



**T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

**EKSOZOMAL İNHİBİTÖRLERİN EPİGENETİK
REGÜLASYONDAKİ ROLÜ**

Şeyma Gül DURGUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Danışman
Doç. Dr. Nuray VAROL**

2022-AFYONKARAHİSAR

*Yanımda olmalarını çok istediğim
Mehmet DURGUT ve Süleyman EFE'ye
ithafen...*

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

EKSOZOMAL İNHİBİTÖRLERİN EPİGENETİK
REGÜLASYONDAKİ ROLÜ

Şeyma Gül DURGUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Doç. Dr. Nuray VAROL

2022 – AFYONKARAHİSAR

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK



KABUL VE ONAY



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her konuda her zaman destek olan, bu uzun ve zorlu yolculukta karşıma çıkan engellerle başa çıkmamı sağlayan, birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım ve aynı zamanda kendisinden pek çok şey öğrendiğim çok kıymetli danışmanım Doç. Dr. Nuray VAROL'a, bu süreçte beni her zaman destekleyen, yönlendiren ve yardımcı olan çok değerli hocalarım Prof. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN ve Prof. Dr. Saliha Handan YILDIZ'a, yüksek lisans tez çalışmamdaki desteklerinden dolayı Öğr. Grv. Dr. Cem KARAOSMANOĞLU'na ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca arkamda duran, bana inanan ve beni yetiştirip bugünlere gelmemi sağlayan anneme, babama ve tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Şeyma Gül DURGUT

Afyonkarahisar, Haziran 2022

EKSOZOMAL İNHİBİTÖRLERİN EPIGENETİK REGÜLASYONDAKİ ROLÜ

Şeyma GÜL DURGUT

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Haziran 2022

Danışman: Doç. Dr. Nuray VAROL

ÖZET

DNA metilasyonu, epigenetik gen düzenlenmesinin temel mekanizmalarından biri olup en iyi bilinen epigenetik modifikasyondur. Bu epigenetik modifikasyon, DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) tarafından katalize edilir ve işlevlerine göre iki gruba ayrılır: sürdürme DNMT (DNMT1) ve *de novo* DNMT'ler (DNMT 3A ve DNMT3B). DNA metilasyon aberasyonları, prostat kanserinde sıklıkla görülmekte ve bu durum DNMT enzim ifadenmesinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Eksozomlar, hücre-hücre iletişimde anahtar mekanizmalarından biri olup sadece tümör progresyonunda değil, aynı zamanda alıcı hücrelerde mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlamada da önemli rol oynarlar. Bu bilgiler ışığında, öncelikle DNA metiltransferaz enzimlerinin prostat kanseri hücrelerinden derive eksozomal kargo molekülleri arasında transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde yer alıp almadığını belirlemeyi, sonrasında eksozomal DNMT'lerin alıcı hücrelerde DNMT ifadenmesini nasıl etkilediğini ve son olarak da spesifik eksozom inhibitörlerinin DNMT'lerin ifadenmesi üzerindeki etkisini belirlemeyi amaçladık.

Çalışmamızda *DNMT* genlerinin (*DNMT1*, *DNMT3A* ve *DNMT3B*) ifadenmesi, qPCR ile analiz edildi. Protein ekspresyonu, immüblotlama yöntemi ile belirlendi. Eksozomlar ise 'exosome isolation reagent' kullanılarak izole edildi.

Bu çalışma ile ilk kez, prostat kanseri-derive eksozomlarda *DNMT* mRNA'larının (*DNMT1*, *DNMT3A* ve *DNMT3B*) eksozomal kargo molekülleri arasında yer aldığını gösterdik. Sonrasında, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak PC3 hücrelerinden derive eksozomlarla muamele edilen PC3 hücrelerinde *DNMT* mRNA seviyelerinde, özellikle de *DNMT3A*'da artış gözlemledik. Son olarak, dozdan bağımsız bir şekilde, spesifik eksozom inhibitörü GW4869'un, transkripsiyonel düzeyde eksozom içeren PC3 hücrelerinde *DNMT*lerin ifadenmesini azalttığını belirledik. Bununla birlikte, GW4869'un hem eksozom içeren hem de eksozom içermeyen PC3 hücrelerinde *DNMT* mRNA'larının ifadenmesini önemli ölçüde azalttığını gözlemledik.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular, *DNMT* mRNA'ları içeren prostat kanseri-derive eksozomların alıcı hücrelerde DNA metilasyonunun yeniden programlanmasına katkıda bulunabileceğini gösterdi. Biz de bu bulgulara dayanarak eksozom inhibitörlerinin yeni DNMT inhibitörleri olarak kullanılabileceğini önermekteyiz. Sonuçlarımızı desteklemek için bu konu ile ilgili daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: DNA metilasyonu, *DNMT*, Eksozom, GW4869, Prostat kanseri

THE ROLE OF EXOSOMAL INHIBITORS IN EPIGENETIC REGULATION

Şeyma Gül DURGUT

Afyonkarahisar Health Sciences University

Institute of Graduate Education Department of Medical Genetics Master Thesis

June 2022

Supervisor: Doç. Dr. Nuray VAROL

ABSTRACT

DNA methylation is one of the main mechanisms of epigenetic gene regulation and the most well-known epigenetic marks. This epigenetic modification is catalyzed by DNA methyltransferases (DNMTs) and are divided into two groups based on their functions; maintenance DNMT (DNMT1) and *de novo* DNMTs (DNMT 3A and DNMT3B). Aberration of DNA methylation occurs frequently in prostate cancer and has been associated with increased DNMT enzyme expression. Exosomes are one of the key mechanisms in cell-cell communication and play an important role in not only tumor progression but also non-mutational epigenetic reprogramming in recipient cells. In the light of this information, we aimed to determine, firstly whether DNA methyltransferase enzymes are among the exosomal cargo molecules derived from prostate cancer cells at transcriptional and translational levels, secondly how exosomal DNMTs affect the expression of DNMTs in recipient cells, and finally the effect of specific exosome inhibitors on the expression of DNMTs.

The expression of DNMTs (DNMT1, DNMT3A and DNMT3B) were analyzed by qPCR in exosome, recipient cells with/without treatment with an exosome inhibitor (GW4869). Protein expression was determined by immunoblotting. Exosome was isolated using exosome isolation reagent.

For the first time, we show that *DNMT* mRNAs (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*) were involved among exosomal cargo molecules in prostate cancer-derive exosomes. Thereafter, we observed an increase in *DNMT* mRNA levels, especially *DNMT3A*, in PC3 cells treated with exosomes derived from PC3 cells depending on concentration and time. Finally, we determined that in a dose-independent manner, the specific exosome inhibitor GW4869 decreased the expression of *DNMTs* in PC3 cells containing exosomes at the transcriptional level. However, we observed that GW4869 significantly diminished the expression of *DNMT* mRNAs in both PC3 cells containing exosomes and non exosome. Our findings showed that prostate cancer derive exosome containing *DNMT* mRNAs may contribute to the reprogramming of DNA methylation in the recipient cells and we also suggest that exosome inhibitors can be used as new DNMT inhibitors. Further studies are needed to support our results.

Keywords: DNA methylation, *DNMT*, Exosome, GW4869, Prostate cancer

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Ekstraselüler Veziküller.....	3
2.2.Eksozomlar.....	5
2.3.Eksozomların Biyogenezi ve Salgılanma Mekanizmaları.....	7
2.3.1.Endozomal Ayırma Kompleksi (ESCRT)-Bağımlı Mekanizma.....	9
2.3.2. ESCRT-Bağımsız Mekanizma.....	10
2.3.3. Eksozomların Salgılanması ve Hücrelere Alınma Şekilleri.....	11
2.4.Kanserde Eksozomlar.....	12
2.5.EV Salımının Farmakolojik İnhibitörleri.....	18
2.5.1. GW4869.....	18

2.6.Eksozomlar ve Epigenetik Yeniden Düzenlenme.....	22
2.7. Epigenetik Düzenlenme.....	25
2.7.1. DNA Metilasyonu.....	26
2.7.2. DNA Metiltransferazlar (DNMT).....	26
2.7.2.1.DNMT’lerin Biyolojik Özellikleri.....	28
2.7.2.2. DNMT’lerin Patolojik Özellikleri.....	29
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1.Gereç ve Solüsyonlar.....	32
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	32
3.1.2.Hücre Kültürü ve Kullanılan Solüsyonlar.....	33
3.1.3. RNA İzolasyonu İçin Kullanılan Kimsalllar ve RT-PCR Primerleri.....	33
3.1.4. Protein İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasallar ve Western Blot Analizi Solüsyonları	34
3.1.5. İmmunblotting Antikorları.....	34
3.1.6. Kullanılan Kitler.....	35
3.2. Yöntem.....	35
3.2.1. Hücre Kültürü.....	35
3.2.2. İnhibitör Uygulaması.....	35
3.2.3. Eksozom İzolasyonu.....	36
3.2.4. RNA İzolasyonu ve RT-PCR.....	36
3.2.5. Protein İzolasyonu ve Western Blot Yöntemi.....	38

3.2.6. İstatistiksel Analiz.....	38
4.BULGULAR.....	39
4.1. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi.....	39
4.2. 24 Saatlik Eksozomal DNMT1 Enziminin mRNA ve Protein İfadelenme Düzeyinin Belirlenmesi.....	40
4.3.Eksozomal DNMT'ların mRNA İfadelenme Düzeyinin Belirlenmesi.....	41
4.4. 24 Saatlik Eksozomlarla Muamele Edilmiş PC3 Hücrelerinde DNMT Enzimlerinin Transkripsiyonel İfadelenme Düzeyi.....	43
4.5. 48 Saatlik Eksozomlarla Muamele Edilmiş PC3 Hücrelerinde DNMT Enzimlerinin Transkripsiyonel İfadelenme Düzeyi.....	44
4.6. Eksozom İnhibisyonunun PC3 Hücrelerinde DNMT'ların İfadelenme Düzeyine Etkisi.....	45
4.7. Androjen Bağımsız Hücrelerden Derive Eksozomların, Androjen-Bağımlı Hücreleri İle İnkübasyonu Sonrasında DNMT Enzimlerinin Transkripsiyonel İfadelenme Düzeyine Etkisi.....	47
4.8. Androjen Bağımlı Hücrelerden Derive Eksozomların, Androjen-Bağımsız Hücreleri İle İnkübasyonu Sonrasında DNMT Enzimlerinin Transkripsiyonel İfadelenme Düzeyine Etkisi.....	48
4.9. PC3 Hücrelerinde Eksozomal UHRF1 ve USP7 Genlerinin İfadelenme Düzeyleri.....	49
5. TARTIŞMA.....	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	60
KAYNAKLAR	

EKLER

ÖZGEÇMİŞ



KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

aSMase : Asit sfingomiyelinaz
CAF : Kanseri-ilişkili fibroblastlar
CpG : Sitozin-Guanin dinükleotidi
DC : Dendritik hücre
DNA : Deoksiribo nükleik asit
DNMT : DNA metiltransferaz
EC : Endotel hücre
EMT : Epitelyal mezenkimal geçiş
ESCRT : Endozomal ayırma kompleksi
EV : Ekstraselüler vezikül
ILV : İntralüminal vezikül
kDa: Kilodalton
miRNA : mikroRNA
ml: Mililitre
mRNA : mesajcı RNA
MSC : Mezenkimal kök hücreler
MV : Mikrovezikül
MVB : Multiveziküler cisimcik
µg : Mikrogram
µm: Mikrometre
µM : Mikromolar
nm : Nanometre
nSMase : nötral sfingomiyelinaz
PCa : Prostat kanseri
PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu
piRNA : Piwi-etkileşimli RNA
PSA : Prostat spesifik antijen
PLP : Proteolipid protein
RNA : Ribonükleik asit
RNAi : RNA interferaz

rRNA : Ribozomal RNA
RT-PCR : Eş-zamanlı PCR
scaRNA : Küçük Cajal gövdesine özgü RNA
siRNA : Küçük engelleyici RNA
snRNA : Küçük nükleer RNA
snoRNA : Küçük nükleolar RNA
TDE : Tümör derive eksozom
TfR : Transferrin reseptör
tRNA : Taşıyıcı RNA



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1: Kullanılan cihazlar.....	32
Tablo 3.2: İnsan prostat kanser hücre kültüründe kullanılan kimyasallar.....	33
Tablo 3.3: RNA izolasyonu için kullanılan kimyasal malzemeler ve RT-PCR aşamasında kullanılan primerler.....	33
Tablo 3.4: Protein izolasyonu, SDS-PAGE ve western blot analizi için kullanılan solüsyonlar ve antikorlar.....	34
Tablo 3.5: İmmunblotting için kullanılan antikorlar.....	34
Tablo 3.6: Çalışma süresince kullanılan kitler.....	35
Tablo 3.7: <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>DNMT3B</i> , <i>USP7</i> , <i>UHRF1</i> ve <i>GAPDH</i> genleri için qPCR tepkime karışımı.....	36
Tablo 3.8: Hedef genlere ait dizi bilgileri ve RT ² qPCR Primer Assay katalog numaraları.....	37
Tablo 3.9: <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>DNMT3B</i> , <i>USP7</i> , <i>UHRF1</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan RT-PCR tepkime programı.....	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Ekstraselüler veziküller.....	4
Şekil 2.2: Eksozom biyogenezi ve salgılanma mekanizmaları.....	8
Şekil 2.3 : GW4869'un kimyasal formülü.....	19
Şekil 2.4 : Sfingomiyelinin seramide dönüşümü.....	19
Şekil 4.1: <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>DNMT3B</i> , <i>USP7</i> , <i>UHRF1</i> ve <i>GAPDH</i> genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri.....	39
Şekil 4.2: PC3 ve LNCaP prostat kanser hücrelerinin <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>DNMT3B</i> ve <i>GAPDH</i> genlerine ait erime eğrileri.....	40
Şekil 4.3: PC3 hücrelerinde derive eksozomal DNMT1 enzim düzeyi.....	41
Şekil 4.4: 24 saatlik PC3 kanser hücrelerinden derive eksozomlar içerisinde DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B mRNA ifadelenme düzeylerindeki değişimleri.....	42
Şekil 4.5: 48 saatlik PC3 kanser hücrelerinden derive eksozomlar içerisinde DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B mRNA ifadelenme düzeylerindeki değişimleri.....	43
Şekil 4.6: Konsantrasyon bağımlı 24 saatlik eksozomal DNMT'lerin PC3 kanser hücrelerinde DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B mRNA ifadelenme düzeyi üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.7: Konsantrasyon bağımlı 48 saatlik eksozomal DNMT'lerin PC3 kanser hücrelerinde DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B mRNA ifadelenme düzeyi üzerine etkisi.....	45
Şekil 4.8: PC3 prostat kanser hücrelerinin düşük konsantrasyonda (2,5 µg), 10 µM ve 20 µM konsantrasyonunda GW4869 ile 24 saat inkübasyonu sonrasında eksozom salınım inhibisyonunun DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B mRNA ifadelenme düzeyine etkisi.....	46

Şekil 4.9: PC3 prostat kanser hücrelerinin yüksek konsantrasyonda (10 µg), 10 µM ve 20 µM konsantrasyonunda GW4869 ile 24 saat inkübasyonu sonrasında eksozom salınım inhibisyonunun DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B mRNA ifadenme düzeyine etkisi.....	47
Şekil 4.10: PC3 derive 24 saatlik ve 48 saatlik eksozomların LNCaP ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B enzimlerinin transkripsiyonel ifadenme düzeyindeki değişimler.....	48
Şekil 4.11: LNCaP derive 24 saatlik ve 48 saatlik eksozomların PC3 ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında DNMT1 enziminin transkripsiyonel ifadenme düzeyindeki değişimler.....	49
Şekil 4.12: 24 saatlik PC3 kanser hücrelerinden derive eksozomlar içinde UHRF1 ve USP7 mRNA ifadenme düzeylerindeki değişimleri.....	50
Şekil 4.13: 48 saatlik PC3 kanser hücrelerinden derive eksozomlar içinde <i>USP7</i> ve <i>UHRF1</i> mRNA ifadenme düzeylerindeki değişimleri.....	51
Şekil 4.14: Doz bağımlı 24 saatlik eksozomal DNMT'lerin PC3 kanser hücrelerinde UHRF1 ve USP7 mRNA ifadenme düzeyi üzerine etkisi.....	52
Şekil 4.15: Doz bağımlı 48 saatlik eksozomal DNMT'lerin PC3 kanser hücrelerinde <i>USP7</i> ve <i>UHRF1</i> mRNA ifadenme düzeyi üzerine etkisi.....	53

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanserin temel özelliklerinden biri mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlamadır. Kanser hücrelerinde en sık rastlanan ve en çok çalışılan epigenetik mekanizma DNA metilasyonudur. Kanser hücrelerinde DNA metilasyon profillerinin kanser gelişimde, progresyonunda, tedaviye yanıtındaki rolü iyi bilinmektedir. Bununla birlikte kanser hücrelerinde bu epigenetik modifikasyon nasıl tetikleniyor ve bir hücreden diğer hücrelere nasıl geçiş yaptığı konusu henüz tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Genetik mutasyonlardan farklı olarak DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmaların geri dönüşümlü olması kanser çalışmalarında bu konuyu daha cazip hale getirmektedir. Hücreler arası haberleşmenin önemli elemanlarından biri olan eksozomların alıcı hücrenin epigenetik yeniden programlanmasında rolünü belirlemeye yönelik çalışmalar katlanarak artmaktadır. Son yıllarda iki farklı kanser tipinden salınan eksozomlar içerisinde DNA metilasyonundan sorumlu olan DNA metiltransferaz enzimlerinin transkriptlerinde ekzosomal kargo molekülleri arasında yer aldığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, ekzosomal kargo içeriği kanserin tipine ve derecesine göre farklılık göstermektedir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda ilk olarak prostat kanseri derive eksozomlar içerisinde DNMT mRNA'larının kargo moleküllerinden biri olup olmadığını, ikinci olarak, ekzosomal DNMT'lerin alıcı hücredeki DNMT ifadenme düzeyini nasıl etkilediğini ve son olarak spesifik eksozom inhibitörlerinin DNMT ifadenmesi üzerine etkisini belirlemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

Prostat kanseri (PCa), erkeklerde yüksek ölüm oranına sahip en sık karşılaşılan solid malignitedir (Lorenc ve ark., 2020). Prostat kanseri, oldukça heterojen bir hastalıktır ve sıklıkla kemiğe ve diğer organlara metastaz yaparak mortaliteye neden olur (Saini, 2016). Birçok vakada, prostat kanserinin tedavisi, geç teşhis ve metastaz oranı nedeniyle zordur (Lorenc ve ark., 2020).

Prostat kanserinin gelişimi ve progresyonunda androjen hormonlar önemli rol oynar ve tedavi için androjen inhibitörleri kullanılır. Ancak prostat kanseri hastalarının büyük bir kısmı androjen tedavisine direnç gösterir ve bir süre sonra metastatik kastrasyona dirençli hale gelir (Dülgar ve ark., 2018 ; Lorenc ve ark., 2020). Özellikle kastrasyon dirençli olan prostat kanseri hastaları, hastalığın ileri safhalarında radyoterapiye ve kemoterapötiklere direnç geliştirir. Bu nedenle, prostat kanseri hastalarının etkili tedavi süreci, metastatik kastrasyona dirençli prostat kanserinde bireysel tedaviyi destekleyen belirleyici biyobelirteçlere ihtiyaç duyar (Lorenc ve ark., 2020).

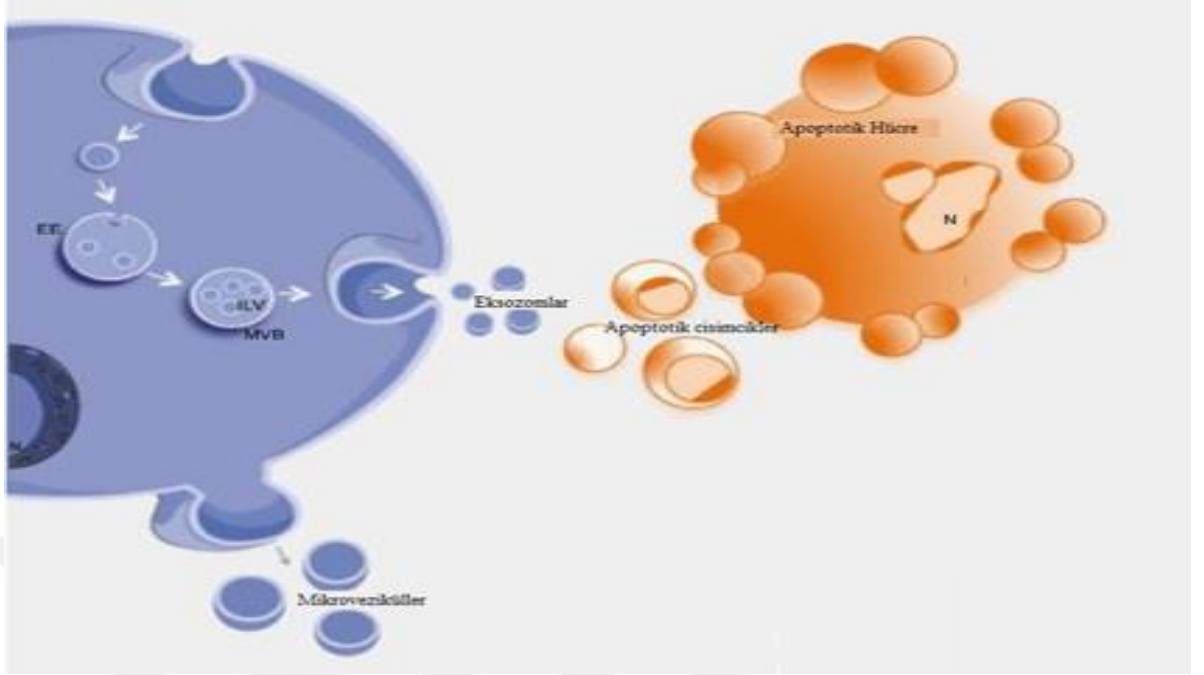
Serumdaki prostat spesifik antijen (PSA) seviyeleri, 20 yılı aşkın süredir prostat kanseri biyobelirteci olarak kullanılmaktadır (Saini, 2016). PSA veya kallikrein-3 (KLK3), *KLK3* geninden tarafından kodlanan ve prostat bezinde yüksek düzeyde ifadelenen bir glikoproteindir (Filella ve Foj, 2016). Kallikrein ilişkili serin proteaz olan PSA, prostat bezinin epitel hücrelerinin salgı ürünüdür. Sağlıklı erkeklerin serumunda az miktarda bulunmasına rağmen normal prostat yapısının bozulması sonucunda kana salınır ve prostat kanseri veya diğer prostat hastalıklarında düzeyi yükselir. Bununla birlikte, PSA prostat kanserine spesifik bir indikatör değildir (Shephard ve ark., 2017). Düşük özgünlüğe sahip olmasına rağmen prostat kanserinin tanısının yanı sıra prostatit veya iyi huylu prostat hiperplazisinin (BPH) saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Filella ve Foj, 2016). Gleason skorlaması ile gerçekleştirilen histopatolojik derecelendirme de prostat kanserinin önemli bir prognostik göstergesi olarak kullanılır. Gleason skoru güçlü bir prognostik gösterge olmasına rağmen, benzer histolojik paternlere sahip tümörler farklı klinik sonuçlara sahip olabileceğinden hastalığın agresiflik derecesini doğru bir şekilde tahmin edemez. Bu nedenle, daha iyi tanısal ve prognostik potansiyele sahip alternatif PCa biyobelirteçlerinin geliştirilmesine ihtiyaç

vardır (Saini, 2016). Son yıllarda, PCa hastalarını izlemek için minimal invaziv yöntemler olarak likit biyopsiler, dolaşımdaki tümör hücreleri, eksozomlar ve dolaşımdaki nükleik asitler karşımıza çıkmaktadır (Lorenc ve ark., 2020). PCa'nın da içerisinde yer aldığı birçok kanser türünde kan ve idrardan elde edilen eksozomlar yeni tanısal ve prognostik göstergeler olarak önerilmektedir (Filella ve Foj, 2016).

2.1. Ekstraselüler Veziküller

Ekstraselüler veziküller (EV'ler), prokaryotlar gibi organizmalardan yüksek ökaryotlara kadar değişen çok çeşitli hücrelerde fizyolojik ve patolojik şartlar altında salgılanan membranla çevrili heterojen veziküllerdir. EV'lerin önemi, bilgiyi diğer hücelere aktarma işlevlerinden kaynaklanır, böylece alıcı hücrenin fonksiyonu da etkilenir. EV'ler ile iletilen benzersiz sinyaller, birçok farklı habercinin uzak bölgelere eş-zamanlı olarak ulaştırılmasını sağlar. 2006-2007 yıllarında, EV'lerin mikroRNA (miRNA)'da dahil olmak üzere RNA içerdiğinin keşfedilmesi sonucunda EV'ler, hücreden hücreye iletişim aracı olarak büyük bir ilgi kazanmıştır. EV'ler, tükürük, idrar, nazal ve bronşiyal lavaj sıvısı, amniyotik sıvı, anne sütü, plazma, serum ve seminal sıvı gibi biyolojik sıvılardan izole edilebilir. EV'ler içerisinde hücre iskeleti proteinleri, sitozolik proteinler, ısı şok proteinleri, plazma membran proteinleri ve vezikül trafikte rol oynayan proteinler bol miktarda bulunur. Yapılan çalışmalar, EV'lerin içeriklerinin, boyutlarının ve membran kompozisyonlarının oldukça heterojen ve dinamik olduğunu, ayrıca hücresel kaynağa ve çevresel koşullara bağlı olarak değiştiğini göstermektedir (Yáñez-Mó ve ark., 2015 ; Catalano ve O'Driscoll, 2019).

