelerinden izole edilen ekzozomal RNA’ların konsantrasyonları (Kontrol: Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, TMZ 100: 100 µM TMZ uygulanan hücre grubu, TMZ 200: 200 µM TMZ uygulanan hücre grubu).	57
Tablo 0.1: Tez kapsamında analizi yapılan genler.	92

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

%	: Yüzde
~	: Yaklaşık
<	: Küçüktür
>	: Büyüktür
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
cm ²	: Santimetre kare
dk	: Dakika
g	: Gram
kDa	: Kilo Dalton
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
°C	: Derece Santigrat
pg	: Pikogram
V	: Volt
β	: Beta

Kısaltmalar Açıklama

AIC	: 5-aminoimidazol-4-karboksamid
ALIX	: “Apoptosis-linked gene 2 - interacting protein X”
APGN	: Alkilpurin-DNA-N-glikosilaz
APS	: Amonyum persülfat (“Ammonium persulfate”)
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (“American Type Culture Collection”)
BCA	: Bikinkoninik Asit (“Bicinchoninic Acid”)
BER	: Baz Kesip Çıkarma Onarımı (“Base Excision Repair”)

BSA	: Sığır Serum Albumini (“Bovine Serum Albumin”)
DMEM	: Dulbecco’nun Modifiye Eagle Besiyeri (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”)
DMSO	: Dimetil Sülfoksit (“Dimethyl Sulfoxide”)
ECM	: Hücre Dışı Matris (“Extracellular matrix”)
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit (“Ethylenediaminetetraacetic acid”)
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (“Epidermal Growth Factor Receptor”)
ELISA	: Enzim-Bağlı-İmmün Assay (“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”)
ESCRT	: “Endosomal Sorting Complexes Required for Transport”
EV	: Hücre Dışı Vezikül (“Extracellular vesicle”)
FBS	: Fetal Sığır Serumu (“Fetal Bovine Serum”)
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (“U.S. Food and Drug Administration”)
GAPDH	: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz (“Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase”)
GBM	: Glioblastoma Multiforme
GPC-1	: “Glypican-1”
HGNC	: İnsan Genomu Organizasyonu Gen Nomenklatür Komitesi (“The Human Genome Organisation (HUGO) Gene Nomenclature Committee”)
HRP	: Yaban Turpu Peroksidazı (“Horseradish Peroxidase”)
HSP	: Isı Şoku Proteini (“Heat Shock Protein”)
IC₅₀	: %50 İnhibisyona Neden Olan Konsantrasyon (“The Half Maximal Inhibitory Concentration”)
ILV	: İntralüminal Vezikül (“Intraluminal Vesicle”)
LFA-1	: Lenfosit Fonksiyonuyla İlişkili Antijen-1
LOH	: Heterozigotluk Eksikliği (“Loss of heterozygosity”)
MET	: Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptörü (“Hepatocyte Growth Factor Receptor”)
MGMT	: O ⁶ -Metilguanin DNA Metiltransferaz (“O ⁶ -Methylguanine DNA Methyltransferase”)
MHC	: Majör Histokompatibilite Kompleksi
MIF	: Göç Engelleyici Faktör (“Migration Inhibitory Factor”)
MMP	: Matriks Metalopeptidaz (“Matrix metallopeptidase”)
MMR	: Yanlış Eşleşme Onarımı (“Mismatch Repair”)
MSDC	: Miyeloid Türevi Baskılayıcı Hücre (“Myeloid-Derived Suppressor Cell”)
MTIC	: 5-(3-metiltriazen-1-il) imidazol-4-karboksamid

MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür (“3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide”)
MVC	: Multiveziküler Cisimcik
MVE	: Multiveziküler Endozom (“Multivesicular Endosomes”)
MYR	: Mirisetin
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NK	: Doğal Öldürücü Hücreler (“Natural Killer”)
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi (“Polyacrylamide Gel Electrophoresis”)
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (“Phosphate Buffered Saline”)
PMSF	: Fenilmetilsülfonil Florür
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
sHSP	: Küçük Isı Şoku Proteinleri (“Small Heat Shock Proteins”)
TBST	: Tween 20 içeren Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi (“Tris Buffered Saline with Tween 20”)
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (“Tetramethylethylenediamine”)
TMZ	: Temozolomid (“Temozolomide”)
TSG101	: “Tumor Susceptibility Gene 101”
WA	: Withaferin A
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (“World Health Organization”)

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BEYİN KANSER HÜCRELERİNDEN SALINAN EKSTRASELÜLER VEZİKÜL İÇERİKLERİ ÜZERİNE TEMOZOLOMİDİN ETKİLERİ

Ezgi KIYGA

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR

II. Danışman : Doç. Dr. Zelal ADIGÜZEL

Kanser, dünya genelinde ölüme neden hastalıklar arasında ilk sıralarda rapor edilmektedir ve moleküler mekanizmalarının tam olarak anlaşılması için *in vitro* deneyler büyük önem taşımaktadır. Tüm kanser türleri arasında beyin tümörleri yaygın olarak gözlemlenmemelerine rağmen glioblastomalar (GBM), yetişkinlerde en kötü huylu ve en hızlı seyreden primer beyin tümörlerindedir. Hastalara uygulanan tüm tedavilere rağmen ortalama yaşam süresi 14.6 aydır. GBM tedavisinde karşılaşılan en büyük zorluklar kan beyin bariyerinin varlığı ve tedavi sonrası gelişen dirençtir. Bir kemoterapi ajanı olan temozolomid yapısı nedeni ile kan beyin bariyerini geçebildiğinden, GBM tedavisinde kullanılan önemli bir terapötiktir.

Son zamanlarda yapılan araştırmalar kanser hücrelerine uygulanan ilaçların, farklı süreçlerde görev alan (apoptoz, DNA hasar yanıtı, hücre döngüsü regülasyonu, stres yanıtı, tümör oluşumu ve baskılanması) genlerin ekspresyon seviyesini değiştirdiğini belirtmektedir. Bu genlerdeki ekspresyonel artış genellikle tedaviye karşı direnç ile ilişkilendirilmektedir. Tedavinin başarı

şansını arttırmak amacıyla bu genlerin ekspresyon seviyelerinin, baskılanması kullanılan önemli stratejilerdendir.

Ekstrasellüler veziküllerin en alt birimini oluşturan eksozomlar hücreler arası iletişimde, sinyal iletiminde ve kanser dahil birçok hastalığın patolojik sürecinde rol oynamaktadır. Eksozomlar sahip oldukları çeşitli nükleik asit, miRNA, mRNA, protein (bazı stres proteinleri (Hsp'ler) dahil) içerikleri sayesinde kanser progresyonunda, metastazında, invazyonunda ve direnç oluşumunda görev almaktadır. Bu nedenle kanser hücrelerinden salınan eksozom içeriklerinin terapötik bir hedef olabileceği düşünülmektedir.

Tez kapsamında kanser ilacı olarak kullanılan temozolomid U87-MG ve LN229 insan glioblastoma hücrelerine uygulanarak, öncelikle hücre içerisindeki farklı stres proteinlerinin ve çeşitli RNA'ların ekspresyon seviyeleri üzerine olan etkileri belirlenmiş, daha sonra belirli hücre protein ve RNA'ların seviyeleri bu hücre hatlarından besiyerine salınan EV içerikleriyle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu bağlamda öncelikle TMZ'nin U87-MG ve LN229 insan glioma hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiş ve belirli TMZ konsantrasyonlarında hücrelere uygulanarak hücre içindeki stres proteinlerinin ve 92 gene ait RNA seviyelerinin ne düzeyde etkilendiği yapılan ekspresyon çalışmalarıyla saptanmıştır. Sonraki aşamada GBM hücrelerinden besiyerine salınan eksozomların izolasyonu ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve ilaç uygulaması sonrasında seçilen proteinlerin ve RNA'ların anlatım seviyeleri değerlendirilmiştir. Yapılan deneylerde RAD51 gen ekspresyonunun sadece U87-MG hücrelerinde, MDM2 gen ekspresyonunun ise hem LN229 hücrelerinde hem de bu hücrelerden kökenlenen eksozomlarda arttığı saptanmıştır. İmmünojenik analizler TMZ uygulamasının iki glioma hücresinde de Hsp70 ekspresyonunu arttırdığını, Hsp27 ekspresyonunu ise sadece LN229 hücrelerinde arttırdığını göstermiştir. TMZ uygulamasının glioma hücrelerinden kökenlenen eksozomlardaki proteinler üzerine etkileri incelendiğinde, Hsp60 ve Hsp70 ekspresyonlarının arttığı belirlenmiştir.

Bu tez kapsamında elde edilen bulgular, glioblastoma hastalarının tedavisinde yenilikçi yaklaşımların geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Ocak 2021, 119 sayfa.

Anahtar kelimeler: Glioma, Ekstrasellüler veziküller, Temozolomid, HSP.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

EFFECTS OF TEMOZOLOMIDE ON EXTRACELLULAR VESICLE CONTENTS RELEASED FROM BRAIN CANCER CELLS

Ezgi KIYGA

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR

Co-Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Zelal ADIGÜZEL

Cancer, is one of the most prominent member of the diseases that causes deaths worldwide and *in vitro* experiments are of paramount importance to elucidate its molecular mechanisms. Although brain tumors are not commonly observed among all types of cancer, glioblastomas (GBM) are the most malignant and the fastest-progressing primary brain tumor in adults. Despite all the treatments applied to the patients, the average life expectancy is 14.6 months. The main difficulties encountered in GBM treatment are the presence of the blood brain barrier and resistance that occurs after treatment. Temozolomide, a chemotherapy agent, is an important therapeutic used in the treatment of GBM, as it can cross the blood brain barrier due to its structure.

Recent studies have indicated that drugs applied to cancer cells can change the expression levels of some genes involved in different processes such as apoptosis, DNA damage response, cell

cycle regulation, stress response, tumor formation and suppression. Increased expression of these genes is generally associated with resistance to treatment. Suppression of the expression levels of these genes is one of the main strategies used in order to increase the chance of success of the treatment.

Exosomes, which forms the smallest subgroup of extracellular vesicles known so far, play a role in intercellular communication, signal transmission and pathological processes of many diseases, including cancer. Exosomes can involve in cancer progression, metastasis, invasion and resistance formation through their various nucleic acid, miRNA, mRNA, protein (including some stress proteins (Hsp)) contents. Therefore, exosome contents released from cancer cells are considered to be a therapeutical target.

Within the scope of the thesis, by applying temozolomide, which is used as a cancer drug, to human glioblastoma cells (U87-MG and LN229), primarily we determined the expression levels of different stress proteins and various RNAs in the cell and then the levels of certain cellular proteins and RNAs were compared with the EV contents released from these cell lines into the medium. In this context, firstly, the cytotoxic effects of TMZ on U87-MG and LN229 human glioma cell lines were evaluated and by applying certain TMZ concentrations to cells, the level of stress proteins and RNA levels of 92 genes in the cells were detected by expression studies. In the next stage, the isolation and characterization studies of exosomes released from GBM cells into the medium were carried out and expression levels of selected proteins and RNAs after drug administration were evaluated. In the experiments, it was determined that RAD51 gene expression increased only in U87-MG cells, while MDM2 gene expression increased both in LN229 cells and in exosomes originating from these cells. Immunological analysis showed that TMZ administration increased Hsp70 expression in both glioma cells, while Hsp27 expression increased only in LN229 cells. When the effects of TMZ application on proteins in exosomes originating from glioma cells were examined, it was determined that Hsp60 and Hsp70 expressions increased.

The findings obtained within the scope of this thesis will contribute to the development of innovative approaches in the treatment of glioblastoma patients.

January 2021, 119 pages.

Keywords: Glioma, Extracellular vesicles, Temozolomide, HSP.

1. GİRİŞ

Farklı doku ve organlarda kontrolsüz hücre bölünmesi sonucunda oluşan kanser, bulunduğu doku veya organa göre spesifik olarak isimlendirilmekte ve dünya genelinde neden olduğu ölüm oranlarıyla önemli bir sağlık problemi olarak kabul edilmektedir. Popülasyonda görülme sıklıkları ve ölüm oranları açısından farklı kanser tiplerinin ortaya çıktığı bilinmektedir (Siegel ve diğ., 2020). Beyin ve diğer sinir sistemi tümörleri ölüm oranları açısından değerlendirildiğinde, en yaygın görülen kanser türleri arasında yer almaktadır. Merkezi sinir sistemi tümörleri arasında yer alan ve glial hücrelerden kaynaklanan glioblastoma multiforme (GBM), erişkinlerde gözlemlenen en malign beyin tümörüdür (Rosell ve diğ., 2008). Tüm kanserlerde olduğu gibi GBM hücrelerinde de anjiyogenez, invazyon, yaşam sinyallerinin aktivasyonunda artış, kontrolsüz çoğalma ve apoptoza direnç gelişimi görülmektedir (Adamson ve diğ., 2009; Krakstad ve Chekenya, 2010). Günümüzde GBM için uygulanan standart tedavi biçimleri; cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir (Adamson ve diğ., 2009; Omay ve Vogelbaum, 2009). Tümörün tedaviye yanıtı hastadan hastaya değişmektedir. Cerrahi tekniklerdeki gelişmelere, radyoterapi ve kemoterapi tedavilerindeki ilerlemelere rağmen maalesef prognoz oldukça kötü olup, GBM hastalarının ortalama sağkalım süresi yaklaşık 15 aydır. Hastaların yalnızca %3-5'lik bir bölümü 3 yıldan daha uzun süre yaşamaktadır (Krex ve diğ., 2007).

Bir DNA alkilleyici ajan olarak kemoterapide kullanılan temozolomid (TMZ), kan-beyin bariyeri geçebilme özelliği nedeniyle GBM hastalarının tedavileri için uzun süredir kullanılmaktadır. TMZ, DNA'nın purin bazlarına (O⁶-guanin, N⁷-guanin ve N³-adenin) bir metil grubu sağlayarak, hücre döngüsünün G2/M fazında durmasını indüklemekte ve apoptoza neden olmaktadır. TMZ'nin bu etkinliğinde MGMT (O⁶-Metilguanin DNA metil transferazın), Yanlış eşleşme onarımı ("Mismatch Repair System", MMR) ve Baz kesip çıkarma onarımı ("Base Excision Repair", BER) gibi DNA tamir sistemleri görev almaktadır (Marchesi ve diğ., 2007). Bu sistemlerin hatalı çalışması hücrelerde TMZ'ye karşı direnç oluşumunu tetiklemektedir (Yuan ve diğ., 2012). Bu durum, başarılı bir tedavinin önünde büyük engeller oluşturmaktadır.

Hücrel iletişim, çok hücreli organizmalardaki çeşitli aktivitelerin koordine edilmesinde, düzenlenmesinde ve doku/organların gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (Raposo ve

Stoorvogel, 2013). Hücreler, sıklıkla hücrel homeostazın korunması ve/veya hücre dışı ortamdaki patojenlere yanıt için, bilgi alışverişinde bulunmaktadır. Ancak yapılan son çalışmalar, hücrel mesaj iletiminde, ekstrasellüler alana salgılanan hücre dışı veziküllerin (“Extracellular vesicles”, EV’ler) de görev alabileceğini göstermektedir (Ratajczak ve diğ., 2006). EV’ler, plazma membranından doğrudan ya da dolaylı olarak oluşabilen ve serum, tükürük, idrar ya da beyin omirilik sıvısı (BOS) gibi vücut sıvılarında bulunabilen partiküllerdir. Bu veziküller kargo içerikleri, büyüklükleri, plazma membranından oluşum şekilleri ve sekresyon mekanizmaları dikkate alınarak **mikroveziküller**, **eksozomlar** ve **apoptotik cisimler** olmak üzere 3 temel grupta sınıflandırılmaktadır. Eksozomlar diğer EV tiplerine kıyasla patolojik ve fizyolojik süreçlerde önemli görevler üstlenmektedir. Eksozomlar hakkındaki ilk bulgular, bu partiküllerin hücreden atık uzaklaştırmada görevli olduğu yönünde iken; yapılan çalışmalar hücreler arası haberleşme, sinyal iletimleri gibi önemli rollerde kullanılmak üzere, nükleik asitler, proteinler, miRNA, mRNA, nükleoproteinler ve çeşitli enzimler taşıdıklarını ortaya koymaktadır (Van der Pol ve diğ., 2012; Raposo ve Stoorvogel, 2013). Boyutları 30-100 nm arasında değişen eksozomlar sahip oldukları içerikler sayesinde nörodejeneratif bozukluklar ve kanser dahil birçok hastalıkta etkili olmaktadır (Akers ve diğ., 2013; Zhang ve diğ., 2015). Özellikle tümör hücrelerinden kökenlenen eksozomlar, içeriklerindeki onkojenik sinyal proteinleri ve nükleik asitler aracılığıyla proliferasyonda, farklılaşmada, anjiyogenezde, metastazda ve ilaç direncinde görev almaktadır. Yapılan bir çalışmada, GBM hücrelerinin tümör öncülü olan glia hücrelerinden kökenlenen ekstrasellüler veziküllerin, hastalık tanısında kullanılabilir mutant RNA ve proteinleri taşıdığı gösterilmiştir (Skog ve diğ., 2008). Ekstrasellüler veziküllerin sahip oldukları proanjiyojenik mRNA ve EGFRvIII içerikleri ile GBM’de endotelial proliferasyonu uyardığı ve bu sayede tümör hücreleri için daha uygun mikroçevre sağladığı farklı bir çalışmada rapor edilmiştir (Al-Nedawi ve diğ., 2008). Liu ve arkadaşları (2020) eksozomal miR-139-3p’nin kolorektal kanser hastalarının metastaz takibinde önemli bir biyobelirteç olabileceğini bildirmiştir. Eksozomal nükleik asitler kadar eksozomal proteinlerde kanser tanısında kullanılabilir potansiyeli taşıyan araçlardır. Bununla birlikte eksozomal proteinlerin hücreler arasında transfer edilebilmesi tümör ilerlemesini kolaylaştırmaktadır (Al-Nedawi ve diğ., 2008; Demory Beckler ve diğ., 2013).

Stres proteinleri (Hsp’ler) evrimsel olarak korunmuş ve tüm türlerde var olan büyük bir protein ailesidir. Hsp’ler HSPA (HSP70), HSPB (küçük HSP), HSPC (HSP90), HSPH (HSP110) ve

DNAJ (HSP40) olarak, insan şaperonin aileleri ise HSPD/E (HSP60/HSP10) ve CCT (TRiC) olarak sınıflandırılmaktadır (Kampinga ve diğ., 2009). Normal koşullar altında hücrede farklı fonksiyonlara sahip olan bu protein grubu radyasyon, oksidatif/iskemik stres, toksinler, çevresel kirlenmeler, ağır metaller, inflamasyon ve kemoterapi gibi çeşitli stres faktörlerine bir cevap olarak hücrede indüklenmektedir (Papp ve diğ., 2003; Garrido ve diğ., 2006; Jago ve diğ., 2013; Lianos ve diğ., 2015). Farklı kanser türlerinde normal hücrelere kıyasla yüksek ekspresyon seviyesine sahip Hsp'ler, hastalığın aşamalarını ve agresifliğini belirlemede kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu protein grubu tümör hücresi proliferasyonu, farklılaşması, istilası, metastazı ve ilaç direnci gibi çeşitli aşamalarda da rol oynamaktadır (Calderwood ve diğ., 2006).

Hsp'ler hücrenin çekirdek, sitoplazma, membran, mitokondri ve endoplazmik retikulum dahil farklı kısımlarında bulunabilmelerine rağmen, eksozom sekresyon yolu ile ekstrasellüler ortama da salgılanabilmektedir (De Maio, 2014). Başlangıçta sitoprotektif rolleri ile tanımlanan intrasellüler Hsp'lere artık lokalizasyonlarına bağlı olarak, yeni ve farklı görevler atfedilmektedir. Intrasellüler Hsp70 ve Hsp90 hücrede koruyucu bir etkiye sahipken, ekstrasellüler Hsp70 immünomodülasyonda ve kanser hücrelerinin immün yanıtında önemli bir rol oynamaktadır (Bausero ve diğ., 2005). Mikrovesikül içinde bulunan Hsp70 makrofajların aktifleşmesinde görev alırken, invaziv kanserlerden eksozom içinde salınan Hsp90, kanser hücrelerinde migrasyonu arttırmaktadır (McCready ve diğ., 2010, Vega ve diğ., 2008). Bununla birlikte eksozomal Hsp'lerin farklı kanser türlerinin tanısında biyobelirteç olarak kullanılabilmesi, yapılan birçok çalışmada bildirilmektedir (Campanella ve diğ., 2015; Gobbo ve diğ., 2015; Weeraphan ve diğ., 2019; Wyciszkievicz ve diğ., 2019). Bu çalışmalarda eksozomal Hsp'ler, çalışmaların odak noktasını oluşturmaktadır.

Bu tez çalışmasında iki farklı glioma hücresine (U87-MG ve LN229) uygulanan TMZ'nin hücresel ve eksozomal bazı mRNA'lar ve proteinler üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla, öncelikle TMZ uygulamasının U87-MG ve LN229 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve tezin devam çalışmaları için uygun dozlar seçilmiştir. TMZ'nin seçilen dozları U87-MG ve LN229 hücrelerine uygulanarak çeşitli stres proteinleri ve RNA'lar üzerindeki etkileri kontrol grubu ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir. TMZ uygulaması sonrasında bu hücrelerin ekstrasellüler alana salgıladıkları eksozomların izolasyon çalışmaları gerçekleştirilerek, eksozom karakterizasyon

alışmaları kalitatif ve kantitatif olarak yapılmıştır. TMZ uygulaması ile glioma hucelerinde ekspresyon seviyesi anlamlı olarak değişen stres proteinleri ve RNA'lar, eksozom duzeyinde de incelenerek, tez kapsamında her iki huce hattından elde edilen analiz sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak bu kapsamda yapılan tum alışmalar, TMZ'nin insan glioma huce hatlarında ve onlardan koken alan eksozomlarda direnç oluşumunu tetikleyecek farklı gen ve proteinlerin ekspresyon seviyelerini değerlendirerek, kanserde tedavi yanıtını araştırmak için umut verici yeni bir hedefin ortaya konması amacını taşımaktadır.





2. GENEL KISIMLAR

2.1. KANSER

Dünyada yaklaşık her 6 ölümden birinin, ülkemizde ise her 5 ölümden birinin sebebi olarak rapor edilen kanser, dünya çapında ve ülkemizde ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (World Health Organization,2018; TÜİK, 2016). 2018 yılına ait kanser verilerine göre dünya genelinde çeşitli kanser türleri dolayısıyla hayatını kaybeden kişi sayısı yaklaşık 9.6 milyondur ve bu ölümlerin ~%70'i düşük ya da orta gelirli ülkelerde gerçekleşmiştir. Bununla birlikte kansere neden olan etmenler arasında yer alan yüksek vücut kitle indeksi, düşük meyve ve sebze tüketimi, fiziksel aktivite eksikliği, tütün ve alkol kullanımının kanserden ölümlerin yaklaşık üçte birine sebep olduğu bildirilmiştir (World Health Organization, 2018).

2020 kanser istatistik raporuna göre; erkeklerde prostat, akciğer, bronş, kolon ve rektum kanserleri tüm kanser vakalarının %43'ünü oluşturmakta ve tahmini olarak erkeklerde ölüm vakalarının %42'sine karşılık gelmektedir. Kadınlarda en sık gözlemlenen kanserler ise meme, akciğer, bronş, kolon ve rektum kanserleri olup; meme kanseri tüm vakaların ~%30'unu oluşturmaktadır. Cinsiyete bağlı olarak en sık gözlemlenen kanserler ve ölüm oranları Tablo 2.1'de verilmiştir. Tabloya ait veriler incelendiğinde, beyin ve diğer sinir sistemi tümörleri her iki cinsiyette de en sık gözlemlenen kanser türlerinden olmamasına rağmen, ölüm oranları açısından bakıldığında yaygın görülen kanser türleri arasında yer almaktadır. Aynı raporda 2020 yılında beyin ve diğer tümörlerden kaynaklanacak tahmini ölüm sayısının 18.020 olacağı bildirilmektedir (Siegel ve diğ., 2020). Bununla birlikte, gelecek 20 yıl içerisinde kanser için beklenen tahmini vaka sayısının 30 milyonun üzerinde olması beklenmektedir (IARC, 2020). Bu doğrultuda kanserin teşhisi ve tedavisinde kullanılabilecek yeni yöntem ve uygulamaların geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir.

Tablo 2.1: 2020 kanser istatistiklerine göre erkeklerde ve kadınlarda en yaygın görülen kanser türleri ve ölüm oranlarına ait veriler (Siegel ve diğ., 2020).

Tahmini Yeni Vakalar						
Erkek - Kadın						
Prostat	191.930	%21		Meme	276.480 %30	
Akciğer & bronş	116.300	%13		Akciğer & bronş	112.520 %12	
Kolon & rektum	78.300	%9		Kolon & rektum	69.650 %8	
Mesane	62.100	%7		Rahim	65.620 %7	
Melanoma	60.190	%7		Tiroid	40.170 %4	
Böbrek & böbrek pelvisi	45.520	%5		Melanoma	40.160 %4	
Hodgkin dışı lenfoma	42.380	%5		Hodgkin dışı lenfoma	34.860 %4	
Ağız boşluğu ve farenks	38.380	%4		Böbrek & böbrek pelvisi	28.230 %3	
Lösemi	35.4700	%4		Pankreas	27.200 %3	
Pankreas	30.400	%3		Lösemi	25.060 %3	
Tümü	893.660	%100		Tümü	912.930 %100	
Tahmini Ölümler						
Erkek - Kadın						
Akciğer & bronş	72.500	%23			Akciğer & bronş	63.220 %22
Prostat	33.330	%10	Meme		42.170 %15	
Kolon & rektum	28.630	%9	Kolon & rektum		24.570 %9	
Pankreas	24.640	%8	Pankreas		22.410 %8	
Karaciğer ve safra yolu	20.020	%6	Over		13.940 %5	
Lösemi	13.420	%4	Rahim		12.590 %4	
Özofagus	13.100	%4	Karaciğer ve safra yolu		10.140 %4	
Mesane	13.050	%4	Lösemi		9.680 %3	
Hodgkin dışı lenfoma	11.460	%4	Hodgkin dışı lenfoma		8.480 %3	
Beyin & sinir sistemi	10.190	%3	Beyin & sinir sistemi		7.830 %3	
Tümü	321.160	%100	Tümü		285.360 %100	

2.1.1. Glioma

Glioma, genel olarak birincil beyin tümörlerini tanımlamak için kullanılan bir terimdir ve merkezi sinir sistemi tümörleri içinde yer almaktadır (Huang ve diğ. 2017). 2016 yılında Dünya Sağlık Örgütü ("World Health Organization", WHO) merkezi sinir sistemi tümörlerine ait moleküler bilgileri, histolojik verilerle bütünleştirerek yeniden sınıflandırmıştır. Merkezi sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırılması diffüz astrositik ve oligodendrogliyal tümörler (diffüz astrositoma, anaplastik astrositoma, glioblastoma, oligodendroglioma, anaplastik oligodendroglioma, oligoastrositoma, anaplastik oligoastrositoma), ependimal tümörler ve lenfomalar başta olmak üzere 16 başlık altında toplanmaktadır (Louis ve diğ., 2016).

Astroitik tümörler grubu içinde yer alan gliomaların en malignant tipi **glioblastoma multiform** (GBM) olarak adlandırılmaktadır. “Glioblastoma multiforme” terimi, ilk defa Cushing ve Bailey tarafından geliştirilen 1926 sınıflandırma sisteminde kullanılmıştır (Bailey ve Cushing, 1926). GBM, agresif ve yüksek proliferatif seyrenden dolayı WHO sınıflandırılmasında IV. derece tümörler grubunda bulunmaktadır (Louis ve diğ., 2016). Tüm erişkin kanser tanılarının sadece %2’sini temsil eden primer merkezi sinir sistem tümörlerinin yaklaşık %50’sini GBM oluşturmaktadır. Her 100.000 kişide 3.20 insidansına sahip nadir bir tümör grubu olsa da (Lukas ve diğ., 2019), kötü prognoz gözlenen GBM hastalarının ortalama yaşam süresi 14.6 ayı geçmemektedir (Krakstad ve Chekenya, 2010).

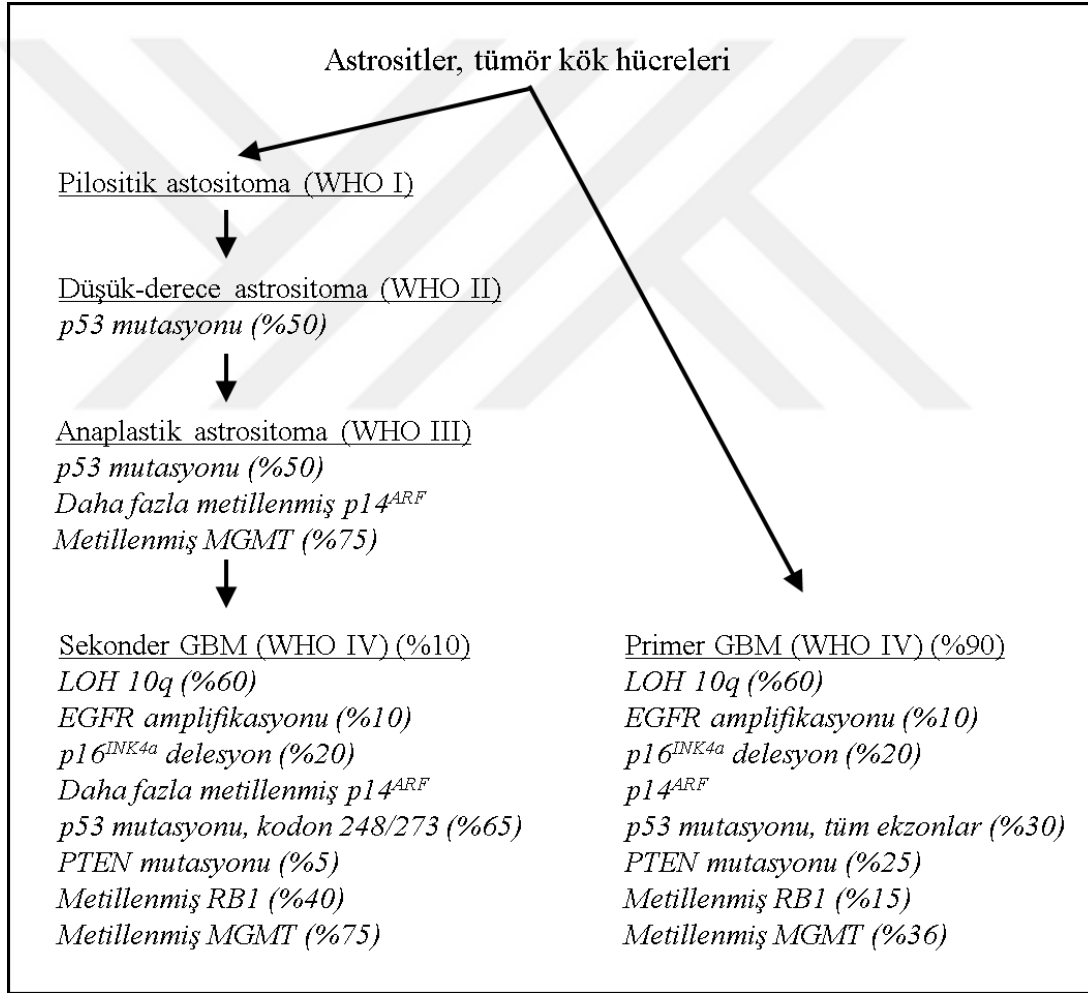
Diğer tüm kanser türlerinde olduğu gibi GBM hücrelerinde de anjiyogenez, invazyon, metabolik aktivitede artış, kontrolsüz çoğalma ve apoptoza direnç gelişimi görülmektedir (Adamson ve diğ., 2009; Krakstad ve Chekenya, 2010). Radyoterapi, kemoterapi ve/veya cerrahi uygulamaların GBM tedavisindeki olumlu etkilerinin, hastaların ortalama yaşam süreleri dikkate alındığında oldukça düşük olduğu bilinmektedir. GBM tedavisindeki bu başarısızlığın en önemli etmenlerinden biri radyoterapi ve kemoterapi direncidir ve bu direnç mekanizması halen belirsizliğini korumaktadır (Kim ve diğ., 2008; Combs ve diğ., 2016). Tedavide karşılaşılan bir diğer sorun ise büyük molekülü ilaçların ve küçük molekülü farmasötiklerin beyin dokusuna geçişini engelleyen kan beyin bariyerinin varlığıdır. GBM’in, çevresinde bulunan normal beyin dokusuna da yayılım göstermesi, cerrahi müdahalenin başarısız olmasına yol açmakta ve bu durum ölümcül sonuçlara neden olmaktadır (Yue ve diğ., 2014). Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi tedavi yaklaşımlarına rağmen, GBM hastalarının hayatta kalma oranlarında halen bir düzelme sağlanamamıştır ve bu nedenle GBM en ölümcül kanser türlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Nam ve de Groot, 2017).

Araştırmacıların, glioblastoma üzerinde yaptıkları moleküler analizler:

- tirozin kinazlar tarafından aktive olan sinyal iletim yollarındaki epidermal büyüme faktörü reseptörlerinde (“Epidermal Growth Factor Receptor”, EGFR gen amplifikasyonu, PTEN mutasyonu) farklılıklar olduğunu
- hücre döngüsü durdurma yolları düzenleyicilerinde (p53 mutasyonu) farklılıklar olduğunu

- kromozom düzeyinde genetik değişimler olduğunu (17p, 13q, 9p, 19q, 10q, 22q, 18q kaybı ile 7 ve 12q amplifikasyonu)

ortaya koymuş ve bu değişimlerin kanser hücrelerinde anjiyogenez, invazyon ve adezyon ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (Sehgal, 1998; Sallinen ve diğ., 2000; Zhang ve diğ., 2003). Ayrıca kromozom 10q ve 19q üzerindeki heterozigotluk eksikliğinin (“Loss of heterozygosity”, LOH) GBM’deki en yaygın mutasyonlar olduğu belirlenmiştir (Kanu ve diğ., 2009). Primer ve sekonder GBM’in başlangıç ve ileri aşamalarında meydana gelen genetik değişiklikler şekil 2.1’de verilmiştir.



şekil 2.1: Birincil ve ikincil GBM’nin başlangıcında ve ileri aşamalarında meydana gelen genetik değişiklikler (Kanu ve diğ., 2009).

2.1.2. Kanser Çalışmalarında Kullanılan Glioma Modelleri

Kanser tedavisinde kullanılan ilaç ya da uygulanan yöntemlerin moleküler mekanizmasını belirleyebilmek adına araştırmacılar model olarak çeşitli hücre hatlarından faydalanmaktadır. Bu bağlamda beyin tümörleri çalışmalarında genetik farklılık gösteren C6 (sıçan), 9L (sıçan), CNS-1 (sıçan), RT-2 (sıçan), T9 (sıçan), GL261 (fare), U87-MG (insan), U118MG (insan), U251MG (insan), U373MG (insan), T98G (insan), A172 (insan), LN229 (insan) gibi çeşitli GBM hücre hatları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmalarda en sık kullanılan insan glioma hücre hattı U87-MG'dir (Clark ve diğ., 2010) ve bu hücre hattının kullanıldığı 3000'den fazla çalışma bulunmaktadır (NCBI PubMed, 2020).

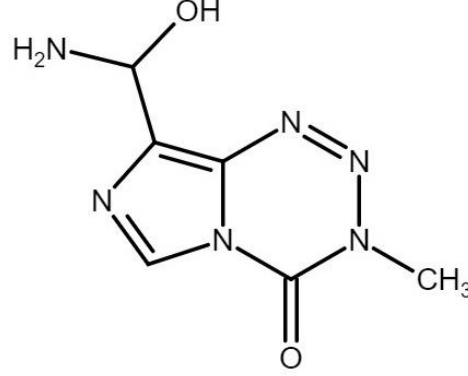
İlk kez Kafkas bir erkeğin beyin tümöründen üretilen U87-MG hücre hattı, Ponten ve Macintyre (1968) tarafından karakterize edilmiştir. Bu hücre hattı genetik heterojenitesi nedeniyle adherent ve agregat oluşturan küçük küresel iki farklı hücre tipinden oluşmaktadır (Bertrand ve diğ., 2009). U87-MG hücre hattında *p14^{ARF}* ve *p16* delesyonu gibi çeşitli mutasyonlar bulunmaktadır. Ayrıca proliferasyon, anjiyogenez ve apoptoza dirençte anahtar rol oynayan PI3K/AKT'ı aktive eden tümör baskılayıcı PTEN proteininin mutant formu sentezlenmektedir (Jacobs ve diğ., 2011). Bununla birlikte, bu hücreler mutant olmayan p53 ("wild-type") geni taşımaktadır (Cerrato ve diğ., 2001).

U87-MG hücre hattının aksine LN229 hücre hattının kullanıldığı daha az sayıda çalışma bulunmaktadır. Literatürde LN229 hücrelerinin kullanıldığı yaklaşık 200 çalışma görülmektedir (NCBI PubMed, 2020). Sağ frontal parieto-okspital glioblastomlu bir kadın hastadan 1979'da elde edilen LN229 hücrelerinde, p53 (TP53) mutasyonu ile birlikte *p16* ve *p14^{ARF}* tümör baskılayıcı genlerinde olası homozigot delesyonlar görülmektedir. Ayrıca mutant olmayan PTEN ("wild-type") geni taşımaktadır (ATCC, 2020).

2.1.3. Glioma Tedavisinde Temozolomid

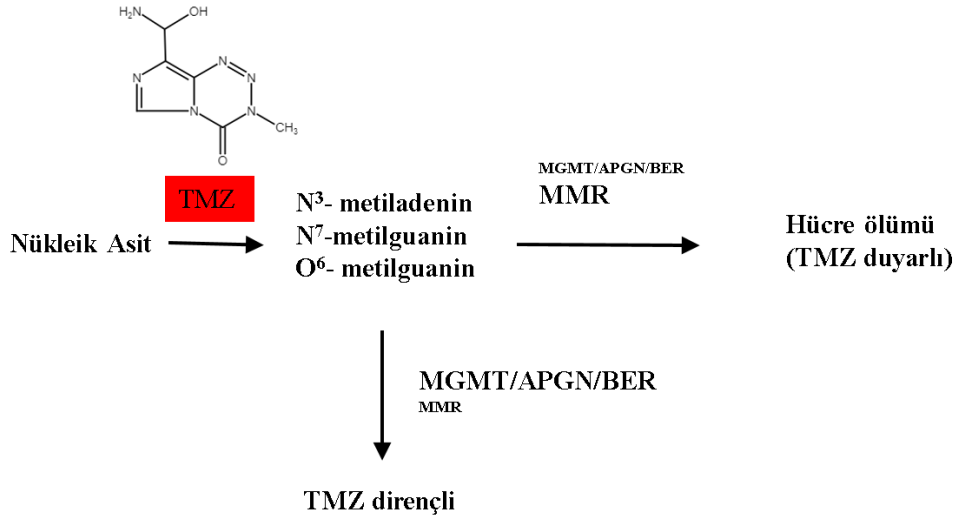
Bir kemoterapi ajanı olan temozolomid (TMZ) alkile edici ajan dakarbazinin imidazotetrazin türevidir (Şekil 2.2) ve kimyasal adı 3-metil-4-oksoimidazo [5,1-d] [1,2,3,5] tetrazin-8-karboksamiddir (Moody ve Wheelhouse, 2014). TMZ, 5'ten düşük pH'larda stabil formda kalırken, 7'den yüksek pH'larda 5-(3-metiltriazin-1-il) imidazol-4-karboksamide (MTIC, C₆H₆N₆O₂) hızla hidrolize edilmektedir. MTIC daha ileri aşamalarda hidrolizlenerek 5-aminoimidazol-4-karboksamid (AIC) ve metilhidrazin ürünlerine dönüşmektedir (Reid ve diğ.,

1997). Lipofilik yapısı nedeniyle kan beyin bariyerini geçebilen TMZ, Gıda ve İlaç Dairesi (“Food and Drug Administration”, FDA) onaylı olup, hem düşük hem de yüksek dereceli astrositik tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Alifieris ve Trafalis, 2015).