EV'ler, biyogenez süreçleri başta olmak üzere boyutları ve hücresel kökenlerine göre; mikroveziküller, eksozomlar ve apoptotik cisimcikler olarak sınıflandırılırlar (Catalano ve O'Driscoll, 2019 ; Zhang ve ark., 2019) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Ekstraselüler veziküller. Ekstraselüler veziküller genel olarak üç sınıfa ayrılır: a) Plazma membranının dışa doğru tomurcuklanması sonucu oluşan mikroveziküller/ mikropartiküller/ ektozomlar; b) Endozomal ağ içinde oluşan ve plazma membranından multiveziküler cisimciklerin füzyonu üzerine salınan eksozomlar ve c) apoptoz geçiren hücrelerden salınan apoptotik cisimcikler. EE, erken endozom; MVB, multiveziküler cisimcik; ILV, intralüminal veziküller; N, nükleus (Yáñez-Mó ve ark., 2015).

Mikroveziküller (MV), genellikle plazma zarının tomurcuklanmasıyla oluşan, çapı 0.1-1 μm (100-1000 nm) olan, heterojen ve membranla çevrili veziküllerdir (Lemoinne ve ark., 2014; Tricarico ve ark., 2017). MV'ler değişken şekil ve hacimli olarak trombositler, endotel hücreler (EC'ler) ve kırmızı kan hücrelerinin ürünleri olarak karakterize edilir (Zhang ve ark., 2019). Literatürde, mikroveziküller aynı zamanda ektozomlar, onkozomlar ve mikropartiküller olarak da adlandırılmaktadır. Son yıllarda araştırmacılar, mikroveziküllerin, ekstraselüler ortamın değiştirilmesinde, hücreler arası sinyalizasyonda ve hücreden bağımsız matriks proteolizi yoluyla hücre invazyonunun gerçekleştirilmesinde önemli rolleri olduğunu belirlemişlerdir (Tricarico ve ark., 2017). MV'ler ayrıca içerdikleri lipid, sitosolik protein, RNA ve/veya miRNA'lar aracılığıyla hedef hücrenin fonksiyonunu düzenler (Lemoinne ve ark., 2014).

Ekstraselüler veziküllerin bir diğer üyesi olan apoptotik cisimciklerin boyutu genellikle diğer membranla çevrili veziküllere nazaran daha büyüktür (500 nm – 2 μm). Eksozomlar ve mikroveziküller normal hücresel süreçler sırasında salgılanırken, apoptotik cisimcikler yalnızca programlanmış hücre ölümü yani apoptoz sırasında meydana gelir. Apoptoz,

hücreler için önemli bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptoz çekirdekdeki kromatinin yoğunlaşması ile başlar ve daha sonra membranın tomurcuklanmasıyla apoptotik cisimcikler veya apoptozomlar olarak adlandırılan membranla çevrili veziküller meydana gelir. (Akers ve ark., 2013).

Eksozomlar, hücreler tarafından salgılanan ve tüm vücut sıvılarında bulunan, çapları 30-150 nm olan küçük veziküllerdir. Kendine özgü RNA ve protein kargoları taşıyan bu veziküller, hücreden hücreye iletişim ve sinyalizasyon gibi birçok biyolojik fonksiyona sahiptir (Zerlinger ve ark., 2015).

2.2. Eksozomlar

Chargaff ve West 1946'da insan plazmasında yapmış oldukları çalışmalarında trombosit içermeyen plazmanın pıhtılaşma özelliği gösterdiğini keşfettiler. Ayrıca çalışmalarında yüksek hızlı santrifüjlemeden (31,000 xg) sonra plazmanın pıhtılaşma kabiliyetini önemli ölçüde kaybettiğini tespit ettiler. Bu çalışma sonucunda, insan plazmasının yüksek hızlı santrifüjleme sırasında küçük bir pelet halinde çöken bir pıhtılaşma bileşenine sahip olduğu belirlendi (Chargaff ve West, 1946 ; Hargett ve Bauer, 2013). Yıllar sonra Peter Wolf, bu pıhtılaşma baskılayıcılarının trombositlerden üretilen 20–50 nm çapındaki veziküller olduğunu keşfetti. 1983'te JBC (Harding ve ark., 1983) ve Cell (Pan ve Johnstone,1983) adlı farklı iki dergide aynı hafta içinde yayınlanan iki makale ile, retikülositlerde transferrin reseptörlerinin, olgun retikülositlerinden üretilen ve hücre dışı ortama salgılanan yaklaşık 50 nm çapındaki aktif veziküllerle etkileşime girdiği belirlendi (Wolf, 1967; Mashouri ve ark., 2019) . ‘Eksozom’ terimi birkaç yıl sonra Rose Johnstone tarafından ilk kez kullanıldı, ancak bu terim aslında 1981'de ektoenzim aktivitesine sahip hücreler tarafından salgılanan veziküller için Trams ve arkadaşları tarafından kullanıldı (Trams ve ark.,1981 ; Harding ve ark., 2013).

Eksozomların içeriğine bakıldığında lipidler, nükleik asitler (DNA, mRNA ve miRNA), içinde ve yüzeyinde bulunan reseptörler, transkripsiyon faktörleri, enzimler, ekstraselüler matriks proteinleri gibi çeşitli protein komplekslerinden oluştuğu görülmektedir. Protein analizleri eksozomların içerdiği bazı proteinlerin köken aldıkları hücre ve dokuya spesifik olduğunu bazı proteinlerin ise tüm eksozomlar arasında ortak olduğunu ortaya

koymuştur. Retikülositlerin yüzeyindeki transferrin reseptörleri (TfR) ile birlikte B lenfositleri ve dendritik hücreler üzerinde sunulan hücre adhezyon molekülleri (CAM), integrinler, tetraspaninler, MHC sınıf I, II gibi adhezyon molekülleri, spesifik eksozom proteinlerinin tipik örnekleri arasındadır. Diğer taraftan Rab2, Rab7, flotilin ve anneksin gibi füzyon ve transfer proteinleri, Hsp70 ve Hsp90 gibi ısı şok proteinleri, aktin, miyozin, tübülün içeren hücre iskeleti proteinleri ve multiveziküler cisimciklerin (MVB) oluşumuna aracılık eden ALIX gibi proteinler spesifik olmayan eksozom proteinleri arasında yer alır (Mashouri ve ark., 2019). Ayrıca, kan, meni, idrar, tükürük, anne sütü, asit sıvısı, amniyotik sıvı, beyin omurilik sıvısı ve safra dahil olmak üzere birçok vücut sıvısında eksozomlar bulunmaktadır (Zeringer ve ark., 2015).

Eksozomların lipid içeriği hücreye özgüdür ve korunur. Lipidler sadece eksozom şeklini korumada önemli bir role sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda eksozom biyogenezinde ve alıcı hücrelerde homeostazı düzenlemede de önemli rol oynar. MVB'lerin iç zarındaki lizobisfosfatidik asit (LBPA) gibi lipidlerin yüksek yoğunluğu, intralüminal veziküllerin (ILV) oluşumuna ve dolayısıyla eksozomların oluşumuna neden olur. ALIX proteini ile LBPA etkileşimi, MVB membranının içe doğru tomurcuklanmasını neden olur. Sfingomiyelin, fosfatidilkolin ve BMP (Bis (monoaçilglisero) fosfat), farklı tipteki veziküllerin sınıflandırılmasında yardımcı olan faktörler arasındadır. Farklı mikrovezikül türleri benzer sfingomiyelin ve fosfatidilkolin içeriğine sahipken, eksozomlarda ise sfingomiyelin konsantrasyonu daha yüksektir. BMP, eksozomların köken aldıkları endozomlara özgüdür. Ayrıca yapılan çalışmalar, hedef hücrelere aktarılan eksozomların, alıcı hücrelerin özellikle kolesterol ve sfingomiyelin kompozisyonunu değiştirmek suretiyle hücre homeostazını etkilediğini göstermektedir (Mashouri ve ark., 2019).

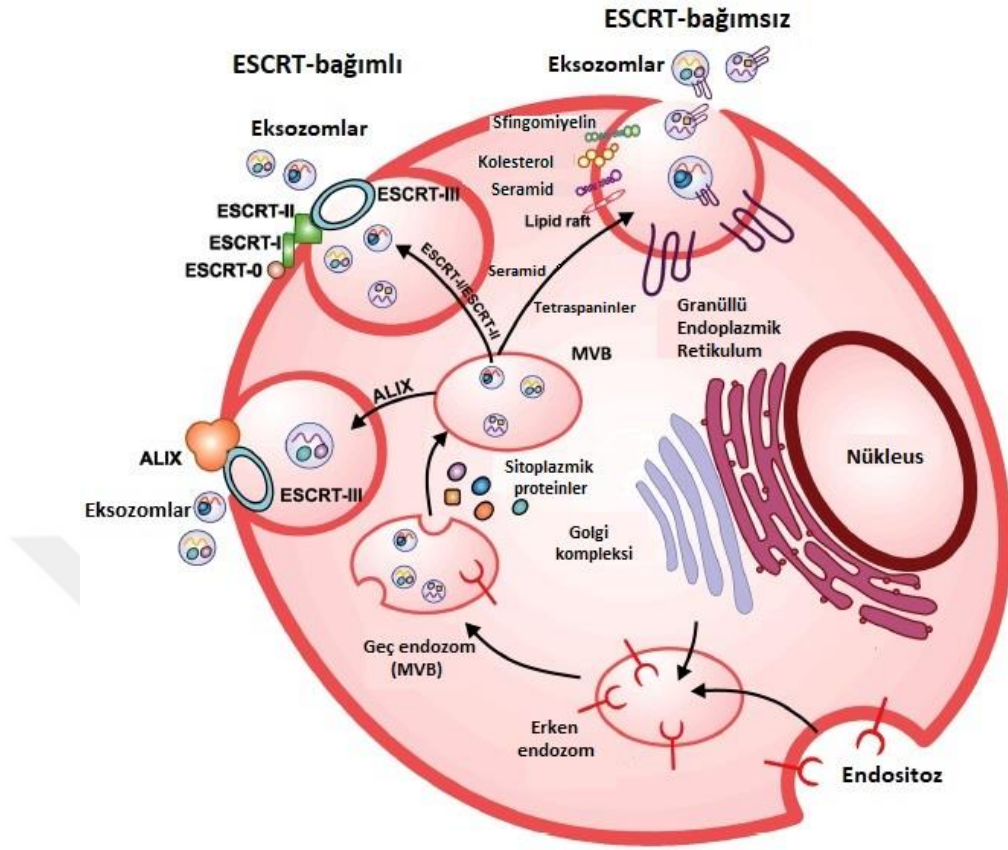
Eksozomların bir diğer kargo molekülü, RNA (özellikle miRNA ve mRNA)'lardır. İçerdiği mRNA'ların bir kısmı hedef hücreler tarafından proteinlere çevrilebilir. Son dizileme deneyleri, mRNA ve miRNA'ların yanı sıra eksozomların yüzlerce kodlamayan RNA (snRNA, snoRNA, scaRNA, piRNA), tRNA ve rRNA dahil olmak üzere çok çeşitli RNA içerdiği göstermektedir (Zeringer ve ark., 2015). Kargo biyomoleküllerinden miRNA'lar, eksozomal hücreler arası iletişimdeki rolleri açısından kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Eksozomal miRNA'ların rolü, ateroskleroz, miyokard enfarktüs ve

kanserin de dahil olduğu daha pek çok hastalıkta belirlenmiştir. Ayrıca yapılan son çalışmalar ile, hücreler arası iletişimde önemli etkiye sahip olan miyeloid kökenli düzenleyici hücrelerden elde edilen eksozomlarda mitokondriyal DNA'nın yanı sıra mitokondri organelinin varlığı da belirlenmiştir (Hough ve ark.,2018; Jadli ve ark., 2020).

Hücrel içe alım nedeniyle, eksozomlar aracılığıyla alıcı hücrenin bazal işlevleri ve gen ifadesi düzenlenir. Eksozomlar tüm vücut sıvılarında bulunabilirler. Bu nedenle hem fizyolojik hem de patolojik sinyallerin taşıyıcıları olarak işlevlerini yerine getirmek için bu vücut sıvıları sayesinde hedef hücrelere ulaşırlar. Eksozomlar, adezyon proteinleri ve vektör ligandları aracılığıyla alıcı hücrelerle etkileşime girme konusunda olağanüstü kapasiteye sahiptir. Hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullar altında, farklı türdeki hücrelerden ekstraselüler ortama eksozom salınabilir. Salınan bu eksozomların işlevleri çeşitlilik göstermekle birlikte esas olarak köken aldıkları hücre veya dokuya bağlıdır (Farooqi ve ark., 2018). Örneğin, merkezi sinir sistemi tarafından salınan eksozomlar, hücre içindeki atıklardan kurtulmayı sağlarken aynı zamanda sinir hücreleri arasında iletişim aracı olarak görev yapar (Frühbeis ve ark.,2013). Bu yaşamsal beyin işlevlerine aracılık etmenin yanı sıra, eksozomlar bir dizi nöroinflamatuvar durumun patogenezinde de rol oynar (Gupta ve Pulliam,2014).

2.3. Eksozomların Biyogenezi ve Salgılanma Mekanizmaları

Eksozomların biyogenezi, çeşitli sinyal yollarıyla düzenlenen çok aşamalı biyolojik bir süreçtir. Eksozom biyogenezi için farklı mekanizmalar tanımlanmış olup endozomal ayırma kompleksine (ESCRT) bağımlı ve bağımsız mekanizmalar olarak iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Eksozom biyogenezi ve salgılanma mekanizmaları. ESCRT, Endozomal ayırma kompleksi; MVB, multiveziküler cisimcik (Jadli ve ark., 2020).

Eksozomların biyogenezi, hücre membranının içe doğru tomurcuklanmasıyla erken endozom oluşumu ile başlar ve bunu erken endozomal membranın ikinci kez içe doğru tomurcuklanması takip eder. İkinci kez içe doğru tomurcuklanma, geç endozomların yani intralüminal veziküllerin (ILV) oluşumuyla sonuçlanır. Bu aşamada, intralüminal vezikülleri kapsayan geç endozomlar, multiveziküler cisimcikler (MVB) olarak tanımlanır. Lizozomlarla birleşen MVB'ler ya lizozom içerisinde parçalanır ya da eksozomların oluşumu için endositik yolağı takip eder. Bu aşamada, plazma membran yüzey proteinleri, endositik veziküllerin iç membranı teşkil eder. Son aşamada, ekzositik yolak aracılığıyla MVB'ler plazma membranı ile birleşir ve eksozomlar olarak ekstraselüler boşluğa salınır. Eksozom biyogenezi çeşitli endojen moleküllerden ve mikrobiyal enfeksiyonlar gibi dış faktörlerden etkilenmektedir.

2.3.1. Endozomal Ayırma Kompleksi (ESCRT)-Bağımlı Mekanizma

Endozomal Ayırma Kompleksi (ESCRT)-bağımlı mekanizma, eksozom biyogenezi için önerilmiş en iyi mekanizmadır. ESCRT mekanizması, dört protein kompleksi (ESCRT-0, -I, -II ve -III) halinde düzenlenmiş yaklaşık otuz proteinin yanı sıra VPS4, VTA1 ve ALIX gibi ESCRT ilişkili proteinlerden oluşur. Ubikuitin-etkileşimli domainleri sayesinde ESCRT-0, eksozomal kargoların kümelenmesine ve transferine olanak sağlar. Bununla birlikte, diğer ESCRT protein komplekslerinin (ESCRT-I, -II, -III) endozomal membrana katılmasını sağlar. ESCRT-I ve ESCRT-II kompleksi, endozomal membranin tomurcuklanmasından sorumludur. ESCRT-III aracılı polimerik filament oluşumu ve vezikül füzyonu, intralüminal veziküllerin membran invajinasyonuna ve oluşumuna olanak sağlar. VPS4 ATPaz gibi ESCRT ilişkili proteinler, ESCRT protein kompleksinin ayrılmasında ve geri dönüşümünde önemli bir rol oynar. Birçok çalışma, eksozom oluşumu ve salınımı için ESCRT'ye bağlı mekanizmayı kanıtlarla desteklemektedir. Bununla birlikte, bazı çalışmalar ESCRT-bağımlı mekanizma ile çelişmektedir, bu nedenle intralüminal vezikül oluşumu ve eksozom salınımı için ESCRT'den bağımsız bir mekanizma önermektedirler.

ESCRT-bağımlı MVB oluşumu, lizozomal degradasyon ve eksozom biyogenezi için oldukça önemlidir. ESCRT protein komplekslerinin, mono-ubikitinlenmiş proteinleri hedefleyen lizozomal degradasyondaki fonksiyonları çeşitli çalışmalarla belirlenmiş olsa da, bu protein komplekslerinin eksozom biyogenezindeki rolü, son zamanlarda çeşitli hücre kökenli eksozomlarda ESCRT bileşeni olan TSG101 ve ALIX'in varlığını doğrulayan proteomik çalışmalarla gösterilmiştir. ESCRT-0'ın bir bileşeni olan hepatosit büyüme faktörü-regüle edilmiş tirozin kinaz substratı (HRS), mono-ubikitinlenmiş kargo proteinlerinin tanınmasında rol oynar ve ayrıca STAM1 (Sinyal dönüştürücü adaptör molekül 1), klatrin ve Eps15 proteinleri ile bir kompleks oluşturur. Bunu takiben HRS proteini TSG101 ile etkileşimi sonucunda ESCRT-I kompleksi toplanır. Bunu ESCRT-I aracılığıyla ESCRT-III kompleksinin oluşumu takip eder (Jadli ve ark., 2020).

Eksozom biyogenezi için ESCRT-bağımlı mekanizma iyi bir şekilde karakterize edilmesine karşın MVB'ler içerine kargo moleküllerinin nasıl seçildiği halen araştırılmaktadır (Gassart ve ark., 2004; Jadli ve ark., 2020).

2.3.2. ESCRT-Bağımsız Mekanizma

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar sonucunda lipidleri, tetraspaninleri veya ısı-şok proteinlerini içeren ESCRT'den bağımsız mekanizmaların ILV oluşumunda ve eksozom biyogenezinde rol aldığı gösterilmiştir (Kowal ve ark., 2014). ESCRT'den bağımsız oluşum, ilk olarak proteolipid proteinleri (PLP) içeren eksozomları salgılayan oligodendroglial hücrelerde yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (Tschuschke ve ark., 2020). Bu çalışmada, membran lipidi olan sfingomiyelinin, seramide hidrolizi için gereken nötral sfingomiyelinaz (nSMase) enziminin eksozom inhibitörü GW4869 ile inhibisyonu sonucunda oligodendroglial hücre hattında proteolipid protein (PLP) içeren eksozom salınımının azaldığı görülmüştür. Bu durum, PLP'nin ILV'lere seramid-aracılı tasnifini ve dolayısıyla ESCRT'den bağımsız eksozom oluşumunu göstermektedir (Trajkovic ve ark., 2008 ; Jadli ve ark., 2020). Eksozomal proteinlerin (CD63, CD81 veya TSG101) GW4869 muamelesi sonucunda salınımının azaldığını gösteren benzer çok sayıda *in vitro* çalışmalar bulunmaktadır (Chairoungdua ve ark., 2010 ; Hoshino ve ark., 2013). Bunun aksine, hücre ölümünü indüklemeyen konsantrasyonda GW4869 ile muamele primer hücre hatlarında eksozomların salınımının artmasına neden olmaktadır. Yüksek GW4869 konsantrasyonu, ilaca-bağlı hücre ölümü nedeniyle eksozom salınımını engellemektedir.

CD63'ün, Epstein Barr virüsünde kodlanan LMP1 (latent membran protein-1) proteininin ILV'lere hedeflenmesinde ve eksozomlar içerisine salınmasında görev aldığı daha önceden bilinmektedir ve bu durum göstermektedir ki ILV'lerin oluşumunda ve eksozomların salınmasında CD63'e bağımlı bir mekanizma rol oynar (Jadli ve ark., 2020).

ESCRT- bağımsız mekanizmanın sadece MVB'lerin ve eksozomların oluşumunda değil, aynı zamanda eksozom içeriklerinin modifikasyonunda da etkili olduğu bulunmuştur. Sıçan pankreas adenokarsinom modelinde (As-Tspan8), tetraspanin Tspan8 ifadenmesi, eksozomlarda mRNA ve transmembran proteinlerinin (VCAM-1, $\alpha 4$ integrin) içeriklerinin modifikasyonu ile sonuçlanmaktadır (Nazarenko ve ark., 2010). Son zamanlarda, CD81 proteinince zengin domainlerin, eksozomlara paketlenme için kargo moleküllerinin seçiminde rol oynadığı görülmüş ve böylece kargoların tasnifi ve ILV'lerin oluşumu için ESCRT-bağımsız bir mekanizma açıklanmıştır. CD81 nakavt

farelerden elde edilen primer lenfoblast hücrelerinde, eksozomlarda B-hücre reseptör MHC moleküllerinin ve ICAM-1 (hücreler arası adhezyon molekülü-1) 'in tasnifinin bozulduğunu ve eksozomlarda CD81-ilişkili Rac molekülünün miktarında azalma olduğunu göstermiştir. Bu çalışma sonucunda, tetraspaninlerle etkileşim halinde olan moleküllerin eksozomlara yüklenmesinde CD81'in önemli bir rol oynadığı ortaya konmuştur (Perez-Hernandez ve ark., 2013 ; Jadli ve ark., 2020).

2.3.3. Eksozomların Salgılanması ve Hücrelere Alınma Şekilleri

Hücre kökeninin türüne bağlı olarak, hücrelerden eksozom salınım mekanizmaları genel olarak konstitütif veya indüklenabilir olarak sınıflandırılır. Eksozomların konstitütif salınım mekanizması; heterotrimerik G-proteini, protein kinaz D ve Rab GTPazlar aracılığıyla gerçekleşir. Eksozomların indüklenabilir salınımına ise, düşük pH, DNA hasarı, trombin, ekstraselüler ATP, hücre içinde artmış Ca^{+2} miktarı, hipoksi ve lipopolisakkarit (LPS) uyarımı gibi çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik uyarıcılar aracılığıyla gerçekleşir (Jadli ve ark., 2020).

Eksozomların hücrelerden salgılanması için, MVB'lerin hücre çeperine taşınması, kenetlenmesi ve plazma membranıyla füzyonu ile ilişkili moleküler bir mekanizma gereklidir. Eksozomların salgılanma işlemi, hücre iskeleti molekülleri (aktin ve mikrotübüller), miyozinler ve kinesinler, Rab GTPazlar ile düzenlenirken füzyon mekanizmaları ise SNARE proteinlerine ve bağlama faktörleri tarafından düzenlenir. Rab proteinleri, GTPaz aktivitesini kullanarak vezikül tomurcuklanması ve membran füzyonu gibi hücre içi veziküler trafiğinin düzenlenmesinde rol oynar (Jadli ve ark., 2020). Rab proteinlerine yönelik çok sayıdaki nakavt çalışmaları Rab proteinlerinin veziküllerin füzyonu ve salgılanmasını takiben MVB'lerin plazma zarına kenetlenmesi için gerekli olduğunu göstermiştir (Savina ve ark., 2002; Ostrowski ve ark., 2010; Abrami ve ark., 2013; Jadli ve ark., 2020).

Eksozom salınımının düzenlenmesi, biyolojik uyarıcılara yanıt olarak çeşitli hücresel modellerde gözlenmiştir. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki artış, insan eritrolösemi hücrelerinde eksozom salınımında artışa yol açmış ve bu durum MVB'lerin

füzyonunda Rab ile birlikte kalsiyum düzeyinin de rol oynadığını göstermiştir (Savina ve ark.,2005).

MVB'lerin plazma membranı ile füzyonu, ekstraselüler ortamda eksozomların salınımı için önemli bir adımdır. MVB'lerin plazma membranı ile füzyonunda yer alan moleküler mekanizma tam olarak anlaşılamamış olsa da, membran füzyonunda SNARE'ler, Rab'lar, Ras GTPazlar ve bağlama faktörleri gibi proteinlerin rol oynadığı bilinmektedir. SNARE proteinleri, veziküllerin plazma membranı veya farklı organellerin membranı ile füzyonunda rol oynar. Bununla birlikte, tek bir hücre tipindeki farklı eksozom alt popülasyonlarının salgılanması için farklı SNARE proteinleri, MVB'lerin plazma membranı ile füzyonunu teşvik eder. Bu nedenle, spesifik SNARE proteininin inhibisyonu, eksozomların yalnızla belirli alt popülasyonunun salınımını etkileyebilir (Jadli ve ark., 2020).