Şekil 2.2: TMZ'nin kimyasal formülü.

DNA alkilleyici bir ajan olarak bilinen TMZ, hücre döngüsünün G2/M fazında durmasını indükleyerek apoptoza neden olmaktadır. TMZ'nin moleküler mekanizması, DNA'da metil eklentilerinin oluşturması esasına dayanmaktadır. Bu metil eklentileri guanin üzerinde N⁷ ve O⁶ bölgelerinde, adenin üzerinde ise N³ bölgesinde meydana gelmektedir. Guaninin O⁶ bölgesindeki alkilasyon, DNA replikasyonu sırasında metilguaninin karşısına sitozin yerine bir timinin yerleştirilmesine yol açmakta ve bu durum hücre ölümüne neden olmaktadır (Lee, 2016). Bununla birlikte, TMZ'nin etkinliğinden DNA tamir sistemleri; MGMT (O⁶-Metilguanin DNA metil transferaz), Yanlış eşleşme onarımı (“Mismatch Repair System”, MMR) ve Baz kesip çıkarma onarımının (“Base Excision Repair”, BER) sorumlu olduğu düşünülmektedir (Marchesi ve diğ., 2007). Hücrenin sahip olduğu MMR fonksiyonu ile TMZ'nin etkinliği arasında yakın bir ilişki bulunmaktadır (Sarkaria ve diğ., 2008). Ancak MMR fonksiyonu ile MGMT fonksiyonu arasında ters bir ilişki bulunmaktadır (Kaina ve diğ., 2010). MMR sistemi düzgün biçimde çalışan malign hücrelerde TMZ'nin apoptozu indüklediği, ancak MMR sistemi hatalı çalışan hücrelerde bunun olmadığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Omar ve Mason 2010; Yuan ve diğ., 2012). Ayrıca MGMT ekspresyon seviyesi düşük olan ve aktif bir MMR sistemine sahip tümör hücrelerinde TMZ'nin apoptoza yol açtığı bildirilmiştir (Caporaso ve diğ., 2007; Pagani ve diğ., 2007) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: TMZ'nin direnç mekanizması (Lee, 2016).

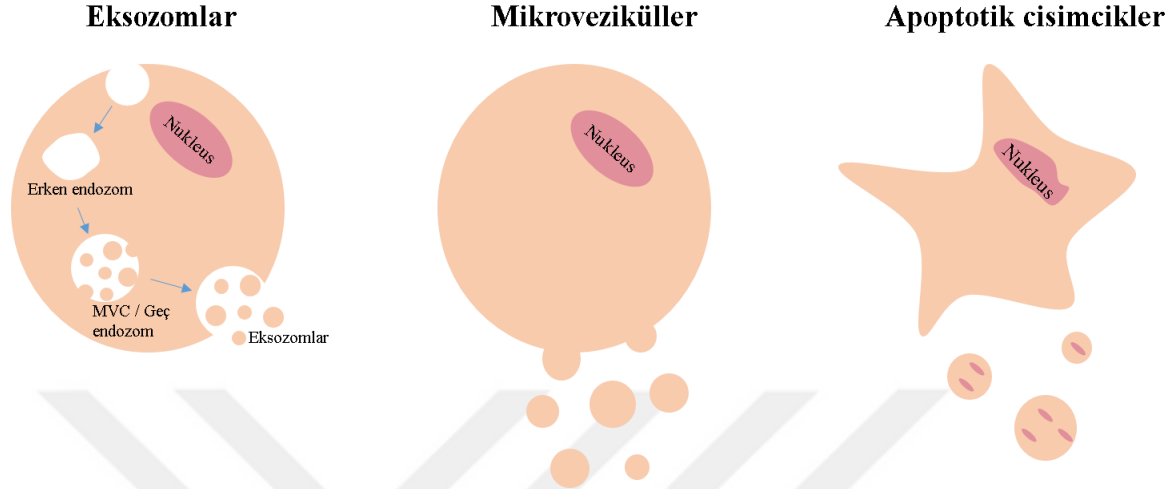
TMZ guanin üzerinde N⁷ ve O⁶ bölgelerine, adenin üzerinde ise N³ bölgesine metil grupları ekleyerek DNA'yı değiştirir. Bu metillenmiş bölgeler mutasyona uğrayabilir ve bu mutasyonlar ya yanlış eşleşme onarım sistemi (MMR) ile kalıcı hale gelebilir ya da Alkilpurin-DNA-N-glikozilaz (APNG) gibi bir DNAglikozilazın etkisiyle Baz kesip çıkarma onarımı (BER) ve ya O6-metilguanin metiltransferaz (MGMT) gibi demetile edici bir enzimin etkisiyle ortadan kaldırılabilir. Bu nedenle MMR sistemi aktif olduğunda GBM hücreleri TMZ'ye karşı duyarlıdır; ancak MGMT, APNG ve BER proteinlerinin varlığı bu hücreleri TMZ'ye dirençli hale getirir.

2.2. HÜCRE DIŞI VEZİKÜLLER

Hücreler arası iletişim, çok hücreli organizmalarda farklı aktivitelerin koordinasyonunda, düzenlenmesinde ve çeşitli doku/organların gelişiminde önemli roller oynamaktadır (Raposo ve Stoorvogel, 2013). Hücresel homeostazı korumak veya hücre dışı ortamdaki patojenlere cevap vermek için hücreler birbirleriyle sürekli bilgi alışverişinde bulunmaktadır. Bilim insanları uzun yıllar boyunca hücresel iletişimin, sadece hormonlar, sitokinler veya nörotransmitterler aracılığıyla sağlandığını düşündüler (Camussi ve diğ., 2010). Ancak son çalışmalar hücrelerin, hücre dışı veziküller ("Extracellular vesicle", EV) aracılığıyla da iletişim kurabildiğini göstermektedir (Ratajczak ve diğ., 2006).

EV'ler hücre zarına benzeyen lipit bir tabaka ile çevrili, küçük küresel yapılardır ve plazma zarından doğrudan veya dolaylı olarak oluşabilmektedir. Bu veziküller kargo içeriği, büyüklüğü, plazma membran oluşumu ve sekresyonuna göre sınıflandırılmaktadır (Cordonnier ve diğ., 2017). EV'ler, endositik yoldan yönlendirilen ve hücre dışı ortama ekzositozla salınan **eksozomlar**, (Trams ve diğ., 1981), doğrudan plazma zarından tomurcuklanarak hücre dışına salgılanan **mikroveziküller** (Borges ve diğ., 2013) ve apoptoz sırasında hücreler tarafından salınan **apoptotik cisimler** (They ve diğ., 2001) olmak üzere temelde üç gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.4). Diğer EV'lere kıyasla eksozomlar, daha fazla fizyolojik ve patolojik süreçte rol

oynamaktadır ve çoğunlukla hücre dışı veziküller için genel bir isim olarak kullanılmaktadır (They ve diğ., 2009; Zhang ve diğ., 2015; Soung ve diğ., 2016).



Şekil 2.4: Hücre dışı veziküllerin sınıflandırılması (Önay-Uçar ve diğ., 2021).

Eksozomlar, dolaylı olarak hücre zarından köken alan ve şimdiye kadar bilinen en küçük EV alt grubunu oluşturan biyoaktif veziküllerdir. Boyutları 30-100 nm arasında değişmektedir. Eksozom terimi ilk defa 1981 yılında Trams ve arkadaşları tarafından farklı hücre tiplerinden hücre dışı ortama salınan küçük vezikülleri tanımlamak için kullanılmıştır (Trams ve diğ., 1981). Pan and Johnstone 1983 yılında, elektron mikroskobu yardımıyla eksozomların multiveziküler cisimciklerden (MVC'ler) köken aldığını göstermiştir (Pan ve Johnstone, 1983). Keşfedildikleri ilk zamanlarda hücrenin atıklarını uzaklaştırmak için görevli olduğu düşünülen eksozomların, sahip oldukları nükleik asit, protein, miRNA, mRNA, nükleoprotein içerikleri nedeniyle hücreler arası iletişim ve sinyal iletimi gibi önemli süreçlerde yer aldığı düşünülmektedir (Van der Pol ve diğ., 2012; Akers ve diğ., 2013; Zhang ve diğ., 2015). Eksozomlar bağışıklık hücreleri, nöronlar, tümör hücreleri gibi tüm hücre tipleri tarafından salgılanabilmekte ve kan, idrar, tükürük, seminal sıvı, amniyotik sıvı, anne sütü ve beyin omurilik sıvısı gibi birçok vücut sıvısında bulunabilmektedir (Vlassov ve diğ., 2012).

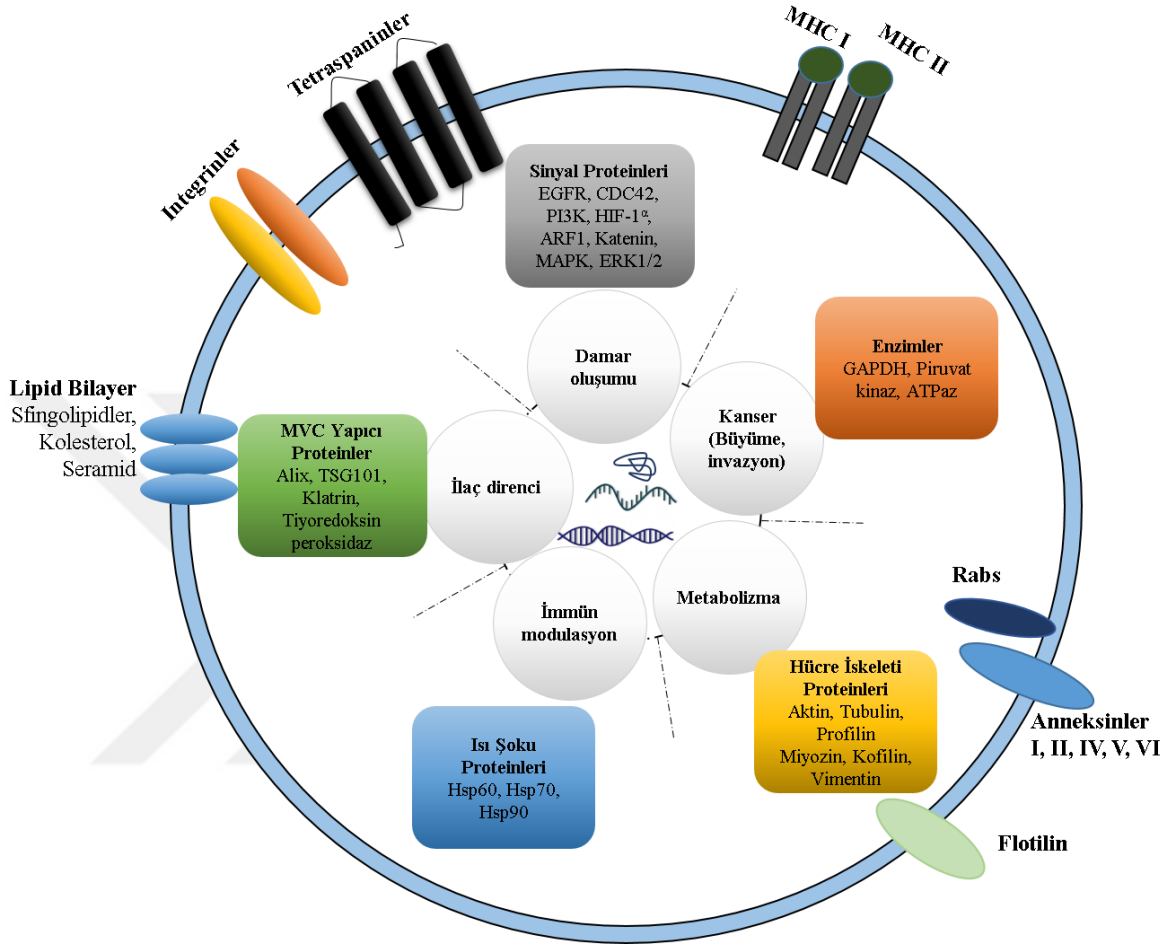
Eksozomlar, içe doğru tomurcuklanma ile oluşan erken endozomun plazma zarından ayrılması ile oluşmaktadır. İntralüminal veziküller (ILV'ler) erken endozomların olgunlaşma sürecinden sonra ortaya çıkmaktadır. CD9 ve CD63 gibi tetraspaninler ILV oluşumunda rol oynamaktadır. Bu ILV içeren erken endozomlar, multiveziküler endozomlar (MVE) ya da multiveziküler cisimcikler (MVC) ya da geç endozomlar olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.4). Olgunlaşma

sırasında, MVC'ler içeriklerine ve amaçlarına göre, üç farklı son ürüne dönüşebilmektedir. MVC'ler, sahip oldukları protein içeriklerini degrade edebilmek için lizozomlarla birleşebilmekte, geçici bir saklama bölgesi oluşturabilmekte veya ekzositoz ile hücre zarından salınabilmektedir. Son aşamada hücre dışına salgılanan tüm MVC'ler **eksozom** olarak adlandırılmaktadır (van Niel ve diğ., 2006; Raposo ve Stoorvogel, 2013). ILV yüzeyinde bulunan ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II ve ESCRT-III alt birimlerinden oluşan ESCRT ("Endosomal Sorting Complexes Required for Transport") proteinleri, eksozom biyogenezinde rol oynamaktadır (Williams ve Urbe, 2007). ESCRT'den bağımsız olarak hücre içi Ca^{+2} seviyesi, p53 ve ALIX ("Apoptosis-linked gene 2-interacting protein X") proteinleri ile Rab protein ailesi de eksozom oluşumunda görev almaktadır (Cordonnier ve diğ., 2017).

Eksozomların hedef hücre tarafından nasıl tanındığı ve hedef hücreye nasıl nüfuz ettiği henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte, eksozom içeriğinin hücre tarafından alınmasının üç şekilde gerçekleştiği bilinmektedir. Eksozom içeriği reseptör etkileşimi, fagositoz veya membran füzyonu aracılığıyla hedef hücreye alınabilmektedir (They ve diğ., 2009).

Eksozomların hücre tipine spesifik içeriklere sahip olması, onların diğer EV türlerinden ayırt edilmelerini sağlamaktadır (Crescitelli ve diğ., 2013; Raposo ve Stoorvogel, 2013). Membran bileşenleri eksozomun köken aldığı hücrenin membranına benzemektedir. Bu zamana kadar tanımlanmış eksozomlar ve içerikleri Exocarta web sitesinde (www.exocarta.org) listelenmektedir. Eksozomlar, tetraspanin (CD9, CD63, CD81) gibi adhezyon proteinlerini, integrinleri (lenfosit fonksiyonuyla ilişkili antijen 1, LFA-1), immün sistemi uyarıcı molekülleri (majör histokompatibilite kompleksi I/II, MHC I/II), hücre iskeleti moleküllerini (aktin, miyozin, tubulin), MVC oluşumunda yer alan proteinleri (ALIX, tumor susceptibility gene 101 (TSG101)), hücre içi sinyal proteinlerini (14-3-3 proteinleri, syntenin), enzimleri (piruvat kinaz, gliseraldehid 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH)) ve Fas-ligand gibi bazı ligandları içermektedir (Campanella ve diğ., 2014). Buna ek olarak eksozomların lümenlerinde (Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90) ve membranlarında (Hsp60, Hsp70 ve Hsp90) çeşitli Hsp'ler bulunmaktadır (Mathew ve diğ., 1995; Campanella ve diğ., 2012) (Şekil 2.5). Eksozom proteinleri hücre lizatındaki proteinler ile karşılaştırıldığında, özellikle bazı proteinlerin eksozomlarda daha fazla bulunduğu görülmektedir. Bu proteinler (CD9, CD63, CD81, ALIX, TSG101) genellikle eksozom biyobelirteci olarak kabul edilmektedir (Logozzi ve diğ., 2009). Birçok proteinin yanı sıra eksozomlar mRNA, miRNA, rRNA ve tRNA dahil olmak üzere

zengin bir RNA içeriğine de sahiptir. Bu RNA'ların alıcı hücreye transferi sonrasında hücrede belirli genlerin ekspresyon seviyelerini değiştirdiği bilinmektedir (Mittelbrunn ve diğ., 2012).



Şekil 2.5: Eksozomların moleküler içeriği ve sınıflandırılması (Önay-Uçar ve diğ., 2021).

2.2.1. Eksozom ve Kanser

Hücre içi gerekli bilgilerin taşınmasından ve iletilmesinden sorumlu olan eksozomların, aynı zamanda bağışıklık sisteminin aktivasyonunda ve kanser başta olmak üzere HIV, Parkinson, Alzheimer gibi çeşitli hastalıkların patolojik süreçlerinde rol aldığı düşünülmektedir (Lo Cicero ve diğ., 2015; Whiteside, 2017). Proliferatif kanser hücreleri, başka dokulara anjiyogenez ile yayılım gösterebilmekte, invazyon ve metastaz yapma yeteneği sergilemekte ve immün sistemden kaçabilmektedir. Tümörden köken alan eksozomların özellikle kanser tespitinde, tümör ilerlemesi (invazyon) ve metastazının potansiyel düzenleyici nedenleri hakkında bilgi sağlamakta görevli olabileceği belirtilmektedir. Bununla birlikte eksozomlar, kanser hücrelerinde malign büyümeyi kolaylaştıran ve biyolojik olarak aktif molekülleri transfer

edebilen, hücre içi iletişim ağında oldukça önemli görevler üstlenmektedir (Lo Cicero ve diğ., 2015). Tümörden köken alan eksozomların tümör ilerlemesi ile ilişkili olmasının yanı sıra, hastalığın ilerlemesini engelleyen antitümoral aktivitelerde de rol oynayabileceği vurgulanmaktadır (Peinado ve diğ., 2012; Melo ve diğ., 2014; Costa-Silva ve diğ., 2015).

Sağlıklı hücrelerin salgıladığı eksozomlarla karşılaştırıldıklarında, tümör hücrelerinin daha fazla eksozom salgıladığı bilinmektedir. Bununla birlikte tümör hücresinin salgıladığı eksozom içeriklerinin, sağlıklı hücreden salgılanan eksozom içeriğinden oldukça farklı olduğu da gösterilmiştir (Bae ve diğ., 2018).

Son yıllarda kanser tanısına yönelik birçok çalışmada eksozomların kullanıldığı bilinmektedir. Eksozom içeriğini ortaya koyan birçok *in vitro* ve prelinik çalışma, eksozomal lipid ve metabolit içerikleri ile karşılaştırıldığında, eksozomal protein ve nükleik asit bileşimlerinin, kanser tanısı ve izlenmesi hakkında daha kesin bilgiler sunduğunu ortaya koymuştur (Kalluri, 2016). Beyin omurilik sıvısı, safra, gözyaşı, anne sütü ve kan dahil olmak üzere birçok biyolojik sıvıda tespit edilebilen kanser eksozomlarının, özellikle pankreas, meme, yumurtalık ve beyin tümörlerinin malignite tanısında kullanılabilirliği düşünülmektedir (Skog ve diğ., 2008; Corcoran ve diğ., 2011; Melo ve diğ., 2015). Ek olarak akciğer yassı hücre karsinomu (Aushev ve diğ., 2013), hepatoselüler karsinom (Wang H. ve diğ., 2014), over kanseri (Taylor ve diğ., 2008), kolorektal kanserler (Silva ve diğ., 2012), glioblastoma (Skog ve diğ., 2008) gibi kanser tipleri üzerinde yapılan çalışmalarda, eksozomların kanser tanısında kullanılabilir potansiyel araçlar olduğu gösterilmiştir. Eksozomal nükleik asitler üzerinde yapılan bir çalışmada eksozomal miR-21'in, özofagus skuamöz hücreli karsinom hastalarının serumunda arttığı ve bu durumun ileri hastalık seviyesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Tanaka ve diğ., 2013). Pankreas kanseri hasta serumlarında ise eksozomal miR-141'in ekspresyon seviyesinin yükseldiği gözlemlenmiştir (Li ve diğ., 2015).

Eksozomal proteinler hücresel kökeni yansıtabildikleri için, kanserin saptanmasında önemli roller oynamaktadır. Eksozomlar aracılığıyla hücreler arasında transfer edilebilen onkoproteinler, tümör oluşumunu kolaylaştırmaktadır (Al-Nedawi ve diğ., 2008; Demory Beckler ve diğ., 2013). Melonoma hastalarının 3. ve 4. evrelerinde eksozomla ilişkili hepatosit büyüme faktörü reseptörü ("hepatocyte growth factor receptor", MET) ve fosforile MET (Tyr1349) proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin, sağlıklı bireylere kıyasla arttığı tespit edilmiştir (Peinado ve diğ., 2012). Ayrıca, makrofaj göçünü engelleyici faktör ("migration

inhibitory factor”, MIF), glipikan-1 (“Glypican-1”, GPC-1) gibi çeşitli eksozomal proteinlerin pankreas kanseri hastalarında ekspresyon seviyelerinin yükseldiği bildirilmiştir (Melo ve diğ., 2014). Eksozomların bu özellikleri klinik araştırmalarda biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyellerini arttırmaktadır (Gonda ve diğ., 2013).

Birçok kanser türünde görülen tümör heterojenitesi genomdaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır. Bağışıklık hücrelerinin, mezenkimal hücrelerin ve hücrese olmayan bileşenlerin çeşitliliği, tümörlerin fonksiyonel olarak heterojenliğine neden olmaktadır. Tümör mikroçevre heterojenitesi ise tümörlerde başka bir karmaşıklık katmanı olarak ortaya çıkmaktadır. Eksozomlar, tümör mikroçevresinin anahtar bileşenlerindedir ve özellikle tümör hücrelerinden salınan eksozomlar, stromal yanıtları manipüle ederek protümörijenik veya antitümörijenik ortama neden olmaktadır. Stromal hücrelerden salgılanan eksozomlar ise, içeriklerine bağlı olarak kanser ilerlemesini desteklemekte veya sınırlandırmaktadır (Kalluri, 2016).

Eksozomların biyolojik fonksiyonlarını açıklayan çalışmalar, adaptif bağışıklığın düzenlenmesinde de rol oynadıklarını göstermiştir (They ve diğ., 2002). Tümörlerden salgılanan eksozomların immünolojik aktiviteleri, tümör antijen sunumunun modülasyonundan tümör bağışıklığının polarizasyonuna kadar değişen karmaşık ve dinamik bir yapıdır (Clayton ve Mason, 2009; Greening ve diğ., 2015). Eksozomlar bağışıklık-kanser hücresi iletişiminin kritik araçlarıdır, ancak tümör mikroçevresindeki eksozomların fonksiyonel olarak heterojen oldukları bilinmektedir. Bu heterojenlik eksozomların antitümörijenik ve protümörijenik rollerini araştırırken zorluk yaratmaktadır. Yapılan çalışmalar, dentritik hücrelerden köken alan eksozomların T ve B hücrelerini aktive edebildiğini, kanser hücresinden köken alan eksozomların ise aktive edilmiş T hücrelerine sunulan bir tümör antijen kaynağı olabildiğini göstermiştir (Zitvogel ve diğ., 1998; Wolfers ve diğ., 2001). Eksozomlar, antitümör bağışıklık yanıtlarında görev almalarının yanı sıra, immün sistemden kaçışta da rol oynamaktadır. Kanser hücrelerinden kökenlendiklerinde doğal öldürücü hücrelerin proliferasyonunu ve sitotoksik fonksiyonlarını inhibe edebildikleri gibi, T hücrelerinin apoptozunu indükleyerek hücrenin biyolojik işlevini de etkileyebilmektedir (Andreola ve diğ., 2002; Clayton ve diğ., 2008). Ayrıca, yapılan bir çalışmada meme kanseri hücrelerinden kökenlenen eksozomların kemik iliğindeki CD11-pozitif hücreler üzerinde etkili olduğu, IL-6 salgılanmasını teşvik ettiği ve sonuçta dendritik hücrelerin farklılaşmasını baskıladığı gösterilmiştir (Yu ve diğ., 2007). 2006

yılında Liu ve arkadaşları, meme kanseri hücrelerinden kökenlenen eksozomların, IL-2 aracılı proliferasyonu indükleyerek ve doğal öldürücü hücrelerin aktivasyonunu bloke ederek, tümörün büyümesine katkıda bulunduğunu bildirmiştir (Liu ve diğ., 2006). Tümörlerde eksozomların bağışıklık fonksiyonlarının daha iyi anlaşılması, yeni ve etkili antitümör tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Bu anlamda tedaviye yönelik devam eden bir klinik çalışmada, kanser hastalarının (küçük hücreli akciğer kanseri) antitümör bağışıklık yanıtını aktive etmek için dentritik hücrelerden kökenlenen eksozomlar (eksozomlar) kullanılmaktadır (Kucharzewska ve diğ., 2013).

Kanser hücrelerinin oksijen ve beslenme ihtiyaçlarını sağlamakla sorumlu anjiogenezin düzenlenmesi aşamasında da eksozomların görev aldığı bilinmektedir. Glioblastoma ve kolon kanserinden kökenlenen eksozomlar, taşıdıkları anjiogenik proteinler, mRNA'lar ve miRNA'lar aracılığı ile endotel hücre proliferasyonuna neden olmaktadır (Skog ve diğ., 2008; Hong ve diğ., 2009). Böbrek kanseri hücre hatları tarafından salgılanan CD105-pozitif eksozomların ise vasküler endotel hücrelerini etkilediği ve büyümeyi desteklediği bilinmektedir (Grange ve diğ., 2011).

Stromal veya kanser hücresi eksozomları, alıcı hücreler üzerinde çift yönlü etkiye sahiptir. Araştırmaların büyük çoğunluğu kanser hücresi kaynaklı eksozomların protümörijenik, proinvaziv ve prometastatik etkileri olduğunu gösterirken, stromal türevli eksozomların kanser eksozomlarından farklı ve belki de karşıt fonksiyonlara sahip olabileceğini akla getirmektedir. Kanser eksozomları, iyi huylu epitel hücrelerinin malign hücrelere dönüştürülmesinde, kanser hücresi invazyonunu teşvik etmek için hücre dışı matrisin ("Extracellular matrix", ECM) yeniden modellenmesinde, metastatik gelişmeyi arttırmak için metastatik bölgenin modülasyonunda rol oynamaktadır (Kalluri, 2016).

Eksozomlar sahip oldukları morfolojik ve biyolojik özelliklerinden dolayı, kanserin tüm aşamalarında önemli oyuncular olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak, eksozom biyolojisi halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu bağlamda gelecekteki araştırmalar, eksozomların sağlık ve hastalık durumlarında bilinmeyen birçok eylemi çözebileceğini vaat etmektedir.

2.3. STRES (ISI ŞOKU) PROTEİNLERİ

Stres proteinleri olarak da bilinen ısı şoku proteinleri (“Heat shock protein”, Hsp) ilk olarak 1962 yılında *Drosophila melanogaster*’in tükrük bezlerinde ısı stresine cevap olarak indüklenen bir protein grubu olarak keşfedilmiştir (Ritossa, 1962). Moleküler şaperon olarak da işlev gören Hsp’ler evrimsel olarak korunmuş ve tüm türlerde var olan büyük bir protein ailesidir. Normal şartlar altında, hücre içinde farklı fonksiyonlar gösteren bu protein ailesi; ısı şoku, radyasyon, oksidatif/iskemik stres, toksinler, çevresel kirleticiler, ağır metaller, inflamasyon ve kemoterapi de dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve çevresel stres faktörlerine bir cevap olarak hücrede indüklenmektedir (Papp ve diğ., 2003; Garrido ve diğ., 2006; Jegu ve diğ., 2013; Lianos ve diğ., 2015).

2.3.1. Stres Proteinlerinin Sınıflandırılması ve İşlevleri

1966 yılında yapılan Cold Spring Harbor Toplantısı’nda, ısı şoku ile ilgili tüm proteinlerin Hsp’ler olarak adlandırılmasına karar verilmiştir. Molekül ağırlıkları 10-170 kDa arasında değişmekte olan Hsp aileleri, eski nomenklatüre göre HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 ve sHSP (s, “small”, küçük) olarak sınıflandırılmıştır (Snoeckx ve diğ., 2001). Ancak, İnsan Genomu Organizasyonu Gen Nomenklatür Komitesi [“The Human Genome Organisation (HUGO) Gene Nomenclature Committee”, HGNC] tarafından, Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi Gen Veritabanı (“National Center of Biotechnology Information Entrez Gene Database”)’nda bulunan ısı şoku genleri dikkate alınarak yeni bir terminoloji tanımlanmıştır. Bu yeni terminolojiye göre yapılan sınıflandırılmada ısı şoku protein aileleri: HSPA (HSP70), HSPB (küçük HSP), HSPC (HSP90), HSPH (HSP110) ve DNAJ (HSP40) olarak ve insan şaperonin aileleri ise HSPD/E (HSP60/HSP10) ile CCT (TRiC) olarak gruplandırılmışlardır (Kampinga ve diğ., 2009).

HSPA (HSP70) ailesinin üyeleri olan proteinler oldukça korunmuş bir domen yapısına sahiptir. N-terminal ATPaz domeni (~44 kDa), substrat bağlanma domeni (~18 kDa) ve C-terminal domeni (~10 kDa) içermektedir (Liu ve diğ., 2012). Hsp70’in şaperon aktivitesi; Hsp40, BAG-1 gibi ko-şaperonlar tarafından belirlenmektedir (Wang X. ve diğ., 2014). HSP70 protein ailesi, yanlış katlanmış proteinlerin düzenlenmesi, organellerde bulunan veya sekrete edilen proteinlerin membran translokasyonu, yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanması ve

birleştirilmesi de dahil olmak üzere hücrede birçok farklı rolü üstlenmektedir (Sriram ve diğ., 1997; Mayer ve Bukau, 2005).

HSPB (sHSP) protein ailesi, evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş olup, 12-43 kDa molekül ağırlığına sahip proteinleri kapsamaktadır. Bu protein ailesinin bir üyesi olan Hsp27, hasar gören proteinlerin yeniden doğru bir şekilde katlanmasına yardımcı olarak bir şaperon protein gibi rol oynamaktadır. Güçlü antiapoptotik özellikler gösteren Hsp27, hücre göçünde, hücre büyümesinde, hücre farklılaşmasında ve tümörlerin ilerlemesinde de işlev görmektedir (Khalil ve diğ., 2011)

HSPC (HSP90) ailesinde yer alan proteinler, N-terminal domen (~25 kDa), orta domen (~40kDa) ve C-terminal domenden (~12 kDa) oluşan 3 yapısal domene sahiptir. Birçok fonksiyona sahip bu protein ailesinin üyelerinin ana fonksiyonu, tıpkı diğer stres proteinleri gibi peptidlerle etkileşime girerek onların agregat oluşturmasını engellemektir (Li ve diğ., 2012).

HSPH (HSP100) ailesinin üyeleri olan ısı şoku proteinleri, yaklaşık 200 amino asit içeren ve ATP bağlanma yerlerine sahip 2 korunmuş domen içermektedir. Fizyolojik koşullarda moleküler şaperon olarak işlev gören bu protein ailesi, agregat oluşturmuş proteinlerin yeniden yapılandırılmasında ve proteinlerin yeniden düzenlenmesinde görev almaktadır. Bu protein disagregasyon olayında, Hsp70 ile kompleks oluşturarak şaperon aktivitesi göstermektedir (Snoeckx ve diğ., 2001; Maurizi ve Xia, 2004; Zolkiewski ve diğ., 2012).

DNAJ (HSP40) protein ailesi, şaperon özellik gösterir ve esas olarak Hsp70 kontrolünden sorumludur. Hsp40-Hsp70 kompleksinin, Hsp90 ile beraber çalışarak hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir (Hata ve Ohtsuka 1998; Sterrenberg ve diğ., 2011).

HSPD (HSP60), başlangıçta şaperonin olarak adlandırılan, esas olarak ökaryotların mitokondrilerinde bulunan ve burada Hsp10 ve mitokondriyal Hsp70 ile etkileşen bir protein ailesidir. Denatüre proteinlere bağlanarak, proteinlerin katlanma etkinliğini artırdığı bilinmektedir (Nollen ve diğ., 1999; Wu ve diğ., 2017).

Hsp'ler hücrede sitoplazma, çekirdek, membran, endoplazmik retikulum ve mitokondri dahil olmak üzere tüm hücresel kısımlarda yer almaktadır. Bununla birlikte, ekstrasellüler ortamda membran bağımlı ve membran bağımsız formları bulunmaktadır (De Maio, 2014). Yapılan

çalışmalar, Hsp27 (Liao ve diğ., 2009), Hsp70 (De Maio ve Vazques, 2013) ve Hsp90'ın (Sidera ve Patsavoudi, 2008) hücre dışı ortama salgılanabildiğini ve salgılanan bu proteinlerin özellikle eksozomlarda bulunduğunu göstermiştir.

2.3.2. Ekstrasellüler Hsp'ler

“Ekstrasellüler Hsp'ler” terimi genellikle hücrelerin dışında bulunan çözünür formdaki tüm Hsp'ler, membrana bağlı Hsp'ler veya eksozomal Hsp'ler için kullanılmaktadır. Hsp'ler başlangıçta sitoprotektif bir role sahip hücre içi moleküler şaperonlar olarak tanımlanmalarına rağmen, lokalizasyonlarına bağlı olarak bu proteinlere artık daha yeni ve farklı fonksiyonlar atfedilmektedir. Özellikle normal ve tümör hücreleri tarafından salgılanan eksozomların yüzeyinde bulunan Hsp'lerin, hücreler arası iletişimde anahtar role sahip olabileceği düşünülmektedir (Campanella ve diğ., 2014). İmmünolojik fonksiyonlara sahip ekstrasellüler Hsp'lerin yanı sıra; tümör ilerlemesini, büyümesini ve metastazını kolaylaştırabilen eksozomal Hsp'lere karşı da araştırmacıların ilgisi artmaktadır (Campanella ve diğ., 2014; Cordonnier ve diğ., 2017).

Xiao ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, eksozomların ve eksozom içeriğinde bulunan immünomodülatör moleküllerin (Hsp70, Hsp80, Hsp90) immün cevap oluşumunu kolaylaştırabildikleri gösterilmiştir. Elsner ve diğ. (2007) tümör hücreleri tarafından salınan eksozomal Hsp70'in doğal öldürücü hücrelerin aktivitesini arttırdığını ve bunun da tümör büyümesinin azalması ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan bu çalışmalar, gelecekteki klinik uygulamalarda ekstrasellüler Hsp'lerin kanser dahil birçok farklı hastalığın teşhisi, prognozu ve takibinde biyobelirteçler olarak kullanılma potansiyelinin olduğunu vurgulamaktadır.

2.3.3. Stres Proteinleri ve Kanser

Hsp'ler çeşitli karsinom türlerinde yüksek oranda eksprese edilen, belirli kanser türlerinin derecelerini ve agresifliklerini belirlemek için kullanılan önemli biyobelirteçler arasındadır. Ayrıca tümör hücresi proliferasyonu, farklılaşması, istilas ve metastazı gibi çeşitli olaylarda görev aldıkları da bilinmektedir (Calderwood ve diğ., 2006). Yüksek seviyede ekspresyonu yapılan Hsp'ler ile kanser davranışı arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmaların sayısı her geçen gün artmaktadır. Yapılan çalışmalar Hsp105'in kolorektal kanser ve pankreas adenokarsinomunda (Nakatsura ve diğ., 2001; Kai ve diğ., 2003), Hsp70'in prostat kanserinde (Abe ve diğ., 2004), Hsp27'nin metastatik hepatokarsinomda, mide kanserinde, kolorektal

karsinomda ve beyin tümörlerinde arttığı göstermektedir (Zhang ve diğ., 2003; Chen ve diğ., 2004; Song ve diğ., 2006; Pei ve diğ., 2010).

Farklı tümör modellerinde yapılan araştırmalar Hsp ekspresyonu ile çoklu ilaç direnci (Ciocca ve diğ., 1993a) ve tümör oluşumu arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Bruey ve diğ., 2000). Ekspresyon seviyesi yüksek Hsp'lerin, kanser tedavisinde kullanılan Cisplatin (CDDP), Doxorubicin (Dox), Vincristine, Paclitaxel gibi antikanser ilaçlara karşı, kanser hücresinde direnç oluşturduğu bildirilmiştir (Oesterreich ve diğ., 1993; Garrido ve diğ., 1996; Guttmann ve Koumenis, 2011). Malignant kanser hücrelerinde yüksek ekspresyon seviyesine sahip Hsp27 ve Hsp70'in kemoterapi direncinde etkili olduğu bilinmektedir (Jäättelä, 1999). Benzer şekilde meme kanserinde artmış Hsp27 ve Hsp70 seviyeleri, kanser hücrelerinin özellikle Dox direncini arttırmakta ve bu hücrelerin apoptoza yönelmesini engellemektedir (Ciocca ve Calderwood, 2005; Kim ve Kim, 2011). Aşırı eksprese edilen Hsp70'in meme kanseri, serviks kanseri ve hepatosellüler karsinom hücrelerinde zayıf prognoz ve tedavi direnci ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Sarto ve diğ., 2000; Takashimave diğ., 2003; Chuma ve diğ., 2003). Meme kanserinde Hsp70 proteininin aşırı ekspresyonunun, uygulanan tedavilerin başarısızlığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Ciocca ve diğ., 1993b). Bununla birlikte yüksek ekspresyon seviyesine sahip olan Hsp70'in tümörojenik meme kanseri hücrelerinin hayatta kalması için gerekli olduğu ve Hsp70 ekspresyonunun baskılanmasının tümöre özgü hücre ölüm programını (apoptoz) aktive ettiği bilinmektedir (Nylandsted ve diğ., 2000).

Yapılan immünohistokimyasal çalışmalar, prostat kanserinde oldukça yüksek seviyelerde eksprese olan Hsp27 ile prostat kanseri agresifliği, progresyonu ve hormon tedavisine yanıt vermeyen fenotip gelişimi arasında bir korelasyon olduğunu göstermektedir (Cornford ve diğ., 2000; So ve diğ., 2007). Hormon veya kemoterapiye cevap için indüklenen Hsp27 ekspresyonu prostat kanseri hücrelerinde apoptozu da baskılamaktadır (Vargas-Roig ve diğ., 1998; Rocchi ve diğ., 2004). Bununla birlikte artan Hsp27 seviyelerinin, tümör proliferasyonunu artırarak ve apoptozu azaltarak prostat kanseri hücrelerini koruduğu ve böylece tümör ilerlemesini kolaylaştırdığı ileri sürülmektedir (Garrido ve diğ., 2003; Parcellier ve diğ., 2006). Hsp27 varlığı çeşitli beyin tümörlerinde de belirlenmiş olup, ekspresyonu ile tümör malignite derecesi arasında bir korelasyon olduğu bilinmektedir (Khalid ve diğ., 1995; Hitotsumatsu ve diğ., 1996). Nöronal hücrelerde Hsp27'nin aşırı ekspresyonu, Hsp27 aracılı apoptoz inhibisyonu ile nöroprotektif özellikler göstermektedir (Akbar ve diğ., 2003). Bir çalışmada, aşırı ekspresyonu

yapılan Hsp70'in bazı kanser türlerinin hayatta kalması için öncül bir koşul olduğu ve bu tümör hücrelerinde Hsp70'in baskılanmasının hücre ölümüne neden olduğu ileri sürülmektedir (Nylandsted ve diğ., 2000). Benzer şekilde ekspresyon seviyesi artmış Hsp70'in, hücreleri apoptoza ve nekroza karşı koruduğu bilinmektedir (Jäättelä, 1999; Garrido ve diğ., 2006; Nylandsted ve diğ., 2000). Diğer stres proteinleri üzerine yapılan çalışmalar, ekspresyon seviyelerinde farklılıklar olan Hsp60 ve Hsp90'nın da çeşitli kanser türlerinde tümör ilerlemede rol oynadığını göstermektedir (Zhang ve diğ., 2016; Shipp ve diğ., 2011).

Hsp'ler sadece tümör ilerlemede değil, aynı zamanda kanser hücrelerinin tedaviye yanıtlarının belirlenmesinde de önemli roller oynamaktadır. Hsp'lerin bazıları, tümör mikro ortamı içindeki koruyucu ve yıkıcı immünolojik yanıtlar arasındaki ince dengeyi karmaşık bir şekilde düzenlemektedir. Bu proteinlerin ekspresyon seviyeleri ve aktiviteleri modüle edilerek, kansere karşı yeni bir terapi stratejisi oluşturulmaktadır. Hsp tabanlı bu tip immünoterapötik yaklaşımların kullanımı ve antikanser aşularının geliştirilmesi, kanser tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesine önemli katkılar sağlamaktadır (Das ve diğ., 2019).

Hücre içi ortamda bulunan Hsp'ler gibi hücre dışı ortamda bulunan ve eksozomların önemli bir bileşeni olan Hsp'ler de kanserin tüm aşamalarında yer almakla birlikte, tanı ve tedavi için önemli birer hedef haline gelmeye adaydır. Bu alanda yapılan farklı araştırmalar, kanserli hücrelerden salınan bazı eksozomal Hsp'lerin bağışıklık sistemini etkileyebileceğini göstermiştir. Özellikle eksozomal Hsp70 bir immün düzenleyici faktör olarak işlev görmektedir ve kanser hücrelerinin bağışıklık yanıtında önemli bir rol oynamaktadır (Kumar ve diğ., 2016). Gastpar ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, eksozomal Hsp70'in doğal öldürücü hücrelerin ("Natural Killer", NK) reaktivitesini uyarabildiği gösterilmiştir (Gastpar ve diğ., 2005). Ayrıca, eksozomal Hsp70 makrofajları aktive edebilmekte ve vasküler homeostazı düzenleyebilmektedir (Lancaster ve Febbraio, 2005; Vega ve diğ., 2008). Eksozomal Hsp70'in, makrofajları aktifleştirmek ve doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini indüklemek için bir tür hücreler arası iletişim oluşturduğu düşünülmektedir (De Maio, 2011). Bununla birlikte yapılan çalışmalar eksozomal Hsp'lerin, immün baskılayıcı veya immün sistemi uyarıcı gibi zıt etkilere sahip olabileceğini de göstermektedir. Xie ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Hsp70 ile modifiye edilmiş eksozomların, dentritik hücre olgunlaşmasını ve T (Th1) hücre yanıtlarını uyarabildiği gösterilmiştir (Xie ve diğ., 2010). Yapılan başka bir çalışmada, fare kanser hücre hatlarından salınan eksozomal Hsp70'lerin immün baskılayıcı bir fonksiyona sahip olduğu

ortaya konulmuştur. Bu eksozomal Hsp'ler, antitümör bağışıklığını kısıtlayan ve tümör genişlemesini destekleyen miyeloid türevi baskılayıcı hücreleri ("myeloid-derived suppressor cells" MDSC) aktive edebilmektedir (Chalmin ve diğ., 2010).

Eksozomal Hsp'lerin saptanması ve incelenmesi noninvaziv biyobelirteçlerin belirlenmesi adına faydalı bilgiler sağlayabilmektedir. Özellikle bazı eksozomal Hsp'lerin kanser hastalarının biyolojik sıvılarında yüksek ekspresyon seviyesine sahip olması, onların kanserde biyobelirteç olarak kabul edilmesine yardımcı olmaktadır (Gobbo ve diğ., 2015). Kalın bağırsak hastalarının plazmalarından elde edilen eksozomlarda Hsp60 seviyesi, sağlıklı bireyler ile kıyaslandığında daha yüksek olarak bulunmuştur. Bu nedenle, eksozomal Hsp60'ın kalın bağırsak hastalığı tanısında bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği ileri sürülmektedir (Campanella ve diğ., 2015). Fosforilasyon seviyesi artmış eksozomal Hsp90'nun metastatik kolon kanseri için, eksozomal sHsp'lerin ise jinekolojik kanserler için umut edici biyobelirteçler olabileceği düşünülmektedir (Weeraphan ve diğ., 2019; Wyciszkievicz ve diğ., 2019).

2.4. GLİOMA HÜCRELERİNDE İLAÇ YANITI

Kanser hücrelerinin gen ekspresyon profillerinin incelenmesi, hastalığın gelişimindeki biyolojik etkileri anlamak, tanıda kullanılabilecek olası belirteçleri belirlemek, klinik sonucu tahmin etmek, hastalar için kişiselleştirilmiş farmakolojik tedaviler oluşturmak ve tedavi etkinliğini artırmak amacıyla ilaç maruziyetinin moleküler etkilerini araştırmakta kullanılan bir yöntemdir (Garman ve diğ., 2007). Başarılı bir ilaç tedavisi, tedavinin hedef hücreler üzerindeki spesifik etkilerini ve hasta üzerinde klinik olarak anlamlı etkilerini yansıtan yeterli bir terapötik indeks gerektirir (Sellers ve Fisher, 1999). Bu bağlamda, hasta ve kontrol grupları gen ekspresyon analizi bakımından karşılaştırılabileceği gibi, aynı zamanda ilaç uygulanan hastaların gen ekspresyon analizleri de bu profiller açısından kıyaslanabilir. Gen ekspresyon analizi için çeşitli yollar bulunmakla birlikte, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılan en popüler ve ekonomik yaklaşımlardan biridir.

Kanser hücresine uygulanan ilaçlar hücre döngüsü regülasyonu, DNA hasar yanıtı, apoptoz, tümör oluşumu ve baskılanması gibi süreçlerde görev alan çeşitli genlerin ekspresyon seviyelerini değiştirebilir. Bugüne kadar GBM üzerinde doğal bileşiklerle ve sentetik ilaçlarla yapılan birçok çalışmada, çeşitli genlerin ekspresyon seviyelerinde değişimler gözlemlenmiştir

(Park ve diğ., 2017). GBM hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada resveratrolün otofaji, apoptoz, nekroz, hücre döngüsü süreçlerinde rol alan çeşitli genlerin ekspresyon seviyelerinde farklılık yarattığı gösterilmiştir. Resveratrol üç farklı GBM hücre hattında Atg5, beclin-1 ve LC3-II gibi otofajide görevli olduğu bilenen genlerin anlatım seviyelerini artırarak, otofagozomların oluşumunu indüklemiş ve bu hücrelerde Bax ile kaspaz-3 genlerinin artışı sağlayarak apoptozu tetiklemiştir. Aynı çalışmada hücre döngüsü regülasyonunda görevli siklin A, E ve B genlerinin ekspresyon seviyelerinin arttığı, siklin D1 seviyesinin ise azaldığı gösterilmiştir (Filippi-Chiela ve diğ., 2011). U373-MG hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada, iyi bir antikanser ajan olduğu bilinen kurkuminin matriks metalopeptidaz (“Matrix metalloproteinase”, MMP) geninin ekspresyonunu azalttığı ve bu durumunun invazyonun baskılanmasına ve apoptozun indüklenmesine yol açtığı rapor edilmiştir (Abdullah Thani ve diğ., 2012). Diğer bir araştırmada kurkuminin U87-MG, U251-MG ve C6 hücre hatlarında siklin B1 ve siklin D1 genlerinin ekspresyon seviyelerini azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca hücrelerin sağ kalımını etkilemek için STAT3, NFκB ve PI3K/AKT genlerini de inhibe ettiği gösterilmiştir (Zanotto-Filho ve diğ., 2015). Antikanser özellik gösterdiği bilinen Withaferin A (WA)’nın TMZ dirençli GBM hücrelerinde AKT/mTOR sinyal yolağının inhibisyonu yoluyla apoptozu indüklediği saptanmıştır (Grogan ve diğ., 2014). Benzer şekilde doğal bitkisel flavonoidlerden biri olan ve antikanser özelliği bilinen mirisetinin (MYR), mitokondriyal apoptotik yol aracılığıyla glioblastoma hücrelerinin (DBRTG ve U87-MG) ölümüne neden olduğu belirlenmiştir. MYR uygulanan hücrelerde sitokrom c, Bcl-2, MDM2, K-Ras, Raf-1 ve ERK’ların (ERK ve pERK) ekspresyon seviyeleri azalırken; Bax, kaspaz-3, kaspaz-9 ve Bad’ın ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlenmiştir (Tang ve diğ., 2016).

GBM’de doğal bileşikler kadar sentetik inhibitörler de gen ekspresyon değişimi üzerinde etkilidir (Valdés-Rives ve diğ., 2017). Yapılan *in vitro* çalışmada, ABT-737 gibi kimyasal inhibitörlerin kullanımının, BCL-2 geninin ekspresyonunu azalttığı rapor edilmiştir (Tagscherer ve diğ., 2008). Yapılan bir diğer çalışmada ABT-737 ile benzer yapıya sahip ABT-263’ün, BCL-2 ailesinin başka bir antiapoptotik üyesi olan MCL-1’in ekspresyon seviyesini arttırdığı gözlemlenmiştir (Karpel-Massler ve diğ., 2015). Bir IκK inhibitörü olan BAY 11-7082’nin ise NFκB genini inhibe ederek LN18 ve U87-MG hücrelerinde kemoterapiye karşı direnci azalttığı bildirilmiştir (Coupienne ve diğ., 2011). Faz II GBM hastaları üzerinde yürütülen bir araştırmada ise AT-101 uygulamasının, MGMT geninin metilasyon seviyesinde ve Bcl-2, Bcl-

xL, MCl-1, Bax, Bak proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde değişimlere neden olduğu gösterilmiştir (Fiveash ve diğ., 2009).

GBM tedavisinde klinikte farklı ilaç yaklaşımları kullanılmakla birlikte, TMZ yüksek dereceli gliomaların tedavisinde en sık kullanılan ajandır. Ancak GBM hastalarındaki direnç nedeni ile tedavi sonrası saę kalımda başarı oranı dūřuktur. Bu direnç mekanizmasında DNA tamir genlerinin ve MDM2 geninin ekspresyon seviyelerinin yükselmesi ile p53 ve PTEN gen mutasyonlarının önemli olduğu düşünölmektedir (Messaoudi ve dię., 2015). TMZ'nin, malignant glioma hücrelerinde (A-172, AM-38, T98G, U87-MG, U-138MG, U-251MG ve YH-13) MDK, CASP1 ve MGMT dahil olmak üzere, kemoterapi direnci, prognoz, tümör ilerlemesi veya antiproliferasyon ile ilişkili çok sayıda genin ekspresyon seviyesini arttırdığı ve bu hücrelerde dirence neden olduğu gösterilmiştir (Yoshino ve dię., 2010). Yapılan farklı çalışmalarda TMZ uygulanmasının çeşitli GBM hücrelerinde DNA tamir mekanizmasında rol oynayan RAD51 geninin ekspresyon seviyesini arttırdığı ve bu artışın direnç ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Welsh ve dię., 2009; Zhang ve dię., 2012; Li ve dię., 2019). Bařka bir çalışmada U251 glioblastoma hücre hattına TMZ uygulandığında, MDM2 gen ekspresyon seviyesinin arttığı gösterilmiştir (Stepanenko ve dię., 2016).

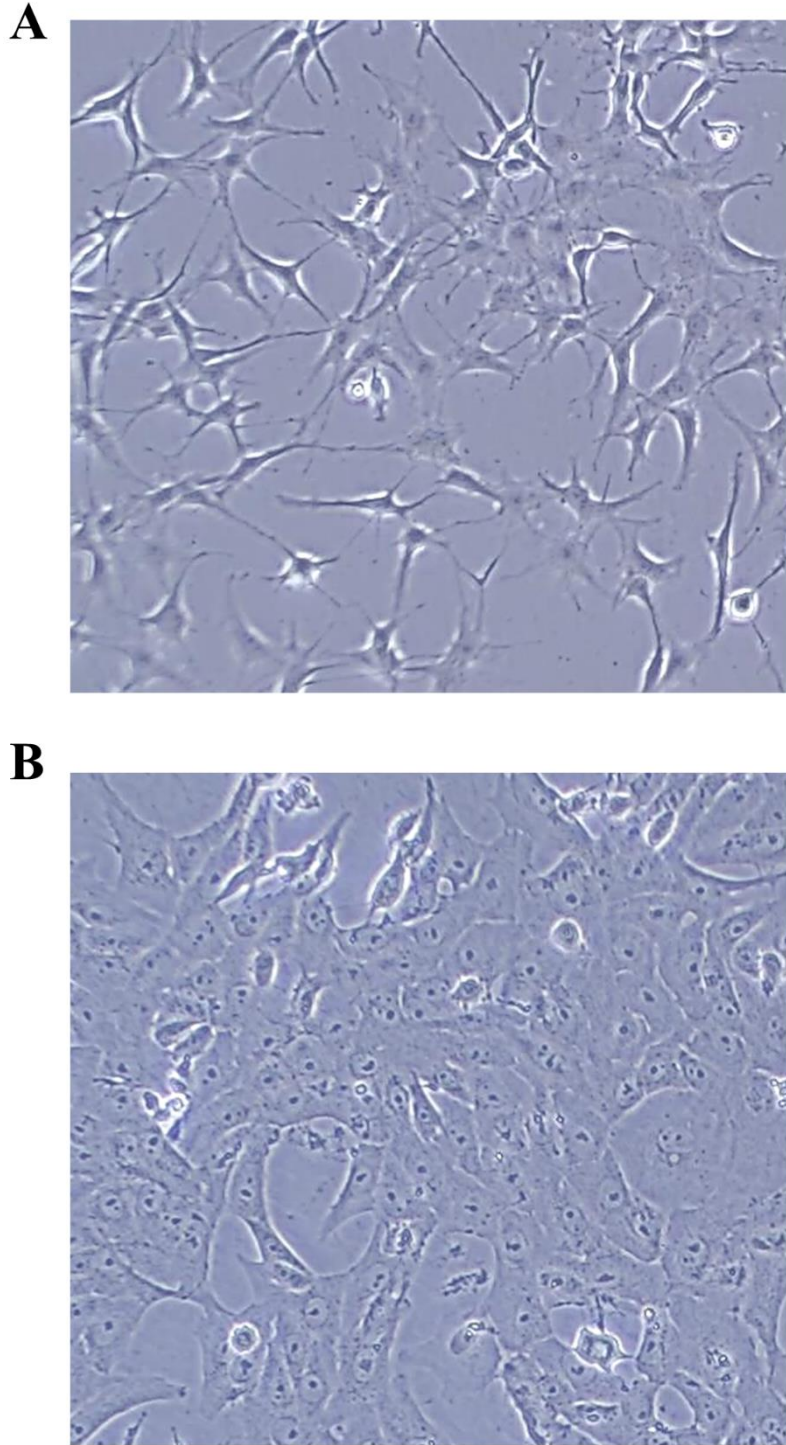
TMZ tedavisinin GBM hücrelerinde çeşitli genlerin anlatım seviyesinde değişime neden olduğu bilinmektedir, ancak eksozom içeriğine de etki edebileceği konusunda literatürde fazla bilgi bulunmamaktadır. Eksozomların protein ve nükleik asit içeriği olarak köken aldıkları hücreyi benzersiz bir şekilde yansıttıkları bilinmektedir (They ve diğ., 2009; Mathivanan ve diğ., 2010). Bu bağlamda, GBM hücrelerinden köken alan eksozomlar ve parental hücrelerin mRNA profillerinin karşılaştırılması sonucunda; TMZ tedavisinde dirençten sorumlu olduğu düşünölen bazı genlerin (GSTp1, MGMT, APNG, ERCC1, ERCC2, MVP, ABCC3, CASP8 ve IGFBP2) mRNA seviyelerinin eksozomda ve parental hücrede mükemmel bir korelasyona sahip olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak bu mRNA'ların TMZ direnci ile ilgili potansiyel eksozomal mRNA biyobelirteçleri olabileceği vurgulanmaktadır (Shao ve diğ., 2015).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. GLİOMA HÜCRELERİ VE KÜLTÜRLEME KOŞULLARI

Bu tez kapsamında kullanılan U87-MG ve LN229 insan glioma hücre hatları, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Hücreleri üretmek için, içeriğinde L-glutamin bulunan “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium/Nutrient Mixture F-12” (DMEM/F12, Sigma-Aldrich, D0547-10X1L) ile hazırlanan besiyeri kullanıldı. 12 g/L DMEM/F12 ve 1.2 g/L sodyum bikarbonat tartılıp (Sigma-Aldrich, S5761) dH₂O kullanılarak tamamen çözdürüldü ve üzerine %1 (v/v) antibiyotik-antimikotik solüsyonu (Gibco, 15140122) eklenerek 0.22 µm’lik filtrelerden (TPP, 90505) geçirildi. Altkültürleme işlemi için kullanılacak besiyerine, ısı ile inaktive edilmiş %5 (“heat-inactivated”) fetal sığır serumu (“Fetal Bovine Serum”, FBS, Gibco 10500-0164) eklenirken; ekzozom deneylerinde kullanılacak besiyerine, %5 ekzozom içermeyen fetal sığır serumu (“Exosome Free Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco A2720801) eklendi. Deneysel çalışmalarda kullanılan tüm hücreler ekzozomsuz besiyerinde üretildi.

U87-MG ve LN229 hücre hatlarının altkültürlenmesi sırasında öncelikle kültür kabındaki besiyeri uzaklaştırıldı. Tripsinin aktivitesini inhibe eden serum artıklarını ortamdan uzaklaştırmak için 5 mL 1X PBS (10X DPBS (Gibco, 14200-067) dilüe edilerek hazırlandı) kültür kaplarına konuldu ve yıkama yapıldı. Yıkama işleminden sonra kültür kabına hücre adezyonunda etkili olan iki değerlikli katyonları uzaklaştırmak ve hücreleri kültür kabının yüzeyinden kaldırmak için, 1 mL 1X Tripsin/EDTA (Sigma-Aldrich, SLBX9589) eklendi. Kültür kapları 37°C’lık etüve kaldırıldı ve 2-3 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon aşamasından sonra hücrelerin yüzeyden ayrılması mikroskop ile kontrol edildi ve yüzeyden ayrılan hücreler üzerine, tripsin aktivitesini sonlandırmak için, 9 mL besiyeri eklendi. Hücreler pipet yardımı ile süspanse hale getirildi ve hücre sayımı için hemositometre (Neubauer lamı) kullanıldı. Sayım aşamasından sonra hücreler, istenilen sayıda yeni kültür kaplarına aktarıldı (Şekil 3.1) ve 37°C’lık % 5 CO₂ sağlayan etüve kaldırıldı. Altkültürleme işlemleri üç günde bir tekrarlandı.



Şekil 3.1: A) U87-MG (Başlangıç hücre sayısı 5×10^3) ve B) LN229 (Başlangıç hücre sayısı 1×10^4) hücre hatlarına ait 24 saatlik kültürlerin invert mikroskop altındaki görüntüleri (100X).

3.2. GLİOMA HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİLERİNİN OLUŞTURULMASI

U87-MG ve LN229 insan glioma hücre hatlarının çoğalma eğrisini oluşturmak ve jenerasyon sürelerini hesaplamak için başlangıç hücre sayıları 5×10^4 ve 1×10^5 hücre/mL olacak şekilde 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekimleri yapıldı ve 10 gün boyunca hücre sayımı yapıldı. Sayım işlemi 4 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Hücrelerin sayım sonuçlarına ait grafik GraphPad Prism 7.0 istatistik programı kullanılarak absiste zaman (gün), ordinatta ise mL'deki hücre sayısı yazılarak oluşturuldu. Sonuçlar tek-yönlü ANOVA testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Çoğalma eğrisi grafiği yardımıyla hücrelerin lag, log ve durağan fazları belirlendi. Jenerasyon sayıları ve süreleri aşağıdaki denklemler (3.1 ve 3.2) kullanılarak hesaplandı (Moat, 1979).

$$n = (\log N_2 - \log N_1) / \log 2 \quad (3.1)$$

n : Jenerasyon sayısı

N_1 : Logaritmik bölünme evresinin başlangıcındaki hücre sayısı

N_2 : Logaritmik bölünme evresinin sonundaki hücre sayısı

$$St = (T2 - T1) / n \quad (3.2)$$

St : Jenerasyon süresi

$T2$: Logaritmik bölünme evresinin bitiş zamanı

$T1$: Logaritmik bölünme evresinin başlangıç zamanı

3.3. SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ

Bu tez kapsamında kullanılan TMZ (Sigma-Aldrich, T2577-100MG)'nin U87-MG ve LN229 insan glioma hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi, MTT yöntemi ile Mosmann (1983) tarafından önerilen prosedür takip edilerek saptandı. Bu yöntemin temeli metabolik olarak aktif hücrelerin MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolyum)) bileşimini, mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesi ile mor renkli ve suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürebilmesi ve oluşan formazan kristallerinin DMSO ile çözülerek belirli dalga boyundaki absorbasının spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

TMZ'nin U87-MG ve LN229 insan glioma hücre hatları üzerindeki etkisini belirlemek için, 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına sırasıyla 5×10^3 ve 1×10^4 hücre ekildi. Hücreler 24 saat %90'dan fazla bağıl nem ve %5 CO₂ sağlayan 37°C'lik etüvde inkübe edildi. İnkübasyondan

sonra kültür kabına tutunmuş hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırıldı ve çeşitli konsantrasyonlarda (50,100,200,400,800,1600 µM) TMZ içeren besiyerleri hücrelerin üzerine dikkatlice eklendi. TMZ uygulamaları 24, 48 ve 72 saat süre ile yapıldı. Uygulanan TMZ'nin stok solüsyonu 100 mM konsantrasyonda DMSO (BioFrox, 1084ML500) içinde çözdürülerek hazırlandı. DMSO'nun hücreler üzerindeki toksik etkisini elimine etmek amacıyla, besiyerindeki konsantrasyonunun %1'in altında kalması sağlandı.

24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlardan sonra hücrelerin üzerinden TMZ içeren besiyerleri uzaklaştırılarak, son konsantrasyonu 0,5 mg/mL olan MTT içeren 100 µL besiyeri her bir kuyuya eklendi ve 4 saat boyunca 37°C, %5 CO₂'de inkübasyona bırakıldı. MTT'nin (Sigma-Aldrich, M5655) stok solüsyonu steril 1X PBS içerisinde 5 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. İnkübasyon aşamasından sonra MTT içeren besiyeri uzaklaştırılarak her bir kuyuya 150 µL DMSO eklendi ve çalkalayıcı üzerinde en az 2 saat boyunca formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı. Formazan kristallerinin çözünmesinin ardından oluşan renkli ürünün absorbansı 562 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu (Biotek, ELx800) kullanılarak ölçüldü ve absorbans değerleri kontrole göre karşılaştırılarak hücre canlılığı % olarak aşağıdaki denklem 3.3 kullanılarak hesaplandı.

$$\%Canlılık = \frac{\text{Deney grubuna ait absorbans} \times 100}{\text{Kontrol grubuna ait absorbans}} \quad (3.3)$$

Deneyler en az 5 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre bu tez kapsamında U87-MG ve LN229 hücrelerine uygulanacak TMZ konsantrasyonları belirlendi.

3.4. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Bu tez kapsamında kullanılacak deney gruplarının oluşturulması aşamasında TMZ uygulamaları farklı boyutlardaki hücre kültür kaplarında gerçekleştirildi. Hemisitometredeki hücre sayımı sonuçlarına göre, uygun sayılarda hücreler kültür kaplarına ekildi (bakınız Tablo 3.1 ve Tablo 3.2) ve tek tabakalı kültürler oluşturuldu. Hücreler, %90 bağıl nem ve %5 CO₂ sağlayan 37°C'lık bir inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon aşamasından sonra kültür kapları, kalıntıları uzaklaştırmak için 3 defa steril 1X PBS ile yıkandı. Sitotoksosite analiz sonuçlarına göre aşağıdaki kontrol ve deney grupları oluşturuldu:

1. Kontrol grubu: Eksozomsuz besiyeri kullanılan ve herhangi bir uygulama yapılmayan hücreler
2. Deney grubu I (TMZ 100): Eksozomsuz besiyeri kullanılan ve 100 μ M TMZ uygulanan hücreler
3. Deney grubu II (TMZ 200): Eksozomsuz besiyeri kullanılan ve 200 μ M TMZ uygulanan hücreler

MTT analiz sonuçlarına göre U87-MG ve LN229 hücrelerine iki farklı konsantrasyonda TMZ ajanı 72 saat boyunca uygulandı. TMZ uygulamasının ardından hücreler toplandı ve eksozom izolasyon protokolleri takip edildi.

Tablo 3.1: Tez kapsamında kullanılan kültür kapları ve ekilen U87-MG hücre sayıları.

Hücre Kültür Kapları	Alan (cm ²)	Ekilen Hücre Sayısı
96 kuyucuklu hücre kültür kabı	0.32	5x10 ³
24 kuyucuklu hücre kültür kabı	1.9	3x10 ⁴
6 kuyucuklu hücre kültür kabı	9.6	1.5x10 ⁵
T-25 hücre kültür kabı	25	4x10 ⁵
T-150 hücre kültür kabı	150	2x10 ⁶

Tablo 3.2: Tez kapsamında kullanılan kültür kapları ve ekilen LN229 hücre sayıları.

Hücre Kültür Kapları	Alan (cm ²)	Ekilen Hücre Sayısı
96 kuyucuklu hücre kültür kabı	0.32	1x10 ⁴
24 kuyucuklu hücre kültür kabı	1.9	6x10 ⁴
6 kuyucuklu hücre kültür kabı	9.6	3x10 ⁵
T-25 hücre kültür kabı	25	8x10 ⁵
T-150 hücre kültür kabı	150	4x10 ⁶

3.5. HÜCRELERİN TOPLANMASI

Kontrol grubu ve TMZ uygulaması yapılan hücreler toplanırken şu protokol takip edildi: Öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırıldı. Kültür kabına 1X steril PBS eklenerek hücreler yıkandıktan sonra, aynı kültür kabına tripsin/EDTA solüsyonu ilave edilerek hücrelerin tutundukları yüzeyden ve birbirinden ayrılması sağlandı. Tripsin aktivitesini inhibe etmek için uygun miktarda besiyeri kültür kabına eklenerek (150 cm²'lik kültür kapları için 10

mL, 25 cm² lik kültür kapları için 5 mL, 6 kuyucuklu kültür kapları için 2 mL) pipetaj yapıldı. Süspansiyon hale getirilen hücreler steril tüplere alınarak oda sıcaklığında 3000xg'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Son aşamada pellet üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak, pellet 1X steril PBS ile süspansiyon hale getirildi ve aynı koşullarda tekrar santrifüj edildi. Tüm besiyeri kalıntılarını uzaklaştırmak için yıkama aşamaları iki kez daha tekrar edildi ve elde edilen pelletler sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'lık derin dondurucuya kaldırıldı.

3.6. EKSOZOM İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI

Kontrol ve deney gruplarına ait eksozomların eldesi için 150 cm²'lik hücre kültür kapları kullanıldı. Hücrelerin ekiminden 24 saat sonra kültür kapları, besiyeri kalıntılarını uzaklaştırmak için 3 defa steril 1X PBS ile yıkandı ve eksozom bulundurmeyen besiyeri içerisinde farklı konsantrasyonlarda TMZ (100 µM ve 200 µM) hücrelere uygulandı. Kontrol grubu hücrelere ise sadece eksozom içermeyen besiyeri eklendi. Bu işlemden 72 saat sonra besiyerine salınan eksozomların izolasyonu için Bölüm 3.6.1'de verilen protokol takip edildi.

3.6.1. Eksozom İzolasyonu

1. Besiyerinde serbest halde yüzen hücre kalıntılarını uzaklaştırmak için, steril tüplere alınan besiyeri 3000xg'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı dikkatlice yeni steril tüplere aktarıldı.
2. Santrifüj işleminden sonra elde edilen tüm besiyeri steril filtre (Amicon ultra-15 cihaz-50k Merck) kullanılarak 5000xg'de, 15 dakika, 4°C'da santrifüj edildi. Filtrenin altına geçen sıvı atıldı ve süpernatant yeni steril tüplere aktarıldı. Bu filtreleme işlemi sonrasında eksozom izolasyonunun yapılacağı besiyeri hacimsel olarak azaltılmış oldu.
3. Filtrelenen besiyerinden eksozom izolasyonu exoEasy Maxi Eksozom İzolasyon Kiti (Qiagen, katalog no. 76064) kullanılarak yapıldı.
4. Besiyeri ve izolasyon kiti içerisinde bulunan XBP tamponu, steril tüp içerisinde 1:1 (v:v) oranda karıştırıldı ve tüp hafifçe 5 kez ters çevrilerek çalkalandı.
5. Örnek ve XBP karışımı kit bileşenlerinden biri olan exoEasy Spin kolonuna yüklendi ve 500xg'de, 5 dakika, 4°C'da santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen kısım atıldı.
6. Kolon üzerine kalıntıları uzaklaştırmak için kit bileşenlerinden 10 mL XWB tamponu eklendi ve 5000xg'de, 5 dakika, oda sıcaklığında santrifüj edildi. Toplama tüpü ile birlikte içerisindeki sıvı atıldı.

7. Kolon yeni bir toplama tüpüne alındı ve kolon merkezine izolasyon kiti bileşenlerinden 400 µL XE solüsyonu eklendi ve 2 dakika beklendi. Kolon 500xg'de, 5 dakika, oda sıcaklığında santrifüj edildi.
8. Toplama tüpüne geçen sıvı tekrar kolon merkezine uygulandı ve 2 dakika daha bekledikten sonra 5000xg'de, 5 dakika, oda sıcaklığında santrifüj edildi.
9. Toplama tüpüne geçen ve içinde eksozom bulunduran sıvı, steril 1,5 mL'lik tüplere alındı. Sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C'lık derin dondurucuya kaldırıldı.

3.6.2. Eksozomların Kalitatif Olarak Belirlenmesi

İzolasyonu yapılan eksozomların miktar ve karakterizasyon çalışmaları için immünolojik analizler ve Enzim-Bağlı-İmmün Assay ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay", ELISA) yöntemi uygulandı. Örneklerdeki eksozom varlığını tespit etmek için, eksozom ilişkili proteinler (ALIX ve TSG101) immünolojik analizlerle değerlendirildi. Bu kapsamda öncelikle Bölüm 3.10.2'de bahsedildiği şekilde eksozomlar parçalanarak proteinleri izole edildi ve ardından bu proteinler Bölüm 3.11'de anlatıldığı gibi sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılarak ayrıştırıldı. Eksozom varlığını doğrulamak için proteinler, ALIX ve TSG101 primer antikoları kullanılarak Bölüm 3.12'de anlatıldığı şekilde immünolojik analizlerle karakterize edildi.

3.6.3. Eksozomların Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Tez kapsamında çalışılan tüm deney ve kontrol gruplarından izole edilen eksozomların varlık ve miktar tayini, genel bir eksozom markırı kabul edilen CD63 varlığına dayalı PS Capture™ Exosome ELISA Kiti (Katalog No: 297-79201, FUJIFILM) kullanılarak yapıldı. Eksozomların miktar tayinleri için, Bölüm 3.10.3'te anlatılan BCA yöntemi ile konsantrasyonu hesaplanan eksozom proteinleri farklı konsantrasyonlarda (0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 ng/mL) dilüe edilerek standartlar oluşturuldu ve bu standartlar, CD63 taşıyan eksozomların kantitasyonunu sağlayan bir kalibrasyon eğrisi oluşturmak için kullanıldı. Deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Takip edilen kit protokolü ve bileşenleri aşağıda verildi:

1. Öncelikle kit bileşenlerinden 1X Reaksiyon/Yıkama solüsyonu hazırlandı (1 hacim 10X Reaksiyon yıkama solüsyonu+ 9 hacim distile su+1 hacim 100X eksozom bağlama solüsyonu).

2. Eksozom bağlanması için özel olarak tasarlanmış 96 kuyucuklu kaplar, 300 µL Reaksiyon/Yıkama solüsyonu (1X) ile 3 kere yıkandı ve kuyularda kalan sıvılar uzaklaştırıldı.
3. Daha sonra Reaksiyon/Yıkama solüsyonu (1X) ile hem örnekler hem de standart olarak kullanılan ve konsantrasyonu bilinen eksozomal proteinler dilüe edildi. Her bir kuyuya 100 µL örnek ve standart eklendi. Bu kaplar oda sıcaklığında, 2 saat, 500 rpm'de çalkalandı.
4. 2 saat sonrasında kuyucuklar içindeki solüsyonlar uzaklaştırılarak 300 µL Reaksiyon/Yıkama solüsyonu (1X) ile 3 kez daha yıkandı ve kalan sıvılar uzaklaştırıldı.
5. Her bir kuyucuğa 100 µL Reaksiyon/Yıkama solüsyonu (1X) ile dilüe edilen CD63 (1X) antikorunu eklendi ve 96 kuyucuklu kaplar oda sıcaklığında, 1 saat, 500 rpm'de çalkalandı.
6. Süre tamamlandıktan sonra kuyucuklar içindeki solüsyonlar uzaklaştırıldı, 300 µL Reaksiyon/Yıkama solüsyonu (1X) ile 3 kez daha yıkandı ve kalan sıvılar tekrar uzaklaştırıldı.
7. Daha sonra her kuyucuğa 100 µL Reaksiyon/Yıkama solüsyonu (1X) ile dilüe edilen sekonder antikor eklendi ve reaksiyon kabı oda sıcaklığında, 1 saat, 500 rpm'de tekrar çalkalandı.
8. Bu işlemi takiben kuyucuklar içindeki solüsyonlar uzaklaştırıldı ve 300 µL Reaksiyon/Yıkama solüsyonu (1X) ile 5 kez daha yıkayıp kalan sıvılar uzaklaştırıldı.
9. Her bir kuyucuğa kit bileşenlerinden 100 µL TMB solüsyonu eklendi ve reaksiyon kabı 1 dakika çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında, 30 dakika bekletildi.
10. En son aşamada her bir kuyucuğa kit bileşenlerinden 100 µL Stop solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 5 saniye çalkalandıktan sonra örneklerin 450-620 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü.

3.7. RNA ANALİZLERİ

3.7.1. Hücresel RNA İzolasyonları

Bu analizde TMZ uygulaması yapılmış deney grupları ve herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubu 6 kuyucuklu kültür kaplarında üretildi. Kültür kaplarından alınan hücre pelletlerinden total RNA izolasyonu, Nucleospin RNAII (Macherey–Nagel, 740955.50) kit protokolüne uygun olarak, aşağıda verilen şekilde gerçekleştirildi:

1. Hücre pelletleri üzerine kit bileşenlerinden 350 µL RA1 tampon ve 3.5 µL β-Merkaptoetanol eklenerek hızla karıştırıldı ve hücrelerin parçalanması sağlandı.
2. Viskoziteyi azaltmak ve lizattaki kalıntıları uzaklaştırmak için NucleoSpin filtre kolonları toplama tüplerinin içine yerleştirildi. Lizat, kolonun bulunduğu tüplere aktarıldı ve oda sıcaklığında, 11000xg'de, 1 dakika santrifüj edildi.
3. NucleoSpin filtre kolonu uzaklaştırıldıktan sonra homojenize edilmiş lizat üzerine 350 µL %70 etanol eklendi ve elde edilen karışım hızlıca karıştırıldı.
4. 700 µL hacme ulaşan lizat, toplama tüplerinin içine yerleştirilmiş olan Nucleospin RNA II kolonlarına konulduktan sonra oda sıcaklığında, 11000xg'de, 30 saniye santrifüj edildi.
5. Toplama tüplerine geçen kısım atılarak kolonların üzerine kit bileşenlerinden 350 µL MDB ("Membrane desalting buffer") eklenerek kolon oda sıcaklığında, 11000xg'de, 30 saniye santrifüj edildi.
6. 1.5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpleri içinde her bir izolasyon için; 10 µL rDNaz + 90 µL reaksiyon solüsyonu olacak şekilde DNaz reaksiyon karışımı hazırlandı ve 95 µL DNaz reaksiyon karışımı doğrudan kolonun merkezine uygulandı. Kolon oda sıcaklığında, 30 dakika inkübe edildi.
7. NucleoSpin® RNA kolonuna 200 µL Tampon RAW2 eklendi ve 11000xg'de, 30 saniye santrifüjün ardından toplama tüpüne geçen kısım atıldı. (1.yıkama)
8. Aynı NucleoSpin® RNA kolonuna 600 µL Tampon RA3 eklendi ve 11000xg'de, 30 saniye santrifüjün ardından toplama tüpüne geçen kısım tekrar atıldı. (2.yıkama)
9. Aynı NucleoSpin® RNA kolonuna bu kez 250 µL Tampon RA3 eklendi ve 11000xg'de, 30 saniye santrifüjün ardından toplama tüpü atıldı. (3.yıkama)
10. Aynı kolon 1.5 mL'lik tüplerin içine yerleştirildikten sonra tam merkezine 60 µL RNaz'sız su eklendi ve 2 dk beklendi. Oda sıcaklığında, 11000xg'de, 1 dakika santrifüj sonrasında kolon membranındaki RNA'lar elüe edildi. Elde edilen bu RNA'lar daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere -20°C'lık derin dondurucuya kaldırıldı.

3.7.2. Hücresel RNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Bölüm 3.7.1'de anlatılan şekilde elde edilen RNA örneklerinin kalite ve miktar tayini RNA konsantrasyon aralığı 2-3000 ng/µL olan Nanodrop spektrofotometre (NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, Celbio) kullanılarak yapıldı. Bu analiz aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. Öncelikle cihazın ölçüm bölümü hav bırakmayan bir kağıtla (KimWipes, Kimtech) temizlendikten sonra 1 μ L RNaz'sız su, NanoDrop cihazının ölçüm bölümüne konularak kör ölçüm yapıldı.
2. Kör ölçümden sonra cihazın ölçüm bölmesi tekrar temizlendi ve RNA örneğinden 1 μ L ölçüm bölmesine konuldu.
3. RNA örneklerinin 230, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçüldükten sonra, cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanan konsantrasyon ve kalite bulguları kaydedildi.