Eksozomlar ekstraselüler ortama salındıktan sonra, alıcı hücreler ile etkileşime girerler ve bu etkileşim sonucunda eksozomların içerisinde bulunan protein, lipid ve nükleik asit içeriklerinin hücrelere aktarılması, eksozomların fizyolojik ve patolojik rollerini belirler. Eksozomların alıcı hücrelere alınma mekanizması kesin olarak bilinmese de bu konuyla ilgili birkaç mekanizma ileri sürülmüştür. Bu mekanizmalar; fagositoz, makropinositoz, klatrin-aracılı endositoz (CME), caveolin-bağımlı endositoz (CDE) ve plazma membran füzyonudur (Jadli ve ark., 2020).

2.4. Kanserde Eksozomlar

Eksozomların kanser ilerlemesindeki rolü muhtemelen dinamiktir ve kanser tipine, genetiğe ve evreye özgüdür (Kalluri ve LeBleu, 2020). Eksozom-aracılı farklı kargo moleküllerinin transferi kanser progresyonunu ve yayılımını hızlandırır. Tümör hücreleri arasındaki iletişimin artmasından dolayı eksozom salınımında artış görülür ve bu durum kanser hücrelerinden komşu hücrelere tümör spesifik genlerin taşınmasına neden olur. Bir çok kanser türünde, eksozomlar içerisinde tümör spesifik transkriptler (RNA'lar) ve mutant DNA türleri (p53, KRAS) yer almaktadır. Eksozomal biyomoleküllerin fonksiyonları alıcı hücrede sadece anjiyogenez, histon modifikasyonları, immun aktivasyon/inhibisyon, hücre büyümesi, apoptozun regülasyonu ve tedaviye direnç ile

sınırlı değildir. Eksozomal kargo molekülleri arasında farklı miRNA türlerinin bolluğu da aynı şekilde alıcı hücrede tümör gelişimi, progresyonu ve metastazında önemli fonksiyon görmektedir. Hatta eksozomal RNA'lar (miRNA ve mRNA), basit PCR temelli metotlarla hastalığın tanısı için biyobelirteç olarak kullanılabilir (Sharma ve ark., 2016). Meme ve prostat kanserinden derive eksozomlar, miRNA kargolarını transfer etmek suretiyle neoplaziyi indüklerler (Kalluri ve LeBleu, 2020). Prostat kanserinden köken alan eksozomlardaki miR-125b, miR-130, miR-155 ve ayrıca HRas ve Kras mRNA'ları, neoplastik yeniden programlamaya ve adipoz kök hücrelerin tümör oluşumuna katılır (Abd Elmageed ve ark., 2014). Kanser hücrelerinin plastisitesi, kısmen eksozomlara da atfedilebilir, metastatik meme kanseri hücrelerinden gelen eksozomal miR-200, epitelden mezenkimal geçişe (EMT) ve ayrıca zayıf metastatik meme kanseri hücrelerinin metastazına katkıda bulunur (Le ve ark., 2014).

Eksozomlar içerisindeki onkogenik proteinler, komşu dokulara tümörün yayılımına yol açabilmektedir. Son zamanlarda, yeni protein, myoferlin, pankreas ve meme kanserinde bulunduğu tespit edilmiş olup kanser hücrelerinin salgıladığı eksozomların içeriğinde yaygın bulunan bir protein olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma, kanser progresyonu ve metastazındaki myoferlinin öneminin yanı sıra eksozomlar içerisine nükleik asitlerin paketlenmesi ve eksozomların biyogenezi içindeki önemine de vurgu yapmaktadır. Kanser hücrelerinde myoferlin'in eksozomlarda, eksozomal protein yükünün düzenlenmesinde önemli rol oynadığı ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir (Blomme ve ark., 2016).

Eksozomlar sayesinde glioblastoma hücrelerinde fenotip dönüşümüne neden olan epidermal büyüme faktör reseptörünün onkogenik formu EGFRv-III sıklıkla ifadenir, bu sayede MAPK ve Akt içeren dönüştürücü sinyal yollarının aktivasyonunun neden olduğu onkogenik aktivite, eksozomlar sayesinde glioblastoma hücreleri arasında transfer edilir. Ayrıca EGFRv-II-bağımlı genlerin (VEGF, BCl-x(L), p27) ifadenmesinde de değişimlere neden olur ve sonuçta morfolojik değişikliklerle birlikte hücrelerin kontak bağımsız büyüme kapasitesi artar. Böylece kanser hücrelerinde membran mikrovezikülleri onkogenlerin horizontal geçişine katkı sağlayarak kanser hücrelerinin fenotipik değişimine önemli katkı sağlar (Al-Nedawi ve ark., 2008).

Hücre dışı DNA fragmentleri, genellikle genetik kanser biyobelirteçleri olarak dikkati çekmektedir. Fare beyin tümör hücrelerinden salınan eksozomların, tam uzunlukta H-ras, onkogentik N-ras sekansı yanı sıra tüm genomu kapsayan kromatin-ilişki çift zincirli DNA fragmentleri içerdiği gösterilmiştir (Lee ve ark., 2014).

Tümör kütlesi yalnızca heterojen bir kanser hücre popülasyonundan oluşmaz, aynı zamanda başlıca ekstraselüler matriks, kanser-ilişkili fibroblastlar (CAF), inflamatuvar immün hücreleri ve tümör-ilişkili damar sisteminin de oluşturduğu tümör mikro çevresini de içerir. Tümör progresyonu, kanser hücrelerinin çevreleriyle etkileşimlerinden derinden etkilenir ve bu çevre birincil tümörün yok edilip edilmediğini veya metastaz yapma yapmadığını belirler. PCa'da, hücre iskeleti ile ilişkili protein DIAPH3'in modülasyonu ile tümör mikro ortamının koşullandırıldığı gösterilmiştir (Kim ve ark., 2014). Tümör mikro ortamının ana hücresel unsurlarından biri stromal fibroblast hücreleridir. Kanser hücreleri ve stromal hücreler arasında eksozom aracılı horizontal gen transferi, kansere elverişli inflamatuvar ortamın korunmasına önemli katkıda bulunur (Nabet ve ark., 2017). Kanser hücrelerinin, herpes virüs tarafından eksozom-aracılı metabolik yeniden programlama tümör mikro çevresinin gelişimine neden olur. Virüs kodlu miRNA'nın kanser hücrelerine transferi, aerobik glikolize doğru kaymaya yol açar ve bu yolla virüslerin genetik materyale transfer olmaksızın enfeksiyöz olmayan transferi enfekte olmuş hücrenin büyümesini teşvik ederek virüsün uyum başarısını artırır (Yogev ve ark., 2017). Nükleik asitler, sinyal proteinleri ve metabolitler gibi farklı kanser hücresinden derive eksozomal kargo, stromal hücreler üzerinde protümörjenik etkiler yapabilir. Örneğin, göğüs kanseri eksozom derive miR-122, piruvat kinazı ve ardından akciğerlerde glukoz alımını baskılayarak metastazı teşvik eder (Fong ve ark., 2015). Diğer taraftan, immün baskılama, tümör mikro çevrenin önemli bir özelliğidir. Kanser hücreleri, tümör birikiminin temizlenmesi için bağışıklık sistemini inhibe etmek için farklı stratejiler gösterir. Son araştırmalar, eksozomların bu süreçte güçlü oyuncular olduğunu ortaya koydu. Hipoksi tümör-derive mikroveziküller, NK hücrelerini bloke edebilir. Bu veziküller içerisinde kargo moleküllerinden biri miR-23a'dır. Bu miRNA, normoksik kanser hücrelerinden salınan veziküllerde bulunmaz. İmmün sistemi baskılanmış bir mikro çevre için hipoksi önemli bir özellik olarak vurgulanır. Hipoksik PCa eksozomları, PCa hücrelerinde artmış invazyon, köklülük (stemness) ve mikro çevre değişikliklerinden

sorumlu olabilir. Hipoksik koşullar altında, PCa hücrelerinden salgılanan eksozomlar, tümör mikro çevrede fibroblastların neoplastik geçişine neden olur (Ramteke ve ark., 2015).

Eksozomlar, tümör büyümesinde ve metastatik yayılmada kritik olan tümör mikro çevresinin anjiyogenik ve ekstraselüler matriks yeniden yapılandırılmasına katkı sağlamaktadır (Kalluri ve LeBleu, 2020). Meme kanseri derive eksozomal miR-105, endotelyal sıkı bağlanma ZO-1 (zonüler occludens 1) ifadenmesini baskılar ve böylece kan damarlarının bütünlüğünü bozulmasına ve damarların geçirgenliğinin artmasına neden olur (Zhou ve ark.,2014).

Anjiyogenez, hızlı büyüyen solid tümörlerin besin maddelerinin varlığını düzenleyen önemli bir süreçtir. Endotelyal hücrelerin (EC) eksozomal etkileşimi ve alımı, vasküler endotelyal büyüme faktörlerini (VEGF'ler) aktive edebilen tetraspanin 8 ve CD106 ve 49d gibi veziküler kargoların dahil edilmesiyle anjiyogenezi indükleyecektir. VEGF'ler, EC proliferasyonuna, hücre göçüne, yayılımına ve EC progenitörlerinin olgunlaşmasına neden olur (Rajagopal and Harikumar, 2018). Meme kanseri hücrelerinde, eksozom aracılı miR-210'in tümör mikro ortamındaki hücelere aktarıldığını ve miR-210'un anjiyogenezi teşvik etmek için Ephrin A3 ve PTP1B gibi vasküler yeniden modelleme ile ilgili genlerin ifadenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, hipoksik kanser hücrelerinden gelen miRNA'lar gibi hücrel bileşenlerin, eksozomlar yoluyla tümör mikro ortamında komşu kanser hücrelerine yayıldığını ve tümör ilerlemesini etkilediğini göstermektedir (Jung ve ark., 2017).

Metastaz, kanserli hücrelerin tümörün birincil bölgesinden ikincil bölgeye esas olarak kan akışı yoluyla ayrılması ve başarılı bir şekilde istila edilmesi sürecidir. Eksozomların, metastatik hücre invazyonundaki rolü, farklı bir perspektifte tohum ve toprak teorisi (seed and soil theory) ile açıklanabilir. Birincil metastatik hücreler, hücre işgalinden önce hedef bölgeye onkojenik biyomoleküller gönderir. Bu moleküllerde hedef organda bu hücrelerin başarılı bir şekilde metastaz yapmasına yol açan bir pre-metastatik niş oluşumuna neden olur. Örneğin, CD97'nın eksozomal salınımı, kanser hücrelerinde pre-metastatik niş oluşumunda kritik rol oynar (Rajagopal and Harikumar, 2018). Eksozomal miR-21 ve -29a, toll-like reseptörleri için ligand olarak davranır ve pre-metastatik niş

oluşumunda inflamatuvar yanıtı indükleyebilir (Tadokoro ve ark., 2013). Pre-metastatik niş oluşumu, hematopoetik kemik iliği hücrelerinde organotropik metastaza katkıda bulunmaktadır. Bu progenitörlerin, hedef bölgelerde VEGF-1 ifadenmesini arttırdığını ve kanser hücrelerinin invazyonunu ve yerleşik fibroblast hücrelerinde aşırı fibronektin ifadenmesini indüklemeyen önce hücreler kümelere oluştuğu gösterilmiştir. Böylece ikinci bölge, primer kanser hücrelerinin kolayca invaze olabilmesi için uygun hale gelir (Fabbri ve ark., 2012). İntegrinler, adhezyon, göç, hücre farklılaşması, vb. ile ilgili transmembran reseptörleridir. Bu proteinlerin kanserin geç aşamalarında artan ifadenmesi, metastazın bir göstergesi olarak kabul edilir. İnvaze integrin pozitif PCa hücreleri, bu transmembran reseptörlerini eksozomlarda paketleyebilir ve böylece onlarda hücre invazyonunu hızlandırabilir (Fedele ve ark., 2015). Kanser bağlamında, over kanseri hücrelerinden derivate eksozomlardaki MMP (matiks metaloproteaz 1), mezotelyumu yayıflatarak kanser hücrelerinin peritoneal yayılımını teşvik eder (Yokoi ve ark.,2017).

Metastatik ve metastatik olmayan hücreler eksozomların karşılaştırmalı bir proteomik analizi örnekler arasında proteinlerin farklı düzeyde ifadelendiğini göstermiştir. Murin metastatik mesane hücre hatlarında, eksozomal membran yüzeyinde vimentin ve hepatoma-derivate büyüme faktörü , sitoplazmik lümeninde ise kazein kinaz II ve α -anneksin benzeri moleküllerin bulunduğu tespit edilmiştir (Jeppesen ve ark., 2014). Eksozomlar içerisine paketlenen MET onkogenleri, hücreler transformasyonu, tümör hücresi proliferasyonunu, hayatta kalmayı, hareketliliği, invazyon ve metastazı teşvik etme potansiyeline sahiptir. Kanser hücrelerinden salınan eksozomların proteomik analizleri, eksozomal kargo molekülleri arasında integrin ve tetraspanin gibi hücreler hareketle ilişkili sinyal moleküllerinin varlığını ortaya koymuştur (Rajagopal and Harikumar, 2018).

miRNA'nın eksozomlarda tasnifine aracılık eden nSMase2, hipoksi tarafından indüklenerek miR-210 gibi anjiyogenik miRNA'ların salgılanmasına neden olarak tümör anjiyogenezini kolaylaştırır ve böylece metastazı teşvik eder (Kosaka ve ark., 2013). Başka bir çalışmada ise stromal fibroblast hücrelerinden salınan miR-409 EMT'yi indükleyerek ve tümör baskılayıcı genlerin ifadenmesini (RSU1 ve STAG2)

downregüle etmek suretiyle prostat kanseri tümörögenezi önemli katkı sağlamaktadır. Ayrıca, miR-409, ekstraselüler veziküller içerisinde paketlenildiğini insan PCa hücrelerinde metastatik progresyonu arttırdığı gösterilmiştir (Josson ve ark., 2015).

Eksozomal kargo molekülleri arasında glutamat, asetat, stearat, palmitat ve amino asitler gibi metabolitler de yer almaktadır (Kalluri ve LeBleu, 2020). ¹³C işaretli CAF türevi eksozomlar, metabolit transferi yoluyla alıcı kanser hücrelerinin trikarboksilik asit döngüsünü besler, ve prostat ve pankreatik CAF'ler derive eksozomlar ayrıca kanser hücrelerinde lipit takviyesi yapar ve besin yoksunluğu veya besin stresli koşullar altında tümör büyümesini teşvik ettiği gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2016). Plazma kaynaklı eksozomlar, heksokinaz 1, piruvat kinaz, laktat dehidrojenaz, enolaz ve gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz dahil olmak üzere metabolik enzimler içerir ve bu enzimler eksozomda adenosin 5'-trifosfat (ATP)'in üretimine aracılık eder (Ronquist ve ark., 2013). Prostat ve pankreas kanser hücrelerinde, CAF-derive eksozomal miR-22, let7a ve miR-125b oksitatif fosforilasyonu baskılar ve metabolit transferiyle de glikoliz ve glutamin bağımlı indükleyici karboksilasyonu teşvik eder (Zhao ve ark., 2016).

Eksozomların kanserdeki bir diğer rolü ise çeşitli kemoterapötik ajanlara ve antikorlara karşı direnç geliştirilmesini teşvik eder. Bu durum, eksozomların direkt olarak terapötik ajanlarla etkileşime girmesiyle kanser hücrelerine karşı etkinliğini azaltarak veya kanser hücrelerinin transkriptomunu değiştirerek hayatta kalmayı teşvik etmesinin bir sonucudur (Kalluri ve LeBleu, 2020). CAF-derive eksozomlar, kanser kök hücrelerinin büyümesini arttırarak kolorektal kanser kemodirencini teşvik ederler ve kanser hücre popülasyonları arasında ilaç-direnç özelliğinin yayılımına yardımcı olurlar (Hu ve ark., 2015). Tümörler, radyasyon terapisi veya gama sekretaz inhibitörü ile tedavi edildiğinde, radyasyon terapisine dirençli tümör-başlatıcı hücrelerin artması CAF-derive eksozomal RNA ve transpozon elementlerinin kanser hücrelerine transferiyle gerçekleşir (Boelens ve ark., 2014). Over kanser hücrelerinde CAF-derive eksozomal miR-21, APAF1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör 1) bağlanması paclitaxel'e karşı ve makrofajdan derive eksozomal miR-385 ise, pankreas kanseri hücrelerinde sitidin deaminaz aktivitesini indükler ve gemsitabine karşı direnç gelişimine neden olur (Yeung ve ark., 2016 ; Binenbaum ve ark., 2018). Kemoterapi ve radyoterapi direkt olarak eksozom

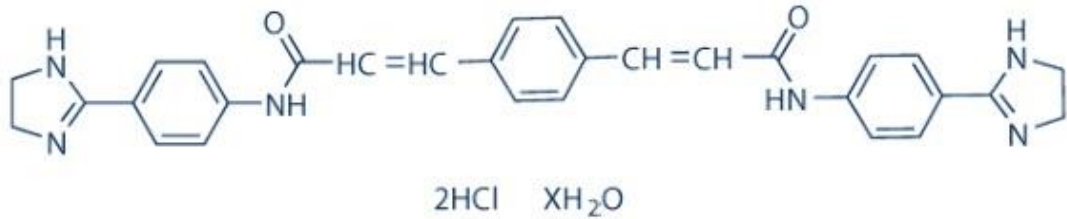
biyogenezini ve içeriğini potansiyel olarak terapinin bir sonucu olarak etkileyebilir (Kalluri ve LeBleu, 2020). Radyasyon tedavisi, kanser hücreleri tarafından ekzozomal miR-7-5p üretimini artırır, bu da bystander etki ile hücre otofajisini indükler (Song ve ark., 2016).

2.5. EV Salımının Farmakolojik İnhibitörleri

EV'ler, kanserinde içerisinde yer aldığı birçok hastalığın gelişimi ve progresyonunda önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle, hem EV'lerin biyogenezi ve fonksiyonlarını belirlemeye yönelik hem de potansiyel terapötik yaklaşımlar için EV salınımının inhibisyonu için birçok farmakolojik ajan üzerinde çalışılmaktadır. Bununla birlikte, EV biyogenezinin karmaşıklığı ve heterojenliği nedeniyle EV'lerin üretimini tamamen engelleyebilecek tek bir farmakolojik inhibitörün geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, bir çok araştırmacı belirli bir hastalıkla ilişkili baskın bir ekstraselüler grubunun tanımlanması ve bu grubun bloke edilmesinin klinik olarak daha yararlı olacağına inanmaktadır. EV salımını bloke etmek için en çok kullanılan inhibitörler ekzozomlar için GW4869 veya MV'ler için Y27632'dir. EV salınımını bloke etmek için kullanılan farmakolojik inhibitörler, etki mekanizmalarına göre iki ana grupta ayrılır: EV trafiğini etkileyenler (calpeptin, manumycin A ve Y27632) ve lipid metabolizmasını etkileyenler (pantethine, imipramine ve GW4869).

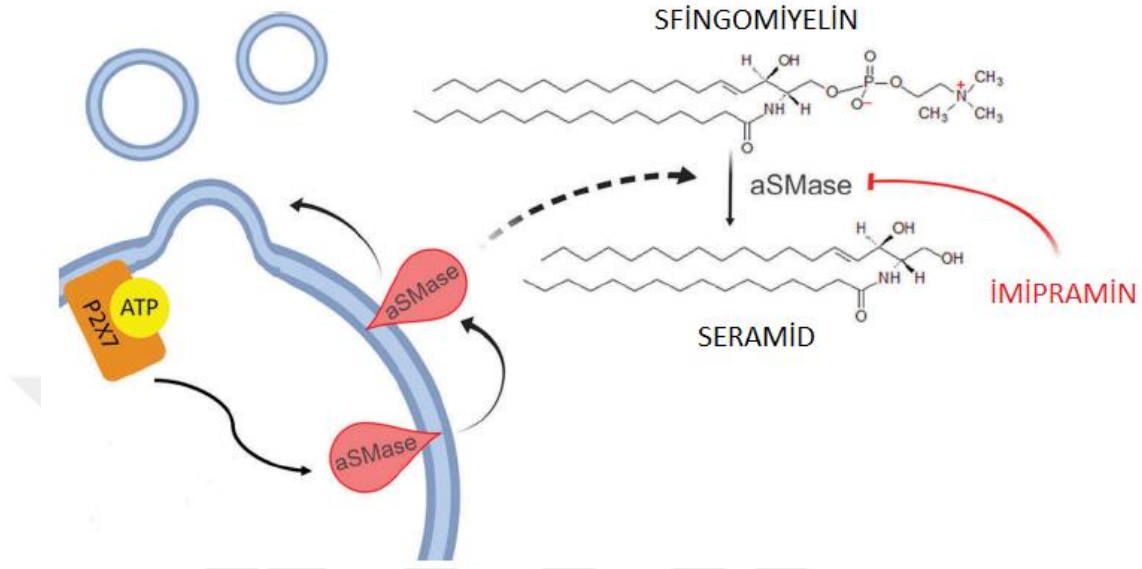
2.5.1. GW4869

GW4869, membran nötral sfingomiyelinaz (nSMase)'ı etkili, spesifik ve nonkompetitif (rekabetçi olmayan) inhibe eden hücre-geçirgen simetrik bir dihidroimidazol-amid bileşiğidir (Catalano ve O'Driscoll, 2019) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 : GW4869'un kimyasal formülü.

nSMase, yaygın bulunan bir enzim olup membran lipid sfingomiyelini hidrolize ederek biyoaktif lipit seramidi oluşumuna yol açar (Catalano ve O'Driscoll, 2019) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 : Sfingomiyelinin seramide dönüşümü. MV'ler, sfingomiyelin ve seramidin zenginleştirilmesi de dahil olmak üzere karakteristik lipid özellikleri gösterirler, bu nedenle membran kompozisyonuna müdahale edebilen her enzim, yani kalpainler, skramblazlar ve asit sfingomiyelinazlar (aSMase) MV'lerin biyogenezinde anahtar bir rol oynar. Asit sfingomiyelinazlar, sfingomiyelini, hücre membranı içinde mikrodomanler oluşturan ve MV'lerin tomurcuklanmasını indükleyen koni şeklindeki sert bir lipid olan seramide dönüştürür. İyi bilinen bir anti-depresan olan imipramin, aSMase'ler üzerine etki ederek membran akışkanlığını artırabilir, böylece MV'lerin oluşumunu engeller (Catalano ve O'Driscoll, 2019).

Eksozomların çift tabakasındaki lipidlerin kantitatif analizi sonucunda, hücrel membrana göre kolesterol, sfingolipidler ve seramid bakımından daha zengin olmasına rağmen daha düşük miktarlarda fosfatidilkolin içerdiği belirlenmiştir. Bu lipid kompozisyonu dikkat çekici bir şekilde lipid-rafta benzer. Eksojen SMase ile muamele edilmesi veya C6-seramid uygulaması vezikül oluşumunu indükleyebilir ve bu durum ESCRT'den bağımsız eksozom oluşmasında seramidin önemini vurgulamaktadır. Bu durumun aksine, yapılan çalışmalarda GW4869'un eksozom salınımını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. SMase aktivitesi üzerine salgılanan seramidin koni şeklindeki yapısı, ESCRT bağımsız eksozomların oluşumunda önemlidir. Çünkü ESCRT- bağımsız MVB'ler içerisine kargolanmada raft-benzeri mikrodomanlere ihtiyaç vardır. Bu mikrodomanler yüksek konsantrasyonda seramidlerin oluşturduğu sfingolipidler içerirler. Seramid, mikrodomanlerden büyük domainlerin oluşumunu indükleyerek domain-indüklü tomurcuklanmayı teşvik eder (Trajkovic ve ark., 2008). SMase, golgi

aygıtı, endozomlar ve hücre zarı dahil olmak üzere bütün hücrelerin çok çeşitli kompartmanlarında bulunur, bu nedenle SMase aktivitesi sadece eksozom oluşumu ile değil, aynı zamanda MV'lerin salınımıyla da bağlantılıdır. Spesifik olarak, hem farmakolojik inhibitör GW4869 hem de sfingomiyelin fosfodiesteraz 2/3'e (SMPD2/3) karşı siRNA'lar kullanılarak, eksozom inhibisyonu ve MV salınımı arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. SKBR-3 hücrelerinin 5 μ M GW4869 (veya siRNA) ile muamelesi sonucunda 100-200 nm boyut aralığındaki vezikül miktarında artışa görülürken serbest bırakılan daha küçük boyutlardaki vezikül miktarında ise önemli bir azalış görülmüştür. Benzer şekilde, SMPD2 veya SMPD3'ün yüksek düzeyde ifadenmesi, büyük boyutlardaki (100-200 nm) vezikül salınımında azalmaya neden olurken daha küçük boyutlardaki vezikül salınımında ise artışa neden olmuştur. Bu etki, ayrıca MV bilayer'ın farklı lipid kompozisyonu ile ilişkilidir. MV membranları, bütün hücre membranlarına göre daha yüksek konsantrasyonda sfingomiyelin içerir ve bu da hücrel membranın tomurcuklanmasını teşvik eder. Bu yüzden lipid kompozisyonuna müdahale etmek suretiyle SMPD2/3 aktivitesinin deregülasyonu, hücre kargosunun salınımını eksozomlardan MV'lere veya tam tersi MV'lerden eksozomlara değiştirebilir (Menck ve ark., 2017).