3.7.3. Eksozomal RNA İzolasyonu

Kontrol ve deney gruplarının besiyerlerinden elde edilen eksozomlardan RNA izolasyonu exoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit (Qiagen, 77064) kullanılarak yapıldı. Kit bileşenleri ve takip edilen protokol aşağıda verildi:


1. Bölüm 3.6.1'de verilen yöntemle elde edilen eksozomların üzerine 700 μ L QIAzol solüsyonu eklenerek hızlıca karıştırıldıktan sonra nükleoprotein komplekslerinin ayrılması için karışım oda sıcaklığında, 5 dakika inkübe edildi.
2. Karışım üzerine 90 μ L kloroform eklenerek 15 saniye boyunca kuvvetli bir şekilde çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında, 3 dakika inkübe edildi.
3. İnkübasyon aşamasını takiben karışım 12000 xg 'de, 4°C'da, 15 dakika santrifüjlenen tüp içinde 3 faz oluşumu gözlemlendi. Eksozomal RNA içeren üst sıvı fazı yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.
4. Eksozomal RNA içeren üst sıvı fazının üzerine 1:2 (v:v) oranında %100 etanol eklenerek karışım hızlıca karıştırıldı.
5. Elde edilen karışım 2 mL toplama tüpü içerisine yerleştirilen RNeasy MinElute spin kolonuna aktarıldıktan sonra oda sıcaklığında, 12000 xg 'de, 15 saniye santrifüj edildi ve toplama tüpüne geçen kısım atıldı.
6. RNeasy MinElute spin kolonu üzerine 700 μ L RWT Buffer eklendi ve oda sıcaklığında, 12000 xg 'de, 15 saniye santrifüj edildikten sonra toplama tüpüne geçen kısım tekrar atıldı.
7. Aynı RNeasy MinElute spin kolonu üzerine 500 μ L RPE Buffer eklendi ve oda sıcaklığında, 12000 xg 'de, 15 saniye santrifüj edildikten sonra toplama tüpüne geçen kısım tekrar atıldı.

8. RNeasy MinElute spin kolonu üzerine bir kez daha 500 µL RPE Buffer eklendi ve oda sıcaklığında, 12000xg'de, 2 dakika santrifüj edildikten sonra toplama tüpü ve içindeki sıvı atıldı.
9. RNeasy MinElute spin kolonu yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kapağı açık bir şekilde oda sıcaklığında, 12000xg'de, 5 dakika santrifüj edildikten sonra toplama tüpü ve içindeki sıvı atıldı.
10. Aynı RNeasy MinElute spin kolonu tekrar yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolonun merkezine 14 µL RNaz'sız su eklenerek 2 dakika beklendi. Daha sonra kolon 12000xg'de, 1 dakika, oda sıcaklığında santrifüj edildi.
11. Toplama tüpüne geçen sıvı tekrar aynı kolonun merkezine uygulandı ve 2 dakika beklendi. 12000xg'de, 1 dakika, oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra kolon membranındaki RNA'lar elüe edildi.

Elde edilen eksozomal RNA'lar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'lık derin dondurucuya kaldırıldı.

3.7.4. Eksozomal RNA Örneklerinin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Bölüm 3.7.3'te anlatıldığı gibi izolasyonları yapılan eksozomal RNA'ların konsantrasyonları Agilent RNA 6000 Pico Kiti (Katolog no:5067-1513) ve Agilent 2100 Bioanalyzer cihazı kullanılarak belirlendi. Kit bileşenleri ve takip edilen kit protokolü aşağıda verildi:

1. Öncelikle kit bileşenlerinden RNA jel matriksi oda sıcaklığında, 1500xg'de, 10 dakika santrifüjlenerek filtreden geçirildi ve küçük hacimlerde (65 µL) tüplere bölüştürülerek 4°C'da saklandı. Kit bileşenlerinden ladder üzerine 90 µL RNaz'sız su eklendi ve küçük hacimlere (1.5 µL) bölüştürülerek -80°C'da saklandı.
2. Her kullanımdan önce tüm kit bileşenleri 30 dakika, oda sıcaklığında bekletildi.
3. Konsantrasyonları belirlenecek eksozomal RNA örnekleri ve ladder, 70°C'lık ısıtıcıda 2 dakika bekletilerek denatüre edildi.
4. 65 µL RNA jel matriksi üzerine 1 µL boya eklendikten sonra 13000xg'de, oda sıcaklığında, 10 dakika santrifüjlendi.
5. Yeni bir RNA çipi, çip hazırlama istasyonu üzerine yerleştirildikten sonra çip üzerindeki  kuyucuğuna 9 µL jel boya karışımı yüklendi.
6. Çip hazırlama istasyonundaki piston 1 mL pozisyonuna getirildi ve istasyon kapatıldı. Piston klips tarafından tutulana kadar ilerletildi.

7. Piston 30 saniye bu pozisyonda bırakıldı ve ardından klips serbest bırakılarak pistonun tekrar 1mL pozisyonuna geri getirilmesi sağlandı.
8. Çip hazırlama istasyonu açılarak (G) işaretli diğer 2 kuyucuğa 9 µL jel boya karışımı yüklendi
9. Daha sonra 9 µL RNA kondisyonlama çözeltisi çipteki CS kuyucuğuna ve 5 µL RNA markırı ise 11 örnek yükleme kuyucuğuna ve (H) kuyucuğa yüklendi.
10. 3. basamakta denatüre edilen 1 µL ladder (H) işaretli kuyucuğa ve 1 µL hacimli denatüre örnekler ise örnek yükleme kuyucuklarına yüklendi. Kullanılmayan her bir örnek yükleme kuyucuğuna ise 1'er µL RNA markırı konularak işlem tamamlandı.
11. Çip 1200 rpm'de, 2 dakika hızlıca karıştırıldıktan sonra Agilent 2100 Bioanalyzer cihazında değerlendirildi.

3.8. HÜCRESEL VE EKSOZOMAL RNA'LARDAN cDNA SENTEZİ

Hem hücresel hem de eksozomal RNA'ların cDNA'ya çevrilmesi aşamasında iScript cDNA sentez kiti (Biorad, 170-8891) kullanıldı (Tablo 3.3). -20°C'da tutulan kit reaktifleri kullanılmadan hemen önce çözündürüldü ve deneyin tüm aşamaları buz üzerinde gerçekleştirildi. Kit içinde bulunan enzim ise kullanılmadan hemen önce -20°C'lık derin dondurucudan alındı.

Tablo 3.3: cDNA sentezi için kullanılan iScript cDNA kitinin içeriği ve reaksiyon başına kullanılan hacimler (Reaksiyon başına toplam hacim 20 µL olmalıdır.).

Kit İçeriği	Reaksiyon Başına Gereken Hacim
5 x iScript reaksiyon karışımı	4 µL
iScript revers transkriptaz	1 µL
RNaz'sız su	x µL
RNA örneği	y µL

cDNA sentezi için kit içerikleri, uygun miktar RNA örneği ve RNA'sız su ile karıştırılarak Tablo 3.3'de verilen oranlarda hazırlandı. Karışım 12000xg'de 30 saniye santrifüjlendikten sonra Tablo 3.4'te verilen reaksiyon protokolü uygulanarak BIO-RAD T100 Gradient 96 well PCR Thermal Cycler cihazında RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 3.4: cDNA sentezi için kullanılan reaksiyon protokolü.

Sıcaklık (°C)	Zaman
25 °C	5 dk
42 °C	30 dk
85 °C	5 dk

Hücresel ve eksozomal RNA'ların cDNA'ya etkin bir şekilde çevrilip çevrilmediğinin kontrolü, GAPDH sabit düzeyli ("housekeeping") gen primerleri kullanılarak gerçek zamanlı PZR reaksiyonunda doğrulandı.

3.9. TEMOZOLOMİD UYGULAMASININ HÜCRELERDEKİ İLAÇ YANITI İLE İLİŞKİLİ GENLERİN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Tezin bu bölümünde U87-MG ve LN229 glioma hücrelerindeki ve bu hücrelerden kökenlenen eksozomlardaki bazı genlerin ekspresyon seviyeleri, gerçek zamanlı PZR analizleri ile değerlendirildi. Gerçek Zamanlı PZR deneylerinde Bio-Rad iQTM5 Real-Time PCR cihazı kullanıldı. TMZ'nin U87-MG ve LN229 hücreleri üzerindeki etkisi 92 adet gen (EK1) incelenerek, eksozom üzerindeki etkileri ise TMZ uygulamasına bağlı olarak hücrede ekspresyonu anlamlı olarak artan 2 gen (RAD51 ve MDM2 genleri) kullanılarak değerlendirildi. Gerçek Zamanlı PZR analizlerinde iTaqTM Universal SYBR® Green Supermix tarafından sağlanan 2X SYBR Green mix (BioRad Cat #172-5124) kullanıldı. Analizde gerekli reaktifler Tablo 3.5'te, reaksiyonun gerçekleşmesi için gereken koşullar ise Tablo3.6'da verildi. Bu analizde PZR karışımı hazırlanıp her bir kuyucuğa uygun hacimde konularak, üzerine 10 ng konsantrasyonda cDNA eklendi ve son hacim 25 µL'ye tamamlandı.

Tablo 3.5: Gerçek zamanlı PZR analizinde gerekli reaktifler ve kullanılan hacimler (Toplam hacim 25 µL olmalıdır.).

PZR Karışımı (tek tüp için)	Hacim (µL)
2xSYBR Green karışımı	12.5
Primer 1 (10 µM)	1.25
Primer 2 (10 µM)	1.25
Su	X
cDNA	Y

Tablo 3.6: Gerçek zamanlı PZR uygulaması için gerekli koşullar.

PZR Basamakları	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Enzim Aktivasyonu	94°C	5.00	} x 40
Denatürasyon	94°C	0.40	
Bağlanma	60°C	0.30	
Uzama	68°C	0.40	
Erime Eğrisi Analizi	94°C	1.00	
	55°C	1.00	
	94°C	0.15	

Gerçek zamanlı PZR verilerinin analizinde 2 farklı yöntem kullanıldı: göreceli ve mutlak kantifikasyon. Birinci yöntem olan göreceli kantifikasyon analizinde gerçek zamanlı PZR verileri, internal kontrol olarak adlandırılan başka bir gene göre analiz edildi. Bu bağlamda deneysel sonuçlarda hataya yol açabilmesi nedeniyle uygun bir internal kontrolün seçilmesi analizin en önemli kısmını oluşturdu. İkinci yöntem olan mutlak kantifikasyon analizinde ise konsantrasyonları bilenen PZR ürünleri seyreltilerek oluşturulan standart grafikler ile hedef genlerin kopya sayıları hesaplandı. Bu PZR ürünleri aynı zamanda hedef genin varlığını veya yokluğunu test etmek için, bir pozitif kontrol olarak da görev yapmaktaydı.

Bu tez kapsamında, TMZ'nin hücreler üzerindeki etkisini ortaya koymak için yapılan gerçek zamanlı PZR analizinde göreceli kantifikasyon tekniği kullanıldı ve her bir örnek 3 farklı internal kontrole göre (HPRT-YWAZ-GAPDH) normalize edildi. Eksozomal RNA miktarının az olması, eksozom içeriğinde internal kontrol miktarının da az olmasına neden olacağından, eksozomal hedef genlerin analizinde mutlak kantifikasyon tekniği kullanıldı. Bu yöntemde öncelikle hedef gene ait PZR ürünleri ile bir standart grafik oluşturuldu.

3.9.1. Analizde Kullanılan Primerlerin Seçimi ve Kontrolü

Kontrol ve deney gruplarına ait hücrelerdeki transkriptomik farklılıkları değerlendirmek amacıyla, ilaç uygulaması ile ekspresyon seviyelerinin değişebileceği düşünülen ve hücrede farklı süreçlerde görev alan (apoptoz, DNA hasarı, oksidatif stres ve hücre döngüsü) 92 gen bölgesi seçildi (EK 1). Analizde kullanılan 92 adet primer, genomik DNA kontaminasyonlarını engellemek için ekzon spesifik olarak dizayn edildi. U87-MG ve LN229 hücrelerinde ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değişen RAD51 ve MDM2

genlerinin primerleri Tablo3.7’de verilirken, bu primerlerin genomdaki yerleri EK 2’de gösterildi. Bu genlerin spesifitesi gerçek zamanlı PZR ile erime eğrisi analizi kontrol edilerek yapıldı.

Tablo 3.7: Glioma hücrelerinde ekspresyon seviyeleri değişen genlerin primer dizileri.

Gen İsimleri	Forward Primer	Reverse Primer
MDM2	GAAATTCCTTAGCTGACTATTGG	TTATCTTCAGGAAGCCAATTCTC
RAD51	TTGAAGCAAATGCAGATACTTCAG	GGCATTTATGCCCACTGCTC

3.9.2. Standart Grafik Oluşturulması

TMZ uygulamasının glioma hücreleri üzerindeki etkilerini ortaya koyan PZR deneyleri, RAD51 ve MDM2 genlerinin anlamlı olarak arttırdığını ortaya koydu. Değişen hücrel RAD51 ve MDM2 genlerine ait PZR ürünlerinin spesifitesi, erime eğrisi incelenerek ve PZR ürünlerine agaroz jelde bakılarak teyit edildi. Hücrel PZR ürünleri, eksozomal PZR çalışmalarında pozitif kontrol olarak ve standart grafiğin oluşturulmasında kullanıldı. Bu genlere ait PZR ürünleri Bölüm 3.7.2’de anlatıldığı şekilde Nanodrop spektrofotometrede ölçüldü ve absorbans değerleri kullanılarak gen ürünlerinin mikrolitredeki kopya sayısı aşağıda verilen denklem 3.4’e göre hesaplandı:

$$Kopya\ sayısı = \frac{DNA\ miktarı\ (ng) \times 6.022 \times 10^{23}}{DNA\ uzunluğu \times 10^9 \times 330} \quad (3.4)$$

Hesaplanan kopya sayıları üzerinden seri sulandırım yapılarak gerçek zamanlı PZR ile hücrel RAD51 ve MDM2 genleri için, C_T değerine karşılık logaritmik kopya sayısını veren standart grafikler oluşturuldu. Kontrol ve deney gruplarına ait eksozomal RAD51 ve MDM2 gen seviyelerindeki değişimlerin analizinde, standart grafiklerden elde edilen denklemler kullanıldı. Sonuçta her bir grubun eksozomlarında bulunan RAD51 ve MDM2 genlerine ait kopya sayıları hesaplandı. Değerlendirme aşamasında TMZ uygulanan deney gruplarındaki kopya sayısı, kontrol grubundaki kopya sayılarına oranlanarak gen anlatım seviyelerindeki değişimler saptandı. Deneyler en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.10. PROTEİN ANALİZLERİ

3.10.1. Hüresel Protein İzolasyonu

Bu bölümde yapılan tüm uygulamalar 25 cm²'lik kültür kaplarında gerçekleştirildi. Kontrol ve deney gruplarından elde edilen hücre pelletlerinden protein izolasyonları, proteaz inhibitörü (Santa Cruz Biotechnology, K1415) ve PMSF (Santa Cruz Biotechnology, A1615) eklenen ticari 1X RIPA Tamponu (Santa Cruz Biotechnology, sc-24948) kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre pelleti üzerine 150 µL soğuk (4°C) 1X RIPA tamponu eklendikten sonra, pellet süspansiyonuna hale getirildi. Etkin parçalanma için buz üzerinde tutulan hücre pelleti, pipet yardımıyla, mekanik parçalama işlemine maruz bırakıldı ve sonrasında ultrasonik su banyosunda 1 dakika bekletildi. Parçalama ve su banyosunda bekletme işlemleri her bir örnek için 5 defa tekrar edildi. Hücre tamamen parçalandıktan sonra süspansiyonuna hale getirilen homojenat 4°C'da, 13000xg hızda, 30 dakika santrifüj edildi (Sigma, 1-15K). Suda çözünebilir proteinlerin bulunduğu süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı ve SDS-PAGE ("Sodium Dodecyl Sulfate- Poly Acrylamide Gel Electrophoresis", Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi) ve Western blot analizlerinde kullanılmak üzere -20°C'da saklandı.

3.10.2. Eksozomal Proteinlerin İzolasyonu ve Konsantre Edilmesi

Kontrol ve deney gruplarına ait eksozomlardan protein izolasyonu, PMSF ve proteaz inhibitör kokteyli içeren ticari 10XRIPA Tamponu (Thermo Scientific™, 89900) kullanılarak gerçekleştirildi. 10XRIPA Tamponu 1:9 (v:v) oranında eksozom içeren sıvı ile karıştırıldı ve pipetaj yapılarak süspansiyonuna hale getirildi. Karışım 5 dakika ultrasonik su banyosunda bekletildi ve ardından 4°C'da, 13000xg hızda 30 dakika santrifüj edildi. Eksozomal proteinlerin bulunduğu sıvı yeni bir steril tüpe aktarıldıktan sonra, proteinleri konsantre etmek için metanol/kloroform protein çöktürme yöntemi kullanıldı. Bu amaçla, Wessel ve Flügge (1984) tarafından önerilen protein çöktürme yöntemi, modifiye edilerek kullanıldı. İlk aşamada 10XRIPA Tamponu içerisinde bulunan eksozomal proteinlerden 1 hacim alınarak üzerine 4 hacim metanol eklendi ve elde edilen karışım hızla karıştırıldı. Karışım üzerine daha sonra 1 hacim kloroform eklenerek tekrar hızla karıştırıldı. Son aşamada 3 hacim dH₂O eklenen karışım tekrar karıştırılarak homojen hale getirildi ve 14000xg'de, 4°C'da, 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonunda tüpte 3 faz oluştuğu görüldü. Üst sıvı tabakası dikkatli bir şekilde tüpten uzaklaştırıldı. Proteinler orta tabakada ince bir faz halinde görüldü. Üst sıvı tabakası uzaklaştırıldıktan sonra tüpün içine 4 hacim metanol eklendi ve oluşan karışım tekrar

karıştırılarak 14000xg'de, 4 °C'da, 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen son üründe eksozomal proteinleri içeren pellet %2 SDS içeren Tris-HCl (pH 6.8) tamponu içinde çözündürüldü.

3.10.3. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

İzole edilen hem hücreSEL hem eksozomal protein örneklerinin konsantrasyonlarının belirlenmesinde Bikinkoninik asit (BCA) yöntemine göre hazırlanmış, ticari "BCA Protein Assay" kiti (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific™, 23225) kullanıldı. Kit içinde bulunan BSA ("Bovine Serum Albumin", Sığır Serum Albumini) farklı konsantrasyonlarda (25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/mL) hazırlanarak protein standartı oluşturulmasında kullanıldı. Konsantrasyonları belirlenecek olan proteinler ile parçalama tamponu (kör örnek), 5 kat dH₂O kullanılarak seyreltilti. Kit bileşenlerinden reaktif A ve B solüsyonları 50:1 (v:v) oranında karıştırılarak BCA belirteci hazırlandı. 96 kuyucuklu mikropolanın kuyucuklarına 200 µL BCA belirteci konularak üzerine 25 µL dilüe edilmiş protein örnekleri, parçalama tamponu (kör örnek) veya standartlar eklendi. Mikropolaka 30 dakika, 37°C'lık etüvde bekletildi. Oluşan renkli ürünlerin 562 nm dalga boyundaki absorpsanları mikropolaka okuyucu yardımı ile ölçüldü. Örneklerin gerçek absorpsan değerleri kör örneğin absorpsanı çıkarılarak belirlendi. Tüm analizler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Örneklerin protein konsantrasyonları, BSA kullanarak oluşturulan standart grafik yardımıyla hesaplandı.

3.11. ELEKTROFORETİK ANALİZLER

Kontrol ve deney gruplarına ait hücrelerden ya da eksozomlardan izole edilen proteinlerin ayrıştırılmasında SDS-PAGE yöntemi kullanıldı (Walker, 2002). Yöntemde kullanılan solüsyonlar ve içerikleri Tablo 3.8'de verildi.

Tablo 3.8: SDS-PAGE’de kullanılan çözeltiler ve içerikleri.

Çözeltiler	Bileşenler	
%30 Akrilamid Solüsyonu	%40 Akrilamid/Bis (Biorad,161-0146) dH ₂ O	100mL 120 mL’ye tamamlanır.
1.875 M Tris-HCl Tamponu (pH 8.8)	Trizma-Baz (Sigma-Aldrich,T1513) dH ₂ O	22.71 g 100 mL’ye tamamlanır.
0.6 M Tris-HCl Tamponu (pH 6.8)	Tris dH ₂ O	7.27 g 100 mL’ye tamamlanır.
%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	SDS ddH ₂ O	10 g 100 mL’ye tamamlanır.
%10 Amonyum Persülfat (APS)	APS (Thermo Fisher Scientific,17874) dH ₂ O Jel döküleceği zaman taze hazırlandı	0.1 g 100 mL’ye tamamlanır.
1X Yürütme Tamponu (25 mM Tris, 192 mM Glisin, %0.1 SDS, pH 8.3)	Trizma-Baz (Sigma-Aldrich, G8898) Glisin SDS dH ₂ O	3.03 g 14.4 g 1 g 1 L’ye tamamlanır.
4X Örnek Yükleme Tamponu	(BIORAD, 1610747)	

Jelin döküleceği kaset hazırlanmadan önce kullanılan camlar (“0.75 mm spacer plates” ve “short plates”), taraklar (0.75 mm) ve contalar (“gaskets”) %70’lik etanol (EtOH) kullanılarak temizlendi. %10’luk ayırma jeli Tablo 3.9’da verilen içerik ve oranlara göre karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan jel karışımı, üretici firmanın önerdiği şekilde jel kasetine takılmış ve jel dökme tablasına yerleştirilmiş olan camların arasına, hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek döküldü. Yükleme jeli için ayrılan kısım, yüzeyin düzgün olmasını sağlamak ve polimerizasyonu engelleyen oksijen ile jelin teması kesmek için dH₂O ile kapatıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra jelin üst kısmındaki dH₂O uzaklaştırılarak %5’lik yükleme jeli hazırlandı (Tablo 3.9) ve polimerize olan ayırma jelinin üstüne döküldü. Örnek yükleme kuyularının oluşması için yükleme jeli polimerleşmeye başlamadan önce 10’luk tarak, camların arasına yerleştirildi. Polimerizasyonu tamamlanan jel kaseti elektroforez tankına yerleştirildikten sonra, 1X yürütme tamponu (Tablo 3.8) kasetler arasına ve tank içerisine doldurularak tarak dikkatlice çıkarıldı. Oluşan örnek yükleme kuyuları 1X yürütme tamponu ile yıkandıktan sonra jel örnek yüklemeye hazır hale geldi.

Tablo 3.9: SDS-PAGE ayırma ve yükleme jeli içerikleri (2 jel hazırlamak için gereken hacimler).

Jel İçerikleri	Ayırma Jeli (%10 Akrilamid)	Yükleme Jeli (%5 Akrilamid)
Tris-HCl (1.875 M, pH:8.8)	2 mL	-
Tris-HCl (0.6 M, pH:6.8)	-	500 µL
dH ₂ O	4.524 mL	3.75 mL
%30 Akrilamid Çözeltisi	3.324 mL	674 µL
%10 Sodyum dodesil sülfat (SDS)	100 µL	50 µL
%10 Amonyum persülfat (APS)	50 µL	25 µL
TEMED	3.75 µL	7 µL

Jelde ayrıştırılacak protein örnekleri; 3:1 (v:v) oranında 4X örnek yükleme tamponu (250 mM Tris-HCl pH 6,8; %8 SDS; %0,2 Bromofenol blue; %40 Gliserol; %20 β-merkaptolanol) ile karıştırılarak 95°C’da 5 dakika inkübe edildi. Jelin ilk kuyusuna protein markırı (ThermoFisher BP3603) yüklendi. Denatüre hale getirilen hücresel ve eksozomal protein örnekleri ise 30 µg/kuyucuk olacak şekilde jele yüklendi. Elektroforez tankı (Mini-Protean, BioRad, ABD) güç kaynağına (PowerPac™ Basic Power Supply, Biorad) bağlanarak, jel sabit voltajda (90V), örnek yükleme tamponu içeriğinde bulunan bromofenol mavisine ait bant, jelin alt kenarına ulaşana dek yürütüldü.

3.12. İMMÜNOLOJİK ANALİZLER

Hücresel ve eksozomal proteinlerin SDS-PAGE yöntemi ile ayrıştırılmasının ardından, jelde bulunan tüm proteinler yarı kuru blotlama sistemi (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad) aracılığıyla polivinilidin diflorür (PVDF) membrana (0.22 µm, “West-lott™ PVDF Transfer membrane”, iNtRON Biotechnology ITM-P3032) aktarıldı. Aktarım işlemi, Western blotlama ve membran “stripping” için kullanılan tüm tampon çözeltileri ve içerikleri Tablo 3.10’da verildi.

Tablo 3.10: Aktarım işlemi, Western blotlama ve membran “stripping” için kullanılan tampon çözeltileri ve içerikleri.

Tampon Çözeltiler	Bileşenler	
1X Transfer Tamponu	Trizma-Baz	3.03 g
	Glisin	14.4 g
	dH ₂ O	Son hacim 850 mL'ye tamamlandı.
	Metanol	150 mL (<i>Transfer tamponu kullanılmadan önce eklendi</i>)
%5'lik Bloklama Tamponu	Yağsız süt tozu (Fluka 70166)	5 g
	1 X Yıkama Tamponu	100 mL'ye tamamlandı.
1X Yıkama Tamponu (1X TBS-Tween-20) (ph 7.5)	Trizma-Baz (20 mM)	2.42 g
	NaCl (150 mM) (Merck 106400)	8.76 g
	dH ₂ O	1 L' ye tamamlandı.
	Tween-20 (%0.1) (Merck 822184)	1 mL
“Stripping” Tamponu	%10'luk SDS	20 mL
	0.5 M Tris-HCl (pH:6.8)	12.5 mL
	Ultrasaf su	67.5 mL
	2-merkaptotanol (AppliChemA,1108)	0.8 mL

Aktarım işlemi için jel boyutunda kesilen PVDF membran, sırasıyla 1 dakika metanolde, 5 dakika dH₂O ve 15 dakika 1X transfer tamponunda (Tablo 3.10) bekletildi. SDS-PAGE'de yürütülen jel ise 15 dakika 1X transfer tamponunda bekletildi. Bu işlemin ardından 1X transfer tamponu ile ıslatılmış olan 3 adet Watman kağıdı transfer cihazına (Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell BIO-RAD) yerleştirildi. Watman kağıtlarının üzerine sırasıyla 1X transfer tamponunda bekletilen membran, jel ve tekrar transfer tamponu ile ıslatılmış 3 adet Watman kağıdı konuldu. Katmanlar arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Blot tankı kapatılıp cihaza yerleştirilmeden önce fazla transfer tamponu peçete yardımıyla silindi. Transfer işlemi 25 V akım uygulanarak 30 dakika süreyle gerçekleştirildi.

Transfer işleminin ardından protein bulunmayan boş alanların kapatılması için membran, %5'lik bloklama tamponu içinde (Tablo 3.10) oda sıcaklığında, 2 saat inkübasyona bırakıldı. Bu işleminin ardından membran, aynı bloklama tamponu kullanılarak hazırlanmış primer antikor ile 4°C'da gece boyu muamele edildi. Analizi yapılacak hedef proteinlere ait primer antikorlar Tablo 3.11'de verildi. Gece boyu primer antikor ile muamelenin ardından, antikor kalıntılarını uzaklaştırmak için membran, 1X yıkama tamponu (%0.05 (v/v) Tween-20 içeren TBS) (Tablo 3.10) ile 4 kez 15'er dakika yıkandı. Primer antikor kalıntıları uzaklaştırıldıktan

sonra membran, bloklama tamponu içinde uygun oranlarda hazırlanan sekonder antikor (Tablo 3.11) ile oda sıcaklığında, 2 saat inkübe edildi. Bu işlemin ardından membran, 1X yıkama tamponu ile 4 kez 15'er dakika tekrar yıkandı. Antikorların bağlandığı spesifik proteinlerin görüntülenebilmesi için “ECL Plus Western Blotting Detection System (Thermo Scientific™, 32106) kullanıldı. Kit içeriğinde bulunan reaktifler (A ve B solüsyonları) 1:1 (v:v) oranında karıştırılarak karanlık odada ve kırmızı ışık altında membrana uygulanarak ve 5 dakika bekletildi. İşlemin ardından membran üzerindeki fazla karışım uzaklaştırıldı ve membran görüntüleme cihazına (ChemiDoc MP, Bio-Rad) yerleştirildi. Membrandan elde edilen protein bant görüntüleri ImageLab 5.2.1 yazılımı kullanılarak analiz edildi.

Tablo 3.11: Tez kapsamında kullanılan primer ve sekonder antikorlar.

Antikor	Konak	Marka	Katalog Numarası	Kullanılan Oran
Hsp60	Tavşan	Novus	NBP1-77397	1/2000
Hsp72 (HspA1B)	Tavşan	Novus	NBP2-16896	1/1000
Hsp27	Tavşan	Novus	NB120-5579	1/1000
Alix (1A12)	Fare	Santa Cruz	sc-53540	1/200
TSG101	Fare	Novus	NB200-112	1/500
GAPDH	Fare	Invitrogen	MA5-15738	1/2500
Keçi anti-Fare Sekonder Antikor, HRP	Keçi	Boster	BA1050	1/2500
Keçi anti-Tavşan Sekonder Antikor, HRP	Keçi	Boster	BA1054	1/2500

Elde edilen protein bant görüntülerinin normalizasyon analizleri için, öncelikle bant görüntüleri alınan membranlardan bağlı antikorlar uzaklaştırıldı ve aynı membran yeniden blotlanmaya uygun hale getirildi. “Stripe etmek” olarak adlandırılan bu işlemi gerçekleştirmek amacıyla “stripping” solüsyonu hazırlandı (Tablo 3.10) ve 65°C’da ısıtıldı. Membran, ısıtılan tampon çözeltisi ile yüzeyi kaplı olacak şekilde, 2 saat 65°C’da inkübe edildi ve inkübasyon işleminin ardından ultrasaf su ile 5 kez 15'er dakika yıkandı. Bu işlemi takiben membran, 1 X yıkama tamponu ile 5 kez 5'er dakika tekrar yıkandı. Blotlama işlemi için uygun hale gelen membran tekrar %5'lik bloklama tamponu içinde oda sıcaklığında, 2 saat inkübasyona bırakıldı. Bu aşamada normalizasyon işlemi için stripe edilmiş membran, HRP (yaban turpu peroksidazı) işaretli GAPDH primer antikoru ile 4°C’da gece boyunca muamele edildi. İşlem tamamlandığında membran 1X yıkama tamponu ile 4 kez 15'er dakika yıkandı ve oda

sıcaklığında uygun sekonder antikor ile inkübe edildi. Sekonder antikor kalıntıları da yıkama işlemi ile uzaklaştırıldıktan sonra ECL Plus Western Blotting Detection System” kullanılarak GAPDH protein bantları alındı. Protein bantlarının normalizasyon hesaplamaları için ImageLab 5.2.1 yazılımı kullanıldı.

3.13. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

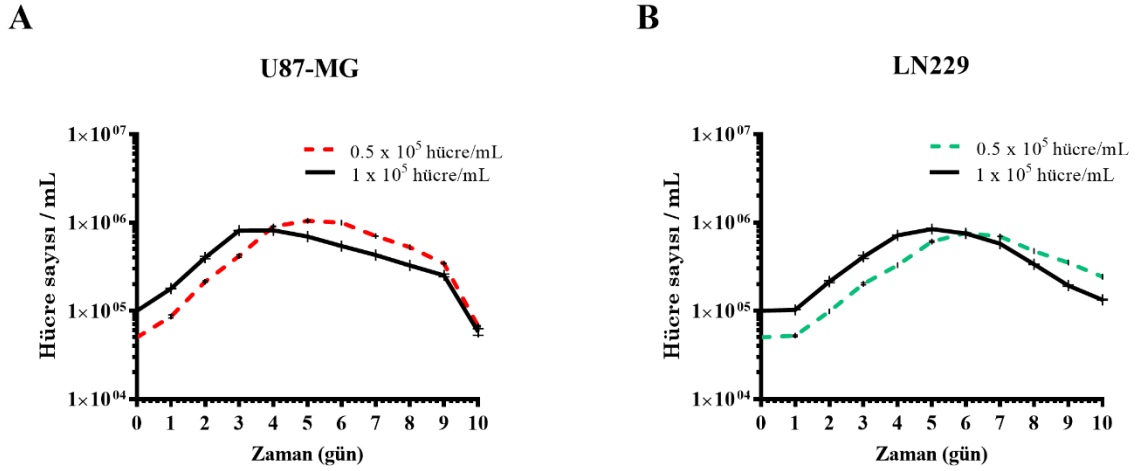
Tez kapsamında yapılan tüm deneyler en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve istatistiksel analizler (aritmetik ortalama hesaplanması, standart sapma değerlerinin belirlenmesi ve grafik çizimi) için “GraphPad Prism 7.0” programı kullanıldı. Deney grupları arasındaki tutarlılık tek-yönlü ANOVA (“one-way ANOVA”) testi ve üst test olarak Dunnett’s testi kullanılarak belirlendi. Yapılan analizlerde anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. U87-MG VE LN229 HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA EĞRİLERİ

Başlangıç sayıları 0.5×10^5 ve 1×10^5 hücre/mL olan U87-MG ve LN229 insan glioma hücre hatlarına ait çoğalma eğrilerinin grafikleri Şekil 4.1’de verildi. U87-MG hücre hattına ait grafik incelendiğinde, başlangıçtaki hücre sayısının 0.5×10^5 hücre/mL olduğu durumda hücrelerin logaritmik faza 1. gün, durağan faza ise 5. gün girdikleri saptandı. Başlangıç hücre sayısı 1×10^5 hücre/mL olduğunda ise hücrelerin logaritmik faza yine 1.gün girdikleri fakat durağan faza 3. gün geçtikleri gözlemlendi. Hücre çoğalma grafiklerindeki sayılar Bölüm 3.2’de verilen denklemde yerine konulduğunda U87-MG hücrelerinin jenerasyon süresinin yaklaşık 16 saat olduğu belirlendi.

LN229 hücre hattına ait grafik incelendiğinde başlangıç hücre sayısı 0.5×10^5 hücre/mL olduğunda, hücrelerin logaritmik faza 1. gün girdikleri, durağan faza ise 6. gün girdikleri görüldü. Başlangıç hücre sayısı 1×10^5 hücre/mL olduğunda ise hücrelerin logaritmik faza yine 1.gün girdiği, ancak durağan faza 5. gün geçtikleri saptandı. Grafik verileri Bölüm 3.2’de verilen denklemde kullanıldığında LN229 hücrelerinin jenerasyon süresinin yaklaşık 30 saat olduğu belirlendi. Bu tez kapsamında kullanılan her iki hücre hattı için de elde edilen jenerasyon süresi verilerinin, literatürle uyumlu olduğu görüldü (Reichert ve diğ.,2002; Huang ve diğ., 2004).

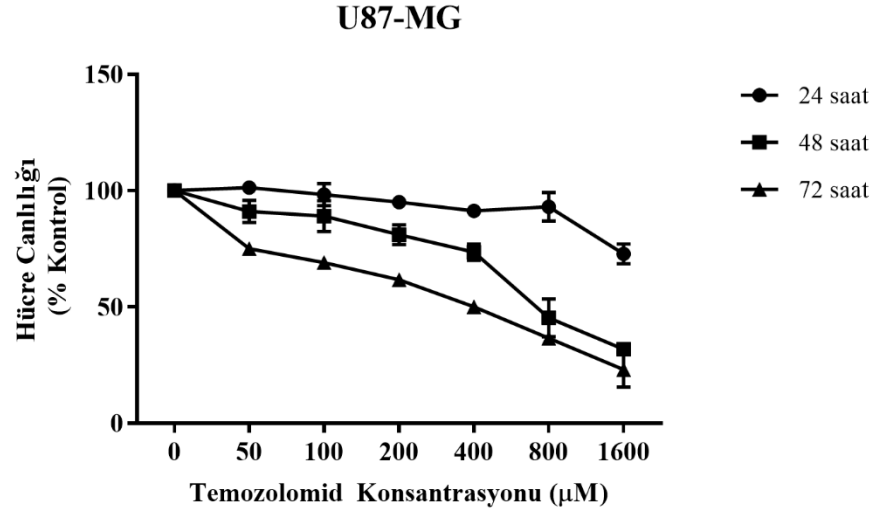


Şekil 4.1: Başlangıç hücre sayıları 0.5×10^5 hücre/mL ve 1×10^5 hücre/mL olan U-87 MG (A) ve LN229 (B) insan glioma hücrelerine ait çoğalma eğrileri.

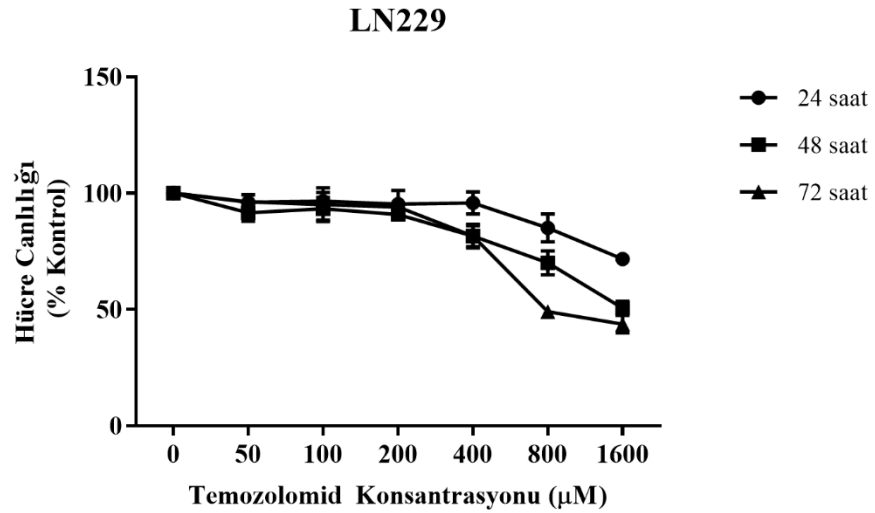
4.2. TEMOZOLOMİDİN U87-MG VE LN229 HÜCRE HATLARI ÜZERİNE SİTOTOKSİK ETKİSİ

Glioma tedavisinde ilaç olarak kullanılan TMZ'nin, U87-MG ve LN-229 hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri MTT analizi (canlılık testi) ile değerlendirildi. MTT analizleri birbirinden bağımsız en az 5 farklı tekrar ile gerçekleştirildi. Tablo 3.1 ve 3.2'de verilen sayılardaki hücreler 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildikten 24 saat sonra, hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa farklı konsantrasyonlarda 0 (kontrol grubu), 50, 100, 200, 400, 800, 1600 μM TMZ içeren besiyerleri eklenerek 24, 48 ve 72 saatlik toksik etkileri değerlendirildi. Hücrelere uygulanan TMZ'nin etkileri GraphPad Prism® 7.00 programında sigmoidal doz yanıtı eğrisi ("sigmoidal dose response variable slope") oluşturularak değerlendirildi ve canlı hücre sayısını %50 düşüren konsantrasyonlar ("half maximal inhibitory concentration", IC_{50}) hesaplandı. MTT analizleri sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.2'de verildi.