Veziküller üzerindeki GW4869 aktivitesi, fibroblast hücreleri kullanılarak kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Lyu ve ark. (2015), kardiyak fibroblastlardan salınan eksozomların prohipertrofik moleküller taşıdığını ve kardiyak fibroblast hücreleri tarafından indüklenen hipertrofinin, eksozom salınımı olmadığında önemli ölçüde azaldığını bildirmiştir. Anjiyotensin II (AngII) 'ın neden olduğu kardiyak fibroblastların aktivasyonunu takiben eksozom salımı artar ve eksozomların alımı ise alıcı kardiyomiyositlerde renin, Anjiyotensin I, Anjiyotensin reseptörü 1 ve 2'nin (AT1R ve AT2R) upregülasyonuna yol açar. Kardiyak fibroblast eksozomlarının bu etkileri, neonatal sıçan kardiyak fibroblastları ile ko-kültüre edilmiş neonatal sıçan kardiyomiyositlerinin 40 μ M GW4869 ile muamelesiyle büyük ölçüde inhibe edilmiştir. C57BL/6N fareleri ile yapılan *in vivo* deneylerle AngII ile indüklenen miyokardiyal hipertrofi ve kardiyak fibrozun, GW4869 ile muamelesi sonrasında belirgin şekilde azaldığı görülmüştür. Bu bulgular kardiyak patolojik hipertrofide eksozomların rolünü ortaya koymaktadır.

Akciğer adenokarsinoma (PC9) hücrelerinde yapılan bir çalışmada hücrelerin gefinitib ile muamelesi sonrasında eksozom salınımının arttığını belirlemişlerdir. Bu hücreler GW4869 ile pre-inkübasyonunu takiben gefinitib'le muamele edildiğinde ise gefinitib'in eksozom üretimi üzerine etkisinin bloke edildiğini belirlemişlerdir (Li ve ark., 2016).

Cao ve ark. (2017)'nin çalışmasında SKOV3 over kanser hücrelerinden salınan eksozomların, normal endometriyal stromal hücre hatlarından (ESC'ler) salınan eksozomlara nazaran daha yüksek miktarda *DNMT1* mRNA'sı içerdiğini göstermişlerdir. SKOV3 hücreleri bu eksozomlarla muamele edildiğinde sisplatin direncinin arttığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada eksozomal DNMT1'in neden olduğunu ileri sürdükleri sisplatin direncinin GW4869 ile muamele sonrasında önemli derecede azaldığını bulmuşlardır.

Eksozomlar ve diğer ekstraselüler veziküllerin tümör progresyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Matsumoto ve ark. (2017), melanomada GW4869 (5µg/mL)'un B16BL6 hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde azalttığını belirlemişlerdir. Bu sonuç, eksozom salınımının GW4869 ile inhibisyonunun, murin B16BL6 hücrelerinin otokrin ile düzenlenen proliferasyonunu baskıladığını göstermektedir. Aynı etki, B16BL6 hücreleri ile deri altından enjekte edilmiş C57BL/6J farelerinde *in vivo* olarak gözlenmiştir. Farelere enjekte edilen B16BL6 hücrelerinden elde edilen eksozomlar, PBS ile tedavi edilen farelere kıyasla tümör büyümesini teşvik ederken, GW4869 ile muamele önemli ölçüde tümör büyümesinde azalmaya ve dolayısıyla murin sağ kalımı ile ilişkilendirilmiştir.

Başka bir çalışma da ise prostat kanser hücreleri (LNCaP, 22Rv1 ve PC3 E006AA-hT), hem hipoksik hem de normoksik şartlarda kültüre edilmiştir. Hipoksik şartlarda prostat kanser hücreleri sağ kalım mekanizması olarak metabolik artıklardan kurtulmak için eksozom yolağı aracılığıyla laktik asiti atmak için normoksik şartlara göre daha fazla eksozom salgılamaktadır. Bu hücreler GW4869 ile muamale edildiğinde ise hücre canlılığının azaldığı belirlenmiştir. Bu çalışma, kanser hücrelerinin sağ kalımında eksozomların önemli bir role sahip olduğuna vurgu yapmaktadır (Panigrahi ve ark.,2018).

2.6. Eksozomlar ve Epigenetik Yeniden Düzenlenme

DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve mikroRNA veya uzun kodlamayan RNA'lar gibi önemli epigenetik mekanizmalar kanser araştırmaların başlıca konuları arasında yer almaktadır. Son zamanlardaki çalışmalar kanser progresyonun epigenetik regülasyonunda ekstraselüler veziküllerin de önemli rol oynadığını göstermiştir. Gen Ontoloji (GO) çalışmaları, ekstraselüler veziküller içerisinde epigenetik regülasyon sorumlu birçok mRNA ve proteinlerin yer aldığını ve özellikle miRNA'ların hücreler arasında genetik alışverişin önemli bir mekanizması olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalar, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve miRNA veya lncRNA gibi epigenetik süreçlerin regülasyonda ekstraselüler veziküllerin önemli rol oynadığı göstermektedir. Son zamanlardaki çalışmalarda veziküller içerisinde yer alan miRNA gibi epigenetik biyobelirteçlerden kanser tanısı ve progresyonunun değerlendirilmesinde faydalanabileceği vurgulanmaktadır (Qian ve ark., 2015). Bununla birlikte, biyoinformatik analizlerde eksozomal mRNA ve proteinlerin, epigenetik kalıtımda önemli rol oynadığını göstermektedir (Sharma 2014; Zhu ve ark., 2014). Dolaşımsal miRNA'lar tümör mikroçevresinin yeniden düzenlenmesine katkı sağladığı kadar alıcı hücrede histon modifikasyonlarını etkilediği biyoinformatik analizler ile gösterilmiştir (Sharma ve ark.,2016; Sharma 2014). Ayrıca Schiera ve ark. (2013)'nın, çalışmasında G26/24 oligodendroglioma hücrelerinden salınan ekstraselüler veziküller içerisinde yer almasına karşın normal astrositlerden salınan ekstraselüler veziküllerde yer almayan farklılaşma spesifik bağlayıcı histon H1⁰'in varlığı gösterilmiştir. Histon H1⁰ çoğunlukla farklılaşma ile ilişkili olup patofizyolojik önemi tam olarak bilinmemesine karşın kanser hücrelerinden derive histon H1⁰, oligodendroglioma tanısı için bir biyobelirteç olabileceği ve ayrıca alıcı hücrenin kanser mikroçevresinin regülasyonunu etkileyebileceği vurgulanmıştır (Schiera ve ark.,2013) .

Ekstraselüler veziküllerin alıcı hücrenin epigenetik yeniden programlanmasında eksozomal miRNA'lar en büyük ilgiyi çekmekte ve eksozomal miRNA'ların kanserin tanısı, prognozu ve tedaviye yanıt üzerine etkisinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin, Meme ve prostat kanserinden derive eksozomlar, miRNA kargolarını transfer etmek suretiyle neoplaziyi indüklerler (Kalluri ve LeBleu, 2020).

Prostat kanserinden köken alan eksozomlardaki miR-125b, miR-130, miR-155 ve ayrıca HRas ve Kras mRNA'ları, neoplastik yeniden programlamaya ve adipoz kök hücrelerin tümör oluşumuna katılır (Abd Elmageed ve ark., 2014). Kanser hücrelerinin plastisitesi, kısmen eksozomlara da atfedilir, metastatik meme kanseri hücrelerinden gelen eksozomal miR-200, epitelden mezenkimal geçişe (EMT) ve ayrıca zayıf metastatik meme kanseri hücrelerinin metastazına katkıda bulunur (Le ve ark., 2014). Meme kanseri derive eksozomal miR-105, endotelial sıkı bağlanma ZO-1 (zonüler occludens 1) ifadenmesini baskılar ve böylece kan damarlarının bütünlüğünü bozulmasına ve damarların geçirgenliğinin artmasına neden olur (Zhou ve ark.,2014). Bununla birlikte, prostat ve pankreas kanser hücrelerinde, CAF-derive eksozomal miR-22, let7a ve miR-125b oksidatif fosforilasyonu baskılar ve metabolit transferiyle de glikoliz ve glutamin bağımlı indükleyici karboksilasyonu teşvik eder (Zhao ve ark., 2016). Dolaşımdaki artmış eksozomal miR-21 salınımı, glioblastoma, pankreas, kolorektal, kolon, karaciğer, meme, over ve özofagus kanserleri ile ilişkilendirilmiştir. Ürin-kaynaklı eksozomal miR-21'in artan salınımı ise, mesane ve prostat kanseri ile ilişkilendirilmiştir (Thind ve Wilson, 2016; Salehi ve Sharifi,2018). Çoklu kanser türleriyle ilişkili diğer eksozomal onkogenik mikroRNA'lar miR-155, miR-17-92 kümesi ve miR-1246'dır (Sakha ve ark.,2016 ; Bhagirath ve ark.,2018). Bu miRNA'ların lenfoma ve lösemide olduğu gibi oral skuamöz hücreli karsinomda ve beyin, pankreas, kolon, karaciğer, meme, prostat ve özofagus kanserlerinde upregüle olduğu gösterilmiştir. miR-146a ve miR-34a'nın da dahil olduğu tümör baskılayıcı miRNA'lar karaciğer, meme, kolon, pankreas kanserleri ve hematolojik malignitelerle ilişkilidir (Salehi ve Sharifi, 2018). Ayrıca idrarda EV'lerin varlığı 2004 yılında keşfedilmiştir. Üriner EV'lerin ürogenital sistemin epitel hücrelerinden köken aldığı düşünülmektedir. Kana özgü prostat antijeni (PSA), prostat kanserinin erken saptanmasında en yaygın kullanılan biyobelirteç olmaya devam etmektedir ancak eksozomal miRNA'ların özgüllüğü arttırdığı ve agresif prostat kanserini agresif olmayanlardan ayırdığı öne sürülmüştür (Lorenc ve ark., 2020). Eksozomal miRNA'lar hastalığın prognozu ve tanısı içinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği vurgulanmaktadır. Örneğin, üriner eksozomlar ve taşıdıkları kargolar , özellikle miR-21 ve miR-375, prostat kanserinin saptanması ve prognozunda ortaya çıkan bir biyobelirteç kaynağı haline gelmiştir (Foj ve ark., 2017). Ayrıca, radyoterapi ile indüklenen serumdaki

eksozomal miRNA'ların ifadenmesi, prostat kanseri için prognostik ve prediktif biyobelirteçler olarak potansiyel değere sahiptir (Lorenc ve ark., 2020).

miRNA'lar gibi ekstraselüler veziküller ile taşınan lncRNA'lar, tümör gelişimi, metastaz ve tedaviye yanıtın belirlenmesinde rol oynar. Hepatoselüler karsinoma hücrelerinden derive lncRNA *TUC339*'ın tümör büyümesi, adezyon ve hücre döngüsünün regülasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (Braconi ve ark., 2011). Aynı şekilde bu kanser hücrelerinden derive ekstraselüler veziküllerle taşınan bir diğer lncRNA olan *Linc-ROR*, kanser hücrelerini kemoterapinin-indüklediği apoptozdan ve sitotoksiteden koruduğu bir başka çalışma ile gösterilmiştir (Takahashi ve ark., 2014).

Meme ve servikal karsinomada ise *MALAT1* lncRNA tümör metastazı ve invazyonu ile ilişkilidir (Lin ve ark., 2007; Schmidt ve ark., 2011). Bir diğer örnek ise eksozomal *LncARS* (sunitinib dirençli renal hücreli karsinomda (RCC) aktive edilen lncRNA), miR-34 ve miR-449'a rekabetçi bir şekilde bağlanır ve sunitinib'in etkisinin üstesinden gelerek tirozin kinazlar AXL ve MET ifadenmesini artırır (Qu ve ark., 2016).

Son yıllarda, eksozomal kargo molekülleri arasında DNA metilasyonundan primer sorumlu DNA metiltransferaz enzimlerinin transkriptlerinin de yer aldığı gösterilmiştir. Over kanser hücreleri ile yapılan bir çalışmada bu hücrelerden derive eksozomlar içerisinde *DNMT1* mRNA'sının bulunduğunu ve alıcı hücrede *DNMT1* mRNA ifadenme düzeyinde artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Bu hücrelerde eksozom salınımı inhibe edildiğinde ise alıcı hücrede *DNMT1* ifadenme düzeyinde azalma tespit edilmiştir (Cao ve ark., 2017). Başka bir çalışmada ise sepsis ve septik şok hastalarının serumlarından izole edilen ekstraselüler veziküllerin kargo molekülleri arasında *DNMT1*, *DNMT3A* ve *DNMT3B* mRNA'sının da bulunduğunu göstermişlerdir (Dakhallah ve ark., 2019). Tang ve ark.larının (2018) çalışmasında ise indüklenmiş pluripotent kök hücre hattı iPS (IMR-90)-4 hücrelerinden derive eksozomlarda ise proteomik analizler sonucunda altı epigenetik enzimin, UBE2N, DNMT3B, AURKB, CARM1, HDAC2 ve HAT1 kargo molekülleri arasında yer aldığı gösterilmiştir.

2.7. Epigenetik Düzenlenme

Bir organizmanın oluşması için klasik genetik süreçlerin yanı sıra düzgün bir gelişim ve hücre işleyişi için gen ifadenmesini kontrol eden epigenetik mekanizmalarda önemli rol oynar. Epigenetik, primer DNA dizisindeki değişikliklerden bağımsız olarak meydana gelen gen ifadenmesindeki kalıtsal değişiklikleri ifade eder. Epigenetik mekanizmalarda yer alan farklı epigenomlar, DNA aynı kalsa bile zigot somatik dokuya dönüştüğünde gelişim sırasındaki hücredeki farklılıkları açıklayabilir.

Gen ifadenmesinin epigenetik düzenlenmesi; DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, miRNA'lar ve nükleozomların DNA boyunca konumlandırılması gibi farklı mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşir. Epigenetik öğeleri arasındaki etkileşim, kromatin yapısını değiştirerek transkripsiyonel aktivasyon ve baskılama arasındaki dengeyi sağlar. Bu nedenle, DNA paketlenmesinin düzenlenmesi, doğru kromozom replikasyonu, gen ifadenmesi ve gen baskılanmasının korunmasını sağlar (Kulis ve Esteller, 2010).

Epigenetik, onkoloji ve immünoloji gibi birçok araştırma alanını kapsamaktadır. Anormal epigenetik süreçler, gen fonksiyonunda değişikliklere ve malign hücrelerin transformasyonuna yol açabilir. Epigenetik modifikasyonlardaki global değişiklikler, kanserin ayırt edici özelliklerinden birisidir. Kanser geleneksel olarak genetik bir hastalık olarak kabul edilse de epigenetik mekanizmalarında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2020).

2.7.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, memelilerde en çok çalışılmış epigenetik modifikasyonlardan biri olup normal hücre fizyolojisi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. DNA metilasyonu, transkripsiyonel düzenlemede kritik bir role sahip olmasından dolayı kanserinde içerisinde yer aldığı birçok hastalığın gelişiminde önemli bir yere sahiptir (Kulis ve Esteller, 2010).

Genomun metilasyon durumu, esas olarak DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) ve DNA demetilazlar tarafından ortak olarak düzenlenir. DNMT'ler, metil donörü olarak S-

adenozil metiyonini (SAM) kullanarak, sitozin-fosfat-guanin (CpG) dinükleotid çiftinde sitozin halkasının 5' ucunda bulunan karbona (C) bir metil grubu (CH₃) ekler ve 5'-metil-sitozin oluşur. DNMT'ler, embriyo gelişimi, hücre farklılaşması ve gen transkripsiyonu gibi birçok biyolojik süreçte önemli rol oynar. Memeli genomik DNA'sında, sitozinin %3 ila %5'i 5-metilsitozin formunda bulunur ve bu 5-metilsitozinin % 70'i CpG bölgelerinde bulunur. Metillenmemiş CpG bölgeleri, temel genler ve dokuya özgü ifadelenen genlerle ilişkilidir, bu da CpG metilasyonunun gen ifadelenmesinde önemli bir rol oynadığını gösterir (Zhang ve ark., 2020).

2.7.2. DNA Metiltransferazlar (DNMT)

DNMT'ler, epigenetik düzenlemede rol oynayan önemli enzimlerdir ve primer olarak DNA metilasyonunu katalize ederler. DNA metilasyonu, gen ifadelenmesinde değişikliklere neden olabilir, ancak DNA dizisini veya gen ürününü değiştirmez (Zhang ve ark., 2020).

İlk ökaryotik DNMT enzimi, 1988'de başarılı bir şekilde klonlanmıştır. DNMT enzim ailesinin beş üyesi vardır :DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L. DNMT1'in temel işlevi, DNA sentezinden sonra genomdaki metilasyon durumunu korumaktır. DNMT2, çoklu tRNA'ları metilleyen bir RNA metiltransferazdır. DNMT3A ve DNMT3B, DNA'nın *de novo* metilasyonunda rol alırken, DNMT3L ise katalitik domaini olmayan DNMT3-benzeri bir proteindir. DNMT3L, DNA *de novo* metilasyonunu pozitif olarak düzenlemek ve ayrıca DNMT3A ve DNMT3B'nin katalitik aktivitelerini geliştirmek için DNMT3A ve DNMT3B ile etkileşime girebilir. DNMT3A ve DNMT3B, *in vivo* olarak farklı genomik DNA bölgelerinin metilasyonunu katalize eder. DNMT3A, nükleozomların çekirdek bölgesindeki DNA'yı neredeyse hiç metilleyemezken, DNMT3B, etkinliği düşük olmasına rağmen bu bölgedeki DNA'yı önemli ölçüde metiller. Embriyonik gelişim sırasında farklı zamanlardaki DNMT'lerin ifadelenmesi, bu enzimlerin farklı DNA bölgelerini metillenmesinin nedenlerinden biri olabilir. Memelilerde, DNA metilasyonu çekirdekte bulunan DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B proteinleri tarafından gerçekleşir.

19. kromozom üzerinde bulunan insan *DNMT1* geni, 4851 baz çiftinden oluşan total protein kodlama bölgesine sahiptir ve yaklaşık 183 kDa'lık bir proteini kodlamaktadır. Genel olarak DNMT1 proteininin üç domaininden yani N-terminal düzenleyici domain, C-terminal katalitik domain ve bir merkezi bağlantı bölgesinden oluştuğu düşünülmektedir. N-terminal düzenleyici domain, proteinin çekirdeğe yerleştirilmesinden sorumludur. C-terminal katalitik domainin büyük bir kısmı, sitozin gibi çeşitli substratlar için bağlanma bölgeleri ile birlikte evrimsel olarak korunmuştur. Diğer iki domaini birbirine bağlayan merkezi bağlantı bölgesi ise, tekrarlayan glisin-lizin-dipeptit dizilerini içerir.

2. kromozom üzerinde bulunan insan *DNMT3A* geni, 2172 baz çiftinden oluşan total protein kodlama bölgesine sahiptir ve yaklaşık 130 kDa'lık bir proteini kodlar. Bir diğer *de novo* DNA metiltransferaz olan *DNMT3B* geni 20. kromozom üzerinde yerleşik olup 2538 baz çiftinden oluşan total protein kodlama bölgesine sahiptir ve yaklaşık 95 kDa'lık bir proteini kodlar. DNMT3A ve DNMT3B, üç domaininden oluşan benzer yapılara sahiptir: N-terminal prolin-triptofan-triptofan-prolin (PWWP) domaini, sisteinle zenginleştirilmiş ATRX-DNMT3-DNMT3L (ADD) çinko bağlama bölgesi ve C-terminal metiltransferaz katalitik bölge. PWWP domaini, DNA'nın spesifik bağlanmasına aracılık eder. Sisteinle zenginleştirilmiş çinko bağlama bölgesi, metiltransferaz aktivitesini artırmak için modifiye edilmemiş histonlarla etkileşime girer. C-terminal katalitik domain ise, enzimin stabil işlevini korur ve DNA metilasyonunu katalize eder. DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B'nin N-terminal düzenleyici domaini; çoğalan hücre nükleer antijeni bağlanma domaini (PBD), nükleer lokalizasyon sinyali (NLS), sitozin açısından zengin çinko parmak DNA bağlanma motifi (ATRX), polibromo homoloji domaini (PHD) ve PWWP tetrapeptid kromatin bağlanma domaininden oluşur. C-terminal katalitik domaini, 10 farklı karakteristik motif içerir ve bu motiflerden 6 tanesi (I, IV, VI, VIII, IX ve X) memelilerde evrimsel olarak korunmuştur. Metilasyon reaksiyonu, sitozin halkası üzerindeki nükleofilik atağa aracılık eden motif IV'deki korunmuş sistein kalıntıları tarafından başlatılır (Zhang ve ark., 2020).

2.7.2.1. DNMT'lerin Biyolojik Özellikleri

Genel olarak DNA metiltransferazlar, kromozom stabilitesinin ve genom bütünlüğünün korunması, embriyo gelişimi, hücre farklılaşması ve organizmaların gelişimi gibi önemli

biyolojik aktivitelerde rol oynar. Sürdürme metiltransferaz enzimi DNMT1'in hemimetile DNA kalıpları için yüksek bir afiniteye sahip olduğuna inanılmaktadır. DNMT3A ve DNMT3B enzimleri, metillenmemiş CpG bölgelerinin metilasyon durumunu değiştiren temel *de novo* metiltransferaz enzimleri olarak kabul edilir. *De novo* metiltransferazlar, esas olarak embriyonik kök hücrelerin gelişiminde aktiftir, burada DNA'daki metillenmemiş sitozinleri tanımlarlar ve yeni bir metilasyon modeli oluştururlar. Ayrıca DNMT3B, DNA metilasyonu meydana geldiğinde erken gelişim aşamasında totipotent embriyonik kök hücrelerde yüksek oranda ifadenir. Bundan sonra, DNMT3A, mezenkimal hücrelerde yaygın olarak ifadenir ve DNMT3B'nin ifadenme seviyesi, geniş çapta ifade edilen DNMT3A'ninkinden daha yüksektir. Hem DNMT3A hem de DNMT3B, çoğu farklılaşmış somatik hücrede downregüledir. Sürdürme metiltransferaz enzimi DNMT1, DNA replikasyon kompleksinin önemli bir komponenti olan endometriyumdaki erken embriyo implantasyonu ile ilişkilidir. DNMT1 enzimleri, metilasyon bölgesini belirledikten sonra, *de novo* metiltransferazlar tarafından oluşturulan metilasyon kalıbını korumak için nükleofilik atak yoluyla DNA hemimetilasyon bölgelerinin metilasyonunu katalize eder.

CpG bölgelerinin DNMT aracılı metilasyonu, kromatin yapısını oldukça sarmal hale getirebilir, promotor bölgelerin aktivasyonunu önleyebilir ve MeCP2 gibi metile CpG bağlanma proteinleriyle etkileşimi kolaylaştırabilir. Bu değişiklikler gen ifadenmesini inhibe edebilir. Metillenmiş DNA ayrıca E2F, CREB gibi metilasyona duyarlı transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını doğrudan inhibe edebilir ve böylece transkripsiyon engellenir.

DNMT'ler ayrıca sinir sistemi ile de yakından ilişkilidir. Birçok çalışma, DNA metilasyonunun transkripsiyonel baskılama ile ilişkili olduğunu bulmuştur. Örneğin, korku ile şartlanma sırasındaki bellek oluşumu, bellek baskılayıcı gen PP1'in metilasyonunu ve baskılanmasını içerir. DNMT'lerin inhibisyonu, PP1 metilasyonunun artmasını önler ve bu durum, bellek konsolidasyonu sırasında anormal gen transkripsiyonuna neden olur. DNMT aktivitesi, hücrel yaşlanma süreciyle de ilgilidir ve birçok yaşlanan dokudaki DNA metilasyonunda geniş çapta bir azalma vardır (Zhang ve ark., 2020).

2.7.2.2. DNMT'lerin Patolojik Özellikleri

Kimyasal karsinojenlerin veya patolojik koşulların neden olduğu genetik mutasyonlar, DNMT'lerin işlevlerini doğrudan etkileyebilir. Bu durum, genom çapında metilasyon profili değişikliklerine ve ayrıca genomik kararsızlığın ve onkogenlerin ifadenmesinin artması, tümör baskılayıcı genlerin ifadenmesinin azalması gibi kansere neden olan değişikliklere sebep olurlar.

Yapılan son çalışmalar ile, DNMT aktivitesindeki ve fonksiyonundaki değişikliklerin neden olduğu gen ifadenme anormalliklerinin, çeşitli kanserlerin oluşumu ve gelişimi ile yakından ilişkili olduğu görülmüştür. Memelilerde, bazı CpG dinükleotidleri genom içerisinde dağınık halde bulunurken, diğerleri CpG adacıkları adı verilen yoğun kümeler oluşturur. Dağınık haldeki CpG'ler hipermetiledir; bunun tersine, CpG adacıkları genellikle metillenmemiştir ve genellikle transkripsiyonel aktivasyonu ve baskılamayı düzenleyen gen promotor bölgelerinde bulunur. Normal hücrelerde, tümör baskılayıcı genlerin (TSG) promotor bölgelerindeki CpG adacıkları metillenmemiştir ve bu bölgelerde kromatin açık bir konformasyondadır, bu nedenle gen transkripsiyonu normal şekilde ilerleyebilir. Bununla birlikte, genom çapındaki hipometilasyon ve promotor bölgesindeki hipermetilasyon, birçok kanser için ayırt edici bir özelliktir ve tümörigenez ile ilişkilidir. Genom çapındaki hipometilasyon, genomik kararsızlığın artmasına neden olur. Daha da önemlisi, genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarının hipermetilasyonu (TSG gibi) inhibe edebilir ve hücre döngüsü, apoptoz, DNA onarımı, hücre etkileşimleri ve anjiyogenez gibi önemli hücresel süreçleri etkileyebilir. Tümör tedavisi, CpG adacıklarının metilasyonu ile inhibe edilen tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonunun eski haline getirilmesine odaklanır. Bu nedenle, DNMT aktivitesindeki anormallikleri araştırmak özellikle önemlidir.

Hücresel düzeyde DNMT değişikliklerinin araştırılmasına ek olarak, araştırmacılar DNMT'nin patolojik özelliklerini incelemek için *in vivo* ve *in vitro* olarak DNMT hayvan modelleri oluşturmuştur (Zhang ve ark., 2020). Belinsky ve ark. (2003), DNMT'nin tümör oluşumundaki işlevsel rolünü incelemek için bozulmuş *DNMT1* genine sahip alel içeren bir fare modeli kullanmıştır. DNMT1'in düzeyinin azalması, bütün kanserojenlerinin neden olduğu akciğer kanseri insidansında azalmaya yol açmıştır ve

DNMT aktivitesi, akciğer kanserine yol açabilecek pnömositlerde azalmıştır. Ayrıca hayvan modelleri ile yapılan başka bir çalışmada DNMT3A'nın, lenfomada DNMT3B'nin upregülasyonunu doğrudan inhibe edebileceği bildirilmiştir. Bu çalışma sonucunda, DNMT3B geninin inaktivasyonunun, DNMT3A'dan noksan farelerde lenfoma gelişimini hızlandırdığı ve DNMT3B'nin upregülasyonunun DNMT3A'dan noksan lenfomanın ilerlemesini inhibe ettiği görülmüştür (Haney ve ark., 2015) . Cilt kanserine neden olan kimyasallarla tedavi edilen farelerde, DNMT3A'nın delesyonu, tümör progresyonunu etkilemeksizin kanserojen kaynaklı skuamöz hücreli karsinomların sayısını artırır. DNMT3A ve DNMT3B'nin her ikisinin delesyonu sonucunda, skuamöz hücreli karsinomlar daha invazif ve metastatik hale gelir (Rinaldi ve ark., 2017) . Bu çalışmalar, DNMT kaybının organizmalar üzerinde büyük bir etkisi olduğunu göstermektedir (Zhang ve ark., 2020) .

Tümörlerde anormal DNMT'lerin etkileri karakterize edildiğinde ilginç bir durum gözlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalar, vulvar skuamöz hücreli karsinomlarda ve hipofiz adenomlarında DNMT3A proteininin yüksek düzeyde ifadenmesi, yüksek invazivlik ve nüksetme gibi malign özelliklerle ilişkili olduğunu göstermiştir (Leonard ve ark., 2016; Ma ve ark., 2018). Benzer şekilde, akciğer kanserinde artan DNMT3A ifadenmesi, tümör hücrelerinin proliferasyonuna ve metastazına yol açar. Yan ve ark. (2014), microRNA-101'in (miR-101) ifadenmesinin, miR-101 bağlanma bölgesine karşılık gelen DNMT3A aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir. miR-101 varlığında, DNMT1 ve DNMT3B'nin ifadenmesi önemli ölçüde değişmemiştir ve bu durum da akciğer kanseri hücrelerinde miR-101'in doğrudan DNMT3A'yı hedeflediğini göstermiştir. Bu nedenle miR-101 ifadenmesi, genel DNA metilasyonunu azaltan endojen DNMT3A ifadenmesini azaltır. E-kaderin (CDH1), akciğer metastazının bilinen bir inhibitörüdür. CDH1 promotorundaki CpG bölgelerinin metilasyon durumu, bisülfid analiz ile miR-101-transfekte edilmiş akciğer kanseri hücrelerinde analiz edilmiştir (Yan ve ark., 2014).

Bu durumun aksine Husni ve ark. (2016), yaptıkları çalışma ile DNMT3A'nın yokluğunun tümör progresyonunu kolaylaştırdığını gözlemlemişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise Gao ve ark. (2011), fare akciğer kanser modeli kullanarak DNMT3A'nın

bulunmadığı WT tümör hücrelerinde DNMT1 veya DNMT3B mRNA miktarlarında önemli bir fark tespit etmemişlerdir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç ve Solüsyonlar

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.1: Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Üretici Firma
Karbondioksitli etüv	Binder
Laminar flow	Metis
Otomatik hücre sayım cihazı	Bio-Rad
Hassas terazi	Ohaus
PCR cihazı	SenQuest
Inverted mikroskop	Leica
RotorGene RT- PCR cihazı	Qiagen
Nanodrop	Thermo Scientific
Ph metre	HI 2221, Hanna
Kemilüminesans görüntüleme	Bio-Rad
Elektroforez güç kaynağı	Bio-rad
Elektroforez tank ve kaseti	Bio-rad
Mikroplaka ELISA okuyucu	Thermo Scientific
Vorteks	Biosan
Kuru ısıtıcı blok	Stuart
Soğutmalı santrifüj	Thermo Scientific
Spin vorteks	Biosan
Mikropipet takımı	Thermo Scientific
Derin dondurucu -20°C	Arçelik
Derin dondurucu -80°C	Thermo Scientific
+4°C soğutucu	Arçelik
Vakum cihazı	Integra

3.1.2. Hücre Kültürü ve Kullanılan Solüsyonlar

Tablo 3.2: İnsan prostat kanser hücre kültüründe kullanılan kimyasallar

Ürün Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
RPMI 1640 with L-glutamine	Biological industries	01-100-1A
Trypsin-EDTA (0.25 %)	Biowest	L0932-100
Fetal Bovine Serum (FBS) heat inactivated	Capricorn	FBS-11A
Penicillin/Streptomycin	Capricorn	PS-B
GW4869	Sigma	D1692-5MG
1 x PBS	Capricorn	PBS-1A
Trypan Blue boyası	Bio-Rad	1450021
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma	D5879-100ML
Total Exosome Isolation Reagent	İnvitrogen	4478359
Exosome-depleted FBS	Gibco	A2720803

3.1.3. RNA İzolasyonu İçin Kullanılan Kimsalllar ve RT-PCR Primerleri

Tablo 3.3: RNA izolasyonu için kullanılan kimyasal malzemeler ve RT-PCR aşamasında kullanılan primerler

Ürün Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
Qiazol Isolation Reagent	Qiagen	79306
Kloroform	Amresco	0757
İzopropanol	Riedel-de Haën	24137
DNMT1 RT primer	Qiagen	330001- PPH01055F
DNMT3A RT primer	Qiagen	330001- PPH02339B
DNMT3B RT primer	Qiagen	330001- PPH01054F
USP7 RT primer	Qiagen	330001- PPH18818A
UHRF1 RT primer	Qiagen	330001- PPH11077B
GAPDH RT primer	Qiagen	330001- PPH00150F

3.1.4. Protein İzolasyonu İçin Kullanılan Kimyasallar ve Western Blot Analizi Solüsyonları

Tablo 3.4: Protein izolasyonu, SDS-PAGE ve western blot analizi için kullanılan solüsyonlar ve antikorlar

Solüsyon	İçeriği
10x RIPA Solüsyonu	CST, 9806S
PMSF solüsyonu	1 mM PMSF
1 X Akrilamid/Bisakrilamid (%30)	29,2 gr Akrilamid, 0,8 gr Bisakrilamid
1X SDS-PAGE RunningBuffer	25mM Tris, 192 mM Glisin, %0,1 SDS
1 X Transfer Buffer	25mM Tris, 192 mM Glisin, %20 Metanol
1,5 M Tris Solüsyonu	27,23 gr/150 mL Tris, pH 8,8
0,5 M Tris Solüsyonu	6 gr/100 mL Tris, pH 6,8
1 X TBS-T	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20
%10 Amonyum Persulfat (APS)	100 mg/mL
4X SDS-PAGE örnek yükleme solüsyonu	Bio-rad, 1610747
Membran Bloklama Solüsyonu	1xTBS, %0,1 Tween20, %5 Yağsız süt tozu

3.1.5. İmmunblotting Antikorları

Tablo 3.5: İmmunblotting için kullanılan antikorlar

Antikor	Üretici Firma	Katalog Numarası	Dilüsyon
DNMT1 primer antikor	CST	5032S	1:1000
CD9 primer antikor	CST	13174S	1:1000
GAPDH primer antikor	CST	2118S	1:1000
Anti-tavşan IgG, HRP bağlı antikor	CST	7074S	1:1000

3.1.6. Kullanılan Kitler

Tablo 3.6: Çalışma süresince kullanılan kitler

Ürün Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
SyberGreen master mix	Qiagen	330500
cDNA Sentez Kiti	Qiagen	330411
BCA protein assay kit	Thermofisher Scientific	23225
Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit	Invitrogen	4478545

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

Kemik metastazı derive androjen-bağımsız PC3 (ATCC® katalog no: CRL-1435) ve metastatik androjen-bağımlı LNCaP (ATCC® katalog no: CRL-1740) prostat kanser hücre hatlarımız AKÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Mustafa YILDIZ'dan temin edilmiştir. PC3 hücreleri, orta derecede metastatik potansiyele sahip ancak androjen reseptörleri ve PSA ifadenmesi olmayan, androjen-bağımsız insan prostat kanseri hücreleridir. LNCaP hücreleri, androjen-bağımlı lenf nodu metastazlı insan prostat adenokarsinom hücreleridir. Bu hücreler, kümeler halinde veya tek hücre olarak çoğalan adherent epitel hücrelerdir. LNCaP hücreleri düşük metastatik potansiyele sahipken PC3 hücreleri yüksek metastatik potansiyele sahiptir (Dozmorov ve ark., 2009).

PC3 ve LNCaP hücreleri, %10 FBS içeren RPMI 1640 besiyerinde %95 nem ve %5 CO₂'li ortamda 37°C ayarlı etüv içerisinde kültüre edildi.

3.2.2. İnhibitör Uygulaması

PC3 hücrelerine eksozom inhibitörü GW4869, 10 µM ve 20 µM konsantrasyonunda 24 saat ve 48 saat süreyle inkübe edildi. GW4869 için çözücü olarak DMSO kullandı ve çözücü kontrolü olarak aynı süre hücreler DMSO ile inkübe edildi. Her bir konsantrasyon için iki ayrı kültür yapılarak deney tekrarlandı.

3.2.3. Eksozom İzolasyonu

Eksozomdan yoksun FBS içeren besiyerinde (eksozom şartlandırma ortamı) inkübasyon sürelerinin dolmasını takiben prostat kanseri hücrelerinden Total Exosome Isolation solüsyonu kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde eksozom izolasyonu gerçekleştirildi, kısaca; inkübasyon süreleri dolmasını takiben besiyeri falkonlara aktarıldı, 2:1 oranında total exosome solüsyonu eklendi ve bir gece +4°C’de inkübe edildi. İnkübasyon süresini dolması takiben 10000 xg ’de +4°C’de bir saat santrifüj edildi ve süpernantant uzaklaştırıldı. Pelet 150 µl PBS ile sulandırıldı ve eksozom örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C’de saklandı.

3.2.4. RNA İzolasyonu ve RT-PCR

Total Exosome RNA & Protein Isolation Kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde eksozomlardan RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Eksozom ve eksozom inhibitörü uygulanan ve uygulanmayan hücrelerden total RNA izolasyonu ise Qiazol Lysis solüsyonu kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirildi. İzole edilen RNA örneklerinden 2000 ng kullanılarak RT² HT First Strand cDNA sentez kiti ile cDNA eldesi gerçekleştirilerek *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *USP7* ve *UHRF* genlerinin mRNA miktarları, RT-PCR yöntemi ile RotorGeneQ cihazı kullanılarak yapıldı. Amplifikasyonlar 25 µL toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, bölgeye özgü primerler (Tablo 3.8) ve RT² SYBR Green Mastermix karışımı ve steril H₂O-PCR grade kullanılarak gerçekleştirildi (Tablo 3.7).

Tablo 3.7: *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *USP7*, *UHRF1* ve *GAPDH* genleri için qPCR tepkime karışımı.

Reaksiyon Bileşeni	Miktar
RT ² SYBR Green Mastermix (Qiagen, Kat. No:330500)	12,5 µl
cDNA	5 µl
RT ² qPCR Primer Assay	1 µl
Nuclease-free H ₂ O	6,5 µl
Toplam miktar	25 µl

Tablo 3.8: Hedef genlere ait dizi bilgileri ve RT² qPCR Primer Assay katalog numaraları.

Gen adı	RefSeq No	Band uzunluğu	Referans pozisyonu*	Katalog numarası
<i>DNMT1</i>	NM_001379	61	4723	PPH01055F
<i>DNMT3A</i>	NM_022552	83	1214	PPH02339B
<i>DNMT3B</i>	NM_006892	93	1535	PPH01054F
<i>USP7</i>	NM_003470	83	1834	PPH18818A
<i>UHRF1</i>	NM_013282	104	2541	PPH11077B
<i>GAPDH</i>	NM_002046	130	822	PPH00150F

* RefSeq sekansındaki ampikon pozisyonu.

RT-PCR karışımları hazırlandıktan sonra cDNA' ar eklendi ve cihaza yerleştirildikten sonra Tablo 3.9'da belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *USP7*, *UHRF1* ve *GAPDH* genleri için aynı program kullanıldı.

Reaksiyon sonucunda, *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *USP7*, *UHRF1* ve *GAPDH* genlerinin mRNA düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri belirlendi. *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *USP7* ve *UHRF1* geninin ifade düzeyi *GAPDH* ifade düzeyine göre normalize edildi.

Tablo 3.9: *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *USP7*, *UHRF1* ve *GAPDH* genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan RT-PCR tepkime programı.

Döngü	Zaman	Sıcaklık
1	10 dakika	95 ⁰
40	15 saniye	95 ⁰
	1 dakika	60 ⁰
+ Erime Eğrisi		

3.2.5. Protein İzolasyonu ve Western Blot Yöntemi

Total Exosome RNA & Protein Isolation Kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde eksozomlardan protein izolasyonu gerçekleştirildi. Hücrelerden ise inkübasyon sürelerinin dolmasını takiben 1mM PMSF içeren RIPA buffer kullanılarak total protein izolasyonu gerçekleştirildi. Eksozom ve hücrelerden izole edilen proteinlerin miktar tayini BCA protein assay kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak yapıldı. Hedef proteinlerin ifadenme düzeyleri Western Blot yöntemi ile belirlendi. Eşit miktardaki protein örneği SDS-PAGE’de yürütüldükten sonra PVDF membrana tranfer edildi. Membran %5’lik yağsız süz tozu ile bloklandıktan sonra DNMT1 ve CD9 genlerine ait primer antikorla +4°C’de bir gece inkübe edildi ve sonrasında membran üç kez TBST ile yıkandıktan sonra sekonder antikorla 2 saat inkübe edildi. Sekonder antikorla inkübasyon sonrasında üç kez TBST ile yıkandıktan ECL western blooting substratı kullanılarak ChemiDoc cihazı ile görüntüleme yapıldı. İnternal kontrol olarak GAPDH kullanıldı.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

mRNA düzeylerindeki değişimler Geneglobe Data Analysis Center istatistik programı kullanılarak “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı. Pfaffl eşitliği, kantitatif ifadenme değerinin (Ct değeri) kontrol ve hasta grubunda karşılaştırmasını gerçekleştiren bir programdır ve 0,05’den küçük olan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

Pfaffl eşitliği;

$$R = \frac{E(\text{hedef})^{\Delta Ct(\text{kontrol-örnek})}}{E(\text{referans})^{\Delta Ct(\text{kontrol-örnek})}}$$

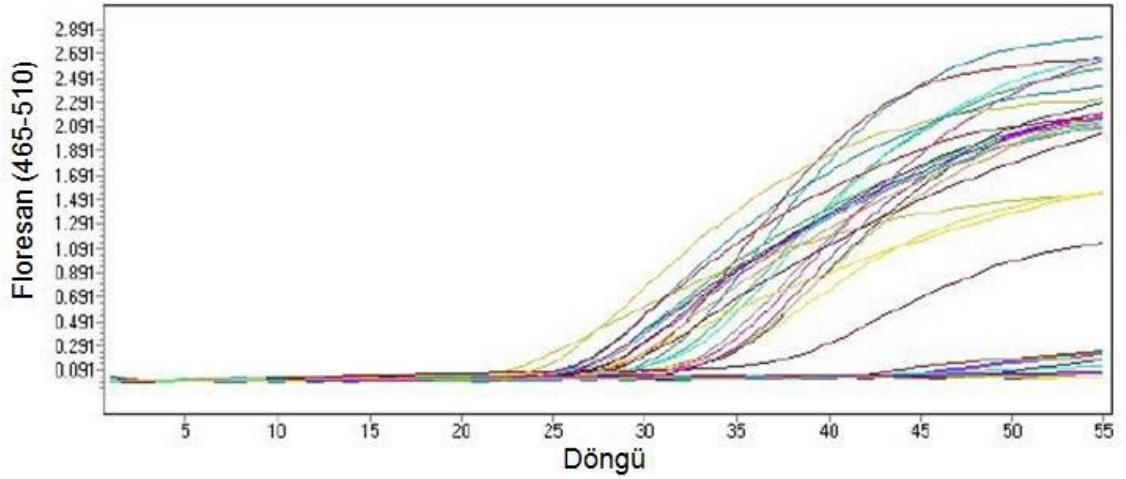
Ct, tepkime sırasında oluşan floresan sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade eder ve Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır. ΔCt değeri ise kontrol ile örneklerin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Eşitlikte belirtilen E, PCR etkinliğini, elde edilen R ise ifade oranını göstermektedir.

4. BULGULAR

4.1. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi

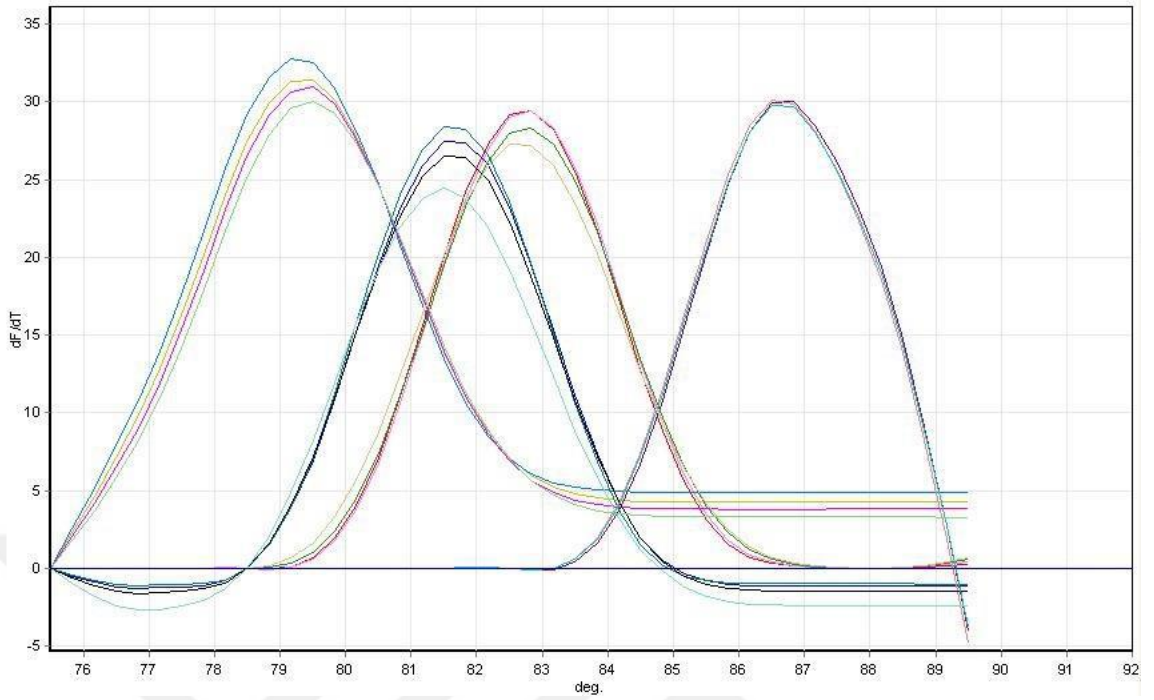
DNMT1, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *USP7* ve *UHRF1* genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için RotorGeneQ cihazı kullanılmıştır. İnsan prostat kanser hücre hatları PC3 ve LNCaP hücrelerinden ve bu hücrelerden derive eksozomlardan elde edilen cDNA’larda *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *USP7* ve *UHRF1* genlerinin normalizasyonu için seçilen *GAPDH* (Gliseralehit-3 fosfat dehidrogenaz) (referans gen) genine özgü primerler ve SYBR Green floresan boya kullanılarak çalışılmıştır.

DNMT1, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *USP7*, *UHRF1* ve *GAPDH* genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren RT-PCR (Eş-zamanlı PCR) tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *USP7*, *UHRF1* ve *GAPDH* genlerinin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. Bu genlerin RT-PCR tepkimesine ait Ct değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

Hedef genlerinin mRNA ifade düzeyinin belirlenmesinde elde edilen floresans ışımının hedef bölgenin amplifikasyonu sonucunda gerçekleştiğini gösteren erime eğrisi (melting curve) Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

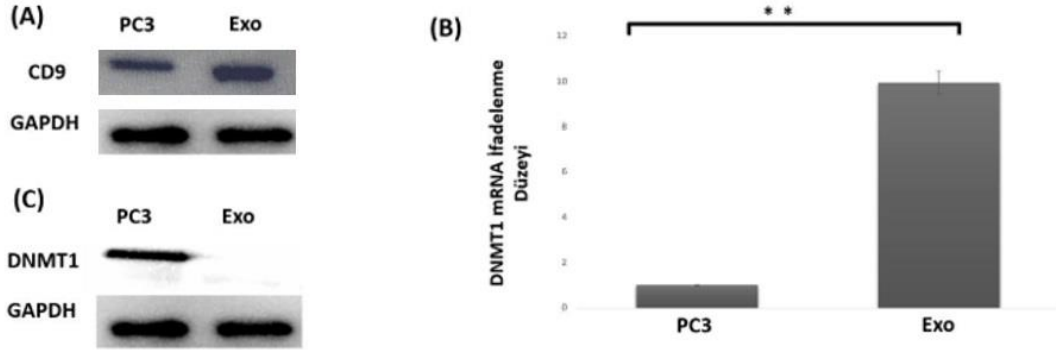


Şekil 4.2: PC3 ve LNCaP prostat kanser hücrelerinin *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* ve *GAPDH* genlerine ait erime eğrileri. Bu genlerin Erime eğrisi analizine ait sıcaklık dereceleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

4.2. 24 Saatlik Eksozomal DNMT1 Enziminin mRNA ve Protein İfadelenme Düzeyinin Belirlenmesi

Çalışmamızda ilk olarak, androjen bağımsız PC3 hücrelerinden izole ettiğimiz veziküllerin eksozom olduğunu göstermek için eksozoma özgü proteinlerden CD9 proteininin ifadenme düzeyi incelendi (Şekil 4.3 A). Eksozomal içerik heterojendir ve hücrenin kökenine, fizyolojik ve patolojik durumuna ve hücre salınım bölgesine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bununla birlikte, eksozomların bileşimi, taşınan kargonun eksozomlara seçici olarak ayrılması nedeniyle köken aldıkları hücrelerden farklılık göstermektedir (Guo ve ark., 2017). Bu nedenle, çalışmamızda ikinci hedefimiz androjen bağımsız insan prostat kanseri hücre hattı PC3 hücrelerinden izole edilen eksozomlar içerisinde DNA metilasyonundan sorumlu enzimlerden biri olan *DNMT1* mRNA ve protein düzeyinin belirlenmesi oldu. PC3 hücreleri, eksozom şartlandırma ortamında 24 saat inkübasyonunu takiben izole edilen eksozomlar içerisinde *DNMT1* mRNA'sı tespit edilirken *DNMT1* protein düzeyi tespit edilmedi (Şekil 4.3 B ve C). Bu nedenle

çalışmamızın diğer aşamalarında DNMT enzimlerinin mRNA ifadenme düzeylerine odaklanıldı.