A



B



Şekil 4.2: TMZ'nin U87-MG(A) ve LN229(B) hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde uygulanmasının, hücre canlılığı üzerine etkileri (24, 48 ve 72 saatlik uygulama için R^2 değerleri sırasıyla U87-MG için 0.808, 0.955, 0.971 ve LN229 için ise 0.834, 0.945, 0.963).

MTT analiz sonuçları, U87-MG ve LN229 hücrelerine TMZ uygulanmasının, doza ve zamana bağlı bir şekilde hücre ölümüne neden olduğunu gösterdi. Her iki hücre hattında da düşük dozlarda ($\leq 50 \mu\text{M}$) uygulanan TMZ hücre canlılığı üzerinde önemli bir fark yaratmazken, yüksek dozlarda ($\geq 800 \mu\text{M}$) uygulanan TMZ'nin zamana bağlı olarak hücre canlılığını inhibe ettiği görüldü. U87-MG ve LN229 hücrelerine 24, 48 ve 72 saatlik süreyle uygulanan TMZ'nin canlı hücre sayısını %50 oranında düşüren konsantrasyonları Tablo 4.1'de verildi. Bu

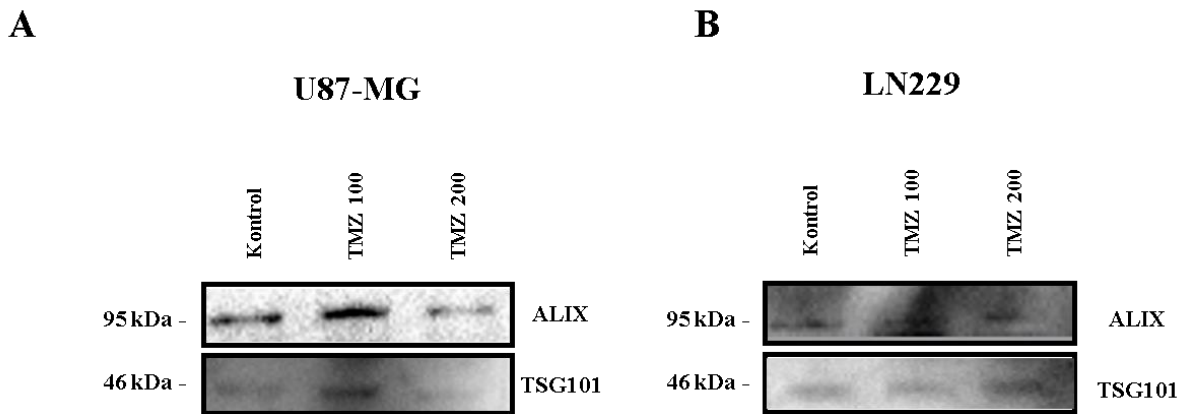
analizlerden elde edilen sonuçlara göre, tezin devam çalışmalarında kullanılacak TMZ'nin her iki hücre hattına da 72 saat süreyle 100 μ M ve 200 μ M konsantrasyonlarında uygulanmasına karar verildi. U87-MG hücrelerine uygulanan 100 μ M TMZ %12 oranında, 200 μ M TMZ ise %30 oranında hücre ölümüne neden olurken; LN229 hücrelerine uygulanan 100 μ M TMZ %4 oranında, 200 μ M TMZ ise %5 oranında canlılığa neden oldu.

Tablo 4.1: U87-MG ve LN229 hücrelerine uygulanan TMZ'nin IC₅₀ değerleri.

	U87-MG	LN229
24 saat	-	-
48 saat	776.24 μ M	1584.89 μ M
72 saat	398.10 μ M	758.57 μ M

4.3. EKSOZOM KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI

Bu kapsamda Bölüm 3.6'da anlatıldığı şekilde eksozom izolasyonu yapıldıktan sonra, Bölüm 3.10.2'de açıklandığı gibi eksozomal protein izolasyonu gerçekleştirildi. Eksozomal protein izolasyonunun doğruluğunu kontrol etmek için eksozomal markır olarak kabul edilen ALIX ve TSG101 proteinlerinin varlığı Bölüm 3.12'de anlatıldığı şekilde Western blot analizi aracılığıyla gösterildi. Tez kapsamında çalışılan hücre hatlarına ait tüm kontrol ve deney gruplarından elde edilen eksozomal markır görüntüleri Şekil 4.3'te verildi.

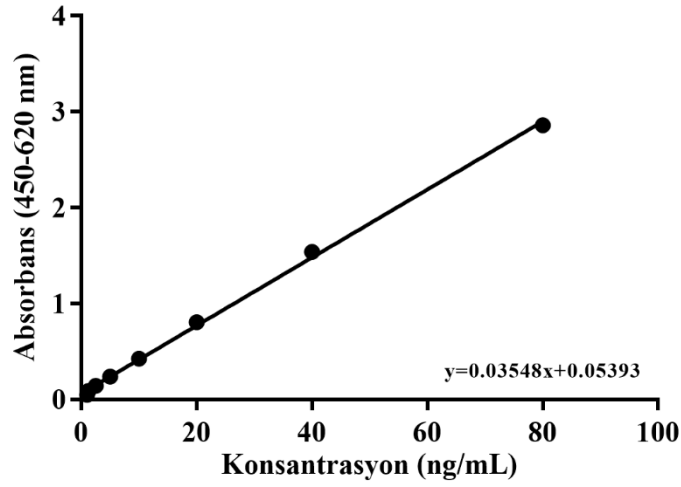


Şekil 4.3: U87-MG (A) ve LN229(B) hücrelerinden kökenlenen eksozomlara ait markır görüntüleri (**Kontrol:** Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, **TMZ 100:** 100 μ M TMZ uygulanan hücre grubu, **TMZ 200:** 200 μ M TMZ uygulanan hücre grubu).

Bu tez çalışmasında, immünolojik analizlere ek olarak, eksozomların varlık ve miktar tayininde genel bir eksozom markırı kabul edilen, CD63 varlığına dayalı PS Capture™ Exosome ELISA Kiti (Katalog No: 297-79201, FUJIFILM) de kullanıldı. Bu amaçla konsantrasyonu BCA yöntemi ile (Bkz. Bölüm 3.10.3) hesaplanan eksozomal protein, farklı konsantrasyonlarda (0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 ng/mL) seyreltilerek, öncelikle standart bir grafik oluşturuldu (Şekil 4.4). Elde edilen grafik ve doğru denklemi kullanılarak kontrol ve deney gruplarının eksozom miktarları hesaplandı. Her iki hücre hattında da birbirinden bağımsız 3 farklı deney grubu kullanılarak elde edilen sonuçlar Şekil 4.5'te verildi. Standart grafik (Şekil 4.4) ve doğru denklemi kullanılarak hücrelerin salgıladığı eksozom miktarları hesaplandı. Bu analize göre U87-MG hücrelerinin kontrol grubunun besiyerine salgıladığı eksozom miktarı 799.2 ± 73.24 ng/mL, 100 μ M TMZ uygulanan U87-MG hücrelerinin besiyerine salgıladığı eksozom miktarı 729.7 ± 81.74 ng/mL ve 200 μ M TMZ uygulanan U87-MG hücrelerin besiyerine salgıladığı eksozom miktarı 866.9 ± 42.92 ng/mL olarak bulundu. Sonuçlar farklı konsantrasyonlarda TMZ uygulamasının U87-MG hücre hattından eksozom salınımı üzerinde, istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir fark oluşturmadığını ortaya koydu (Şekil 4.5 (A)).

Aynı denklem yardımıyla LN229 hücrelerinin kontrol grubunun besiyerine salgıladığı eksozom miktarı 2459 ± 266.1 ng/mL, 100 μ M TMZ uygulanan LN229 hücrelerinin besiyerine salgıladığı eksozom miktarı 2609 ± 306.4 ng/mL ve 200 μ M TMZ uygulanan LN229 hücrelerinin besiyerine salgıladığı eksozom miktarı ise 2633 ± 261.6 ng/mL olarak hesaplandı. U87-MG hücrelerine ait sonuçlara benzer şekilde, farklı konsantrasyonlarda TMZ uygulamasının LN229 hücre hattından eksozom salınımı üzerinde, istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı görüldü (Şekil 4.5 (B)). Bununla birlikte iki hücre eksozom miktarları açısından karşılaştırıldığında, LN229 hücrelerinden salınan eksozom miktarının, U87-MG hücrelerine kıyasla daha fazla olduğu tespit edildi.

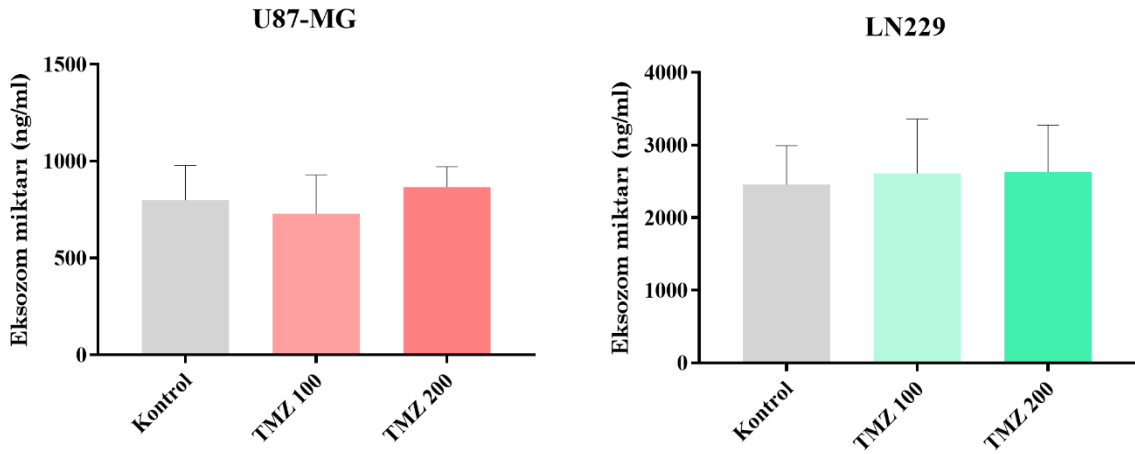
CD63 ELISA Standart Grafiği



Şekil 4.4: Eksozomal proteinlerdeki CD63 proteinleri (0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 ng/mL) kullanılarak oluşturulan standart grafik (R^2 değeri 0.998).

A

B



Şekil 4.5: U87-MG (A) ve LN229 (B) hücrelerine farklı konsantrasyonlarında uygulanan TMZ'nin, hücrelerden salınan eksozom miktarları üzerindeki etkileri (**Kontrol**: Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, **TMZ 100**: 100 μ M TMZ uygulanan hücre grubu, **TMZ 200**: 200 μ M TMZ uygulanan hücre grubu).

4.4. TEMOZOLOMİD UYGULAMASININ İLAÇ YANITI İLE İLGİLİ GENLERİN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Tez kapsamında LN229 ve U87-MG hücrelerine uygulanan TMZ'nin etkisini değerlendirmek amacıyla; apoptoz, oksidatif stres, DNA hasar genlerini de içeren toplam 92 genin analizi, göreceli kantifikasyon analiz tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. Deneyler en az üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı ve ortalama değerler grafiğe yansıtıldı. Değerlendirme aşamasında herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubundaki genlerin anlatım seviyesi 1 olarak kabul edildi ve diğer gruplardaki genlerin anlatım seviyeleri kontrol grubu ile kıyaslanarak hesaplandı. Deney grupları arasındaki tutarlılık tek-yönlü ANOVA ("one-way ANOVA") testi ve üst test olarak Dunnett's testi kullanılarak belirlendi.

Bu çalışma kapsamında öncelikle 6 kuyucuklu kültür kaplarında üretilen hücrelerden izole edilen RNA'ların konsantrasyonları ve kaliteleri belirlendi (Tablo 4.2). Belirlenen RNA konsantrasyonlarının ve kalitelerinin, cDNA sentezi ve gerçek zamanlı PZR çalışmalarında kullanılmak için uygun olduğu görüldü. Her iki hücre hattından elde edilen RNA'lardan, cDNA sentezi başarılı bir şekilde gerçekleştirildi ve sonuçlar GAPDH "housekeeping" geninin gerçek zamanlı PZR analizi yapılarak gösterildi (EK 3).

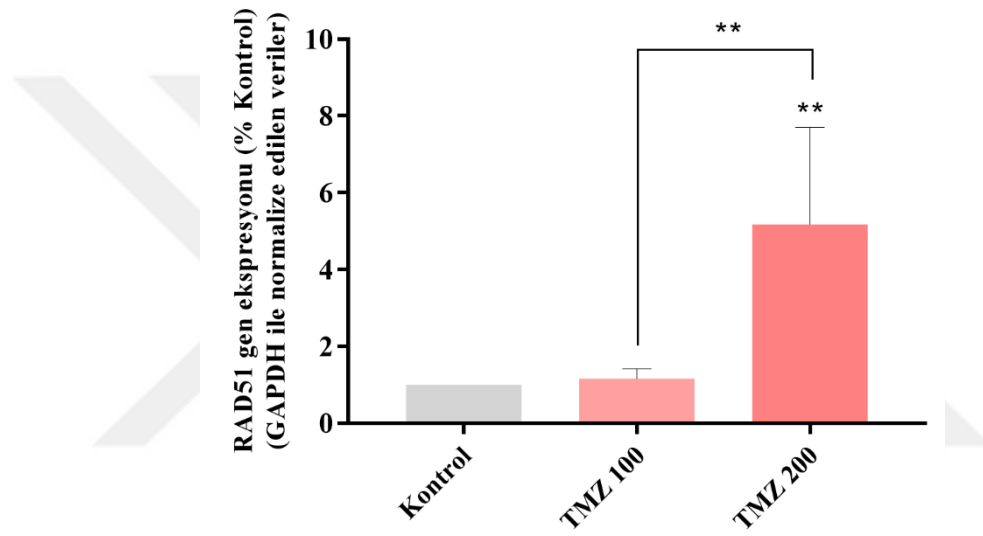
Tablo 4.2: TMZ uygulaması sonucu U87-MG ve LN229 hücrelerinden izole edilen RNA'ların miktar ve kalite tayini (**Kontrol:** Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, **TMZ 100:** 100 μ M TMZ uygulanan hücre grubu, **TMZ 200:** 200 μ M TMZ uygulanan hücre grubu).

	Örnek	RNA Konsantrasyonu (ng/ μ L)	260/280
U87-MG	Kontrol	341.3 \pm 49.10 ng/ μ L	2.10
	100 TMZ	239.5 \pm 11.86 ng/ μ L	2.08
	200 TMZ	259.3 \pm 15.86 ng/ μ L	2.11
LN229	Kontrol	169.7 \pm 36.17 ng/ μ L	2.05
	100 TMZ	175.2 \pm 31.37 ng/ μ L	2.05
	200 TMZ	189.3 \pm 37.72 ng/ μ L	2.07

Bu analiz aşamasında 100 μ M ve 200 μ M TMZ uygulanan her iki hücre hattında da 92 genin analizi, kontrol grubu ile karşılaştırılarak yapıldı ve sonuçlar 3 farklı housekeeping gen (HPRT-YWAZ-GAPDH) ile normalize edildi. Analiz sonuçları 200 μ M TMZ uygulamasının her iki hücrenin farklı genlerinde anlamlı bir artış ortaya çıkardığını gösterdi. U87-MG hücrelerine

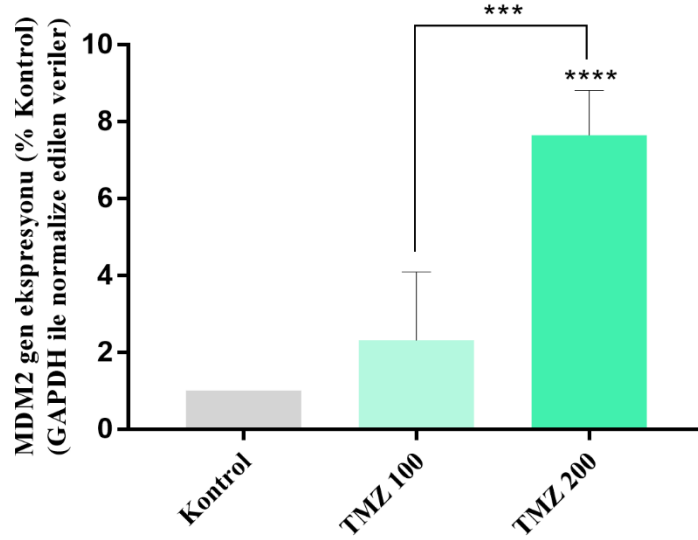
uygulanan 200 μ M TMZ'nin RAD51 gen ekspresyonunu istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde arttırdığı (5.28 kat) görülürken (Şekil 4.6), 100 μ M TMZ uygulamasının RAD51 geninin anlatım seviyesinde herhangi bir anlamlı değişime neden olmadığı belirlendi. Benzer şekilde LN229 hücrelerine uygulanan 200 μ M TMZ, MDM2 geninin ekspresyon seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırırken (7.64 kat), 100 μ M TMZ uygulamasının MDM2 geninin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir etki yaratmadığı gözlemlendi (Şekil 4.7).

U87-MG



Şekil 4.6: U87-MG hücrelerine TMZ uygulanmasının RAD51 gen ekspresyonu üzerindeki etkileri (** $p < 0.01$, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir.) (**Kontrol:** Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, **TMZ 100:** 100 μ M TMZ uygulanan hücre grubu, **TMZ 200:** 200 μ M TMZ uygulanan hücre grubu).

LN229



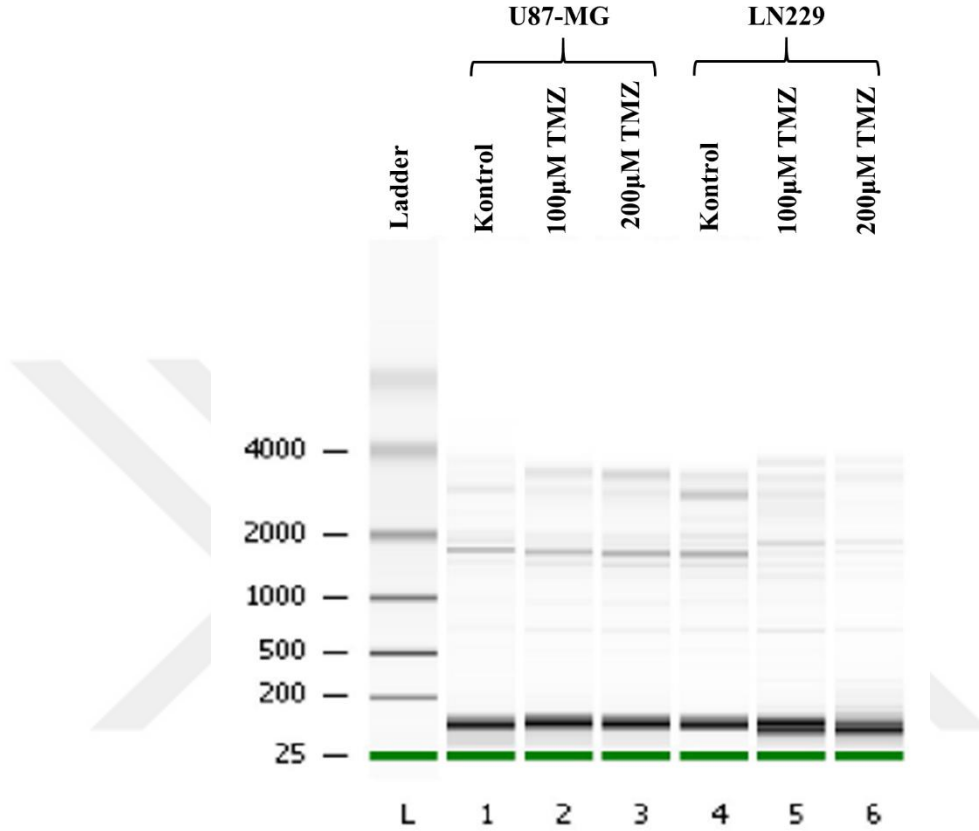
Şekil 4.7: LN229 hücrelerine TMZ uygulanmasının MDM2 gen ekspresyonu üzerindeki etkileri (** $p < 0.001$ ve **** $p < 0.0001$, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir.) (**Kontrol:** Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, **TMZ 100:** 100 μM TMZ uygulanan hücre grubu, **TMZ 200:** 200 μM TMZ uygulanan hücre grubu).

4.5. TEMOZOLOMİD UYGULAMASININ EKSOZOMAL MDM2 VE RAD51 GENLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Tez kapsamında TMZ uygulamasının sadece U87-MG ve LN229 hücrelerindeki RAD51 ve MDM2 genlerinin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri değil, eksozomal RAD51 ve MDM2 genleri üzerindeki etkileri de değerlendirildi. Bu kapsamda Bölüm 4.4'te elde edilen verilere dayanarak U87-MG hücrelerinde sadece eksozomal RAD51 geni incelenirken, LN229 hücrelerinde ise yalnızca MDM2 geni ekspresyon seviyeleri değerlendirildi. Yapılan gerçek zamanlı PZR analizinde, hedef gene ait PZR ürünleri ile standart grafikler oluşturularak mutlak kantifikasyon analizi gerçekleştirildi. Deneyler en az üç tekrarlı olacak şekilde farklı deney setleri kullanılarak yapıldı ve ortalama değerler grafiğe yansıtıldı. Deney grupları arasındaki tutarlılık tek-yönlü ANOVA ("one-way ANOVA") testi ve üst test olarak Dunnett's testi kullanılarak belirlendi.

Çalışma kapsamında Bölüm 3.6'da anlatılan şekilde eksozom izolasyonu yapıldıktan sonra eksozomal RNA'lar izole edilerek, RNA'ların kalitesi ve miktarları Agilent Bioanalyzer ile

kontrol edildi (Şekil 4.8 ve Tablo 4.3). Örneklerin RNA konsantrasyonları ve kaliteleri cDNA sentezinde kullanım için uygun bulundu.

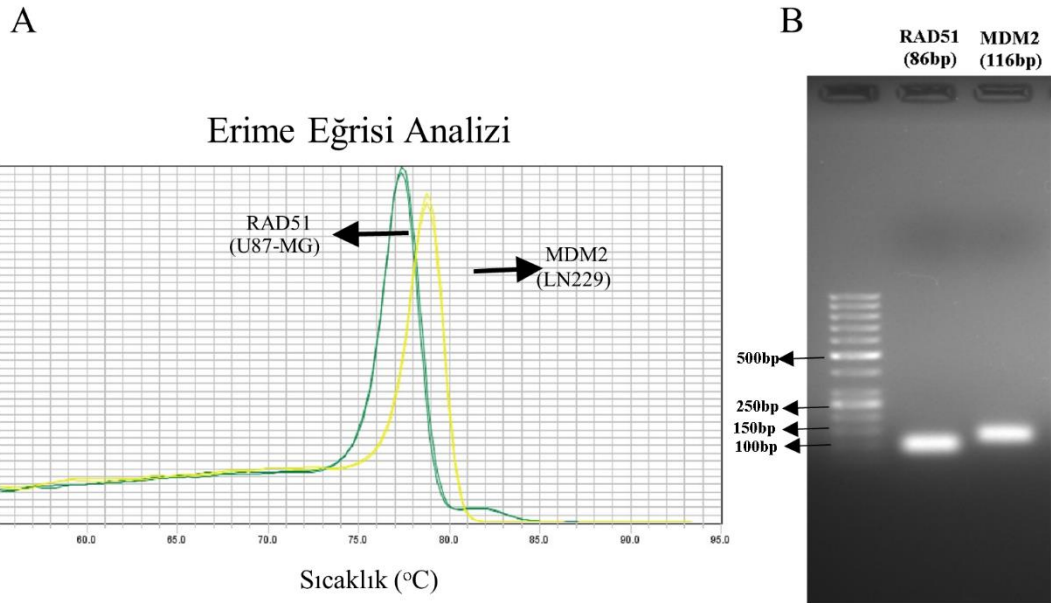


Şekil 4.8: U87-MG ve LN229 hücrelerinden izole edilen eksozomal RNA'ların Agilent Bioanalyzer görüntüsü (**Kontrol:** Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, **TMZ 100:** 100 µM TMZ uygulanan hücre grubu, **TMZ 200:** 200 µM TMZ uygulanan hücre grubu).

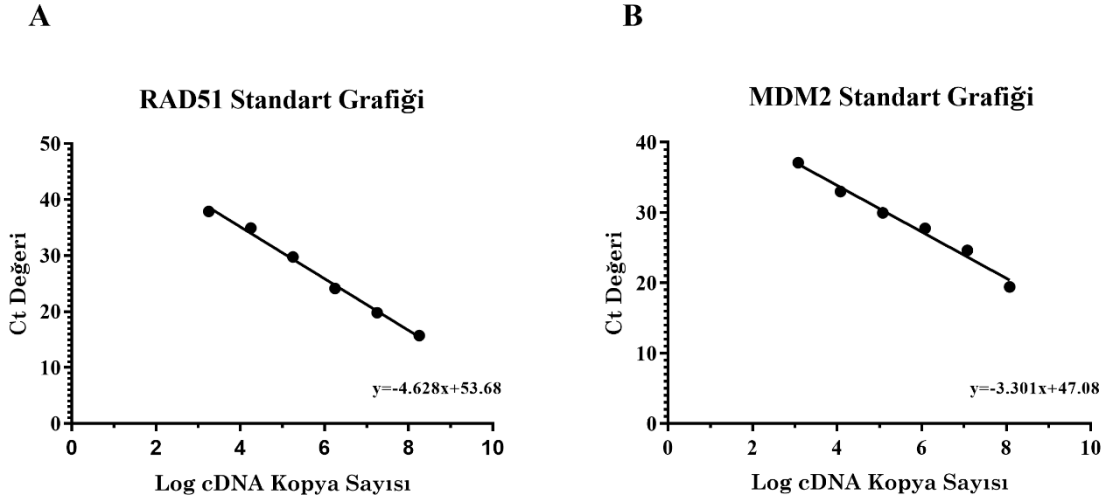
Tablo 4.3: Agilent Bioanalyzer sonuçlarına göre U87-MG ve LN229 hücrelerinden izole edilen eksozomal RNA'ların konsantrasyonları (**Kontrol:** Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, **TMZ 100:** 100 µM TMZ uygulanan hücre grubu, **TMZ 200:** 200 µM TMZ uygulanan hücre grubu).

	Örnek	Eksozomal RNA Konsantrasyonu (pg/µL)
U87-MG	Kontrol	12.395 ± 5.430 pg/µL
	100 TMZ	27.829 ± 4.389 pg/µL
	200 TMZ	22.830 ± 4.167 pg/µL
LN229	Kontrol	8.330 ± 5.967 pg/µL
	100 TMZ	10.115 ± 4.355 pg/µL
	200 TMZ	16.395 ± 8.861 pg/µL

Bu analizde, RAD51 ve MDM2 genlerinin ekspresyon seviyelerindeki farklılığı eksozom düzeyinde belirlemek için, gerçek zamanlı PZR'den elde edilen RAD51 ve MDM2 PZR ürünleri pozitif kontrol olarak kullanıldı. Gen ürünlerinin spesifitesinin incelendiği erime eğrisi grafiği ve agaroz jelde ayrılma görüntüleri Şekil 4.9'da verildi. PZR ürünlerinin Nanodrop spektrofotometredeki ölçüm değerleri RAD51 geni için 836 ng/μL, MDM2 geni için 751 ng/μL olarak belirlendi. Bu değerler Bölüm 3.9.2'de verilen denklemde yerine konularak her iki gene ait PZR ürünlerinin mikrolitresindeki kopya sayısı hesaplandı. Buna göre RAD51 genine ait PZR ürününde $\sim 18 \times 10^{12}/\mu\text{L}$ kopya bulunurken, MDM2 genine ait PZR ürününde $\sim 12 \times 10^{12}/\mu\text{L}$ kopya saptandı. Son olarak kopya sayısına göre yapılan seri sulandırılmalar sayesinde hem RAD51 hem de MDM2 genleri, için C_T değerine karşılık logaritmik cDNA kopya sayısını veren standart grafikler oluşturuldu. RAD51 ve MDM2 genleri için oluşturulan standart grafik Şekil 4.10'da verildi.

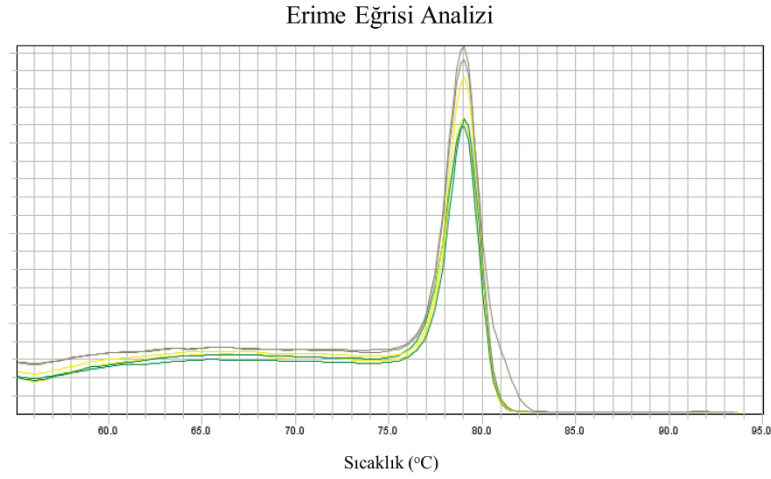


Şekil 4.9: Hücresel RAD51 ve MDM2 genlerinin PZR ürünlerinin spesifitesi ile ilgili görüntüler A) Erime Eğrisi Analizi Grafiği B) Gen Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.



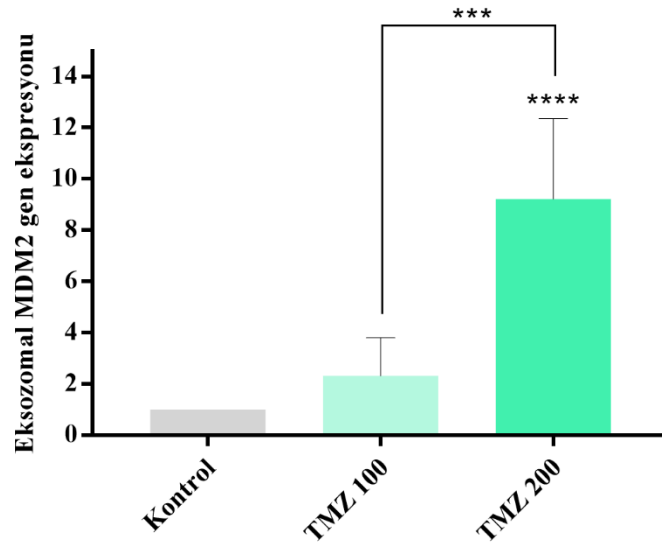
Şekil 4.10: A) Eksozomal RAD51 genine ait ekspresyonel değişimi hesaplamak için oluşturulan hücrel RAD51 standart grafiği (R^2 değeri 0.994). B) Eksozomal MDM2 genine ait ekspresyonel değişimi hesaplamak için oluşturulan hücrel MDM2 standart grafiği (R^2 değeri 0.985).

TMZ uygulamasının eksozomal RAD51 ve MDM2 genlerinin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri her bir gen için oluşturulan standart grafik denklemler kullanılarak değerlendirildi (Şekil 4.10). Yapılan analiz RAD51 geninin U87-MG eksozomlarının içinde çok düşük miktarlarda bulunduğunu gösterdi. Ayrıca ürün ile birlikte primer dimerlerinin oluştuğu da gözlemlendi (EK 4). Primer dimerlerinin oluşumu RAD51 geninin ekspresyon seviyesindeki değişimin, kopya sayısı standart grafiğine göre hesaplanmasını engelledi. MDM2 geninin ise LN229 hücrelerinden salınan eksozomların içinde paketlenmiş ve PZR analizinde tek ürün oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 4.11). Şekil 4.10(B)'de verilen denkleme göre MDM2 geninin ekspresyon seviyesi hesaplandığında 200 μ M TMZ uygulamasının eksozomal MDM2 ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde 9.22 kat oranında arttırdığı, ancak 100 μ M TMZ uygulamasının herhangi bir değişime neden olmadığı belirlendi (Şekil 4.12).



Şekil 4.11: Eksozomal MDM2'nin belirlenmesine yönelik yapılan PZR analizinde tek ürün olduğunu gösteren erime eğrisi grafiği.

LN299

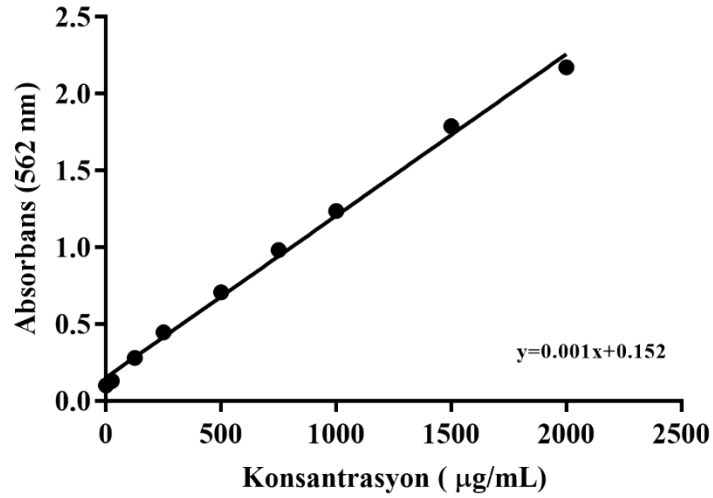


Şekil 4.12: LN299 hücrelerine uygulanan TMZ'nin hücrelerden salınan eksozomlardaki MDM2 gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri (***) $p < 0.001$ ve *****) $p < 0.0001$, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir.) (**Kontrol:** Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, **TMZ 100:** 100 μM TMZ uygulanan hücre grubu, **TMZ 200:** 200 μM TMZ uygulanan hücre grubu).

4.6. HÜCRESEL VE EKSOZOMAL PROTEİN ÖRNEKLERİNİN KONSANTRASYONLARI

Tez kapsamında kullanılan tüm deney ve kontrol gruplarının protein konsantrasyonları bikinkoninik asit (BCA) yöntemine göre, “BCA Protein Assay” kiti (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific™) kullanılarak belirlendi. Bu amaçla kit içeriğinde bulunan sığır serum albümini (BSA) proteini dH₂O ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda (25, 125, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/mL) standartlar hazırlandı. Standart protein örneklerinin BCA analizi yapılarak elde edilen standart grafik ve doğru denklemi yardımıyla tüm protein örneklerinin konsantrasyonları hesaplandı (Şekil 4.13). Çalışmanın farklı evrelerinde deney ve kontrol gruplarından elde edilen hücresel proteinlerin konsantrasyon aralığının 4000-13570 µg/mL olduğu, eksozomal protein konsantrasyon aralığının ise 1500-3500 µg/mL olduğu belirlendi.

BCA Standart Grafiği



Şekil 4.13: Sığır serum albümini (BSA) standartları (25, 125, 250, 500, 100, 1500, 2000 µg/mL) kullanılarak oluşturulan standart grafik (R^2 değeri 0.995).

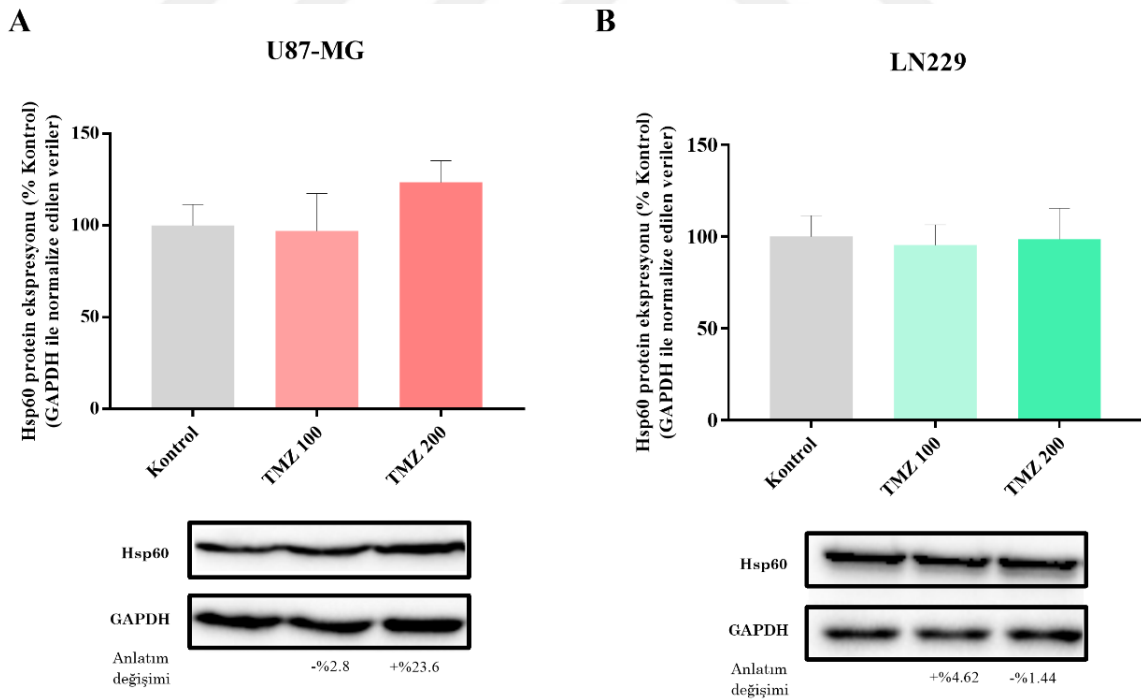
4.7. İMMÜNOLOJİK ANALİZLER

SDS-PAGE yöntemi kullanılarak moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılan proteinler, Bölüm 3.12’de anlatıldığı şekilde PVDF membrana aktarıldıktan sonra, hedefe özgü antikorlarla (Tablo 3.11) işleme sokuldu. Tez çalışması kapsamında tüm immünojenik analizler en az üç

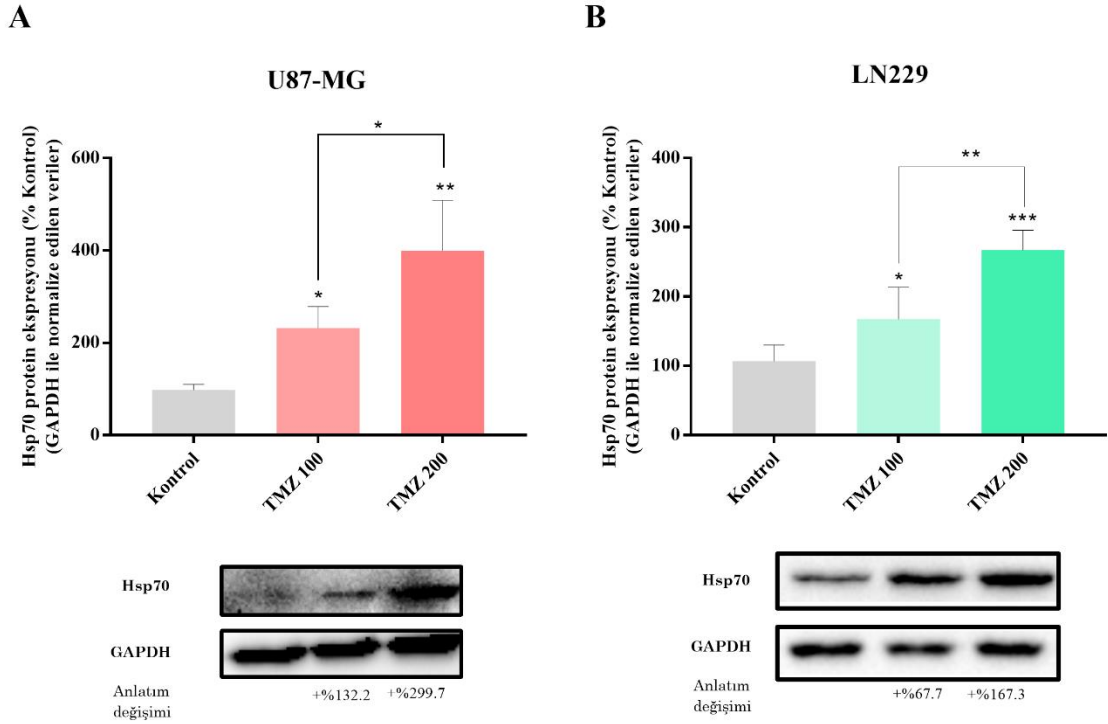
tekrarlı olacak şekilde ve farklı deney setleri kullanılarak yapıldı. Normalizasyon analizleri ImageLab 5.2.1 yazılımı ile gerçekleştirildi. Değerlendirme aşamasında TMZ uygulanmayan kontrol grubundaki proteinlerin ekspresyon seviyesi %100 olarak kabul edildi ve diğer grupların proteinlerinin ekspresyon seviyesi kontrol grubuna oranlanarak saptandı. Deneyler arasındaki tutarlılık tek-yönlü ANOVA (“one-way ANOVA”) testi ve üst test olarak Dunnett’s testi kullanılarak belirlendi.

4.7.1. Temozolomid Uygulamasının Hücresel Stres Proteinleri Üzerindeki Etkileri

Tezin bu aşamasında U87-MG ve LN229 hücrelerine 100 μ M ve 200 μ M konsantrasyonlarında TMZ uygulanması yapılarak, hiçbir uygulama yapılmamış kontrol hücrelerindeki bazı proteinlerin ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı. Elde edilen verilere göre, U87-MG hücrelerine uygulanan 100 μ M ve 200 μ M TMZ’nin, kontrole kıyasla Hsp60 ekspresyonu üzerinde anlamlı bir değişim oluşturmadığı gözlemlendi (Şekil 4.14(A)). Bununla birlikte, uygulanan TMZ’nin Hsp70 anlatım seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 4.15(A)).

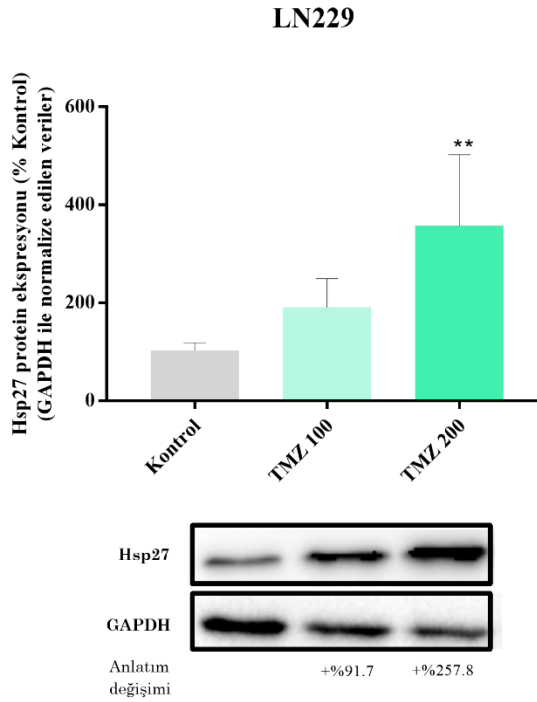


Şekil 4.14: U87-MG (A) ve LN229 (B) hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan TMZ’nin Hsp60 ve GAPDH proteinleri üzerine etkisi (**Kontrol:** Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, **TMZ 100:** 100 μ M TMZ uygulanan hücre grubu, **TMZ 200:** 200 μ M TMZ uygulanan hücre grubu).



Şekil 4.15: U87-MG (A) ve LN229 (B) hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan TMZ'nin Hsp70 ve GAPDH proteinleri üzerine etkisi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir.) (**Kontrol:** Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, **TMZ 100:** 100 μM TMZ uygulanan hücre grubu, **TMZ 200:** 200 μM TMZ uygulanan hücre grubu).

100 μM ve 200 μM TMZ uygulamasının LN229 hücrelerindeki Hsp gen ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri incelendiğinde Hsp60 ekspresyonunu kontrol grubuna göre değiştirmedığı (Şekil 4.14(B)), ancak Hsp70 ekspresyon seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı belirlendi (Şekil 4.15(B)). Bununla birlikte 100 μM TMZ uygulamasının Hsp27 anlatım seviyesini etkin bir şekilde değiştirmedığı, fakat 200 μM TMZ uygulamasının LN229 hücrelerindeki Hsp27 ekspresyon seviyesini kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttırdığı saptandı (Şekil 4.16).

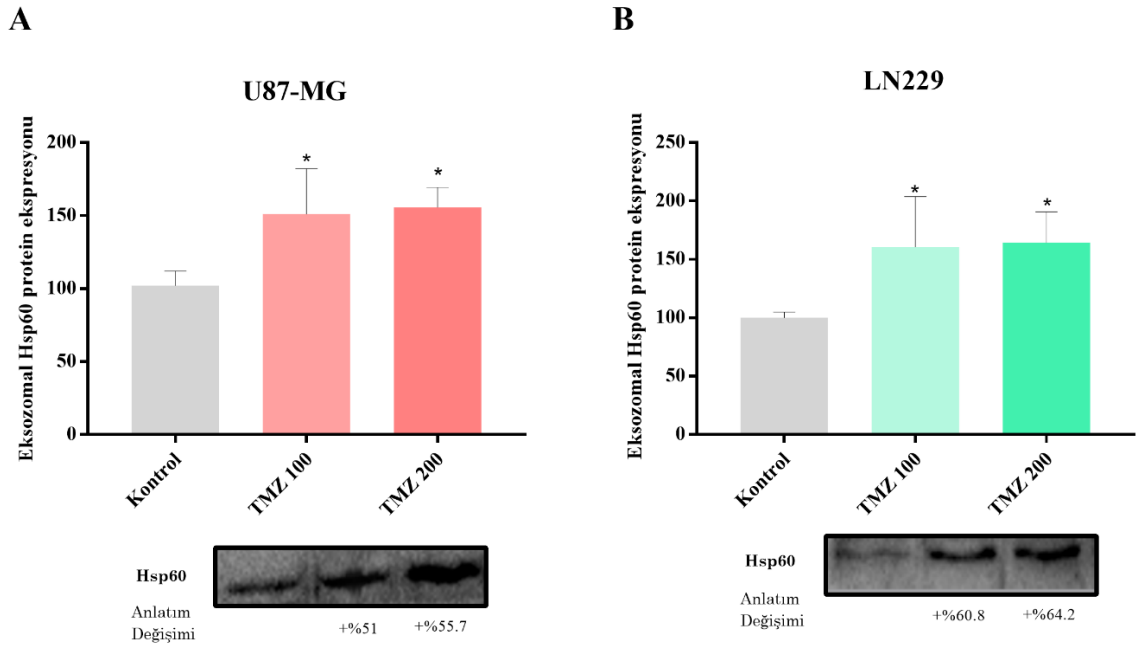


Şekil 4.16: LN229 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan TMZ'nin Hsp27 ve GAPDH proteinleri üzerine etkisi (** $p < 0.01$, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir.) (**Kontrol:** Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, **TMZ 100:** 100 μ M TMZ uygulanan hücre grubu, **TMZ 200:** 200 μ M TMZ uygulanan hücre grubu).

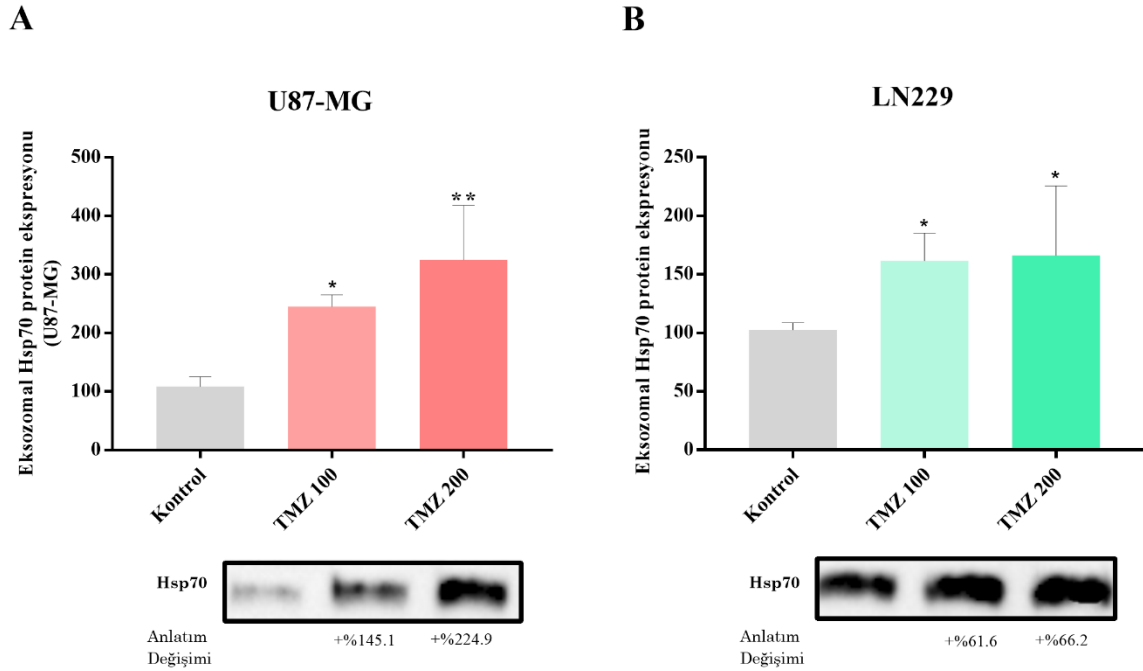
4.7.2. Temozolomid Uygulamasının Eksozomal Stres Proteinleri Üzerindeki Etkileri

Tezin bu bölümünde U87-MG ve LN229 hücreleri üzerine farklı dozlarda uygulanan TMZ'nin, hücrelerden besiyerine salınan eksozomlardaki Hsp ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri değerlendirildi. 100 μ M ve 200 μ M TMZ uygulamalarının U87-MG hücreleri tarafından salınan eksozomlardaki Hsp60 ekspresyonunun, kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi (Şekil 4.17(A)). Benzer şekilde eksozomal Hsp70 ekspresyonunun da istatistiksel olarak anlamlı bir artış ortaya koyduğu görüldü (Şekil 4.18(A)).

TMZ uygulamasının LN229 hücrelerinden salınan eksozomlardaki stres proteinleri üzerine etkileri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hem Hsp60 hem de HSP70 ekspresyon seviyelerinin istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde artmış olduğu belirlendi (Şekil 4.17(B) ve Şekil 4.18 (B)).



Şekil 4.17: U87-MG (A) ve LN229(B) hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan TMZ'nin eksozomal Hsp60 proteini üzerine etkisi ($*p<0.05$, dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir.) (Kontrol: Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, TMZ 100: 100 μ M TMZ uygulanan hücre grubu, TMZ 200: 200 μ M TMZ uygulanan hücre grubu).



Şekil 4.18: U87-MG (A) ve LN229(B) hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan TMZ'nin eksozomal Hsp70 proteini üzerine etkisi ($*p<0.05$, $**p<0.01$ dikey çubuklar standart sapma değerlerini göstermektedir.) (Kontrol: Uygulama yapılmamış kontrol hücreleri, TMZ 100: 100 μ M TMZ uygulanan hücre grubu, TMZ 200: 200 μ M TMZ uygulanan hücre grubu).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya genelinde ölüme neden olan hastalıklar arasında kanser ilk sıralarda yer almaktadır ve gelecek 20 yıl içerisinde vaka sayısının 29.5 milyonun üzerinde olması beklenmektedir (World Health Organization,2018; IARC,2018). Diğer kanser tipleriyle kıyaslandıklarında beyin ve sinir sistemi tümörleri popülasyonda sık görülmemelerine rağmen, ölüm oranları dikkate alındığında en yaygın görülen kanserler türleri arasında yer almaktadır (Siegel ve diğ., 2020). Merkezi sinir sistemi tümörleri arasında oldukça sık rastlanan gliomaların en malignant tipi glioblastoma multiform (GBM) olarak kabul edilmektedir. GBM'in, agresif ve oldukça proliferatif seyriden dolayı kötü prognoz gözlenen hastaların ortalama yaşam süresi, uygulanan tüm tedavilere rağmen oldukça sınırlı kalmaktadır (Kraakstad ve Chekenya, 2010; Louis ve diğ., 2016).

GBM'in tedavisinde radyoterapi, kemoterapi ve/veya cerrahi yöntemler kullanılmaktadır. Yapılan bir araştırma, kemoterapi ve radyoterapinin kombine olarak GBM'de kullanılmasının, hastanın sağkalım oranını arttırdığını göstermektedir (Fine ve diğ., 1993). Kan-beyin bariyerinin varlığı tedaviyi zorlaştırmaktadır. Tüm bu zorluklara rağmen oral kemoterapötik ilaçlardan biri olan temozolomid (TMZ), DNA alkilleyici bir ajan olarak fonksiyon göstermekte ve glioblastoma tedavisinde çok sık tercih edilmektedir (Filippi-Chiela ve diğ., 2013). Lipofilik yapısı nedeniyle kan beyin bariyerini geçebilen TMZ, bu özelliği ile diğer kemoterapötik ilaçlardan ayrılmaktadır. TMZ hem düşük hem de yüksek dereceli astrositik tümör tedavisinde kullanılmaktadır (Alifieris ve Trafalis, 2015); fakat tedavideki etkin sonuçları bilinmesine rağmen, özellikle tümör hücrelerinde meydana gelen TMZ direnci nedeniyle hastaların tedaviye yanıtı birbirinden farklılık göstermektedir. Bu direnç TMZ'nin terapötik etkinliğini sınırlamaktadır (Huang ve diğ., 2012).

Hücreler arası iletişim, hücrel homeostazı korumak ve/veya hücre dışı ortamdaki patojenlere cevap vermek gibi çeşitli aktivitelerin koordinasyonunda ve düzenlenmesinde çok önemli bir rol üstlenmektedir. Bu iletişimde hormonlar, sitokinler veya nörotransmitterlerin yanı sıra farklı boyutlara sahip hücre dışı veziküller (EV'ler)'de önemli görevler yapmaktadır (Ratajczak ve diğ., 2006; Camussi ve diğ., 2010). EV'ler kargo içeriği, büyüklüğü, plazma membran oluşumu ve sekresyonuna göre mikroveziküller, eksozomlar ve apoptotik cisimler olmak üzere, temelde

3 gruba ayrılmaktadır. Eksozomlar diğer EV'lere kıyasla daha fazla fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynamaktadır (They ve diğ., 2009; Zhang ve diğ., 2015; Soung ve diğ., 2016).

Birçok farklı hücre tiplerinden kökenlenebilen eksozomlar, EV'lerin en küçük alt grubunu oluşturmaktadır. Boyutları 30-100 nm arasında değişen eksozomlar, sahip oldukları nükleik asit, protein, miRNA, mRNA, nükleoprotein içerikleri sayesinde nörodejeneratif bozukluklar ve kanser dahil birçok hastalıkta görev almaktadır. (Van der Pol ve diğ., 2012; Akers ve diğ., 2013; Zhang ve diğ., 2015). Özellikle sahip oldukları onkojenik sinyal protein ve nükleik asit içerikleri ile tümör hücrelerinden kökenlenen eksozomlar tümör ilerlemesi, invazyonu ve metastazında rol oynamaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda, eksozomların sahip olduğu nükleik asit içeriklerinin (mRNA ve miRNA) kanser tanısında kullanılabilecek potansiyel araçlar olduğunu gösterilmiştir (Skog ve diğ., 2008; Taylor ve diğ., 2008; Li ve diğ., 2015). Eksozomal proteinler de kanser tanısında önemli belirteçlerdir. Bununla birlikte eksozomlar aracılığıyla hücreler arasında transfer edilebilen onkoproteinlerin tümör oluşumunu kolaylaştırdığı bilinmektedir (Al-Nedawi ve diğ., 2008; Demory Beckler ve diğ., 2013).

Stres proteinleri olarak bilinen Hsp'ler evrimsel süreçte iyi korunmuş büyük bir protein ailesidir. Gliomalar dahil bazı kanser türlerinde, normal hücrelere kıyasla daha yüksek seviyede ekspresyon yaptıkları bilinmektedir. Bu durum tedaviye yanıtta, kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir. Bunun yanı sıra Hsp'ler tümör hücresinin çoğalması, farklılaşması, istilası, metastazı ve ilaç direnci gibi önemli süreçlerde de görev almaktadır (Calderwood ve diğ., 2006). Yüksek seviyede ekspresyon yapan Hsp'ler ile kanser davranışı arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar halen devam etmektedir.

Stres proteinleri genellikle hücre içi moleküller olarak kabul edilmelerine rağmen, son çalışmalar eksozom aracılı sekresyon yolu ile bu proteinlerin hücre dışı konumlarda da bulunabileceğini göstermektedir (De Maio, 2014). Bu Hsp'ler tümör ilerlemesini, büyümesini ve metastazını kolaylaştırabildikleri için, araştırmaların odak noktasını oluşturmaktadır. Sonuçta bu proteinler, tanı ve tedavi için önemli hedefler olarak kabul edilmektedir. (Cordonnier ve diğ., 2017). Eksozomal Hsp'ler aynı zamanda immün düzenleyici faktör olarak işlev görebilmekte ve kanser hücrelerinin bağışıklık yanıtında da önemli fonksiyonlar üstlenmektedir (Kumar ve diğ., 2016).

Yapılan bir çalışmada kolon kanseri hastaları ve sağlıklı bireylerden alınan plazma örneklerinden elde edilen eksozomlarda Hsp60 seviyesinin arttığı belirlenmiş ve bu artışın hastalığın tanısında bir biyobelirteç olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (Campanella ve diğ., 2015). Metastatik kolon kanserinde fosforilasyon seviyesi artmış eksozomal Hsp90'nın, jinekolojik kanserlerde ise eksozomal sHsp'lerin umut vaat eden biyobelirteçler olabileceği gösterilmiştir (Weeraphan ve diğ., 2019; Wyciszkievicz ve diğ., 2019).

Bu tez çalışmasında; glioma tedavisinde kemoterapötik bir ilaç olarak kullanılan TMZ'nin U87-MG ve LN229 insan glioma hücrelerine uygulanmasını takiben, hücrel ve eksozomal içerik değişimlerinin incelenmesi hedeflemiştir. Bu kapsamda, öncelikle hücrelere uygulanacak TMZ'nin sitotoksik analizleri tamamlanmış ve bu analiz sonuçlarına göre hücrelere uygulanacak dozlara karar verilmiştir. Son olarak TMZ uygulamasının hücrel seviyede stres proteinleri ve bazı mRNA'lar üzerindeki etkileri değerlendirilmiş ve bu sonuçlar eksozomal protein ve mRNA içerikleri ile karşılaştırılmıştır.

TMZ'nin U87-MG ve LN229 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla 24, 48 ve 72 saatlik uygulamaları yapılmış, sonrasında MTT analizi gerçekleştirilmiş ve %50 inhibisyona neden olan TMZ konsantrasyon (IC_{50}) değerleri hesaplanmıştır. Yapılan analizler 24 saatlik TMZ uygulamasının her iki hücrede de IC_{50} değerini bulmaya yeterli olmadığını göstermiştir. Ancak 48 ve 72 saat TMZ uygulaması U87-MG hücrelerinde toksik etkiye neden olmuş ve IC_{50} değerleri sırasıyla 776.24 μM ve 398.10 μM olarak bulunmuştur. LN229 hücrelerine 48 ve 72 saat uygulanan TMZ için elde edilen IC_{50} değerleri ise sırasıyla 1584.89 μM ve 758.57 μM olarak bulunmuştur (Tablo 4.1). Yapılan bu çalışmalar neticesinde TMZ'nin her iki hücre hattına 72 saat süre ile uygulanmasına karar verilmiştir. Tez kapsamında gerçekleştirilen MTT analizi sonuçları diğer sitotoksikite çalışmaları ile karşılaştırıldığında; U87-MG hücreleri için 72 saat uygulanan TMZ'nin IC_{50} dozunun bir çalışmada 100-500 μM arasında olduğu söylenirken (Munoz ve diğ., 2014), diğer bir çalışmada 397.2 μM olduğu görülmüştür (Lin ve diğ., 2012). LN229 hücrelerine 72 saat uygulanan TMZ'nin IC_{50} değerinin ise 954.2 μM olduğu bildirilmiştir (Lan ve diğ., 2016). Yapılan bu tez çalışmasında TMZ uygulamasına ait IC_{50} değerleri kendi içinde karşılaştırıldığında, U87-MG ve LN229 hücreleri için farklı sonuçların alındığı görülmektedir. LN229 hücrelerine uygulanan TMZ için elde edilen IC_{50} değeri (758.57 μM), U87-MG hücreleri için elde edilen IC_{50} değerinden (398.10 μM) daha yüksektir. Bu sonuç TMZ'nin U-87 MG hücre hattında, LN229 hücre hattına kıyasla,

daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu anlamda elde edilen bulgular diğer çalışmaların sonuçları ile uyumludur (Lan ve diğ., 2016; Lee, 2016).

Sitotoksisite analizlerine göre U87-MG ve LN229 insan glioma hücrelerine uygulanacak 2 farklı TMZ konsantrasyonu (100 ve 200 μ M) belirlenmiştir. Seçilen dozların LN229 glioma hücrelerinin canlılığı üzerinde anlamlı bir toksik etkisi bulunmamaktadır. U87-MG hücrelerinde uygulanan TMZ ise hücre canlılığını en fazla %30 oranında etkilemektedir. Bununla birlikte seçilen dozlar literatürde TMZ çalışmalarında en fazla tercih edilen konsantrasyonlar arasında yer almaktadır (Barciszewska ve diğ., 2015; Akbarnejad ve diğ., 2017). MTT analizi aracılığıyla uygulanacak TMZ konsantrasyonları belirlendikten sonra, kontrol ve deney grubu hücrelere ajan uygulamaları yapılmış ve hem hücreler hem de hücrelerden kökenlenen eksozomlar toplanmıştır.

Öncelikle U87-MG ve LN229 hücrelerinden besiyerine salınan eksozomların varlığı, eksozom markırı olan kabul edilen ALIX ve TSG101 antikorlarının Western blot analizi ile gösterilmiştir. Membran görüntüleri incelendiğinde her iki hücre hattında da kontrol ve deney grupları arasında farklılık olduğu görülmektedir (Şekil 4.3). Eksozom karakterizasyon çalışmalarında eksozomal proteinlerin Western blot yöntemi ile varlık tayini çok tercih edilen bir yöntem olmakla birlikte, farklı EV tiplerinin sahip olduğu protein içeriklerinin değişken olması eksozomal miktar tayininde farklı yöntemlerin tercih edilmesine neden olmaktadır (Doyle ve Wang, 2019). Bu nedenle tez kapsamında, hücrelerden besiyerine salınan ve bu besiyerinden izole edilen eksozomların miktar tayini için CD63 varlığına dayalı PS Capture™ Exosome ELISA Kiti kullanılmıştır. Yapılan analiz TMZ uygulanmasının kontrol ve deney gruplarından salınan eksozomların miktarları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığını ortaya koymuştur (Şekil 4.5). Simon ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan çalışmada, U87-MG ve LN18 hücrelerine uygulanan bir anti-kanser ilacın, besiyerine salınan eksozom konsantrasyonunda anlamlı bir değişim yaratmadığı gösterilmiştir. Eksozom miktarını kantitatif olarak değerlendirdiğimiz bu analiz sonuçları literatürle uyumlu görünmektedir ve uygulanan TMZ dozlarının eksozom miktarını değiştirmeden, eksozom içeriğine etki ettiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte ELISA sonuçları LN229 hücrelerinden salınan eksozom miktarının, U87-MG insan glioma hücrelerinden salınan eksozom miktarından farklı olduğunu işaret etmektedir. Bu farklılık başlangıç hücre ekim sayısından kaynaklanabilir. Konfluent hücre kültürlerinin, kolesterol metabolizmasına bağlı

olarak, konfluent olmayan hücre kültürlerinden daha fazla ekzozom ürettikleri bilinmektedir. Ayrıca hücreler arasındaki temasın engellenmesi, aktif olarak bölünmeyi de engellediği için hücreden EV salınmasını da azaltabilmektedir (Gurunathan ve diğ., 2019). Ekzozom miktarının hücre tipine bağlı olarak değiştiğini ortaya koyan başka çalışmalarda bulunmaktadır. Simon ve diğ. (2018) U87-MG ve LN18 hücrelerinin besiyerine farklı konsantrasyonlarda ekzozom saldıgını, Tian ve diğ. (2014) olgunlaşmamış dendritik hücrelerin sınırlı sayıda EV ürettiklerini ve Chen ve diğ. (2011) ise mezenkimal kök hücrelerin çok sayıda EV ürettiklerini bildirmiştir. Dolayısıyla ELISA kiti aracılığıyla saptanan, U87-MG ve LN229 hücrelerinden salınan ekzozom miktarındaki farklılık, beklenen bir olaydır.

Başarılı bir ilaç tedavisinin hedef hücredeki etkisini ortaya koyabilmek için terapötik indeks belirlenmelidir. Bu bağlamda tez kapsamında U87-MG ve LN229 hücrelerine uygulanan TMZ'nin hücre döngüsü regülasyonu, DNA hasar yanıtı, apoptoz, tümör oluşumu ve baskılanması gibi çeşitli genler üzerindeki etkileri gerçek zamanlı PZR analizleri ile araştırılmıştır. Toplam 92 genin tarandığı PZR analizi sonuçları, 200 µM TMZ uygulamasının her iki hücrede de birer genin ekspresyonunu istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde arttırdığını göstermiştir. U87-MG hücrelerinde DNA tamir mekanizmasında rol oynayan RAD51 geninin ekspresyonunun yaklaşık 5 kat arttığı saptanmıştır (Şekil 4.6) ve bu artışın direnç ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. RAD51 geni, somatik hücrelerde çift sarmal kırığı meydana geldiğinde tamir sisteminin işleyebilmesi için iplik transferini kolaylaştırarak homolog rekombinasyonda görev almaktadır. Pankreas adenokarsinomu, prostat kanseri ve over kanseri gibi çeşitli tümör tiplerinde anlatım seviyesinin yüksek olduğu, yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Maacke ve diğ., 2000; Collis ve diğ., 2001; Rapakko ve diğ., 2006). Yüksek RAD51 seviyesi homolog rekombinasyonun artmasına neden olduğu için kemoterapi gibi DNA'ya zarar veren reaktiflere karşı direnci de açıklamaktadır. Ayrıca, TMZ uygulanan çeşitli GBM hücrelerinde RAD51 geninin anlatım seviyesinin arttığı ve bu artışın direnç ile ilişkili olduğu daha önce yapılmış çalışmalarda ortaya konulmuştur (Welsh ve diğ.,2009; Zhang ve diğ.,2012; Li ve diğ., 2019). Bu nedenle, GMB hücrelerinde TMZ'nin sensitivitesini arttırmak amacıyla RAD51 genini hedefleyen farklı tedavi yaklaşımları denenmektedir (Welsh ve diğ.,2009). Tez çalışması kapsamında elde ettiğimiz bulgular, literatür bilgileriyle uyum göstermektedir. Ancak, GBM hücrelerinde RAD51 aşırı ekspresyonunun neden ve nasıl gerçekleştiği halen belirsizliğini korumaktadır.

Gerçek zamanlı PZR analizi sonuçları LN229 hücrelerine TMZ uygulanmasının MDM2 onkogeninin ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir. Özellikle 200 μ M TMZ uygulaması MDM2 geninin ekspresyonunu 7.64 kat arttırmıştır. MDM2, normal koşullar altında p53 proteinin degradasyonuna aracılık ederek, bu proteinin aktivitesini bastırmak için negatif bir düzenleyici olarak rol oynamaktadır. MDM2'nin onkojenik fonksiyonunun, "wild-type" p53 ile etkileşime girme ve p53 aktivitesini inhibe etme kabiliyetinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda p53 mutasyonu ile birlikte MDM2 geninin aşırı ekspresyonu gözlenmiş (Ko ve diğ., 2000; Vaughan ve diğ., 2011) ve hem p53 mutasyonu taşıyan hem de MDM2 ekspresyon seviyesi yüksek olan tümörlerin daha kötü bir prognoza sahip oldukları bildirilmiştir (Cordon-Cardo ve diğ., 1994; Jones ve diğ., 1998). Ayrıca, ekspresyon seviyesi artan MDM2'nin meme kanserinde cisplatin ve doksorubisin gibi antikanser ilaçlara karşı direnç kazandırdığı da rapor edilmiştir (Suzuki ve diğ., 1998; Hayashi ve diğ., 2006). Sato ve arkadaşları (2011) kök hücre benzeri GBM hücrelerinde yaptıkları bir çalışmada, MDM2 inhibisyonunun, p53 ekspresyonunu arttırdığını ve hücrelerin TMZ'ye karşı daha duyarlı hale geldiklerini bildirmiştir (Sato ve diğ., 2011). Bu tez çalışmasında, mutant p53 aktivitesine sahip LN229 hücrelerine TMZ uygulamasının MDM2 ekspresyonunu arttırdığı ilk kez gösterilmiştir ve tüm literatür bilgileri göz önüne alındığında, bu artışın TMZ'ye karşı direnç ile ilgili olduğu düşünülmüştür.

TMZ uygulamasının hücrelerden salınan eksozomların içeriğine etkilerini değerlendirmek amacıyla, U87-MG glioma hücreleri için eksozomal RAD51 geni ve LN229 hücreleri için ise hücrelerden kökenlenen eksozomlarda eksozomal MDM2 geni incelenmiştir. Yapılan analizde U87-MG hücrelerinden salınan eksozomlarda RAD51 genine ait eksozomal RNA seviyelerinin oldukça düşük olması, gerçek zamanlı PZR analizinde bu genin belirlenmesini olanaksız hale getirmiştir. 200 μ M TMZ uygulaması yapılan LN229 hücreleri ile kontrol grubu sonuçları kıyaslandığında, TMZ'nin eksozomal MDM2 geni üzerinde 9.22 katlık bir artışa neden olduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında TMZ uygulamasının gliomalarda eksozomal MDM2 genini arttırdığı ilk defa gösterilmiştir. Ayrıca, MDM2 mRNA seviyelerinin eksozomda ve parental hücrede mükemmel bir korelasyona sahip olduğu da saptanmıştır. TMZ tedavisinin, GBM hücrelerinde çeşitli genlerin ekspresyon seviyelerinde değişime neden olduğu bilinmektedir, ancak eksozom içeriğine de etki edebileceği konusunda fazla bilgi bulunmamaktadır. Shao ve arkadaşlarının

(2015) yaptıkları bir çalışmada, TMZ direncinden sorumlu olduğu düşünülen çeşitli genlerin (GSTp1, MGMT, APNG, ERCC1, ERCC2, MVP, ABCC3, CASP8 ve IGF2BP2) mRNA profillerinin eksozomda ve parental hücrede uyum gösterdiği ve bu genlerin TMZ direncinde potansiyel markır olabilecekleri bildirilmiştir. Literatür bilgileri de göz önüne alındığında MDM2 mRNA'sının, TMZ direnci ile ilgili potansiyel bir eksozomal mRNA belirteci olabileceği düşünülmektedir.

Bu aşamaya kadar tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda TMZ uygulamasına bağlı olarak artan RAD51 ve MDM2 genlerinin ekspresyon seviyelerinin, ilaç direnci ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle çalışmanın devamında TMZ direnç mekanizmasında görev aldığı bilinen Hsp'ler incelenmiştir. Literatürde hem RAD51'in hem de MDM2 geninin, Hsp'ler ile ilişkisini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır. DNA'da tek ya da çift iplik kırığı meydana geldiğinde, DNA tamir mekanizmasında rol oynayan ATR, FANCA, RAD51 ve BRCA2 gibi çeşitli genlerin Hsp70 ve Hsp90 tarafından aktive edildiği bilinmektedir (Murakami ve diğ., 2015; McLaughlin ve diğ., 2017). Hsp27'nin DNA tamir mekanizmasındaki rolü halen araştırılmaktadır (Dubrez ve diğ., 2020). Hsp'ler mutant p53'lerin MDM2 tarafından degradasyonunu engellemektedir. Moleküler şaperonlar, mutant p53 ara ürünlerinin katlanmasına yardımcı olmakta ve onların p73 ile etkileşimini stabilize etmektedir. Bu durum, mutant p53 degradasyonunun inhibisyonu ve p73 aracılı apoptoz ile sonuçlanmaktadır. Ancak kanser hücrelerinde MDM2 onkogeninin ekspresyonu arttığında mutant p53-p73-Hsp'leri içeren ara komplekslerden Hsp'ler ayrılarak mutant p53, p73, MDM2 içeren ve kanser hücrelerinde kemoterapötik direnci arttıran, amiloid benzeri agregatlar oluşmaktadır (Tracz-Gaszewska ve diğ., 2017).

Bu bilgiler ışığında tezin devam çalışmalarında U87-MG ve LN229 hücrelerine uygulanan TMZ'nin Hsp'ler üzerine etkisi hem hücresel hem de eksozomal seviyede incelenmiştir. Yapılan immünolojik analizler TMZ uygulamasının her iki hücrede de Hsp60 anlatımını istatistiksel olarak değiştirmedeği ortaya koymuştur. Bununla birlikte, 100 µM TMZ U87-MG ve LN229 hücre hatlarında Hsp70 ekspresyonunu sırasıyla %132.2 ve %67.7 oranlarında arttırırken, 200 µM ise TMZ Hsp70 ekspresyonunu her iki hücrede de sırasıyla %229.7 ve %167.3 oranlarında arttırmıştır. Bununla birlikte kontrol ve deney grubu U87-MG hücrelerinde Hsp27 ekspresyonu belirlenmemiştir, ancak 200 µM TMZ uygulaması LN229 hücrelerindeki Hsp27 ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla arttırmış ve bu artışın istatistiksel açıdan anlamlı

bir fark (+%257.8) ortaya koyduğunu göstermiştir. Literatürde TMZ'nin çeşitli glioma hücrelerindeki Hsp'ler üzerine olan etkilerini gösteren farklı yayımlar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda TMZ uygulamasının U87-MG (Paolini ve diğ., 2011) T98G ve U251 (Pasi ve diğ., 2014) hücrelerinde Hsp70 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Castro ve diğ. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, TMZ tedavisinin Gli36 hücrelerinde Hsp70 anlatımını arttırdığı, DBTRG hücrelerinde azalttığı ve U87-MG hücrelerinde ise değiştirmedığı ortaya konulmuştur. Aynı çalışmada TMZ'nin U87-MG, DBTRG ve Gli36 glioma hücre hatlarında Hsp27 ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir. Tüm çalışmalar göz önüne alındığında TMZ uygulamasının farklı glioma hücrelerinde farklı yanıtlara sebep olduğu anlaşılmaktadır (Chorny ve diğ., 2000). Özellikle ekspresyon seviyesi artmış Hsp70 ve Hsp27'nin farklı kanser türlerinde (meme, serviks, hepatosellüler karsinom) kötü prognoz ve tedavi direnci ile ilişkilendirildikleri bilinmektedir (Sarto ve diğ., 2000; Takashimave diğ., 2003; Chuma ve diğ., 2003). Bu bağlamda elde ettiğimiz bulgular literatür ile uyum göstermektedir.