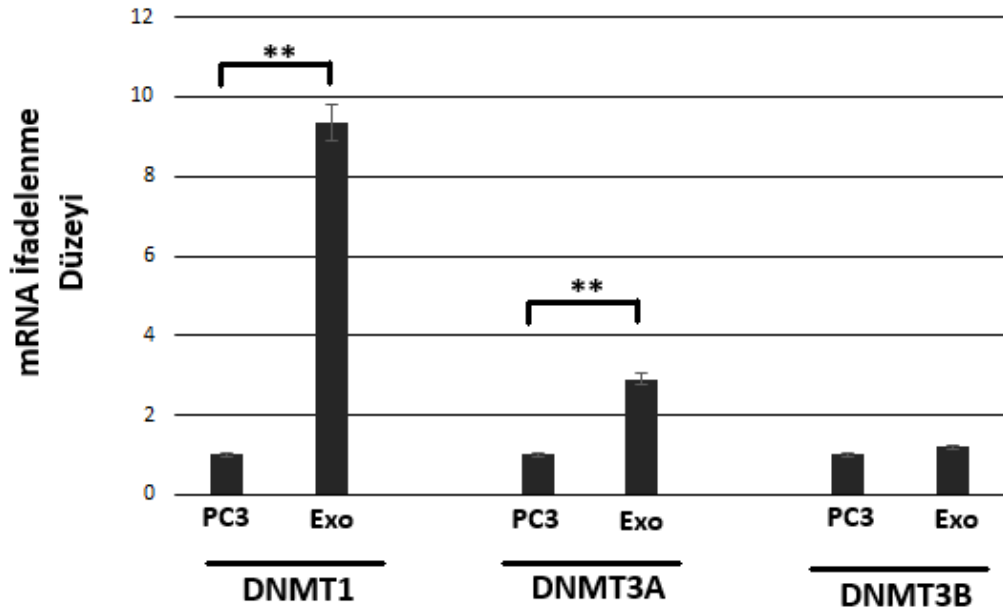


Şekil 4.3: PC3 hücrelerinde derive eksozomal DNMT1 enzim düzeyi (A) PC3 hücrelerinde derive eksozomların yüzeyinde eksozom belirteci CD9'un ifadenme düzeyi (B) PC3 hücrelerinde derive eksozomal *DNMT1* mRNA'sı ifadenme düzeyi (C) PC3 hücrelerinde derive eksozomal DNMT1 protein ifadenme düzeyi. *, $p < (0.01)$, Exo; eksozom.

4.3. Eksozomal DNMT'ların mRNA İfadenme Düzeyinin Belirlenmesi

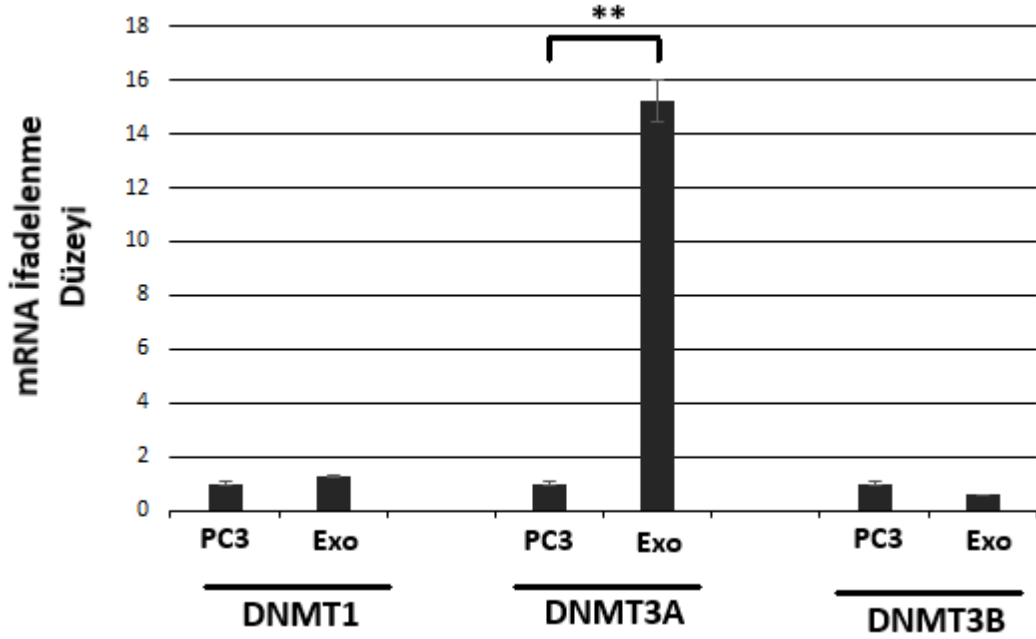
PC3 prostat kanser hücrelerinden derive eksozomlar içerisinde *DNMT1* enziminin mRNA'sının tespit edilmesini takiben çalışmamızın bir sonraki aşamasında eksozom şartlandırma ortamında 24 saatlik ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında PC3 hücrelerinden izole edilen eksozomlar içerisinde *DNMT1*, *DNMT3A* ve *DNMT3B* enzimlerinin mRNA ifadenme düzeyi incelendi.

Bu amaçla öncelikle 24 saatlik PC3 hücrelerinden derive eksozomlar içerisinde *DNMT1*, *DNMT3A* VE *DNMT3B* mRNA'larının kargo biyomolekülleri arasında olduğu tespit edildi. İlginç olarak, 24 saatlik inkübasyon sonrasında izole edilen eksozomlar içerisinde *DNMT1* ve *DNMT3A* mRNA'larının eksozomda PC3 hücrelerine nazaran önemli ölçüde daha yüksek olduğu belirlendi ($p < 0.01$). Kontrol PC3 hücrelerindeki düzeyi ile mukayese edildiğinde sırasıyla *DNMT1* mRNA düzeyi 9,85 kat, *DNMT3A* mRNA düzeyinde 2,89 kat ve *DNMT3B* mRNA düzeyinde ise 1,2 katlık bir artış belirlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: 24 saatlik PC3 kanser hücrelerinden derivate eksozomlar içerisinde *DNMT1*, *DNMT3A* ve *DNMT3B* mRNA ifadenme düzeylerindeki değişimleri. *; ($p < 0.05$), Exo; eksozom.

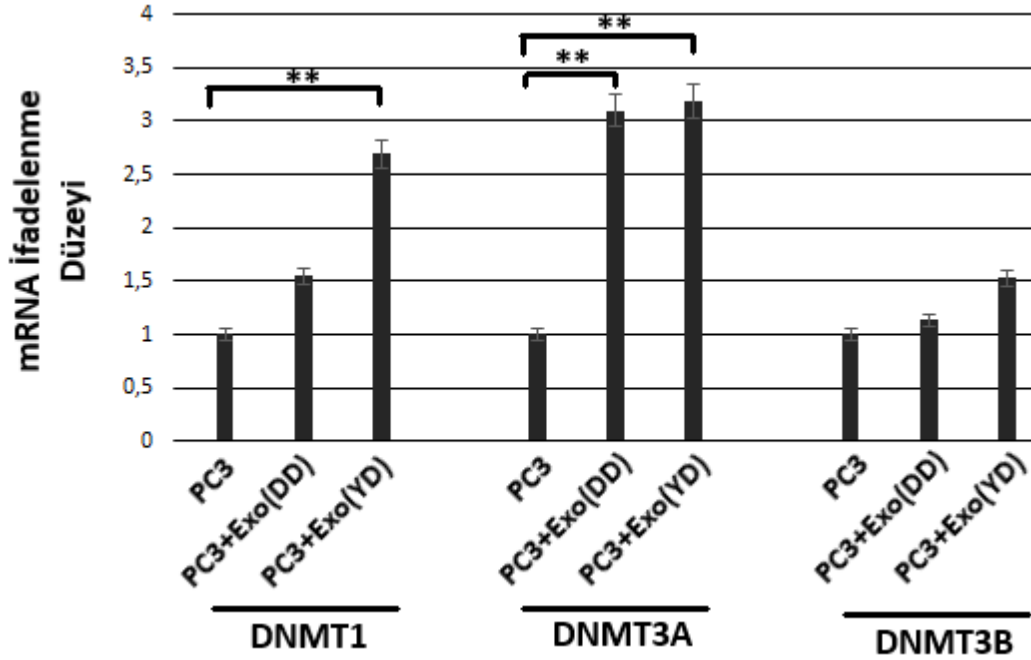
24 saatlik eksozomlarla benzer şekilde 48 saatlik inkübasyon sonrasında izole edilen eksozomlarda da sürdürme ve *de novo* DNMT enzimlerinin mRNA'ları tespit edildi ve mRNA düzeyleri PC3 hücreleri ile kıyaslandığında sırasıyla *DNMT1* mRNA düzeyi 1,26 kat ve *DNMT3A* mRNA düzeyinde 15,24 katlık artış ($p < 0.01$) belirlenirken *DNMT3B* mRNA düzeyinde ise 1,75 katlık bir azalış belirlendi (Şekil 4.5). Bununla birlikte, 24 saatlik eksozom içeriğiyle kıyaslandığında 48 saatlik eksozomlar, daha yüksek düzeyde *DNMT3A* mRNA'sı içermektedir ($p < 0.01$).



Şekil 4.5: 48 saatlik PC3 kanser hücrelerinden derive eksozomlar içerisinde *DNMT1*, *DNMT3A* ve *DNMT3B* mRNA ifadelenme düzeylerindeki değişimleri. *, $p < (0.05)$, Exo; eksozom.

4.4. 24 Saatlik Eksozomlarla Muamele Edilmiş PC3 Hücrelerinde DNMT Enzimlerinin Transkripsiyonel İfadelenme Düzeyi

Eksozomal DNMT enzimlerinin alıcı hücrelerdeki DNMT enzim düzeylerini nasıl etkilediğini belirlemek için 24 saat inkübasyonu takiben PC3 hücrelerinden derive eksozomlar PC3 hücreleriyle iki farklı konsantrasyonda; düşük (2,5 µg) ve yüksek konsantrasyonda (10 µg) inkübe edildi. 24 saat inkübasyon sonrasında düşük konsantrasyonda eksozomlarla muamele edilmiş PC3 hücrelerinde sırasıyla *DNMT1* mRNA düzeyinde 1,55 kat, *DNMT3A* mRNA düzeyinde 3,10 kat ve *DNMT3B* mRNA düzeyinde ise 1,14 katlık artma belirlendi. Düşük konsantrasyonda eksozomlarla muamele edilen hücrelerde yalnızca *DNMT3A* mRNA düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.01$). Yüksek konsantrasyonda eksozom ile muamele edilmiş hücrelerde ise sırasıyla *DNMT1* mRNA düzeyinde 2,69 kat, *DNMT3A* mRNA düzeyinde 3,18 kat ve *DNMT3B* mRNA düzeyinde 1,53 katlık bir artma belirlendi. Yüksek konsantrasyonda eksozomlarla muamele edilen hücrelerde *DNMT1* ve *DNMT3A* mRNA düzeylerindeki artma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.01$) (Şekil 4.6).

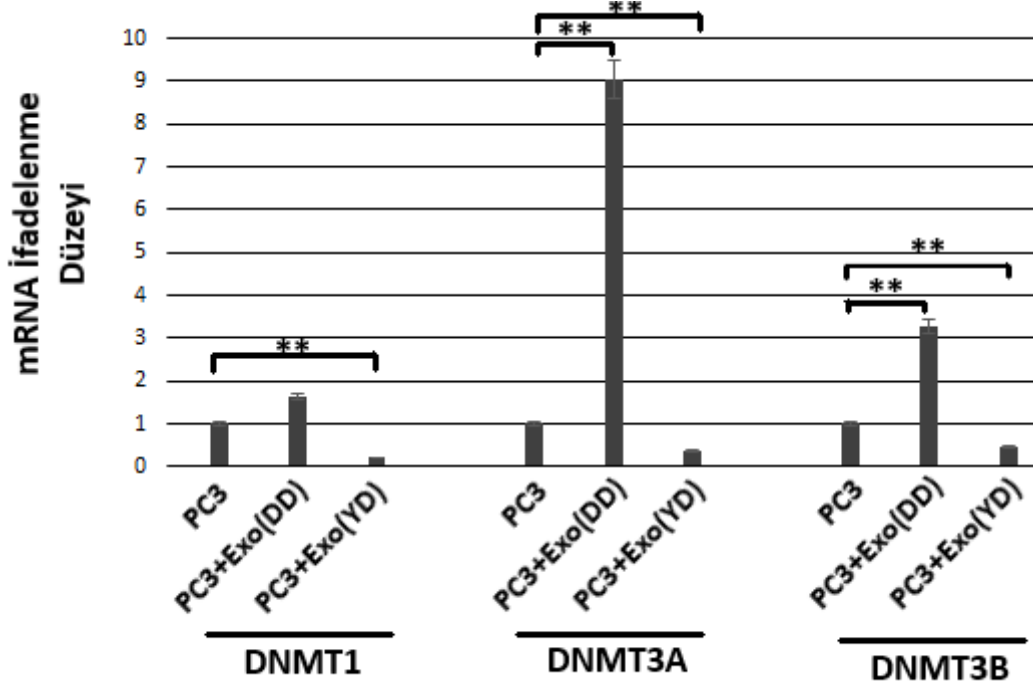


Şekil 4.6: Konsantrasyon bağımlı 24 saatlik eksozomal DNMT'lerin PC3 kanser hücrelerinde *DNMT1*, *DNMT3A* ve *DNMT3B* mRNA ifadenme düzeyi üzerine etkisi. *, ($p < 0.01$), Exo; eksozom.

4.5. 48 Saatlik Eksozomlarla Muamele Edilmiş PC3 Hücrelerinde DNMT Enzimlerinin Transkripsiyonel İfadenme Düzeyi

Eksozomal DNMT enzimlerinin alıcı hücrelerdeki DNMT enzim düzeylerini nasıl etkilediğini belirlemek için bir sonraki aşamada 48 saat inkübasyonu takiben PC3 hücrelerinden derive eksozomlar benzer şekilde PC3 hücreleri iki farklı konsantrasyonda; düşük (2,5 µg) ve yüksek konsantrasyonda (10 µg) 24 saat inkübe edildi. Düşük konsantrasyonda eksozomla muamele edilmiş PC3 hücrelerinde sırasıyla *DNMT1* mRNA düzeyinde 1,62 kat, *DNMT3A* mRNA düzeyinde 9,06 kat ve *DNMT3B* mRNA düzeyinde ise 3,29 kat artma belirlendi. Düşük konsantrasyonda eksozomlarla muamele edilen hücrelerde *de novo* DNA metiltransferaz enzimleri *DNMT3A* ve *DNMT3B* mRNA düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.01$). Yüksek konsantrasyonda eksozom ile muamele edilmiş hücrelerde ise düşük dozun tam tersine sırasıyla *DNMT1* mRNA düzeyinde 4,7 kat, *DNMT3A* mRNA düzeyinde 2,7 kat ve *DNMT3B* mRNA düzeyinde 2,22 katlık bir azalma belirlendi. Yüksek konsantrasyondaki 48 saatlik eksozom uygulaması sonrasında PC3 hücrelerinde *DNMT* enzimlerinin mRNA

ifadelenme düzeyindeki değişimler istatistiksel düzeyde anlamlı bulundu ($p<0.01$) (Şekil 4.7).

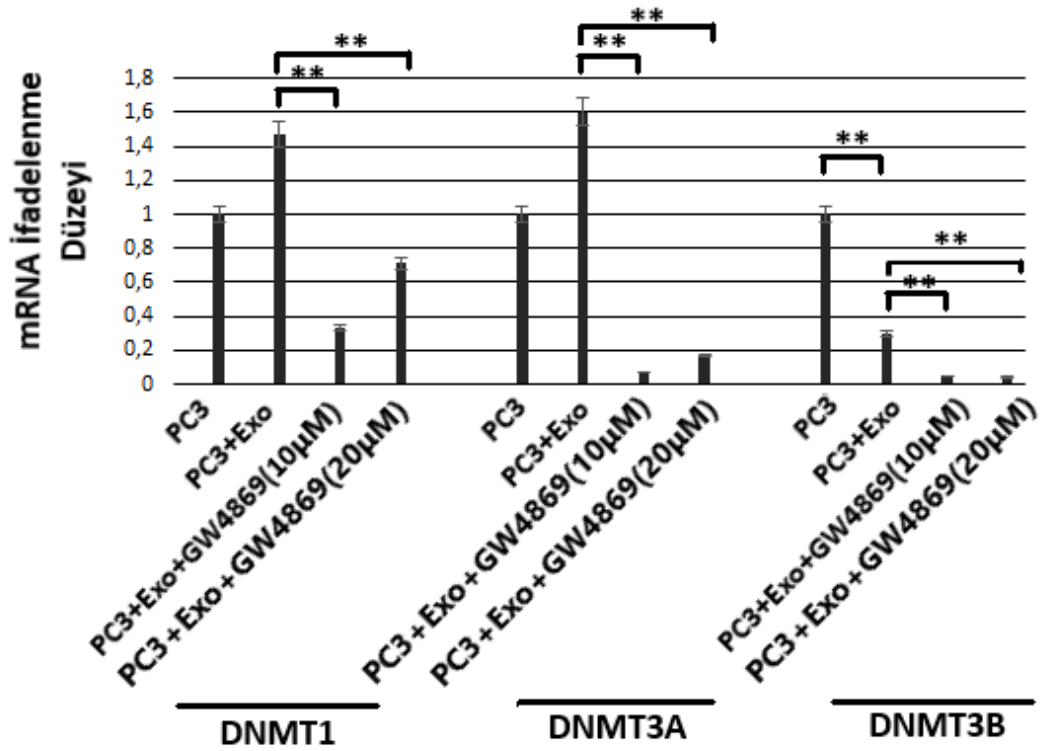


Şekil 4.7: Konsantrasyon bağımlı 48 saatlik eksozomal DNMT'lerin PC3 kanser hücrelerinde *DNMT1*, *DNMT3A* ve *DNMT3B* mRNA ifadelenme düzeyi üzerine etkisi. *, ($p<0.01$), Exo; eksozom.

4.6. Eksozom İnhibisyonunun PC3 Hücrelerinde DNMT'ların İfadelenme Düzeyine Etkisi

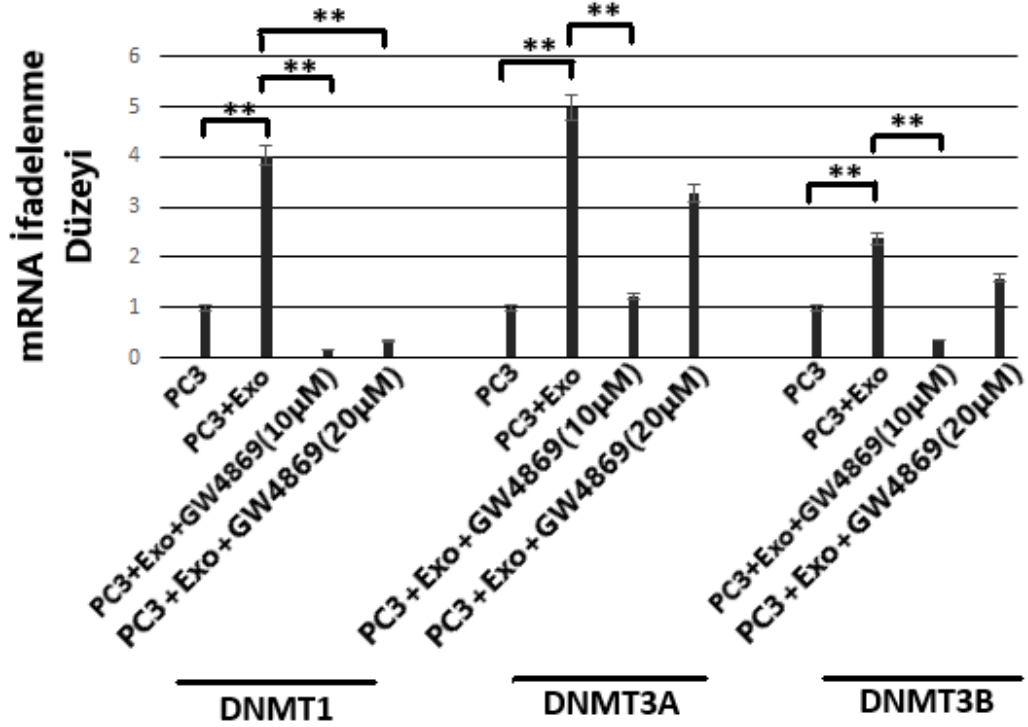
Eksozom inhibitörü GW4869, nSMaz2'in spesifik inhibitörü olup eksozom salınımını inhibe etmek suretiyle eksozomal DNMT'lerin alıcı hücrelere geçişini bloke eder (Cao ve ark., 2017). Eksozom salınımının inhibisyonunun alıcı hücredeki DNMT enzimlerinin ifadelenme düzeylerini nasıl etkilediği belirlemek için ikinci aşama olarak PC3 hücreleri 24 saat konsantrasyon bağımlı olarak eksozom inhibitörü GW4869 ile inkübe edildi. Yukarıda da belirttiğimiz üzere düşük konsantrasyonda eksozomlarla muamele edilen PC3 hücrelerinde kontrol hücrelerine nazaran *DNMT1* ve *DNMT3A* enzim düzeylerinde artış, *DNMT3B* düzeyinde ise azalma belirlendi ($p<0.05$) (Şekil 4.8). Yüksek konsantrasyonda ise *DNMT* enzim düzeylerinde artış belirlendi ($p<0.05$)(Şekil 4.9). Çalışmanın devamında kontrol hücreleri olarak düşük doz (2,5 μg) ve yüksek doz (10 μg) PC3-derive eksozomlar ile ko-kültüre edilen hücreler kullanıldı. Düşük

konsantrasyonda PC-3 derive eksozomlar 10 μ M GW4869 içeren besiyerinde 24 saat inkübasyon sonrasında PC3 hücrelerinde sırasıyla *DNMT1* mRNA ifadenme düzeyinde 4,35 kat, *DNMT3A* düzeyinde 20 kat ve *DNMT3B* düzeyinde ise 5,88 katlık bir azalma belirlenirken ($p<0.05$)(Şekil 4.6), 20 μ M GW4869 içeren besiyerinde inkübe edildiğinde ise *DNMT1* mRNA ifadenme düzeyinde 2,08 kat, *DNMT3A* düzeyinde 9,09 kat ve *DNMT3B* düzeyinde ise 7,14 katlık bir azalma saptandı ($p<0.05$)(Şekil 4.8).



Şekil 4.8: PC3 prostat kanser hücrelerinin düşük konsantrasyonda (2,5 μ g), 10 μ M ve 20 μ M konsantrasyonunda GW4869 ile 24 saat inkübasyonu sonrasında eksozom salınım inhibisyonunun *DNMT1*, *DNMT3A* ve *DNMT3B* mRNA ifadenme düzeyine etkisi. *; ($p<0.01$), Exo; eksozom.

Düşük dozla benzer şekilde yüksek doz ile PC-3 derive eksozomlar 10 μ M GW4869 içeren besiyerinde 24 saat inkübasyon sonrasında PC3 hücrelerinde *DNMT1* mRNA ifadenme düzeyinde 25 kat, *DNMT3A* düzeyinde 4,16 kat ve *DNMT3B* düzeyinde ise 6,66 katlık bir azalma belirlendi ($p<0.05$)(Şekil 4.7). 20 μ M GW4869 içeren besiyerinde inkübe edilen hücrelerde ise *DNMT1* mRNA ifadenme düzeyinde 12,5 kat, *DNMT3A* ve *DNMT3B* düzeyinde ise 1,51 katlık bir azalma belirlendi ($p<0.05$) (Şekil 4.9).



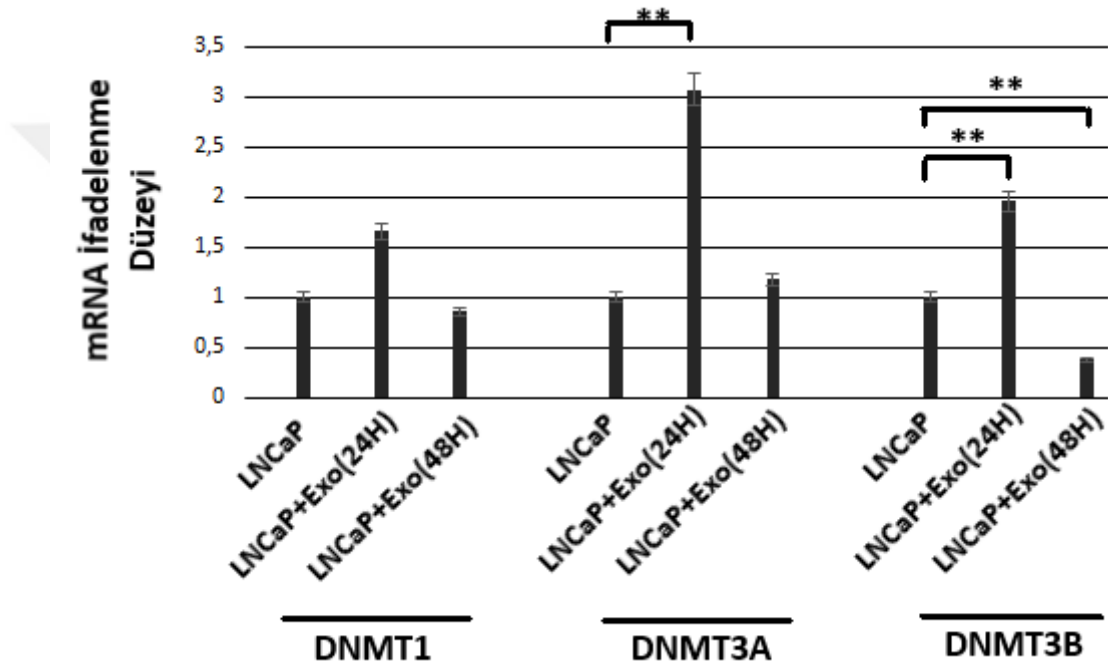
Şekil 4.9: PC3 prostat kanser hücrelerinin yüksek konsantrasyonda (10 µg), 10 µM ve 20 µM GW4869 ile 24 saat inkübasyonu sonrasında ekzozom salınım inhibisyonunun *DNMT1*, *DNMT3A* ve *DNMT3B* mRNA ifadenme düzeyine etkisi. *; ($p < 0.01$), Exo; ekzozom.