TMZ uygulamasının eksozomal Hsp'ler üzerindeki etkisi incelemek üzere kontrol ve deney gruplarından besiyerine salınan eksozomlar toplanmış ve izolasyondan sonra analizlerde kullanılmıştır. Yapılan immünolojik analizler, 100 µM ve 200 µM TMZ uygulamasının U87-MG hücrelerinden salınan eksozomlarda Hsp60 ekspresyon seviyesini sırasıyla %51 ve %51.6 oranında arttırdığını göstermiştir. LN229 hücrelerinde de Hsp60'ın benzer oranlarda artış (sırasıyla %60.8 ve %64.2) gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, TMZ uygulanmasının eksozomal Hsp70 anlatımı üzerinde de etkili olduğu ve her iki hücrede eksozomal Hsp70'lerin ekspresyon seviyesini arttırdığı (U87-MG için sırasıyla %145.1 ve %224.9, LN229 için sırasıyla %61.6 ve %66.2) belirlenmiştir. Bununla birlikte eksozomal Hsp27 anlatımı her iki hücre hattında da saptanamamıştır. TMZ'nin eksozomal proteinlerin içeriğine etki ettiği ve TMZ uygulaması sonrası salınan eksozomların hücreler arası iletişimde rol oynadığı yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (André-Grégoire ve diğ., 2018). Özellikle kanser hücrelerinden salınan eksozomlarda ekspresyon seviyeleri artmış olan Hsp'lerin, kanser tanısında biyobelirteç olarak kullanılabileceği farklı çalışmalarda gösterilmiştir (Campanella ve diğ., 2015; Gobbo ve diğ., 2015; Wyciskiewicz ve diğ., 2019). Dahası bu Hsp'lerin ilaç direnci, kötü prognoz, tedaviye yanıt, migrasyon ve invazyon ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Eguchi ve diğ., 2019). Lv ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, anti-kanser ilaçların hepatosellüler karsinom hücrelerinden Hsp içeren eksozom salınımını arttırdığı ve bu eksozomların sitotoksik

yanıt oluşumunda görev aldığı gösterilmiştir. Bu bağlamda elde ettiğimiz bulgular, literatür ile uyum göstermektedir.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar, farklı hücrelere uygulanan TMZ'nin direnç oluşumunu tetiklediğini göstermiştir. İlacın GBM tedavisi sırasında da direnç oluşturduğu bilinmektedir. Bu bağlamda TMZ'nin GBM tedavisi için en etkili ve uygun ilaç olmayacağı ortadadır. TMZ'nin farklı ilaçlarla kombine olarak kullanılması, tedavi etkinliğini arttırmak için iyi bir strateji olabilir. Bununla birlikte yapılan çalışmalar eksozomal mRNA ve protein seviyelerinin, kökenlendikleri hücrelerin mRNA ve protein seviyeleri ile benzerlik taşıdığını ortaya koymuştur. Bu nedenle GBM tedavisinde eksozomların tedavi yanıtının araştırılmasında kullanılabilir potansiyel biyobelirteçler olabileceği söylenebilir. Ancak, TMZ tedavisi ile ekspresyon seviyeleri artan bazı mRNA ve Hsp'lerin, alıcı hücrelerde nasıl etki gösterebileceğini belirlemek için, daha ileri analizlerin yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdullah Thani, N.A., Sallis, B., Nuttall, R., Schubert, F.R., Ahsan, M., Davies, D., Purewal, S., Cooper, A., Rooprai, H.K., 2012, Induction of apoptosis and reduction of MMP gene expression in the U373 cell line by polyphenolics in *Aronia melanocarpa* and by curcumin, *Oncology Reports*, 28(4), 1435–1442.
- Abe, M., Manola, J.B., Oh, W.K., Parslow, D.L., George, D.J., Austin, C.L., Kantoff, P.W., 2004, Plasma levels of heat shock protein 70 in patients with prostate cancer: a potential biomarker for prostate cancer, *Clinical Prostate Cancer*, 3(1), 49–53.
- Adamson, C., Kanu, O.O., Mehta, A.I., Di, C., Lin, N., Mattox, A.A., Bigner, D.D., 2009, Glioblastoma Multiforme: A review of where we have been and where we are going, *Expert Opinion On Investigational Drugs*, 18(8), 1061-1083.
- Akbar, M.T., Lundberg, A.M., Liu, K., Vidyadaran, S., Wells, K.E., Dolatshad, H., Wynn, S., Wells, D.J., Latchman, D.S., de Bellerocche, J., 2003, The neuroprotective effects of heat shock protein 27 overexpression in transgenic animals against kainate-induced seizures and hippocampal cell death, *The Journal of Biological Chemistry*, 278(22), 19956–19965.
- Akbarnejad, Z., Eskandary, H., Dini, L., Vergallo, C., Nematollahi-Mahani, S.N., Farsinejad, A., Abadi, M., Ahmadi, M., 2017, Cytotoxicity of temozolomide on human glioblastoma cells is enhanced by the concomitant exposure to an extremely low-frequency electromagnetic field (100Hz, 100G), *Biomedicine Pharmacotherapy*, 92, 254–264.
- Akers, J.C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B.S. and Chen, C.C., 2013, Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies, *Journal of Neuro-oncology*, 113, 1-11.
- Alifieris, C. and Trafalis, D., 2015, Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment, *Pharmacology & Therapeutics*, 152, 63-82.
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., Rak, J., 2008, Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells, *Nature Cell Biology*, 10(5), 619–624.
- American Type Culture Collection, 2020, <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2611.aspx#characteristics>, [Ziyaret tarihi:10 Ocak 2020].
- André-Grégoire, G., Bidère, N., Gavard, J., 2018, Temozolomide affects Extracellular Vesicles Released by Glioblastoma Cells, *Biochimie*, 155, 11–15.
- Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., Stringaro, A., Molinari, A., Arancia, G., Gentile, M., Parmiani, G., Fais, S., 2002, Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles, *The Journal of Experimental Medicine*, 195(10), 1303–1316.
- Aushev, V.N., Zborovskaya, I.B., Laktionov, K.K., Girard, N., Cros, M.P., Herceg, Z., Krutovskikh, V., 2013, Comparisons of microRNA patterns in plasma before and after tumor removal reveal new biomarkers of lung squamous cell carcinoma, *PloS one*, 8(10), e78649.

- Bae, S., Brumbaugh, J., Bonavida, B., 2018, Exosomes derived from cancerous and non-cancerous cells regulate the anti-tumor response in the tumor microenvironment. *Genes & cancer*, 9(3-4), 87–100.
- Bailey, P., Cushing H., 1926, A classification of the tumours of the glioma group on a histogenetic basis, with a corre-lated study of prognosis, *British Journal of Surgery*,14, 554-555.
- Barciszewska, A.M., Gurda, D., Głodowicz, P., Nowak, S., Naskręt-Barciszewska, M.Z., 2015, A New Epigenetic Mechanism of Temozolomide Action in Glioma Cells, *PloS one*, 10(8), e0136669.
- Bausero, M. A., Gastpar, R., Multhoff, G., Asea, A., 2005, Alternative mechanism by which IFN-gamma enhances tumor recognition: active release of heat shock protein 72, *Journal of immunology*, 175(5), 2900–2912.
- Bertrand, J., Begaud-Grimaud, G., Bessette, B., Verdier, M., Battu, S., Jauberteau, M.O., 2009, Cancer stem cells from human glioma cell line are resistant to Fas-induced apoptosis, *International Journal Of Oncology*, 34(3), 717-727.
- Borges, F.T. and Reis, L.A., Schor, N., 2013, Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46, 824-830.
- Bruey, J.M., Paul, C., Fromentin, A., Hilpert, S., Arrigo, A.P., Solary, E., Garrido, C., 2000, Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown *in vitro* and *in vivo*, *Oncogene*, 19(42), 4855–4863.
- Calderwood, S.K., Khaleque, M.A., Sawyer, D.B., Ciocca, D.R., 2006, Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis, *Trends in Biochemical Sciences*, 31(3), 164–172.
- Campanella, C., Bavisotto, C.C., Gammazza, A.M., Nikolic, D., Rappa, F., David, S., Cappello, F., Bucchieri, F., Fais S., 2014, Exosomal Heat Shock Proteins as New Players in Tumour Cell-to-cell Communication, *Journal of Circulating Biomarkers*, 3, 4.
- Campanella, C., Bucchieri, F., Merendino, A. M., Fucarino, A., Burgio, G., Corona, D.F., Barbieri, G., David, S., Farina, F., Zummo, G., de Macario, E. C., Macario, A. J., & Cappello, F., 2012, The odyssey of Hsp60 from tumor cells to other destinations includes plasma membrane-associated stages and Golgi and exosomal protein-trafficking modalities, *PloS one*, 7(7), e42008.
- Campanella, C., Rappa, F., Sciumè, C., Marino Gammazza, A., Barone, R., Bucchieri, F., David, S., Curcurù, G., Caruso Bavisotto, C., Pitruzzella, A., Geraci, G., Modica, G., Farina, F., Zummo, G., Fais, S., Conway de Macario, E., Macario, A. J., Cappello, F., 2015, Heat shock protein 60 levels in tissue and circulating exosomes in human large bowel cancer before and after ablative surgery, *Cancer*, 121(18), 3230–3239.
- Camussi, G., Deregibus, M.C., Bruno, S., Cantaluppi, V. and Biancone, L., 2010, Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication, *Kidney International*, 78(9), 838-848.

- Caporaso, P., Turriziani, M., Venditti, A., Marchesi, F., Buccisano, F., Tirindelli, M. C., Alvino, E., Garbin, A., Tortorelli, G., Toppo, L., Bonmassar, E., D'Atri, S., Amadori, S 2007, Novel role of triazenes in haematological malignancies: pilot study of Temozolomide, Lomeguatrib and IL-2 in the chemoimmunotherapy of acute leukaemia, *DNA Repair*, 6(8):1179-86.
- Castro, N.C., Cayado-Gutierrez, N., Zoppino, F.C.M., Fanelli, M.A., Cuello-Carrion, F.D., Sotile M., Nadin, S.B., Ciocca, D.R., 2015, Effects of temozolomide (TMZ) on the expression and interaction of heat shock proteins (HSPs) and DNA repair proteins in human malignant glioma cells, *Cell Stress Chaperones*, 20 (2), 253-265.
- Cerrato, J.A., Yung, W.K., Liu, T.J., 2001, Introduction of mutant p53 into a wild-type p53-expressing glioma cell line confers sensitivity to Ad-p53-induced apoptosis, *Neurooncology*, 3(2), 113–122.
- Chalmin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Vincent, J., Bruchard, M., Remy-Martin, J. P., Boireau, W., Rouleau, A., Simon, B., Lanneau, D., De Thonel, A., Multhoff, G., Hamman, A., Martin, F., Chauffert, B., Solary, E., Zitvogel, L., Garrido, C., Ryffel, B., Borg, C., ... Ghiringhelli, F., 2010, Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells, *The Journal of Clinical Investigation*, 120(2), 457–471.
- Chen, J., Kahne, T., Rocken, C., Gotze, T., Yu, J., Sung, J.J., Chen, M., Hu, P., Malfertheiner, P., Ebert, M.P., 2004, Proteome analysis of gastric cancer metastasis by two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry for identification of metastasis-related proteins, *Journal of Proteome Research*, 3:1009–1016.
- Chen, T.S., Arslan, F., Yin, Y., Tan, S.S., Lai, R.C., Choo, A.B., Padmanabhan, J., Lee, C.N., de Kleijn, D.P., Lim, S.K., 2011, Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs, *Journal of translational medicine*, 9, 47.
- Chorny, J.A., Evans, L.C., Kleinschmidt-DeMasters, B.K., 2000, Cerebral granular cell astrocytomas: a Mib-1, bcl-2, and telomerase study, *Clinical Neuropathology*, 19(4), 170–179.
- Chuma, M., Sakamoto, M., Yamazaki, K., Ohta, T., Ohki, M., Asaka, M., Hirohashi, S., 2003 Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, 37(1), 198–207.
- Ciocca, D.R., Calderwood, S.K., 2005, Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications, *Cell Stress & Chaperones*, 10(2), 86–103.
- Ciocca, D.R., Clark, G.M., Tandon, A.K., Fuqua, S.A., Welch, W.J., McGuire, W.L., 1993b, Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications, *Journal of the National Cancer Institute*, 85(7), 570–574.
- Ciocca, D.R., Oesterreich, S., Chamness, G.C., McGuire, W.L., Fuqua, S.A., 1993a, Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review, *Journal of the National Cancer Institute*, 85(19), 1558–1570.
- Clark, M.J., Homer, N., O'Connor, B.D., Chen, Z., Eskin, A., Lee, H., Merriman, B., Nelson, S.F., 2010, U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line, *PLoS Genetics*, 6(1), e1000832.

- Clayton, A., Mason, M. D., 2009, Exosomes in tumour immunity, *Current Oncology*, 16(3), 46–49.
- Clayton, A., Mitchell, J.P., Court, J., Linnane, S., Mason, M.D., Tabi, Z., 2008, Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression, *Journal of Immunology*, 180(11), 7249–7258.
- Collis, S.J., Tighe, A., Scott, S.D., Roberts, S.A., Hendry, J.H., Margison, G. P., 2001, Ribozyme minigene-mediated RAD51 down-regulation increases radiosensitivity of human prostate cancer cells, *Nucleic Acids Research*, 29(7), 1534–1538.
- Combs, S.E., Schmid, T.E., Vaupel, P., Multhoff, G., 2016, Stress Response Leading to Resistance in Glioblastoma-The Need for Innovative Radiotherapy (iRT) Concepts, *Cancers*, 8 (1), 1-14.
- Corcoran, C., Friel, A.M., Duffy, M.J., Crown, J., O'Driscoll, L., 2011, Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer, *Clinical Chemistry*, 57(1), 18–32.
- Cordon-Cardo, C., Latres, E., Drobnjak, M., Oliva, M.R., Pollack, D., Woodruff, J.M., Marechal, V., Chen, J., Brennan, M.F., Levine, A. J., 1994, Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas, *Cancer research*, 54(3), 794–799.
- Cordonnier, M., Chanteloup, G., Isambert, N., Seigneuric, R., Fumoleau, P., Garrido, C. and Gobbo, J., 2017, Exosomes in cancer theranostic: Diamonds in the rough, *Cell Adhesion & Migration* 11(2), 151–163.
- Cornford, P.A., Dodson, A.R., Parsons, K.F., Desmond, A.D., Woolfenden, A., Fordham, M., Neoptolemos, J.P., Ke, Y., Foster, C.S., 2000, Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer, *Cancer Research*, 60(24), 7099–7105.
- Costa-Silva, B., Aiello, N.M., Ocean, A.J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B.K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M.T., Molina, H., Xiang, J., Zhang, T., Theilen, T.M., García-Santos, G., Williams, C., Ararso, Y., Huang, Y., Rodrigues, G., Shen, T.L., Labori, K. J., ... Lyden, D., 2015, Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver, *Nature Cell Biology*, 17(6), 816–826.
- Coupienne, I., Bontems, S., Dewaele, M., Rubio, N., Habraken, Y., Fulda, S., Agostinis, P., Piette, J., 2011, NF-kappaB inhibition improves the sensitivity of human glioblastoma cells to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy, *Biochemical Pharmacology*, 81(5), 606–616.
- Crescitelli, R., Leasser, C., Szab, T.G., Kittel, A., Eldh, M., Dianzani, I., Buzás, E.I., Lötvall, J., 2013, Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes, *Journal of Extracellular Vesicles*, 2, 10.
- Das, J.K., Xiong, X., Ren, X., Yang, J.M., Song, J., 2019, Heat Shock Proteins in Cancer Immunotherapy, *Journal of Oncology*, 3267207.
- De Maio A., 2014, Extracellular Hsp70: export and function, *Current Protein & Peptide Science*, 15(3), 225–231.
- De Maio, A. and Vazquez, D., 2013, Extracellular heat shock proteins: a new location, a new function, *Shock*, 40, 239-246.

- De Maio, A., 2011, Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage, *Cell Stress Chaperones*, 16, 235-49.
- Demory Beckler, M., Higginbotham, J. N., Franklin, J. L., Ham, A. J., Halvey, P. J., Imasuen, I. E., Whitwell, C., Li, M., Liebler, D. C., Coffey, R. J., 2013, Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS, *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(2), 343–355.
- Doyle, L.M., Wang, M.Z., 2019, Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis, *Cells*, 8(7), 727.
- Dubrez, L., Causse, S., Borges Bonan, N., Dumétier, B., Garrido, C., 2020, Heat-shock proteins: chaperoning DNA repair, *Oncogene*, 39(3), 516–529.
- Eguchi, T., Ono, K., Kawata, K., Okamoto, K., Calderwood, S.K., 2019, *Regulatory Roles of HSP90-Rich Extracellular Vesicles*, Heat Shock Protein 90 in Human Diseases and Disorders, In: Asea A., Kaur P. (eds), Chapter 19, Springer, Switzerland, 3-17.
- Elsner, L., Muppala, V., Gehrman, M., Lozano, J., Malzahn, D., Bickeböller, H., Brunner, E., Zientkowska, M., Herrmann, T., Walter, L., Alves, F., Multhoff, G., Dressel, R., 2007, The heat shock protein HSP70 promotes mouse NK cell activity against tumors that express inducible NKG2D ligands, *Journal of immunology*, 179(8), 5523–5533.
- Filippi-Chiela, E.C., Thomé, M.P., Bueno e Silva, M.M., Pelegrini, A.L., Ledur, P.F., Garicochea, B., Zamin, L.L., Lenz, G., 2013, Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells, *BMC Cancer*, 13, 147.
- Filippi-Chiela, E.C., Villodre, E.S., Zamin, L.L., Lenz, G., 2011, Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells. *PloS one*, 6(6), e20849.
- Fine, H.A., Dear, K.B., Loeffler, J.S., Black, P.M., Canellos, G.P., 1993, Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults, *Cancer*, 71, 2585-2597.
- Fiveash, J.B, Chowdhary, S.A., Peereboom Jr.D., Mikkelsen, T., Nabors, L.B., Lesser, G.J., Rosenfeld, M.R., Ye, X., Grossman, S.A., 2009, NABTT- 0702: A phase II study of R-(-)-gossypol (AT-101) in recurrent glioblastoma multiforme (GBM), *Journal of Clinical Oncology American Society of Clinical Oncology*, 27, 15.
- Garman, K.S., Nevins, J.R., Potti, A., 2007, Genomic strategies for personalized cancer therapy, *Human Molecular Genetics*, 2, 226–232.
- Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E., Kroemer, G., 2006, Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties, *Cell Cycle*, 5 (22), 2592-2601.

- Garrido, C., Mehlen, P., Fromentin, A., Hammann, A., Assem, M., Arrigo, A.P., Chauffert, B., 1996, Inconstant association between 27-kDa heat-shock protein (Hsp27) content and doxorubicin resistance in human colon cancer cells. The doxorubicin-protecting effect of Hsp27, *European Journal of Biochemistry*, 237(3), 653–659.
- Garrido, C., Schmitt, E., Candé, C., Vahsen, N., Parcellier, A., & Kroemer, G., 2003, HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors, *Cell Cycle*, 2(6), 579–584.
- Gastpar, R., Gehrman, M., Bausero, M.A., Asea, A., Gross, C., Schroeder, J.A., Multhoff, G., 2005, Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells, *Cancer Research*, 65(12), 5238–5247.
- Gobbo, J., Marcion, G., Cordonnier, M., Dias, A., Pernet, N., Hammann, A., Richaud, S., Mjahed, H., Isambert, N., Clausse, V., Rébé, C., Bertaut, A., Goussot, V., Lirussi, F., Ghiringhelli, F., de Thonel, A., Fumoleau, P., Seigneuric, R., Garrido, C., 2015, Restoring Anticancer Immune Response by Targeting Tumor-Derived Exosomes With a HSP70 Peptide Aptamer, *Journal of The National Cancer Institute*, 108(3).
- Gonda D.D., Akers J.C., Kim R., Kalkanis S.N., Hochberg F.H., Chen C.C., Carter B. 2013, Neuro-oncologic applications of exosomes, microvesicles, and other nano-sized extracellular particles, *Neurosurgery*, 72(4), 501-510.
- Grange, C., Tapparo, M., Collino, F., Vitillo, L., Damasco, C., Deregibus, M. C., Tetta, C., Bussolati, B., Camussi, G., 2011, Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche, *Cancer Research*, 71(15), 5346–5356.
- Greening, D. W., Gopal, S. K., Xu, R., Simpson, R. J., Chen, W., 2015, Exosomes and their roles in immune regulation and cancer, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 40, 72–81.
- Grogan, P.T., Sarkaria, J.N., Timmermann, B.N., Cohen, M.S., 2014, Oxidative cytotoxic agent withaferin A resensitizes temozolomide-resistant glioblastomas via MGMT depletion and induces apoptosis through Akt/mTOR pathway inhibitory modulation, *Investigational New Drugs*, 32(4), 604–617.
- Gurunathan, S., Kang, M. H., Jeyaraj, M., Qasim, M., Kim, J.H., 2019, Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes, *Cells*, 8(4), 307.
- Guttmann, D.M., Koumenis, C., 2011, The heat shock proteins as targets for radiosensitization and chemosensitization in cancer, *Cancer Biology & Therapy*, 12(12), 1023–1031.
- Hata, M., & Ohtsuka, K., 1998, Characterization of HSE sequences in human Hsp40 gene: structural and promoter analysis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1397(1), 43–55.
- Hayashi, S., Ozaki, T., Yoshida, K., Hosoda, M., Todo, S., Akiyama, S., Nakagawara, A., 2006, p73 and MDM2 confer the resistance of epidermoid carcinoma to cisplatin by blocking p53, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347(1), 60–66.
- Hitotsumatsu, T., Iwaki, T., Fukui, M., Tateishi, J., 1996, Distinctive immunohistochemical profiles of small heat shock proteins (heat shock protein 27 and alpha beta-crystallin) in human brain tumors, *Cancer Research*, 77, 352–361.
- Hong, B. S., Cho, J. H., Kim, H., Choi, E. J., Rho, S., Kim, J., Kim, J. H., Choi, D. S., Kim, Y. K., Hwang, D., Gho, Y. S., 2009, Colorectal cancer cell-derived microvesicles are

- enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells, *BMC Genomics*, 10, 556.
- Huang, C., Conlee, D., Loop, J., Champ, D., Gill, M., Chu, H. J., 2004, Efficacy and safety of a feline immunodeficiency virus vaccine, *Animal Health Research Reviews*, 5(2), 295–300.
- Huang, H., Lin, H., Zhang, X., Li, J., 2012, Resveratrol reverses temozolomide resistance by downregulation of MGMT in T98G glioblastoma cells by the NF- κ B-dependent pathway, *Oncology Reports*, 27 (6), 2050-2056.
- Huang, J., Chen, H., Wei, Q., Zhang, Z., Zhong, Z., Xu, Y., 2017, Downregulation of LKB1 promotes tumor progression and predicts unfavorable prognosis in patients with glioma, *Oncology Letters*, 13(3), 1688–1694.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 2020, <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype>, [Ziyaret Tarihi: 20.12.2020].
- Jäättelä M., 1999, Escaping cell death: survival proteins in cancer, *Experimental Cell Research*, 248(1), 30–43.
- Jacobs, V.L., Valdes, P.A., Hickey, W.F., De Leo, J.A., 2011, Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model, *ASN Neuro*, 3(3), e00063.
- Jego, G., Hazoumé, A., Seigneuric, R., Garrido, C., 2013, Targeting heat shock proteins in cancer, *Cancer Letters*, 332 (2), 275-285.
- Jones, S.N., Hancock, A.R., Vogel, H., Donehower, L.A., Bradley, A., 1998, Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53-independent role for Mdm2 in tumorigenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15608–15612.
- Kai, M., Nakatsura, T., Egami, H., Senju, S., Nishimura, Y., Ogawa, M., 2003, Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors, *Oncology Reports*, 10(6), 1777–1782.
- Kaina, B., Margison, G. P., Christmann, M., 2010, Targeting O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(21), 3663–3681.
- Kalluri R., 2016, The biology and function of exosomes in cancer, *The Journal of Clinical Investigation*, 126(4), 1208–1215.
- Kampinga, H.H., Hageman, J., Vos, M.J., Kubota, H., Tanguay, R.M., Bruford, E.A., Cheetham, M.E., Chen, B., Hightower, L.E., 2009, Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins, *Cell Stress Chaperones*, 14 (1), 105-111.
- Kanu, O.O., Hughes, B., Di, C., Lin, N., Fu, J., Bigner, D.D., Yan, H., Adamson, C., 2009, Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways, *Clinical Medicine, Oncology*, 3, 39–52.
- Karpel-Massler, G., Shu, C., Chau, L., Banu, M., Halatsch, M.E., Westhoff, M.A., Ramirez, Y., Ross, A.H., Bruce, J. N., Canoll, P., Siegelin, M.D., 2015, Combined inhibition of Bcl-2/Bcl-xL and Usp9X/Bag3 overcomes apoptotic resistance in glioblastoma *in vitro* and *in vivo*, *Oncotarget*, 6(16), 14507–14521.

- Khalid, H., Tsutsumi, K., Yamashita, H., Kishikawa, M., Yasunaga, A., Shibata, S., 1995, Expression of the small heat shock protein (hsp) 27 in human astrocytomas correlates with histologic grades and tumor growth fractions, *Cellular and Molecular Neurobiology*, 15(2), 257–268.
- Khalil, A.A., Kabapy, N.F., Deraz, S.F., Smith, C., 2011, Heat shock proteins in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic targets, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1816(2), 89–104.
- Kim, E.J., Choi, C.H., Park, J.Y., Kang, S.K., Kim, Y.K., 2008, Underlying mechanism of quercetin-induced cell death in human glioma cells, *Neurochemical Research*, 33(6), 971–979.
- Kim, L.S., Kim, J.H., 2011, Heat shock protein as molecular targets for breast cancer therapeutics, *Journal of Breast Cancer*, 14(3), 167–174.
- Ko, J.L., Cheng, Y.W., Chang, S.L., Su, J.M., Chen, C.Y., Lee, H., 2000, MDM2 mRNA expression is a favorable prognostic factor in non-small-cell lung cancer, *International Journal of Cancer*, 89(3), 265–270.
- Krakstad, C., Chekenya, M., 2010, Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics, *Molecular Cancer*, 9, 135.
- Krex, D., Klink, B., Hartmann, C., von Deimling, A., Pietsch, T., Simon, M., Sabel, M., Steinbach, J.P., Heese, O., Reifenberger, G., Weller, M., Schackert, G., 2007, Long-term survival with glioblastoma multiforme, *Brain*, 130(10), 2596–2606.
- Kucharzewska, P., Christianson, H. C., Welch, J. E., Svensson, K. J., Fredlund, E., Ringnér, M., Mörgelin, M., Bourseau-Guilmain, E., Bengzon, J., Belting, M., 2013, Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development, *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 110(18), 7312–7317.
- Kumar, S., Stokes, J., 3rd, Singh, U.P., Scissum Gunn, K., Acharya, A., Manne, U., Mishra, M., 2016, Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer, *Cancer Letters*, 374(1), 156–166.
- Lan, F., Yang, Y., Han, J., Wu, Q., Yu, H., Yue, X., 2016, Sulforaphane reverses chemoresistance to temozolomide in glioblastoma cells by NF- κ B-dependent pathway downregulating MGMT expression, *International Journal of Oncology*, 48(2), 559–568.
- Lancaster, G.I., Febbraio, M. A., 2005, Mechanisms of stress-induced cellular HSP72 release: implications for exercise-induced increases in extracellular HSP72, *Exercise Immunology Review*, 11, 46–52.
- Lee S.Y., 2016, Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme, *Genes & Diseases*, 3(3), 198–210.
- Li, J., Soroka, J., Buchner, J., 2012, The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823(3), 624–635.
- Li, Q., Ru, Y., Wang, Q., Lyu, W., Hu, W., Fei, Z., Li, X., Lin, W., 2019, RAD51 promotes proliferation and migration of glioblastoma cells and decreases sensitivity of cells to temozolomide, *Chinese journal of cellular and molecular immunology*, 35(9), 817–822.

- Li, Z., Ma, Y. Y., Wang, J., Zeng, X. F., Li, R., Kang, W., Hao, X. K., 2015, Exosomal microRNA-141 is upregulated in the serum of prostate cancer patients, *OncoTargets and Therapy*, 9, 139–148.
- Lianos, G.D., Alexiou, G.A., Mangano, A., Mangano, A., Rausei, S., Boni, L., Dionigi, G., Roukos, D.H., 2015, The role of heat shock proteins in cancer, *Cancer Letters*, 360 (2), 114-118.
- Liao, W.C., Wu, M.S., Wang, H.P., Tien, Y.W. and Lin, J.T., 2009, Serum heat shock protein 27 is increased in chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma, *Pancreas*, 38, 422-426.
- Lin, C.J., Lee, C.C., Shih, Y.L., Lin, T.Y., Wang, S.H., Lin, Y.F., Shih, C.M., 2012, Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma in vitro and in vivo by inhibiting autophagy, *Free Radical Biology & Medicine*, 52(2), 377–391.
- Liu, C., Yu, S., Zinn, K., Wang, J., Zhang, L., Jia, Y., Kappes, J.C., Barnes, S., Kimberly, R. P., Grizzle, W.E., Zhang, H.G., 2006, Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function, *Journal of immunology*, 176(3), 1375–1385.
- Liu, T., Daniels, C. K., & Cao, S., 2012, Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential, *Pharmacology & Therapeutics*, 136(3), 354–374.
- Liu, W., Yang, D., Chen, L., Liu, Q., Wang, W., Yang, Z., Shang, A., Quan, W., & Li, D., 2020, Plasma Exosomal miRNA-139-3p is a Novel Biomarker of Colorectal Cancer, *Journal of Cancer*, 11(16), 4899–4906.
- Lo Cicero, A., Stahl, P.D., Raposo, G., 2015, Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad, *Current Opinion in Cell Biology*, 35, 69–77.
- Logozzi, M., De Milito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabrò, L., Spada, M., Perdicchio, M., Marino, M. L., Federici, C., Iessi, E., Brambilla, D., Venturi, G., Lozupone, F., Santinami, M., Huber, V., Maio, M., Rivoltini, L., & Fais, S., 2009, High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients, *PloS one*, 4(4), e5219.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., Ellison, D.W., 2016, The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary, *Acta Neuropathol*, 131 (6), 803-820.
- Lukas, R.V., Wainwright, D.A., Ladomersky, E., Sachdev, S., Sonabend, A.M., Stupp, R., 2019, Newly Diagnosed Glioblastoma: A Review on Clinical Management, *Oncology*, 33(3), 91-100.
- Ly, L. H., Wan, Y. L., Lin, Y., Zhang, W., Yang, M., Li, G. L., Lin, H. M., Shang, C. Z., Chen, Y. J., Min, J., 2012, Anticancer drugs cause release of exosomes with heat shock proteins from human hepatocellular carcinoma cells that elicit effective natural killer cell antitumor responses *in vitro*, *The Journal of Biological Chemistry*, 287(19), 15874–15885.
- Maacke, H., Jost, K., Opitz, S., Miska, S., Yuan, Y., Hasselbach, L., Lüttges, J., Kalthoff, H., Stürzbecher, H. W., 2000, DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma, *Oncogene*, 19(23), 2791–2795.

- Marchesi F., Turriziani M., Tortorelli G., Avvisati G., Torino F., De Vecchis L., 2007, Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems, *Pharmacol Research*, 56(4), 275-287.
- Mathew, A., Bell, A. and Johnstone, R.M., 1995, Hsp-70 is closely associated with the transferrin receptor in exosomes from maturing reticulocytes, *Biochemical Journal* 308, 823-830.
- Mathivanan, S., Ji, H., Simpson, R.J., 2010, Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication, *Journal of Proteomics*, 73(10), 1907-1920.
- Maurizi, M. R. and Xia, D., 2004, Protein Binding and Disruption by Clp/Hsp100 Chaperones, *Structure*, 12(2), 175-183.
- Mayer, M. P. and Bukau, B., 2005, Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(6), 670-684.
- McCready, J., Sims, J.D., Chan, D., Jay, D. G., 2010, Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation, *BMC Cancer*, 10, 294.
- McLaughlin, M., Barker, H.E., Khan, A.A., Pedersen, M., Dillon, M., Mansfield, D.C., Patel, R., Kyula, J.N., Bhide, S.A., Newbold, K.L., Nutting, C.M., Harrington, K. J., 2017, HSP90 inhibition sensitizes head and neck cancer to platin-based chemoradiotherapy by modulation of the DNA damage response resulting in chromosomal fragmentation, *BMC Cancer*, 17(1), 86.
- Melo, S. A., Luecke, L. B., Kahlert, C., Fernandez, A. F., Gammon, S. T., Kaye, J., LeBleu, V. S., Mittendorf, E. A., Weitz, J., Rahbari, N., Reissfelder, C., Pilarsky, C., Fraga, M. F., Piwnica-Worms, D., Kalluri, R., 2015, Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer, *Nature*, 523(7559), 177-182.
- Melo, S. A., Sugimoto, H., O'Connell, J. T., Kato, N., Villanueva, A., Vidal, A., Qiu, L., Vitkin, E., Perelman, L. T., Melo, C. A., Lucci, A., Ivan, C., Calin, G. A., Kalluri, R., 2014, Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis, *Cancer Cell*, 26(5), 707-721.
- Messaoudi, K., Clavreul, A., Lagarce, F., 2015, Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide, *Drug Discovery Today*, 20(7), 899-905.
- Mittelbrunn, M. and Sanchez-Madrid, F., 2012, Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 328-335.
- Moat, A.G., 1979, *Microbial physiology*, John Wiley and Sons, New York, ISBN: 0-471-07258-3.
- Moody, C.L., Wheelhouse, R.T., 2014, The medicinal chemistry of imidazotetrazine prodrugs, *Pharmaceuticals*, 7(7), 797-838.
- Mosmann, T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay, *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2), 55-63.

- Munoz, J.L., Rodriguez-Cruz, V., Greco, S.J., Nagula, V., Scotto, K.W., Rameshwar, P., 2014, Temozolomide induces the production of epidermal growth factor to regulate MDR1 expression in glioblastoma cells, *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(10), 2399–2411.
- Murakami, N., Kühnel, A., Schmid, T. E., Ilicic, K., Stangl, S., Braun, I. S., Gehrman, M., Molls, M., Itami, J., Multhoff, G., 2015, Role of membrane Hsp70 in radiation sensitivity of tumor cells, *Radiation Oncology*, 10, 149.
- Nakatsura, T., Senju, S., Yamada, K., Jotsuka, T., Ogawa, M., Nishimura, Y., 2001, Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281(4), 936–944.
- Nam, J.Y., de Groot, J.F., 2017, Treatment of Glioblastoma, *Journal Of Oncology Practice*, 13(10), 629–638.
- NCBI PubMed, 2020, LN229, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, [Ziyaret tarihi: 10 Ocak 2020].
- NCBI PubMed, 2020, U87, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, [Ziyaret tarihi: 10 Ocak 2020].
- Nollen, E.A., Brunsting, J.F., Roelofsen, H., Weber, L.A., Kampinga, H.H., 1999, *In vivo* chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance, *Molecular and Cellular Biology*, 19 (3), 2069-2079.
- Nylandsted, J., Brand, K., Jäättelä, M., 2000, Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 926, 122–125.
- Oesterreich, S., Weng, C.N., Qiu, M., Hilsenbeck, S.G., Osborne, C.K., Fuqua, S.A., 1993, The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines, *Cancer Research*, 53(19), 4443–4448.
- Omar, A.I., Mason, W.P., 2010 Temozolomide: The evidence for its therapeutic efficacy in malignant astrocytomas, *Core Evidence*, 4, 93–111.
- Omay, S.B., Vogelbaum, M.A., 2009, Current concepts and newer developments in the treatment of malignant gliomas, *Indian Journal of Cancer*, 46(2), 88-95.
- Önay-Uçar, E., Mertoğlu, E., Kıyga, E., Şengelen, A., Pekmez, M., Arda, N., (2021, in press), Exosomal Heat Shock Proteins in Cancer, *Heat Shock Proteins and Cancer Therapies Chapter*, In: Asea A., Kaur P. (eds), Chapter 21, Springer, Switzerland.
- Pagani, E., Falcinelli, S., Pepponi, R., Turriziani, M., Caporaso, P., Caporali, S., Bonmassar, E., D'Atri, S., 2007, Combined effect of temozolomide and hyperthermia on human melanoma cell growth and O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity, *International Journal of Oncology*, 30(2):443-51.
- Pan, B.T. and Johnstone, R.M., 1983, Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: selective externalization of the receptor, *Cell*, 33, 967- 978.
- Paolini, A., Pasi, F., Facoetti, A., Mazzini, G., Corbella, F., Di Liberto, R., Nano, R., 2011, Cell death forms and HSP70 expression in U87 cells after ionizing radiation and/or chemotherapy, *Anticancer Research*, 31, 3727-3731.
- Papp, E., Nardai, G., Söti, C., Csermely, P., 2003, Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis, *Biofactors*, 17 (1-4), 249-257.

- Parcellier, A., Brunet, M., Schmitt, E., Col, E., Didelot, C., Hammann, A., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Khochbin, S., Solary, E., Garrido, C., 2006, HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells, *FASEB journal: Official Publication of The Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(8), 1179–1181.
- Park, M.N., Song, H.S., Kim, M., Lee, M.J., Cho, W., Lee, H.J., Hwang, C. H., Kim, S., Hwang, Y., Kang, B., Kim, B., 2017, Review of Natural Product-Derived Compounds as Potent Antiglioblastoma Drug, *BioMed Research International*, 8139848.
- Pasi, F., Paolini, A., Nano, R., Di Liberto, R., Capelli, E., 2014, Effects of single or combined treatments with radiation and chemotherapy on survival and danger signals expression in glioblastoma cell lines, *BioMed Research International*, 453497.
- Pei, H. P., Ge, H., Jiang, R., Zhu, H., 2010, Expression and clinical significance of 14-3-3 sigma and heat shock protein 27 in colorectal cancer, *Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery*, 13(3), 213–215.
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B. A., Callahan, M. K., Yuan, J., Martins, V. R., Skog, J., Kaplan, R. N., Brady, M. S., ... Lyden, D., 2012, Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET, *Nature Medicine*, 18(6), 883–891.
- Pontén, J. ve Macintyre, E.H., 1968, Long term culture of normal and neoplastic human glia, *Acta pathologica Microbiologica Scandinavica*, 74 (4), 465-486.
- Rapakko, K., Heikkinen, K., Karppinen, S. M., Winqvist, R., 2006, Screening for RAD51 and BRCA2 BRC repeat mutations in breast and ovarian cancer families, *Cancer Letters*, 236(1), 142–147.
- Raposo, G. and Stoorvogel, W., 2013, Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends, *The Journal of Cell Biology*, 200(4), 373-383.
- Ratajczak, J., Wyszczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, M. Z., 2006, Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication, *Leukemia*, 20, 1487–1495.
- Reichert, M., Steinbach, J.P., Supra, P., Weller, M., 2002, Modulation of growth and radiochemosensitivity of human malignant glioma cells by acidosis, *Cancer*, 95(5), 1113-1119.
- Reid, J.M., Stevens, D.C., Rubin, J., Ames, M. M., 1997, Pharmacokinetics of 3-methyl-(1H-imidazo[4,5-b]pyridin-2-yl)imidazole-4-carboxamide following administration of temozolomide to patients with advanced cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research*, 3(12), 2393–2398.
- Ritossa, F., 1962, A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*, *Experientia*, 18 (12), 571-573.
- Rocchi, P., So, A., Kojima, S., Signaevsky, M., Beraldi, E., Fazli, L., Hurtado-Coll, A., Yamanaka, K., Gleave, M., 2004, Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer, *Cancer Research*, 64(18), 6595–6602.

- Rosell, R., de Las Peñas, R., Balaña, C., Santarpia, M., Salazar, F., de Aguirre, I., Reguart, N., Villa, S., Wei, J., Ramirez, J. L., Molina, M. A., Ramon y Cajal, S., Jablons, D., & Taron, M., 2008, Translational research in glioblastoma multiforme: molecular criteria for patient selection, *Future Oncology*, 4(2), 219–228.
- Sallinen, S.L., Sallinen, P.K., Haapasalo, H.K., Helin, H.J., Helén, P.T., Schraml, P., Kallioniemi, O.P., Kononen, J., 2000, Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques, *Cancer Research*, 60 (23), 6617-6622.
- Sarkaria, J.N., Kitange, G.J., James, C.D., Plummer, R., Calvert, H., Weller, M., Wick, W., 2008, Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma, *Clinical Cancer Research: An Official Journal Of The American Association For Cancer Research*, 4(10):2900-2908.
- Sarto, C., Binz, P.A., Mocarelli, P., 2000, Heat shock proteins in human cancer, *Electrophoresis*, 21(6), 1218–1226.
- Sato, A., Sunayama, J., Matsuda, K., Seino, S., Suzuki, K., Watanabe, E., Tachibana, K., Tomiyama, A., Kayama, T., Kitanaka, C., 2011, MEK-ERK signaling dictates DNA-repair gene MGMT expression and temozolomide resistance of stem-like glioblastoma cells via the MDM2-p53 axis, *Stem Cells*, 29(12), 1942–1951.
- Sehgal, A., 1998, Molecular changes during the genesis of human gliomas, *Seminars in Surgical Oncology*, 14(3), 3-12.
- Sellers, W.R., Fisher, D.E., 1999, Apoptosis and cancer drug targeting, *The Journal of Clinical Investigation*, 104(12), 1655–1661.
- Shao, H., Chung, J., Lee, K., Balaj, L., Min, C., Carter, B.S., Hochberg, F.H., Breakefield, X.O., Lee, H., Weissleder, R., 2015, Chip-based analysis of exosomal mRNA mediating drug resistance in glioblastoma. *Nature Communications*, 6, 6999.
- Shipp, C., Watson, K., Jones, G.L., 2011, Associations of HSP90 client proteins in human breast cancer, *Anticancer Research*, 31(6), 2095–2101.
- Sidera, K., Patsavoudi, E., 2008, Extracellular HSP90: conquering the cell surface, *Cell Cycle*, 7(11), 1564–1568.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2020, Cancer statistics, *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 70(1), 7–30.
- Silva, J., Garcia, V., Rodriguez, M., Compte, M., Cisneros, E., Veguillas, P., Garcia, J.M., Dominguez, G., Campos-Martin, Y., Cuevas, J., Peña, C., Herrera, M., Diaz, R., Mohammed, N., Bonilla, F., 2012, Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer, *Genes, Chromosomes and Cancer*, 51, 409-418.
- Simon, T., Pinioti, S., Schellenberger, P., Rajeeve, V., Wendler, F., Cutillas, P. R., King, A., Stebbing, J., Giamas, G., 2018, Shedding of bevacizumab in tumour cells-derived extracellular vesicles as a new therapeutic escape mechanism in glioblastoma, *Molecular Cancer*, 17(1), 132.
- Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W. T., Jr, Carter, B. S., Krichevsky, A. M., Breakefield, X. O., 2008, Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers, *Nature Cell Biology*, 10(12), 1470–1476.