Bununla birlikte, iki farklı konsantrasyonda PC3 hücrelerinden derive ekzozomlar ve farklı dozlar da (10 µM ve 20 µM) GW4869 içeren besiyerinde inkübe edilen hücrelerde DNMT enzimlerinin ifadenme düzeyi normal PC3 hücrelerine nazaran anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi ($p < 0.01$) (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).

4.7. Androjen Bağımsız Hücrelerden Derive Ekzozomların, Androjen-Bağımlı Hücreleri İle İnkübasyonu Sonrasında DNMT Enzimlerinin Transkripsiyonel İfadenme Düzeyine Etkisi

PC3 derive ekzozomların farklı özellikteki prostat kanseri hücrelerinde DNMT enzimlerinin transkripsiyonel olarak ifadenme düzeyi üzerine etkisini incelemek için androjen bağımsız prostat kanseri hücre hattı PC3 hücrelerinden derive 24 ve 48 saatlik ekzozomlar, androjen-bağımlı prostat kanseri hücreleri LNCaP ile 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 24 saatlik PC3 ekzozomları ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde *DNMT1* mRNA ifadenme düzeyi 1,66 kat, *DNMT3A* mRNA ifadenme

düzeyi 3,07 kat ve *DNMT3B* mRNA ifadenme düzeyinde 1,96 kat artma belirlendi. *De novo* DNA metiltransferaz enzimlerinin mRNA ifadenme düzeylerinde artma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.01$). 48 saatlik PC3 derive eksozomlar ile 24 saat ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde ise *DNMT1* mRNA düzeyinde 1,16 kat ve *DNMT3B* mRNA ifadenme düzeyinde 2,63 kat azalma gözlemlenirken *DNMT3A* düzeyinde ise 1,18 katlık bir artma belirlendi. *DNMT3B* mRNA ifadeleme düzeyindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$) (Şekil 4.10).

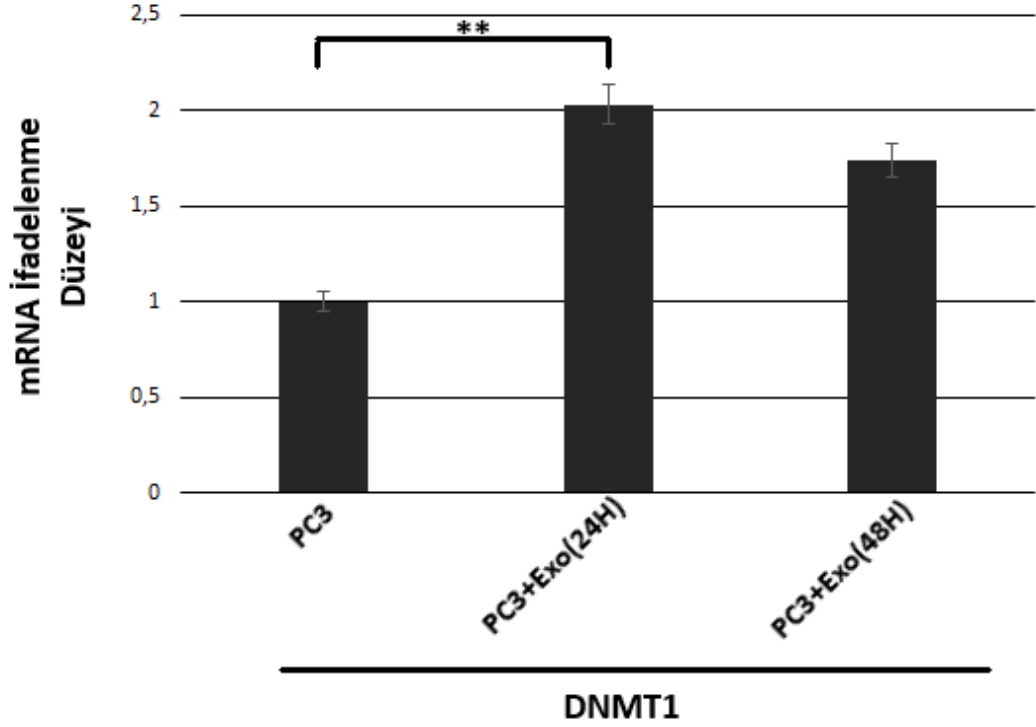


Şekil 4.10: PC3 derive 24 saatlik ve 48 saatlik eksozomların LNCaP ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B enzimlerinin transkripsiyonel ifadenme düzeyindeki değişimler. *; ($p<0.01$), Exo; eksozom.

4.8. Androjen Bağımlı Hücrelerden Derive Eksozomların, Androjen-Bağımsız Hücreleri İle İnkübasyonu Sonrasında DNMT Enzimlerinin Transkripsiyonel İfadenme Düzeyine Etkisi

Çalışmamızın bir sonraki aşamasında ise androjen-bağımlı prostat kanseri hücre hattı LNCaP'den derive 24 ve 48 saatlik eksozomlar ile androjen-bağımsız prostat kanseri hücreleri PC3 ile 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 24 saatlik LNCaP eksozomları ile muamele edilen LNCaP hücrelerinde *DNMT1* mRNA ifadenme düzeyi 2,03 kat ve 48 saatlik LNCaP eksozomları ile muamele edilen PC3 hücrelerinde ise 1,74

kat artma belirlendi. 24 saatlik LNCaP eksozomları ile muamele edilen PC3 hücrelerindeki *DNMT1* mRNA ifadenme düzeyindeki artma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.11).

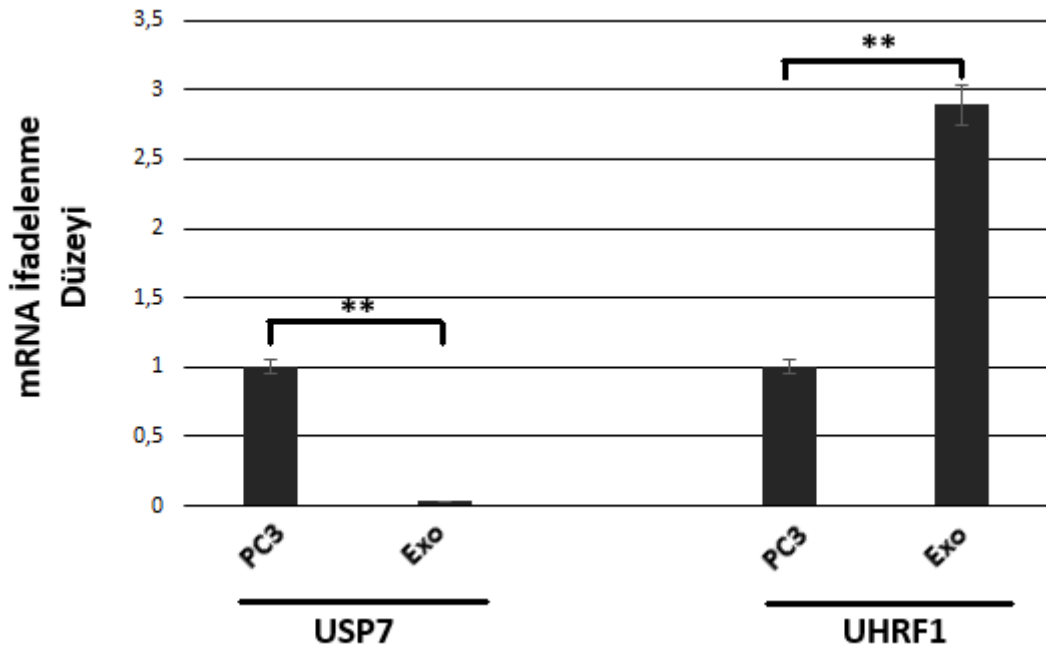


Şekil 4.11: LNCaP derive 24 saatlik ve 48 saatlik eksozomların PC3 ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında DNMT1 enziminin transkripsiyonel ifadenme düzeyindeki değişimler. *, ($p < 0.01$), Exo; eksozom.

4.9. PC3 Hücrelerinde Eksozomal *USP7* ve *UHRF1* Genlerinin İfadenme Düzeyleri

Çalışmamızın bir sonraki aşamasında zaman ve konsantrasyon bağımlı olarak eksozomlar ile muamele edilen PC3 hücrelerinde *DNMT1* enziminin mRNA düzeyindeki azalma ve/veya artmanın DNMT1'in stabilitesinden sorumlu enzimlerden kaynaklanıyor olabileceği düşüncesiyle DNMT1'in stabilitesinden sorumlu enzimler USP7 ve UHRF1'in eksozom içerisindeki ve hücredeki ifadenme düzeylerini inceledik. DNMT1 enziminin aktivitesi için posttranslasyonel modifikasyonların yanı sıra çeşitli proteinler ile etkileşime girmesi gereklidir. PHD ve RING parmak içeren ubiquitin benzeri domain 1 (UHRF1) proteini, DNMT1 enziminin en önemli kofaktörlerinden biridir. Hücre döngüsünün S fazı süresince hemimetile DNA bölgelerine DNMT1'in toplanmasına

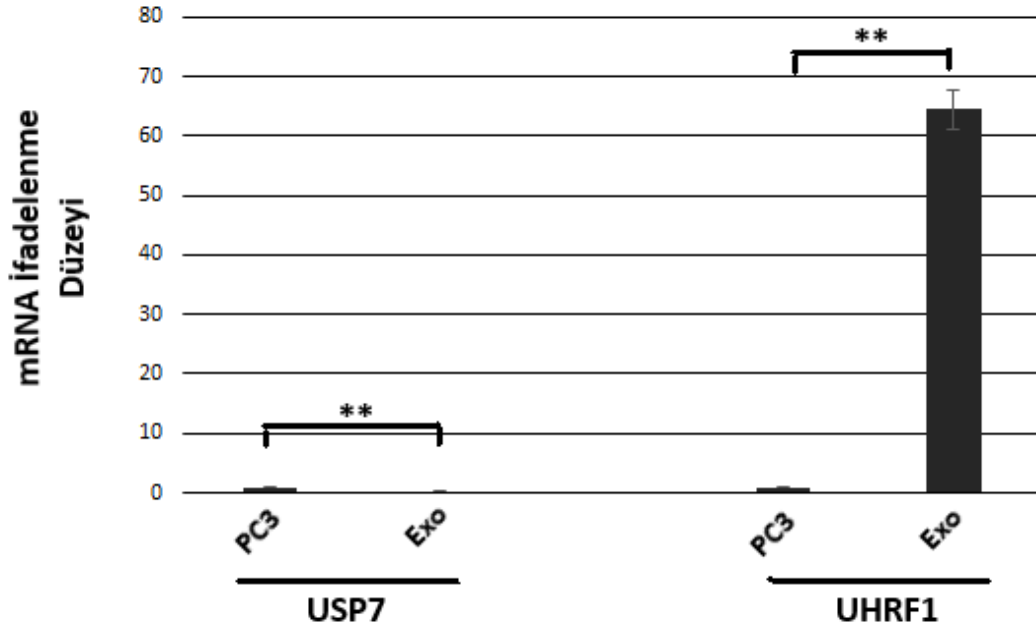
aracılık eder ve aynı zamanda geç S fazı süresince E3 ubiquitin ligaz olan UHRF1, DNMT1'i ubiquitinleyerek DNMT1 enziminin proteolitik parçalanmasına neden olur UHRF1'in aksine deubiquitinaz Herpes ilişkili ubiquitin spesifik proteaz (HAUSP/USP7) ise DNMT1'i deubiquitinleyerek proteolitik parçalanmadan korur (Bostick ve ark.,2007; Du ve ark., 2010). Çalışmamızın bu aşamasında öncelikle 24 saatlik ve 48 saatlik PC3-derive eksozomlar içerisinde *USP7* ve *UHRF1* mRNA düzeylerinin belirlenmesi oldu (Şekil 4.12 ve 4.13). PC3-derive 24 saatlik eksozomlar içerisinde, PC3 hücrelerine nazaran *USP7* mRNA'sının eksozom içerisinde oldukça düşük düzeyde olduğu belirlenmesine karşın *UHRF1* mRNA'sının eksozomda önemli ölçüde yüksek olduğu tespit edildi. PC3 hücreleri ile mukayese edildiğinde sırasıyla *USP7* mRNA düzeyinde 32.45 katlık bir azalma ve *UHRF1* mRNA düzeyinde ise 2.89 katlık bir artış belirlendi ($p<0.01$) (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: 24 saatlik PC3 kanser hücrelerinden derive eksozomlar içerisinde *USP7* ve *UHRF1* mRNA ifadenme düzeylerindeki değişimleri. *, ($p<0.05$), Exo; eksozom.

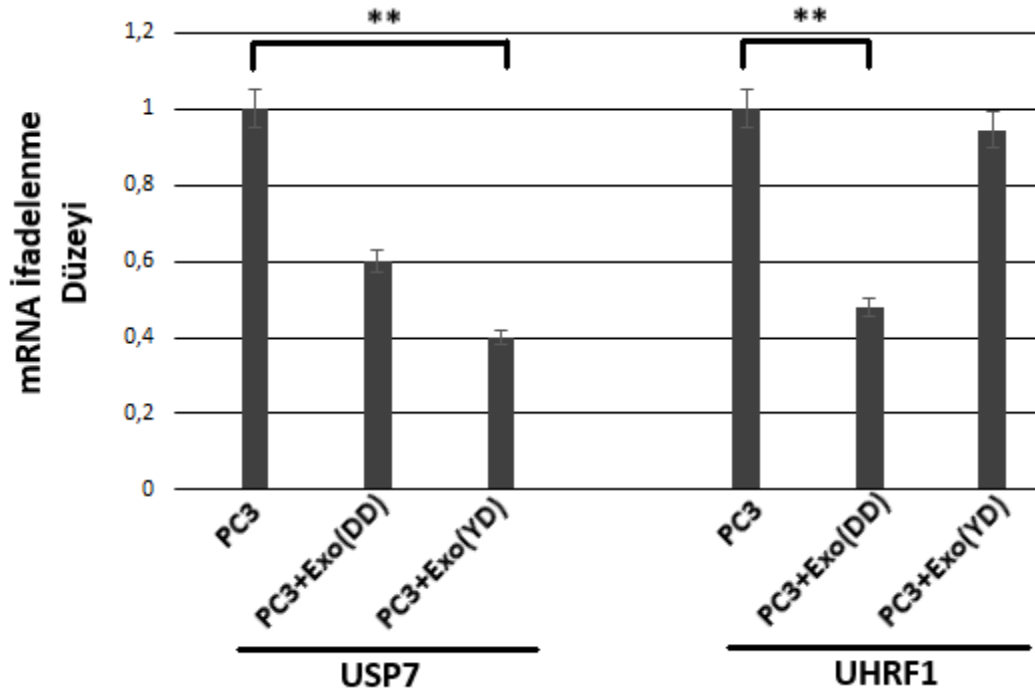
PC3-derive 48 saatlik eksozomlar içerisinde de benzer şekilde *USP7* mRNA'sının eksozom içerisinde oldukça düşük düzeyde olduğu ve *UHRF1* mRNA'sının eksozomda önemli ölçüde daha yüksek olduğu tespit edildi. PC3 hücreleri ile mukayese edildiğinde

sırasıyla *USP7* mRNA düzeyinde 3,7 katlık bir azalma ve *UHRF1* mRNA düzeyinde ise 64,45 katlık bir artış belirlendi ($p<0.01$) (Şekil 4.13).



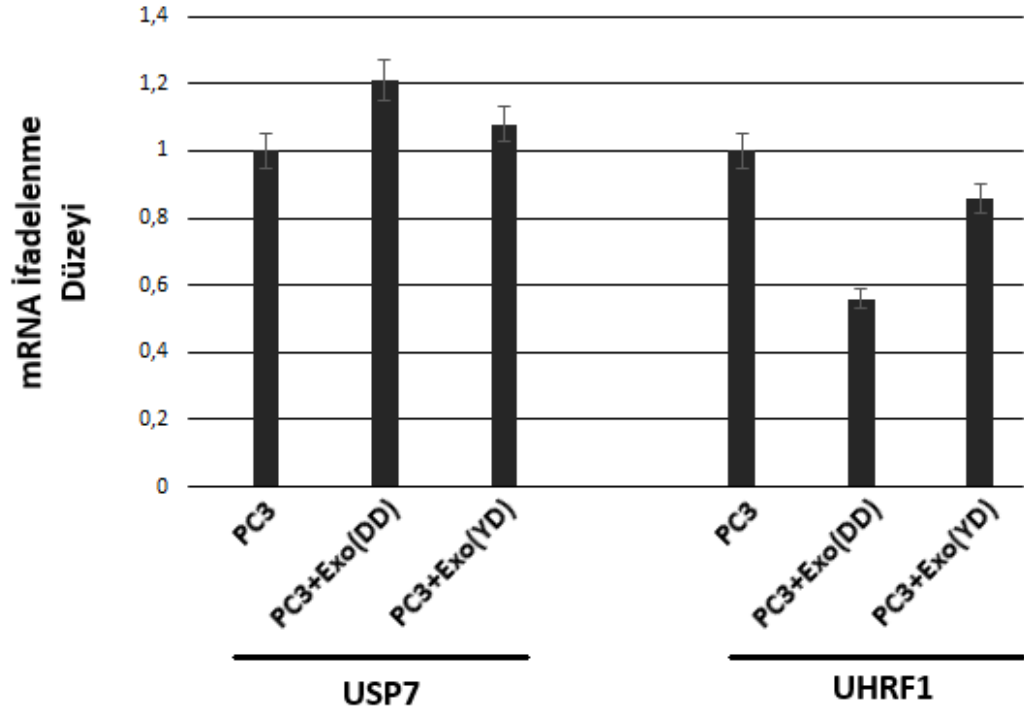
Şekil 4.13: 48 saatlik PC3 kanser hücrelerinden derivate eksozomlar içerisinde *USP7* ve *UHRF1* mRNA ifadenme düzeylerindeki değişimleri. *, ($p<0.05$), Exo; eksozom.

Çalışmamızın bir sonraki aşamasında ise farklı konsantrasyonlarda PC3-derive eksozomlar ile muamele edilmiş PC3 hücrelerinde *USP7* ve *UHRF1* mRNA düzeyleri incelendi. Düşük konsantrasyonda (2,5 μ g) 24 saatlik PC3-derive eksozomlarla 24 saat inkübasyon sonrasında PC3 hücrelerinde sırasıyla *USP7* mRNA düzeyinde 1.66 kat ve *UHRF1* mRNA düzeyinde ise 2 katlık azalma belirlendi ve düşük konsantrasyonda eksozomlarla muamele edilen hücrelerde yalnızca *UHRF1* mRNA düzeyindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.01$). Yüksek konsantrasyonda (10 μ g) eksozom ile muamele edilmiş hücrelerde ise sırasıyla *USP7* mRNA düzeyinde 2.5 kat ve *UHRF1* mRNA düzeyinde 1.1 katlık azalma belirlendi ve yüksek konsantrasyonda eksozomlarla muamele edilen hücrelerde *USP7* mRNA düzeyindeki artma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.01$) (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: Doz bağımlı 24 saatlik eksozomal DNMT'lerin PC3 kanser hücrelerinde *USP7* ve *UHRF1* mRNA ifadenme düzeyi üzerine etkisi. *, ($p < 0.01$), Exo; eksozom.

Son olarak 48 saatlik PC3-derive eksozomlarla 24 saat inkübasyon sonrasında düşük konsantrasyonda *USP7* mRNA düzeyinde 1,21 kat artma ve *UHRF1* mRNA düzeyinde ise 1,78 katlık azalma belirlendi ve bu artma/azalma istatistiksel olarak anlamsız bulundu. Yüksek konsantrasyonda ise sırasıyla *USP7* mRNA düzeyinde 1,08 kat artma ve *UHRF1* mRNA düzeyinde ise 1,16 katlık azalma belirlendi. Yüksek konsantrasyonda 48 saatlik eksozomlarla muamele edilen hücrelerde *USP7* ve *UHRF1* mRNA düzeylerindeki artma/azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: Doz bağımlı 48 saatlik eksozomal DNMT'lerin PC3 kanser hücrelerinde *USP7* ve *UHRF1* mRNA ifadenme düzeyi üzerine etkisi. Exo; eksozom.

5. TARTIŞMA

Ekstraselüler veziküllerin (EV'ler), prostat kanserinin erken teşhisi için gelecekteki hastaların prognozuna ve tedavilerine kişiselleştirilmiş bir yaklaşımda bulunarak anahtar biyobelirteçler olabileceği düşünülmektedir. Prostat kanseri hastalarının kan ve idrarlarından derive EV'ler, prostat kanserinin biyobelirteci olabilecek spesifik biyomoleküller içerir. Eksozomların, yüzeylerinde birçok farklı protein bulunur. Bu proteinler, mono- veya poliklonal olarak farklı antikolar kullanılarak tanınan epitoplara olarak hareket edebilirler. Kan plazmasındaki eksozomların prostat kanseri için belirteç olarak kullanıp kullanılamayacağını belirlemek için özel bir deney oluşturulmuştur. Bu çalışmada, çeşitli EV-türevli proteinler, klinik ortamlarda potansiyel kanser biyobelirteçleri olarak araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda, birkaç üriner eksozom proteinleri, prostat kanseri için ayrı biyobelirteç olarak yüksek bir duyarlılık ve özgüllükte olduğu göstermiştir ve bunların çok panelli bir testte birleştirilmesi, prostat kanserinin hasta olmayan kontrollerden tam olarak ayrılmasını sağlayacak potansiyele sahip olduğu ifade edilmiştir. Çalışmalar, üriner eksozomlar, prostat kanserinin teşhisinde, prognozunda ve izlenmesinde potansiyel bir kullanıma sahip, ümit verici, invazif olmayan biyobelirteç olabileceğini vurgulamaktadır (Lorenc ve ark., 2020).

Son yıllardaki çalışmalarda eksozomların alıcı hücrenin epigenetik yeniden düzenlenmesinde de önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, eksozomal miRNA'lara odaklanılmış olsa da over kanser hücrelerinde CpG adacıklarının DNA metilasyonundan sorumlu olan DNA metiltransferaz enziminin (*DNMT1*) mRNA'sının eksozomal kargo molekülleri arasında olduğu belirtilmiştir (Cao ve ark., 2017). Benzer şekilde farklı iki çalışmada da yine DNMT enzimlerinin eksozomal kargo biyomolekülleri arasında yer aldığı gösterilmiştir (Tang ve ark., 2018; Dakhallah ve ark., 2019).

DNA metilasyonu en çok çalışılan ve en önemli epigenetik mekanizmlardan biridir. CpG adacıklarının metilasyonundan sorumlu primer enzimler DNA metiltransferazlar olup kanser hücrelerinde özellikle tümör baskılayıcı genlerin nonmutasyonel olarak baskılanmalarından sorumludurlar (Hermann ve ark., 2004; Turek-Plewa ve Jagodziński, 2005). Günümüze kadar tanımlanmış beş memeli DNMT enzimi vardır; DNMT1,

DNMT2, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L (Dakhlallah ve ark., 2019). DNA metiltransferazlar, fonksiyonel aktivitelerine ve hedef substratlarına göre *de novo* DNA metiltransferazlar (DNMT3A ve DNMT3B) ve sürerlik DNA metiltransferazlar (DNMT1) olmak üzere iki gruba ayrılır. Gelişimin erken döneminde metilasyon örüntüsü *de novo* DNA metiltansferazlar (DNMT3A ve DNMT3B) aracılığıyla postreplikasyon olarak gerçekleştirilirken (aktif DNA metilasyonu) sürerlik DNA metiltransferaz enzimi (DNMT1) ise replikasyon esnasında (pasif DNA metilasyonu) ve hemimetile bölgelerde DNA metilasyon örüntüsünün korunmasını sağlar (Hermann ve ark., 2004; Turek-Plewa ve Jagodziński, 2005). DNMT'ler arasındaki bu farklı epigenetik fonksiyonlar ayrıcalıklı değildir ve örtüşebilirler. DNMT2, düşük DNA metilasyon aktivitesine sahip olup transfer RNA metiltransferazdır. DNMT3L ise enzimatik aktivitesi yoktur ancak DNMT3A/3B ve diğer baskılayıcı komplekslerle etkileşime girerek gametogenez süresince metilasyon kalıbını oluşturulmasını sağlar (Dakhlallah ve ark., 2019). Kanserde içerisinde yer aldığı bir çok hastalık tipinde DNMT enzimlerinin transkripsiyonel ve translasyonel olarak ifadenme düzeylerinde değişimlere sıklıkla karşılaşılmaktadır. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi prostat kanserinde de DNMT enzimlerinin ifadenme düzeyi artmaktadır. Tzelepi ve ark.larının çalışmasında (2020) ilk olarak prostat kanserinin progresyonunda erken dönemde DNMT1 ve DNMT3L'in ifadenme düzeyi arttığını göstermiştir. Ayrıca bu çalışmalarında androjen ablasyonuna cevaben DNMT2 enzim düzeyi arttığını da bildirmişlerdir. Buna ilaveten ileri evrede DNMT1, DNMT2 ve DNMT3L enzimlerinin ifadenme düzeyide arttığını ve son olarak primer karsinom örneklerine nazaran lenf nodu metastas örneklerinde DNMT1, DNMT2 ve DNMT3L düzeyinde artış olduğu belirlemişlerdir (Tzelepi ve ark., 2020). Bu bilgilerin ışığında, çalışmamızda ilk olarak prostat kanseri derive eksozomlar içerisinde DNMT mRNA'larının kargo moleküllerden biri olup olmadığını, ikinci olarak, eksozomal DNMT'lerin alıcı hücredeki DNMT ifadenme düzeyini nasıl etkilediği ve son olarak spesifik eksozom inhibitörlerin DNMT ifadenmesi üzerine etkisini belirlemeyi amaçladık.