- Snoeckx, L.H., Cornelussen, R.N., Van Nieuwenhoven, F.A., Reneman, R.S., Van Der Vusse, G.J., 2001, Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology, *Physiological Reviews*, 81(4), 1461-1497.
- So, A., Hadaschik, B., Sowery, R., Gleave, M., 2007, The role of stress proteins in prostate cancer, *Current Genomics*, 8(4), 252–261.
- Song, H.Y., Liu, Y.K., Feng, J.T., Cui, J.F., Dai, Z., Zhang, L.J., Feng, J.X., Shen, H.L., Tang, Z.Y., 2006, Proteomic analysis on metastasis-associated proteins of human hepatocellular carcinoma tissues, *Journal of cancer research and clinical oncology*, 132(2), 92–98.
- Soung, Y.H., Nguyen, T., Cao, H., Lee, J. and Chung, J., 2016, Emerging roles of exosomes in cancer invasion and metastasis, *BMB reports*, 49, 18–25.
- Sriram, M., Osipiuk, J., Freeman, B., Morimoto, R., 1997, Human Hsp70 molecular chaperone binds two calcium ions within the ATPase domain, *Structure*, 5(3), 403-14.
- Stepanenko, A.A., Andreieva, S.V., Korets, K.V., Mykytenko, D.O., Baklaushev, V.P., Huleyuk, N.L., Kovalova, O.A., Kotsarenko, K.V., Chekhonin, V.P., Vassetzky, Y.S., Avdieiev, S.S., Dmitrenko, V.V., 2016, Temozolomide promotes genomic and phenotypic changes in glioblastoma cells, *Cancer Cell International*, 16, 36.
- Sterrenberg, J. N., Blatch, G. L., & Edkins, A. L., 2011, Human DNAJ in cancer and stem cells, *Cancer Letters*, 312(2), 129–142.
- Suzuki, A., Toi, M., Yamamoto, Y., Saji, S., Muta, M., Tominaga, T., 1998, Role of MDM2 overexpression in doxorubicin resistance of breast carcinoma, *Japanese Journal of Cancer Research: Gann*, 89(2), 221–227.
- Tagscherer, K.E., Fassl, A., Campos, B., Farhadi, M., Kraemer, A., Böck, B. C., Macher-Goeppinger, S., Radlwimmer, B., Wiestler, O.D., Herold-Mende, C., Roth, W., 2008, Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins, *Oncogene*, 27(52), 6646–6656.
- Takashima, M., Kuramitsu, Y., Yokoyama, Y., Iizuka, N., Toda, T., Sakaida, I., Okita, K., Oka, M., Nakamura, K., 2003, Proteomic profiling of heat shock protein 70 family members as biomarkers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma, *Proteomics*, 3(12), 2487–2493.
- Tanaka, Y., Kamohara, H., Kinoshita, K., Kurashige, J., Ishimoto, T., Iwatsuki, M., Watanabe, M., Baba, H., 2013, Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma, *Cancer*, 119(6), 1159–1167.
- Tang, X.J., Huang, K.M., Gui, H., Wang, J.J., Lu, J.T., Dai, L.J., Zhang, L., Wang, G., 2016, Pluronic-based micelle encapsulation potentiates myricetin-induced cytotoxicity in human glioblastoma cells, *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4991–5002.
- Taylor, D. D., Gercel-Taylor, C., 2008, MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer, *Gynecologic Oncology*, 110(1), 13–21.
- Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J. and Amigorena, S., 2001, Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *Journal of immunology*, 166, 7309-7318.

- Théry, C., Duban, L., Segura, E., Véron, P., Lantz, O., Amigorena, S., 2002, Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes, *Nature Immunology*, 3(12), 1156–1162.
- Théry, C., Ostrowski, M., Segura, E., 2009, Membrane vesicles as conveyors of immune responses, *Nature Reviews. Immunology*, 9(8), 581–593.
- Tian, Y., Li, S., Song, J., Ji, T., Zhu, M., Anderson, G. J., Wei, J., & Nie, G., 2014, A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy, *Biomaterials*, 35(7), 2383–2390.
- Tracz-Gaszewska, Z., Klimczak, M., Biecek, P., Herok, M., Kosinski, M., Olszewski, M. B., Czerwińska, P., Wiech, M., Wiznerowicz, M., Zylicz, A., Zylicz, M., & Wawrzynow, B., 2017, Molecular chaperones in the acquisition of cancer cell chemoresistance with mutated *TP53* and MDM2 up-regulation, *Oncotarget*, 8(47), 82123–82143.
- Trams, E.G., Lauter, C.J., Salem, N. and Heine, U., 1981, Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles, *Biochimica et Biophysica Acta*, 645, 63-70.
- Türkiye İstatistik Kurumu, *Ölüm Nedeni İstatistikleri*, 2016. http://tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1083, [Ziyaret Tarihi: 29.08.2020].
- Valdés-Rives, S.A., Casique-Aguirre, D., Germán-Castelán, L., Velasco-Velázquez, M.A., González-Arenas, A., 2017, Apoptotic Signaling Pathways in Glioblastoma and Therapeutic Implications, *BioMed Research International*, 7403747.
- Van der Pol, E., Böing, A.N., Harrison, P., Sturk, A. and Nieuwland, R., 2012, Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles, *Pharmacological Reviews*, 64, 676-705.
- van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S. and Raposo, G., 2006, Exosomes: a common pathway for a specialized function. *Journal of Biochemistry*, 140(1), 13-21.
- Vargas-Roig, L.M., Gago, F.E., Tello, O., Aznar, J.C., Ciocca, D.R., 1998, Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy, *International Journal of Cancer*, 79(5), 468–475.
- Vaughan, C., Mohanraj, L., Singh, S., Dumur, C.I., Ramamoorthy, M., Garrett, C.T., Windle, B., Yeudall, W.A., Deb, S., Deb, S.P., 2011, Human Oncoprotein MDM2 Up-regulates Expression of NF- κ B2 Precursor p100 Conferring a Survival Advantage to Lung Cells, *Genes & Cancer*, 2(10), 943–955.
- Vega, V.L., Rodríguez-Silva, M., Frey, T., Gehrman, M., Diaz, J.C., Steinem, C., Multhoff, G., Arispe, N., De Maio, A., 2008, Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages, *Journal of Immunology*, 180(6), 4299–4307.
- Vlassov, A.V., Magdaleno, S., Setterquist, R. and Conrad, R., 2012, Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820(7), 940-948.
- Walker, J.M, 2002, SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins, The Protein Protocols Handbook, In: Walker, J.M (ed.), Chapter 11, Humana Press Inc, USA, ISBN: 0-89603-940-4, 61-68

- Wang, H., Hou, L., Li, A., Duan, Y., Gao, H., Song, X., 2014, Expression of serum exosomal microRNA-21 in human hepatocellular carcinoma, *BioMed Research International*, 864–894.
- Wang, X., Chen, M., Zhou, J., Zhang, X., 2014, HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy (Review), *International Journal of Oncology*, 45(1), 18–30.
- Weeraphan, C., Phongdara, A., Chaiyawat, P., Diskul-Na-Ayudthaya, P., Chokchaichamnankit, D., Verathamjamras, C., Netsirisawan, P., Yingchutrakul, Y., Roytrakul, S., Champattanachai, V., Svasti, J., Srisomsap, C., 2019, Phosphoproteome Profiling of Isogenic Cancer Cell-Derived Exosome Reveals HSP90 as a Potential Marker for Human Cholangiocarcinoma, *Proteomics*, 19(12), e1800159.
- Welsh, J.W., Ellsworth, R.K., Kumar, R., Fjerstad, K., Martinez, J., Nagel, R.B., Eschbacher, J., Stea, B., 2009, Rad51 protein expression and survival in patients with glioblastoma multiforme, *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 74(4), 1251–1255.
- Wessel, D., Flügge, U.I., 1984, A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids, *Analytical Biochemistry*, 138, 141–143.
- Whiteside T.L., 2017, Exosomes carrying immunoinhibitory proteins and their role in cancer, *Clinical and Experimental Immunology*, 189(3), 259–267.
- Williams, R.L. and Urbe, S., 2007, The emerging shape of the ESCRT machinery, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8, 355–368.
- Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Théry, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S., Zitvogel, L., 2001, Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming, *Nature Medicine*, 7(3), 297–303.
- World Health Organization, 2018, *Cancer*, <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cancer>, [Ziyaret Tarihi: 29.08.2020].
- Wu, J., Liu, T., Rios, Z., Mei, Q., Lin, X., Cao, S., 2017, Heat Shock Proteins and Cancer, *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(3), 226–256.
- Wyciszkiwicz, A., Kalinowska-Łyszczarz, A., Nowakowski, B., Kaźmierczak, K., Osztynowicz, K. and Michalak S., 2019, Expression of small heat shock proteins in exosomes from patients with gynecologic cancers, *Scientific Reports*, 9, 9817.
- Xiao, W., Dong, W., Zhang, C., Saren, G., Geng, P., Zhao, H., Li, Q., Zhu, J., Li, G., Zhang, S., Ye, M., 2013, Effects of the epigenetic drug MS-275 on the release and function of exosome-related immune molecules in hepatocellular carcinoma cells, *European Journal of Medical Research*, 18(1), 61.
- Xie, Y., Bai, O., Zhang, H., Yuan, J., Zong, S., Chibbar, R., Slattery, K., Qureshi, M., Wei, Y., Deng, Y., Xiang, J., 2010, Membrane-bound HSP70-engineered myeloma cell-derived exosomes stimulate more efficient CD8(+) CTL- and NK-mediated antitumour immunity than exosomes released from heat-shocked tumour cells expressing cytoplasmic HSP70, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(11), 2655–2666.
- Yoshino, A., Ogino, A., Yachi, K., Ohta, T., Fukushima, T., Watanabe, T., Katayama, Y., Okamoto, Y., Naruse, N., Sano, E., Tsumoto, K., 2010, Gene expression profiling

predicts response to temozolomide in malignant gliomas, *International Journal of Oncology*, 36(6), 1367–1377.

- Yu, S., Liu, C., Su, K., Wang, J., Liu, Y., Zhang, L., Li, C., Cong, Y., Kimberly, R., Grizzle, W. E., Falkson, C., Zhang, H. G., 2007, Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells, *Journal of Immunology*, 178(11), 6867–6875.
- Yuan, Y., Xue, X., Guo, R.B., Sun, X.L., Hu, G., 2012, Resveratrol Enhances the Antitumor Effects of Temozolomide in Glioblastoma via ROS-dependent AMPK-TSC-mTOR Signaling Pathway, *CNS Neurosciences and Therapeutics*, 18, 536-546.
- Yue, P.J., He, L., Qiu, S.W., Li, Y., Liao, Y.J., Li, X.P., Xie, D., Peng, Y., 2014, OX26/CTX-conjugated PEGylated liposome as a dual-targeting gene delivery system for brain glioma, *Molecular Cancer*, 13 (191), 1-13.
- Zanotto-Filho, A., Braganhol, E., Klafke, K., Figueiró, F., Terra, S.R., Paludo, F.J., Morrone, M., Bristot, I.J., Battastini, A.M., Forcelini, C.M., Bishop, A., Gelain, D.P., Moreira, J., 2015, Autophagy inhibition improves the efficacy of curcumin/temozolomide combination therapy in glioblastomas, *Cancer Letters*, 358(2), 220–231.
- Zhang, J., Zhou, X., Chang, H., Huang, X., Guo, X., Du, X., Tian, S., Wang, L., Lyv, Y., Yuan, P., Xing, J., 2016, Hsp60 exerts a tumor suppressor function by inducing cell differentiation and inhibiting invasion in hepatocellular carcinoma, *Oncotarget*, 7(42), 68976–68989.
- Zhang, N., Wu, X., Yang, L., Xiao, F., Zhang, H., Zhou, A., Huang, Z., Huang, S., 2012, FoxM1 inhibition sensitizes resistant glioblastoma cells to temozolomide by downregulating the expression of DNA-repair gene Rad51, *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(21), 5961–5971.
- Zhang, R., Tremblay, T. L., McDermid, A., Thibault, P., Stanimirovic, D., 2003, Identification of differentially expressed proteins in human glioblastoma cell lines and tumors, *Glia*, 42(2), 194–208.
- Zhang, X., Yuan, X., Shi, H., Wu, L., Qian, H. and Xu, W., 2015, Exosomes in cancer: small particle, big player, *Journal of Hematology and Oncology*, 8, 83.
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Amigorena, S., 1998, Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes, *Nature Medicine*, 4(5), 594–600.
- Zolkiewski, M., Zhang, T. and Nagy, M., 2012, Aggregate reactivation mediated by the Hsp100 chaperones, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 520(1), 1-6.

EKLER

EK 1

Tablo 0.1: Tez kapsamında analizi yapılan genler.

GENLER	İSİMLERİ	FONKSİYONLARI
Bad	BCL2-Associated Agonist Of Cell Death	<i>pro-apoptotik</i> (BCL-xL ve BCL-2 ile heterodimerler oluşturarak apoptoza pozitif olarak düzenler.)
Bak1	BCL2-antagonist/killer 1	<i>pro-apoptotik</i> (BCL2'ye bağlanarak ve BCL2'yi antagonize ederek programlanmış hücre ölümünü hızlandırır.)
BAX	BCL2 associated X, apoptosis regulator	<i>pro-apoptotik düzenleyici</i>
BCL10	B-cell lymphoma/leukemia 10	<i>pro-apoptotik</i> (pro-kaspaz-9 olgunlaşması ve NF-kappa-B'nin aktivasyonunda görev alır.)
BCLAF1	BCL2-associated transcription factor 1	<i>pro-apoptotik</i> (Hücre ölümünü destekleyen transkripsiyonel baskılayıcı)
Bid	BH3 interacting domain death agonist	<i>pro-apoptotik</i> (sitokrom c'nin salınmasına izin verir.)
Bik	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	<i>pro-apoptotik</i> (Apoptoz baskılayıcıları Bcl-X (L), BHRF1, Bcl-2 ile ilişkidir ve apoptoza hızlandırır.)
Bim	BCL2L11 (BCL2-like 11)	<i>pro-apoptotik</i> (Apoptoza indükler.)
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3)	<i>pro-apoptotik</i> (BCL2 baskılanmasını engeller ve apoptoza tetikler.)
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	<i>pro-apoptotik</i> (Viral ve hücrel anti-apoptoz proteinleri ile etkileşime girer. BCL-2 ve BCL-XL baskılayıcılarının üstesinden gelebilir, BNIP3'ün neden olduğu apoptoza inhibe eder.)
BAG1	BCL2-Associated Athanogene	<i>anti-apoptotik</i> (Apoptoza yol açan bir yolda bir adımı bloke eder.)
BAG3	BCL2-Associated Athanogene 3	<i>anti-apoptotik</i> (Substrat salımını teşvik ederek HSP70/ HSC70'in şaperon aktivitesini inhibe eder.)
BAG4-F	BCL2-Associated Athanogene 4	<i>anti-apoptotik</i> (Substrat salımını teşvik ederek HSP70/ HSC70'in şaperon aktivitesini inhibe eder. Yapısal TNFRSF1A sinyallemesini önler.)
BCL2A1	BCL2-related protein A1	<i>anti-apoptotik</i> (IL-3 yoksunluğunun neden olduğu apoptoza geciktirir.)
Bcl2	B-cell CLL/lymphoma 2	<i>anti-apoptotik</i> (Mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol ederek hücre ölümünü düzenler.)
BCL2L2	BCL2-like 2	<i>anti-apoptotik</i> (Deksametazon kaynaklı apoptoza bloke eder.)

Tablo 0.1 (devam): Tez kapsamında analizi yapılan genler.

GENLER	İSİMLERİ	FONKSİYONLARI
BCL2L10	BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)	<i>anti-apoptotik</i> (BAX'ın neden olduğu apoptozu bastırır.)
Bcl-xL (BCL2L1)	B-cell lymphoma-extra large	<i>anti-apoptotik</i> (sitokrom c gibi mitokondriyal içeriklerin salınmasının engeller)
BFAR	Bifunctional Apoptosis Regulator	<i>anti-apoptotik</i> (Hem ölüm reseptörleri hem de mitokondriyal faktörler yoluyla tetiklenen apoptoz için anti-apoptotik aktiviteye sahiptir.)
BIRC2	Baculoviral IAP repeat containing 2 (CIAP1)	<i>anti-apoptotik</i> (Kaspazları, apoptozu, enflamatuar sinyalleme ve bağışıklığı, mitojenik kinaz sinyallesini, hücre proliferasyonunu, hücre istilasını ve metastazı düzenler.)
BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3 (CIAP2)	<i>anti-apoptotik</i> (Kaspazları, apoptozu, enflamatuar sinyalleme ve bağışıklığı, mitojenik kinaz sinyallesini, hücre proliferasyonunu, hücre istilasını ve metastazı düzenler.)
BIRC4 /XIAP	Baculoviral IAP repeat containing 4/ X-linked inhibitor of apoptosis	<i>anti-apoptotik</i> (Kaspazları, apoptozu, enflamatuar sinyalleme ve bağışıklığı, mitojenik kinaz sinyallesini, hücre proliferasyonunu, hücre istilasını ve metastazı düzenler.)
BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5	<i>anti-apoptotik</i> (Hücre proliferasyonunu teşvik eder ve apoptozu önler.)
BIRC6	Baculoviral IAP repeat containing 6	<i>anti-apoptotik</i> (Kaspazları kontrol ederek ve bir E3 ubiquitin-protein ligaz gibi davranarak hücre ölümünü düzenleyebilir.)
BIRC8	Baculoviral IAP repeat containing 8	<i>anti-apoptotik</i> (BAX'ın aracılık ettiği apoptozu karşı korur.)
BNIP1	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1	<i>anti-apoptotik</i> (Hücre ölümünün bastırılmasında ve mitokondriyal otofajide rol oynayabilir.)
BNIP2	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2	<i>anti-apoptotik</i> (Hücre ölümünün baskılanmasında rol oynar. BCL-2 ve adenovirüs E1B 19 kDa proteinleri ile etkileşime girer.)
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1	<i>apoptotik düzenleyici</i>
BMF	Bcl2 modifying factor	<i>anti- veya pro- apoptotik düzenleyici</i>
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase)	<i>programlı hücre ölümü</i>
CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase	<i>programlı hücre ölümü</i>
CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	<i>programlı hücre ölümü</i>
CASP4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	<i>programlı hücre ölümü</i>

Tablo 0.1 (devam): Tez kapsamında analizi yapılan genler.

GENLER	İSİMLERİ	FONKSİYONLARI
CASP5	Caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase	<i>programlı hücre ölümü</i>
CASP6	Caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase	<i>programlı hücre ölümü</i>
CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase)	<i>programlı hücre ölümü</i>
CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	<i>programlı hücre ölümü</i>
CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	<i>programlı hücre ölümü</i>
CASP10	Caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase	<i>programlı hücre ölümü</i>
CASP14	Caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase	<i>programlı hücre ölümü</i>
DCR-1	TNFRSF10C (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c)	<i>programlı hücre ölümü</i> (Sitotoksik ligand TRAIL için reseptör)
DR4	TNFRSF10A (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a)	<i>programlı hücre ölümü</i> (Sitotoksik ligand TNFSF10 / TRAIL için reseptör)
DR5	TNFRSF10B (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b)	<i>programlı hücre ölümü</i> (Sitotoksik ligand TNFSF10 / TRAIL için reseptör.)
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain)	<i>programlı hücre ölümü</i> (apoptotik adaptör molekül, apoptoz sırasında ölüme neden olan sinyal kompleksini (DISC) oluşumunda görevlidir)
FAS	Fas receptor	<i>programlı hücre ölümü</i> (Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörü)
HRK	Harakiri, BCL2 interacting protein	<i>programlı hücre ölümü</i>
MCL1	Myeloid cell leukemia 1	<i>programlı hücre ölümü</i> (Apoptozun düzenlenmesinde ve canlılığın sürdürülmesinde rol alır.)
NFKB1/p50	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	<i>transkripsiyon faktörü</i> (İltihaplanma, bağışıklık, farklılaşma, hücre büyümesi, tümörjenez ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte rol oynar.)
Noxa (PMAIP1)	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	<i>programlı hücre ölümü</i> (Radyasyona maruz kaldıktan sonra p53 / TP53'e bağlı apoptoza katkıda bulunur.)
Puma	BCL2 binding component 3	<i>programlı hücre ölümü</i> (P53 / TP53'e bağımlı ve p53 / TP53'ten bağımsız apoptozun temel medyatörü)
RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	<i>programlı hücre ölümü</i> (NF-κB aktivatörü)

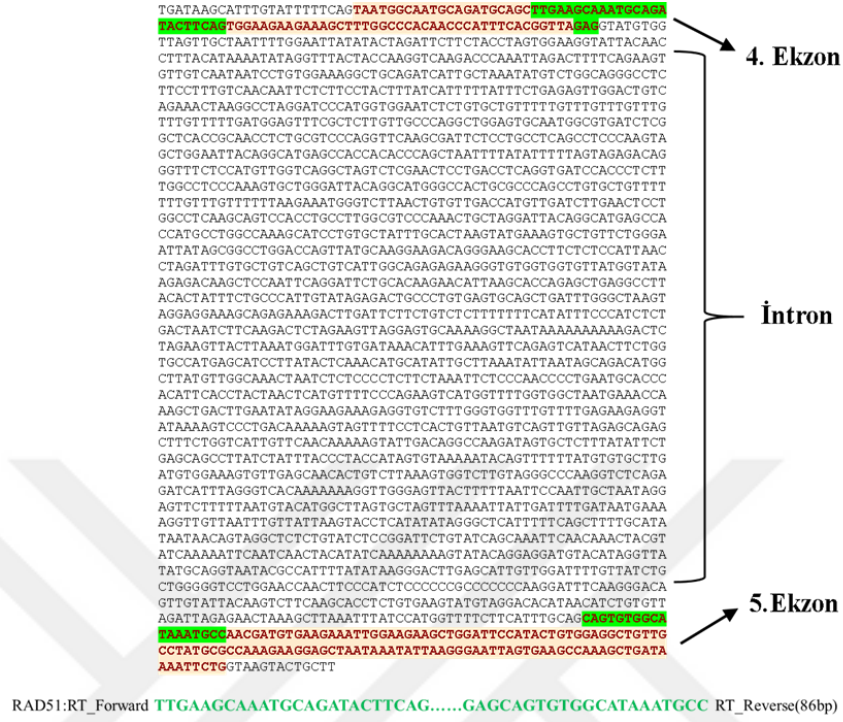
Tablo 0.1 (devam): Tez kapsamında analizi yapılan genler.

GENLER	İSİMLERİ	FONKSİYONLARI
TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	<i>programlı hücre ölümü</i> (Hücrelerin TRAIL kaynaklı apoptozunu inhibe eder)
AKT2	AKT serine/threonine kinase 2	<i>onkogen</i>
BMI1	Polycomb complex protein	<i>proto-onkogen</i> (DNA hasarı onarımında bir rol oynar.)
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like	<i>tümör baskılayıcı</i>
MDM2	Mouse double minute 2 homolog	<i>proto-onkogen</i> (p53 transkripsiyonel aktivasyon inhibitörü)
p53	tumor protein p53	<i>tümör baskılayıcı</i>
AURKA	Aurora A kinase	<i>hücre döngüsü</i> (mikrotübül oluşumunda ve / veya stabilizasyonda rol oynar)
CDC2 (CDK1)	Cell division cycle protein 2 homolog/ Cyclin-dependent kinase	<i>hücre döngüsü</i> (hücre döngüsü düzenlemesi.)
CDC20	Cell division cycle protein 20	<i>hücre döngüsü</i> (hücre döngüsü düzenlemesi.)
CDC25A	Cell division cycle 25 homolog A	<i>hücre döngüsü</i> (G1'den S fazına ilerleme için gereklidir)
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	<i>hücre döngüsü</i> (G1'den S fazına ilerleme için gereklidir)
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	<i>hücre döngüsü</i> (G1'den S fazına ilerleme için gereklidir)
SIRT 2	NAD-dependent deacetylase sirtuin 2	<i>hücre döngüsü</i> (G2 / M geçişi sırasında görev alır)
CAT	Catalase	<i>oksidatif stress</i> (Hidrojen peroksitin detoksifikasyonunda işlev görür)
GPX1	Glutathione peroxidase 1	<i>oksidatif stress</i> (Hidrojen peroksitin detoksifikasyonunda işlev görür)
NOS2	Nitric oxide synthase 2	<i>Nitrozatif stres</i>
NOX1	NADPH oxidase 1	<i>oksidatif stress</i> (süperoksit veya hidrojen peroksit üretmekte göre alır)
NOX4	NADPH oxidase 4	<i>oksidatif stress</i> (Moleküler oksijenin çeşitli reaktif oksijen türlerine (ROS) indirgenmesini katalize eder)
PRDX 1	Peroxiredoxin-1	<i>oksidatif stress</i> (Hidrojen peroksit ve alkil hidroperoksitleri azaltır)
ATM	ATM serine/threonine kinase	<i>DNA hasarı</i> (DNA hasarı kontrol noktasının aktivasyonunu başlatan ve hücre döngüsü durmasına, DNA onarımına veya apoptoza yol açan birkaç anahtar proteini fosforile eder)

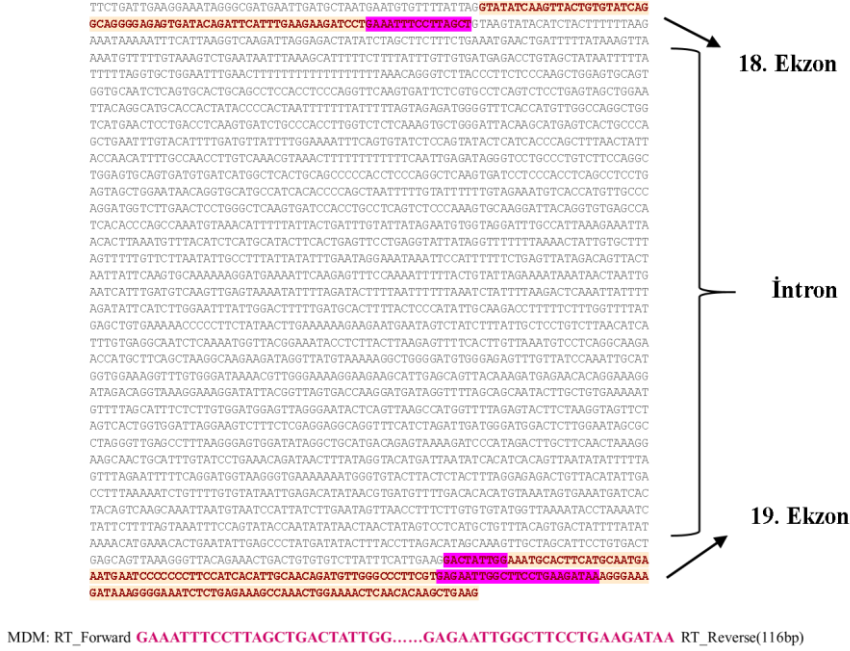
Tablo 0.1 (devam): Tez kapsamında analizi yapılan genler.

GENLER	İSİMLERİ	FONKSİYONLARI
ATR	ATR serine/threonine kinase	<i>DNA hasarı</i> (DNA hasar sensörü; DNA onarımını, rekombinasyonunu ve apoptozu teşvik edebilir)
ERCC1	DNA excision repair protein	<i>DNA hasarı</i> (DNA onarımında görev alır)
ERCC3	DNA repair endonuclease XPF	<i>DNA hasarı</i> (DNA onarımında görev alır)
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	<i>DNA hasarı</i> (DNA onarımında görev alır)
LIG4	DNA ligase 4	<i>DNA hasarı</i> (DNA onarımında görev alır)
MUTYH	mutY DNA glycosylase	<i>DNA hasarı</i> (DNA onarımında görev alır)
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase	<i>DNA hasarı (ROS) maruz kalmanın bir sonucu olarak ortaya çıkan bir mutajenik baz yan ürünü olan 8-oksoguanininin (8-oxoG) uzaklaştırılması</i>
RAD51	RAD51 recombinase	<i>DNA hasarı</i> (DNA onarımında görev alır)
RAD52	RAD52 homolog, DNA repair protein	<i>DNA hasarı</i> (DNA onarımında görev alır)
XPA	XPA, DNA Damage Recognition And Repair Factor	<i>DNA hasarı</i> (DNA hasar sensörü; DNA onarımında görev alır)
XRCC5	X-ray repair cross complementing 5	<i>DNA hasarı</i> (DNA onarımında görev alır)
Atg7	Autophagy related 7	<i>otofaji</i>
BECN1	Beclin 1	<i>otofaji</i>
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2	<i>adaptör protein</i> (Sinyal iletimi / hücre iletişimde rol alır)
GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1	<i>detoksifikasyon.</i>

EK 2

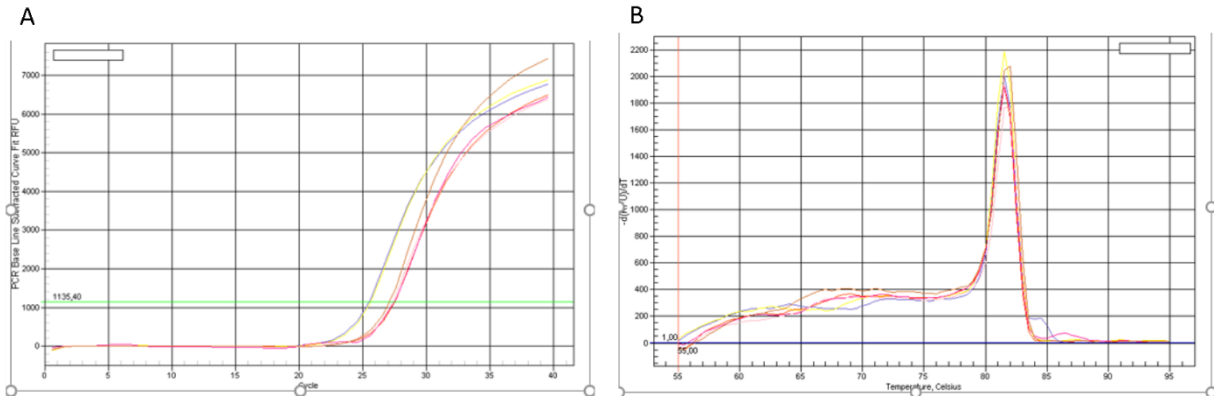


Şekil 0.1: RAD51 genine ait çoğaltılan bölge.

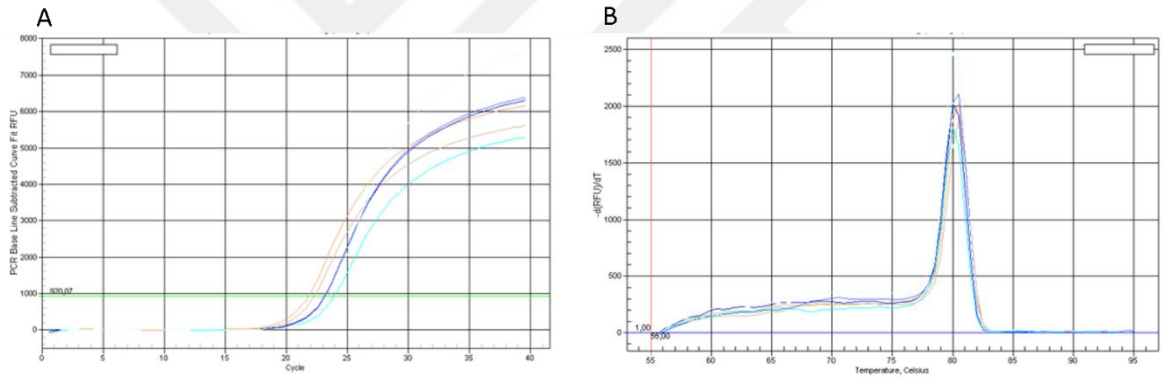


Şekil 0.2: MDM2 genine ait çoğaltılan bölge.

EK 3



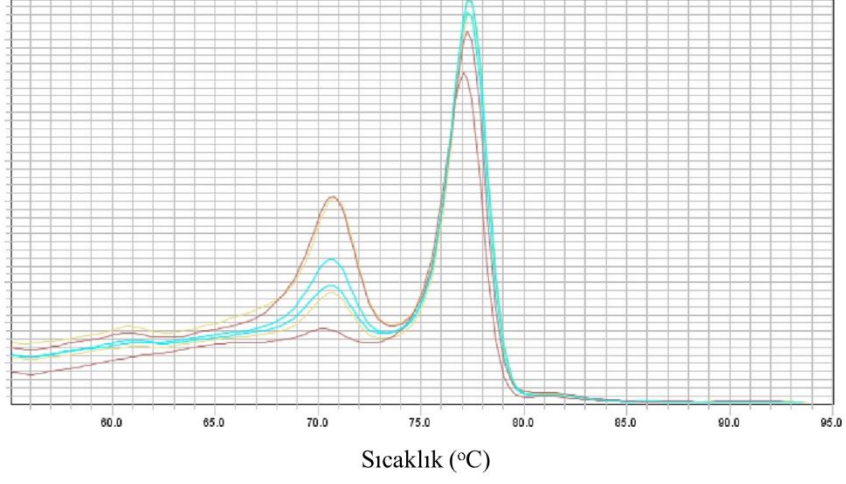
Şekil 0.3: U87-MG hücrelerinden izole edilen RNA'ların başarılı bir şekilde cDNA'ya çevrildiğini gösteren gerçek zamanlı PZR sonuçları A) Threshold Cycle grafiği B) Erime Eğrisi Analiz Grafiği.



Şekil 0.4: LN229 hücrelerinden izole edilen RNA'ların başarılı bir şekilde cDNA'ya çevrildiğini gösteren gerçek zamanlı PZR sonuçları A) Threshold Cycle grafiği B) Erime Eğrisi Analiz Grafiği.

EK 4

Erime Eğrisi Analizi



Şekil 0.5: Eksozomal RAD51 geninin belirlenmesine yönelik analizlerde primer dimer oluşumunu gösteren grafik.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ezgi KIYGA
Doğum Yeri	ADANA
Doğum Tarihi	16.08.1994
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	05532070025
E-Posta Adresi	ezgikyga@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik

Makale ve Bildiriler
<p>SCI, SSCI, AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayınlanan Makaleler</p> <p>Kıyga, E., Şengelen, A., Adıgüzel, Z., Önay-Uçar, E., 2020, Investigation of the role of quercetin as a heat shock protein inhibitor on apoptosis in human breast cancer cells, <i>Molecular Biology Reports</i>, 47 (7), 4957-4967.</p>
<p>Hakemli Kongre / Sempozyumların Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar</p> <p>Kıyga, E., Güngör, G., Önay-Uçar, E., Adıgüzel, Z., 2019, Gene Expression Changes in Response to Temozolomide on GBM Cell Lines and Evaluating Extracellular Vesicle Content, <i>1. International Multidisciplinary Cancer Research Congress</i>, 18-22 September, Diyarbakır, TURKEY.</p> <p>Kıyga, E., Şengelen, A., Adıgüzel, Z., Önay-Uçar, E., 2019, Quercetin-induced heat shock proteins inhibition and cell death in human breast cancer cells, <i>Turkish Journal of Biology</i>, 43(5 Suppl), 1-132, 2019. 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey (MolBiyKon19), ITU Ayazaga Campus Suleyman Demirel Cultural Center – İstanbul, Turkey. 27-29 September 2019. Poster Presentation.</p>

Adıgüzel, Z., Hanalioğlu, Ş., Derdiyok, A., Gungor, G., **Kıyga, E.**, Çakır-Aktaş, C., Işıkkay, I., Saydam, O., Mut-Aşkun, M., 2019, Optimization of Exosomal Transcriptome Sequencing From Glioblastoma Patients to Characterize Their Biomarker Content, *Munzur Zirvesi 1. Uluslararası Uygulamalı Bilimler Kongresi*, 24-26 May, Tunceli, TURKEY.

Mut-Aşkun, M., Işıkkay, İ., Hanalioğlu, Ş., Adıgüzel, Z., Çakır-Aktaş, C, **Kıyga, E.**, Güngör, G., 2019, Determination Of Serum/Extracellular Vesicles-Based Glioblastoma Tumor Biomarkers Using Next Generation Sequence: Methodological Approach And Preliminary Findings, *33. Turkish Neurosurgical Society Congress*, 11-14 April, Antalya, TURKEY.

Cetin, Y., Yıldızhan, Y., Adıgüzel, Z., Gungor, G., **Kıyga, E.**, Yuce, F., Duran, H., 2018, Assessing Toxicity Of Nanoparticles, Commonly Used In Nanomedicine, Tio₂ And Fe₃O₄, Using In Vitro Models, *SANKO University Innovation in Medicine Summit*, 11-13 October, Gaziantep, TURKEY.

Kıyga, E., Şengelen, A., Önay-Uçar, E., 2018, The Investigation Of Quercetin On Apoptosis And Expression Of Hsp27 And Hsp70 Proteins In Human Breast Cancer Cell, *1st International Symposium on Graduate Research in Science Focus on Entrepreneurship and Innovation (ISGRS 2018)*, 4-6 October, İstanbul, TURKEY.

Kıyga, E., Şengelen, A., Önay-Uçar, E., 2017, Effects of Quercetin on Hsp27 and Hsp70 Expression and Apoptosis Induction in MCF-7 Human Breast Cancer Cells, *2. National Proteomics Congress*, 24-25 November, İstanbul, TURKEY.

Kitap ve Kitap Bölümleri

Önay-Uçar E., Mertoğlu E., **Kıyga E.**, Şengelen A., Pekmez M., Arda N., (in press), Exosomal Heat Shock Proteins in Cancer, *Heat Shock Proteins and Cancer Therapies Chapter*, In: Asea A., Kaur P. (eds), Chapter 21, Springer, Switzerland.

Mertoğlu, E., Şengelen, A., **Kıyga, E.**, Önay-Uçar E., 2019, Therapeutic Drugs and Natural Products: The Effect of Suppressing Heat Shock Proteins (Hsp) in Brain Tumors, *Heat Shock Proteins in Neuroscience*, Chapter 20, Springer, Switzerland, 189-208.