Cao ve ark.ları (2017)'de over kanseri hücre hattında yaptığı çalışmada eksozomlar içerisinde *DNMT1* mRNA'sının bulunduğunu göstermişlerdir. Dakhlallah ve ark. çalışmasında (2019), sepsis ve septik şok hastalarının serumlarından izole edilen

ekstrasellüler veziküllerin kargo moleküller arasında *DNMT1*, *DNMT3A* ve *DNMT3B* mRNA'sında bulunduğunu göstermişlerdir. Tang ve ark.larının (2018) çalışmasında ise indüklenmiş pluripotent kök hücre hattı iPS (IMR-90)-4 hücrelerinden derive eksozomlarda ise *DNMT3B* translasyonel düzeyde kargo molekülleri arasında yer aldığı belirtilmiştir. Bizde çalışmamızda benzer şekilde öncelikle ilk kez prostat kanser hücrelerinden izole edilen eksozomlar içerisinde sadece *DNMT1*'in mRNA'sını tespit ederken *DNMT1* translasyonel düzeyde kargolanmadığını belirledik. Bununla birlikte, yine ilk kez bu eksozomlar içerisinde *de novo* DNA metiltransferazların mRNA'larının da (*DNMT3A* ve *DNMT3B*) yer aldığını belirledik. Çalışmamızda 24 saatlik androjen bağımsız prostat kanser hücrelerinden derive eksozomlarda *DNMT1* ve *DNMT3A* mRNA'larının ve 48 saatlik eksozomlar içerisinde ise yalnızca *DNMT3A* mRNA düzeyinin hücrenin normal içeriğine göre daha yüksek düzeyde bulunduğunu belirledik ($p<0.01$). *DNMT1*'in 48 saatlik eksozomlarda düşük düzeyde bulunması öncelikle *DNMT1*'in hücre döngüsü bağımlı olarak sentezlenmesinden kaynaklanıyor olabilir. Bildiğimiz gibi hücrede erken S fazında *DNMT1*'in ifadenme düzeyi artarken geç S fazında ise posttranslasyonel modifikasyonlar aracılığıyla degrade edilmektedir. Ayrıca, mRNA ömrü, miRNA'lar gibi posttranskripsiyonel mekanizmalar ve/veya translasyonu bu duruma katkı sağlıyor olabilir. Aynı şekilde eksozomların kargo molekülleri arasında spesifik olarak *DNMT*'leri hedefleyen miRNA'larda yer almakta ve hedef hücrede *DNMT* ifadenmesini negatif yönde etkilemektedir. Örneğin, septik SHY5Y hücrelerinden derive eksozomal miR-126 alıcı hücrede *DNMT1*, *DNMT3A* ve *DNMT3B* transkriptlerinin ifadenmesini azalttığı gösterilmiştir (Cui ve ark., 2020). *DNMT1* ifadenme düzeyinde azalmaya karşın 24 saatlik eksozomlara nazaran 48 saatlik eksozomlarda *DNMT3A* düzeyinde anlamlı bir artış bulunmaktadır ($p<0.01$). Bu durum gösteriyor ki prostat kanseri hücrelerinde *WIF-1* gibi spesifik genlerin DNA metilasyonundan *DNMT3A* enzimi sorumlu olabilir.

Cao ve ark.ları çalışmalarında (2017) over hücre hattı SKOV3 hücrelerinden derive eksozomları yüksek konsantrasyonda aynı hücrelerle 24 saat inkübe ettiğinde hücrelerde *DNMT1* mRNA ifadenme düzeyinin arttığını belirlemiştir. Bu çalışmalarında ayrıca eksozomlarla muamele edilen hücrelerde sisplatine karşı direncin arttığı ve hücrelerde apoptoz düzeyinin de azaldığını gözlemlemiştir. Bununla birlikte SKOV3

hücrelerinden izole edilen eksozomların over kanseri farelerde tümör hacmini arttırdığını ve yaşam süresini önemli ölçüde azalttığını gözlemlemişlerdir. Bizde çalışmamızda iki farklı konsantrasyonda (düşük konsantrasyon; 2,5 µg ve yüksek konsantrasyon; 10 µg) eksozomlarla aynı hücreler inkübe edildiğinde bu hücrelerde 24 saatlik inkübasyon sonrasında *DNMT* mRNA düzeylerinde bir artış olduğunu, *DNMT1* ve *DNMT3A* mRNA ifadenme düzeyindeki artışın ise istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirledik. 48 saatlik inkübasyonda ise düşük konsantrasyonda *DNMT3A* ve *DNMT3B* mRNA düzeylerinde anlamlı bir artış belirlenirken yüksek konsantrasyon uygulanan hücrelerde ise *DNMT* mRNA düzeylerinde anlamlı bir azalma belirlendi ($p<0.01$). Bilindiği gibi eksozomlar içerik içerisinde en sık rastlanan kargo molekülleri arasında miRNA'lar da yer almaktadır. Bu nedenle yüksek konsantrasyonda eksozom uygulanan hücrelerdeki miRNA düzeyinin artışı *DNMT* mRNA'larını negatif yönde etkiliyor olabilir. Ayrıca hücredeki *DNMT* mRNA'ların posttranskripsiyonel ve/veya posttranslasyonel modifikasyonlarının yanı sıra bu hücrelerin replikasyon zamanına göre *DNMT*'lerin mRNA ifadenme düzeyi değişmektedir.

Eksozom inhibitörü GW4869, nSMaz2'in spesifik inhibitörü olup eksozom salınımını inhibe eder. Che ve ark.larının çalışmasında (2019) androjen bağımsız hücre hattı PC3 ile eksozom inhibitörü GW4869 ile 48 saat inkübasyon sonrasında eksozomal miR-143 düzeyinde azalma olduğunu gözlemlemişlerdir. Bizde çalışmamızda eksozom salınımını spesifik olarak inhibe eden GW4869 içeren besiyerinde aynı deneyi tekrarladığımızda eksozomal *DNMT* enzimlerinin ifadenme düzeyi önemli derecede azaldığını belirledik. Ayrıca özellikle düşük konsantrasyonda GW4869 içeren besiyerine inkübe edilen hücreler eksozomla muamele edildiğinde kontrol hücrelerine (PC3+exo) nazaran *DNMT* ifadenme düzeyleri önemli ölçüde azalmıştır. Bu durum eksozom aracılı miRNA taşınması azalmasından dolayı *DNMT*'leri hedefleyen miRNA'lar tarafından *DNMT* mRNA'ları degrade olabilir. Düşük konsantrasyon ve yüksek konsantrasyon GW4869 içeren besiyerinde inkübe edilen hücreler kıyaslandığında ise yüksek konsantrasyon GW4869 içeren besiyerinde inkübe edilen hücrelerde *DNMT* enzimlerin ifadenme düzeyi artmaktadır. Ayrıca eksozom ile muamele edilmemiş PC3 hücreleri ile karşılaştırıldıklarında ise her iki konsantrasyonda da *DNMT* ifadenme düzeylerinin azaldığı belirledik. Bu sonucumuz ayrıca göstermektedir ki, kanser hücrelerinde eksozom

spesifik inhibitörler DNMT ifadenmesinin baskılanmasında önemli terapötik ajanlar olabilir. Buna karşın, Cao ve ark.larının çalışmasında (2017) da benzer sonuçlar gözlemlenmesine karşın GW4869 ve eksozom ile muamele edilen hücreler ile muamele edilmemiş hücrelerde *DNMT1* ifadenme düzeyinde bir farklılık bulunmamışlardır.

Çalışmamızın bir sonraki aşamasında androjen bağımsız hücrelerden farklı özelliklerdeki prostat kanseri hücrelerinden derive eksozomların uygulaması sonrasında DNMT enzim düzeylerinde etkisi nasıl diye incelediğimizde ister androjen bağımsız hücrelerden derive eksozomları androjen bağımlı hücrelerle inkübe ettiğimizde ister androjen bağımlı hücrelerden derive eksozomlarla androjen-bağımsız hücreleri inkübe ettiğimizde aynı hücre derive eksozomlarla muamele edilen hücrelere benzer şekilde DNMT enzimlerinin transkripsiyonel ifadenme düzeylerinde artış belirledik. Bu durum gösteriyor ki, hedef hücre özelliği ayırt etmeksizin prostat kanseri hücrelerinden derive eksozomlar alıcı hücrede DNMT enzimlerinin ifadenme düzeyini pozitif yönde etkilemektedir.

Biz daha önceki çalışmamızdan biliyoruz ki, DNMT1'in posttranslasyonel modifikasyonlar aracılığıyla ifadenme düzeyinde önemli etkisi olan iki protein USP7 (Herpes ilişkili ubiquitin özgü proteaz, HAUSP) ve UHRF1 (PHD ve RING parmak içeren ubiquitin benzeri domain1) proteinleridir. UHRF1, DNA metilasyonunun devamlılığı için DNMT1'in kritik kofaktörlerinden biridir ve ayrıca E3 ligazdır. USP7 ise ubiquitin dekonjugasyon enzimlerinden biri olup DNMT1'in deubiquitine edilmesinden sorumludur. Replikasyonun erken S fazında UHRF1, hemimetile bölgelerde DNMT1 enzimin toplanmasına aracılık ederken geç S fazında ise ubiquitinlemek suretiyle DNMT1'in proteozom aracılı parçalanmasına aracılık etmektedir. USP7 ise UHRF1 aracılı ubiquitinlenmeye karşı DNMT1 enzimini korur (Varol ve ark., 2014). 24 saatlik ve 48 saatlik eksozom içeriğini karşılaştırdığımızda 24 saatlik eksozomlarda daha yüksek düzeyde DNMT1 mRNA'sı ile karşılaştık. Benzer şekilde yüksek konsantrasyonda eksozomlarla muamele edilen hücrelerde 24 saatlik inkübasyon sonrasında *DNMT1* ifadenme düzeyinde önemli derecede artış belirlerken 48 saatlik eksozomlarla 24 saatlik inkübasyon sonrasında ise önemli derecede DNMT1 mRNA'sında azalma belirledik. Bu durum aklımıza DNMT1'in stabilitesinden sorumlu enzimlerle ilişkili olabileceğini getirdi. Bu hipotezimizi test etmek için öncelikle eksozom

içeriğine baktığımızda hem *USP7* hem de *UHRF1* prostat kanseri derive eksozomların kargo molekülleri arasında yer aldığını gözlemledik. Özellikle *UHRF1* zaman bağımlı olarak eksozomlar içerisinde düzeyi artmaktadır. Ancak alıcı hücrede hem *USP7* hem de *UHRF1* mRNA ifadenme düzeyinde kontrol hücrelerine kıyasla zaman ve doz bağımlı olarak önemli bir değişiklik belirlemedik. Bu durum bize, *USP7* ve *UHRF1*'in ifadenme düzeylerinden bağımsız olarak alıcı hücrede *DNMT* enzimlerinin ifadenme düzeylerindeki farklılıkların bu enzimlerin posttranskripsiyonel ve/veya posttranslasyonel düzeyde düzenlenmesinden kaynaklandığını düşündürmektedir.

Elde ettiğimiz bulgularla literatürde ilk kez prostat kanseri hücrelerinden derive eksozomal kargo molekülleri arasında *DNMT* enzimlerinin mRNA'larının da yer aldığını gösterdik. Bununla birlikte eksozomal *DNMT*'lerin alıcı hücrelerde *DNMT*'lerin ifadenme düzeyine önemli etkisi olduğunu belirledik. Bu bulgumuz eksozomal *DNMT* mRNA'larının alıcı hücrede DNA metilasyonunun yeniden programlanmasına aracılık edebileceğini göstermektedir. Bu bulgunun desteklenmesi için ilave çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca prostat kanseri hücrelerinin spesifik eksozom inhibitörü GW4869 ile inkübasyonu sonrasında hücrelerden derive eksozom ile muamele edilen ve edilmeyen hücrelerde *DNMT*'lerin ifadenme düzeyindeki azalmaya neden olması eksozom inhibitörlerinin *DNMT* inhibitörleri olarak kullanılabileceğini akla getirmektedir. Ancak bu sonucunda ilave çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız bu çalışmanın sonucunda ;

- İlk olarak, literatürde ilk kez prostat kanser hücrelerinden derive eksozomlar içerisinde sürdürme DNMT enzimi *DNMT1*'in ve *de novo* DNMT enzimleri *DNMT3A* ve *DNMT3B* enzimlerinin transkripsiyonel düzeyde bulunduğunu belirledik.
- Androjen bağımsız prostat kanser hücresi PC3-derive eksozomların aynı hücrelerle konsantrasyon ve zaman bağımlı olarak inkübe ettiğimizde DNMT enzimlerinin alıcı hücrede konsantrasyon bağımsız olarak 24 saatlik eksozomlarla inkübasyon sonrasında DNMT enzimlerinin mRNA düzeylerinde artış belirlerken 48 saatlik eksozomlarla inkübasyon sonrasında yüksek konsantrasyonda *DNMT* enzimlerinin mRNA ifadenme düzeyinde anlamlı bir azalma düşük konsantrasyonda ise artma belirledik. Konsantrasyon bağımlı artma ve/veya azalmanın hücredeki hangi mekanizma tarafından sağlandığını belirlemek için ilave çalışmalar yapılması gerekmektedir.
- Eksozomal inhibitör olan GW4869 içeren besiyerinde inkübe edilen hücrelerde hem eksozom içeren hem de eksozom içermeyen androjen bağımsız PC3 hücrelerinde *DNMT* enzimlerinin mRNA ifadenme düzeyinde anlamlı bir azalmaya neden olduğunu belirledik. GW4869 uygulaması sonrasında eksozom ile muamele edilen ve edilmeyen hücrelerde DNMT ifadenme düzeylerindeki azalma GW4869'un DNMT inhibitörü olarak da fonksiyon görebileceğini düşürdüğünden dolayı spesifik gen bölgelerinde metilasyon üzerine etkisinin belirlenmesi gerektiğini önermekteyiz.
- Farklı özelliklere sahip prostat kanseri hücrelerinden, androjen-bağımlı ve androjen bağımsız, derive eksozomlarla muamele edilen edilen prostat kanseri hücrelerinde, aynı hücre derive eksozomlarla muamele edilen hücrelerde olduğu gibi DNMT enzimlerinin mRNA ifadenme düzeyinde artış tespit ettik.
- Yüksek konsantrasyonda 48 saatlik eksozomla inkübasyon sonrasında *DNMT1* ifadenmesindeki azalmanın nedenini olarak *DNMT1*'in stabilitesinden sorumlu enzimleri (*USP7* ve *UHRF1*) incelediğimizde, *USP7* ve *UHRF1*'in eksozomlar

içerisinde yer almalarına karşın alıcı hücredeki düzeyleri ile karşılaştırdığımızda *DNMT1*'in mRNA düzeyindeki azalma ile arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenemedik. *De novo* DNA metiltansferaz enzimlerin kararlılığından sorumlu olan enzimlerin henüz tanımlanmamış olmasından dolayı bu enzimlerdeki ifadenme artışı veya azalması üzerine etkisini araştıramadık.

- Son olarak, bu çalışmamızda prostat kanserinden derive eksozomal kargo molekülleri arasında DNMT enzimlerinin mRNA'sının olduğunu ve mRNA'ların alıcı hücredeki bu enzimlerin ifadenme düzeyini etkilediğini belirledik. Bulgularımızı desteklemek için *DNMT* ifadenme düzeylerindeki artış veya azalmanın global metilasyon düzeyine etkisinin nasıl olduğunun da belirlenmesi gerektiğini önermekteyiz.

KAYNAKLAR

- Abd Elmageed, Z.Y., Yang, Y., Thomas, R., Ranjan, M., Mondal, D., Moroz, K. (2014) 'Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes'. *Stem Cells*, 32(4), pp. 983-997.
- Abrami, L., Brandi, L., Moayeri, M., Brown, M.J., Krantz, B.A., Leppla, S.H. (2013) 'Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin'. *Cell Rep*, 5(4), pp. 986-996.
- Akers, J.C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B.S., Chen, C.C. (2013) 'Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies'. *J Neurooncol*, 113(1), pp. 1-11.
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A. et al. (2008) 'Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells'. *Nat Cell Biol*, 10(5), pp. 619-624.
- Belinsky, S.A., Klinge, D.M., Stidley, C.A., Issa, J.P., Herman, J.G., March, T.H. et al. (2003) 'Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer'. *Cancer Res*, 63(21), pp. 7089-7093.
- Bhagirath, D., Yang, T.L., Bucay, N., Sekhon, K., Majid, S., Shahryari, V. et al. (2018) 'microRNA-1246 Is an Exosomal Biomarker for Aggressive Prostate Cancer'. *Cancer Res*, 78(7), pp. 1833-1844.
- Binenbaum, Y., Fridman, E., Yaari, Z., Milman, N., Schroeder, A., Ben, D.G. et al. (2018) 'Transfer of miRNA in Macrophage-Derived Exosomes Induces Drug Resistance in Pancreatic Adenocarcinoma'. *Cancer Res*, 78(18), pp. 5287-5299.
- Blomme, A., Fahmy, K., Peulen, O., Costanza, B., Fontaine, M., Struman, I. et al. (2016) 'Myoferlin is a novel exosomal protein and functional regulator of cancer-derived exosomes'. *Oncotarget*, 7(50), pp. 83669-83683.
- Boelens, M.C., Wu, T.J., Nabet, B.Y., Xu, B., Qiu, Y., Yoon, T. et al. (2014) 'Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways'. *Cell*, 159(3), pp. 499-513.
- Bostick, M., Kim, J.K., Estève, P.O., Clark, A., Pradhan, S., Jacobsen, S.E. (2007) 'UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells'. *Science*, 317(5845), pp. 1760-1764.
- Braconi, C., Valeri, N., Kogure, T., Gasparini, P., Huang, N., Nuovo, G.J. et al. (2011) 'Expression and functional role of a transcribed noncoding RNA with an ultraconserved element in hepatocellular carcinoma'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(2), pp. 786-791.
- Cao, Y.L., Zhuang, T., Xing, B.H., Li, N., Li, Q. (2017) 'Exosomal DNMT1 mediates cisplatin resistance in ovarian cancer'. *Cell Biochem Funct*, 35(6), pp. 296-303.
- Catalano, M., O'Driscoll, L. (2019) 'Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors'. *J Extracell Vesicles*, 9(1):1703244.

- Chairoungdua, A., Smith, D.L., Pochard, P., Hull, M., Caplan, M.J. (2010) 'Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling'. *J Cell Biol*, 190(6), pp. 1079-1091.
- Chargaff, E., West, R. (1946) 'The biological significance of the thromboplastic protein of blood'. *J Biol Chem*, 166(1), pp. 189-197.
- Che, Y., Shi, X., Shi, Y., Jiang, X., Ai, Q., Shi, Y. et al. (2019) 'Exosomes Derived from miR-143-Overexpressing MSCs Inhibit Cell Migration and Invasion in Human Prostate Cancer by Downregulating TFF3'. *Mol Ther Nucleic Acids*, 18, pp.232-244.
- Cui, J., Liu, N., Chang, Z., Gao, Y., Bao, M., Xie, Y. et al. (2020) 'Exosomal MicroRNA-126 from RIPC Serum Is Involved in Hypoxia Tolerance in SH-SY5Y Cells by Downregulating DNMT3B'. *Mol Ther Nucleic Acids*, 20, pp. 649-660.
- Dakhlallah, D.A., Wisler, J., Gencheva, M., Brown, C.M., Leatherman, E.R., Singh, K. et al. (2019) 'Circulating extracellular vesicle content reveals de novo DNA methyltransferase expression as a molecular method to predict septic shock'. *J Extracell Vesicles*, 8(1), pp. 1669881.
- Dozmorov, M.G., Hurst, R.E., Culkin, D.J., Kropp, B.P., Frank, M.B., Osban, J. et al. (2009) 'Unique patterns of molecular profiling between human prostate cancer LNCaP and PC-3 cells'. *Prostate*, 69(10), pp. 1077-1090.
- Du, Z., Song, J., Wang, Y., Zhao, Y., Guda, K., Yang, S. et al. (2010) 'DNMT1 stability is regulated by proteins coordinating deubiquitination and acetylation-driven ubiquitination'. *Sci Signal*, 3(146), pp. 80.
- Dülger, Ö., Yılmaz, M., Tural, D. (2018) 'Metastatik Kastrasyona Dirençli Prostat Kanserinde Sistemik Tedavi'. *Nucl Med Semin*, 4, pp. 225-230.
- Fabbri, M., Paone, A., Calore, F., Galli, R., Gaudio, E., Santhanam, R. et al. (2012) 'MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(31), pp. 2110-2116.
- Farooqi, A.A., Desai, N.N., Qureshi, M.Z., Librelotto, D.R.N., Gasparri, M.L., Bishayee, A. et al. (2018) 'Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds'. *Biotechnol Adv*, 36(1), pp. 328-334.
- Fedele, C., Singh, A., Zerlanko, B.J., Iozzo, R.V., Languino, L.R. (2015) 'The $\alpha\beta 6$ integrin is transferred intercellularly via exosomes'. *J Biol Chem*, 290(8), pp. 4545-4551.
- Filella, X., Foj, L. (2016) 'Prostate Cancer Detection and Prognosis: From Prostate Specific Antigen (PSA) to Exosomal Biomarkers'. *Int J Mol Sci*, 17(11):1784.
- Foj, L., Ferrer, F., Serra, M., Arévalo, A., Gavagnach, M., Giménez, N. et al. (2017) 'Exosomal and Non-Exosomal Urinary miRNAs in Prostate Cancer Detection and Prognosis'. *Prostate*, 77(6), pp.573-583.
- Fong, M.Y., Zhou, W., Liu, L., Alontaga, A.Y., Chandra, M., Ashby, J. et al. (2015) 'Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis'. *Nat Cell Biol*, 17(2), pp. 183-194.
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W.P., Krämer-Albers, E.M. (2013) 'Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication'. *Front Cell Neurosci*, 7, pp. 182.

- Gao, Q., Steine, E.J., Barrasa, M.I., Hockemeyer, D., Pawlak, M., Fu, D. et al. (2011) 'Deletion of the de novo DNA methyltransferase Dnmt3a promotes lung tumor progression'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(44), pp. 18061-18066.
- Gassart, A., Géminard, C., Hoekstra, D., Vidal, M. (2004) 'Exosome secretion: the art of reutilizing nonrecycled proteins?'. *Traffic*, 5(11), pp. 896-903.
- Guo, W., Gao, Y., Li, N., Shao, F., Wang, C., Wang, P. et al. (2017) 'Exosomes: New players in cancer'. *Oncol Rep*, 38(2), pp. 665-675.
- Gupta, A., Pulliam, L. (2014) 'Exosomes as mediators of neuroinflammation'. *J Neuroinflammation*, 11, pp. 68.
- Haney, S.L., Hlady, R.A., Opavska, J., Klinkebiel, D., Pirruccello, S.J., Dutta, S. et al. (2015) 'Methylation-independent repression of Dnmt3b contributes to oncogenic activity of Dnmt3a in mouse MYC-induced T-cell lymphomagenesis'. *Oncogene*, 34(43), pp. 5436-5446.
- Harding, C., Heuser, J., Stahl, P. (1983) 'Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes'. *J Cell Biol*, 97 (2), pp. 329–339.
- Hargett, L.A., Bauer, N.N. (2013) 'On the origin of microparticles: From "platelet dust" to mediators of intercellular communication'. *Pulm Circ*, 3(2), pp.329-340.
- Hermann, A., Gowher, H., Jeltsch, A. (2004) 'Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases'. *Cell Mol Life Sci*, 61(19-20), pp. 2571-2587.
- Hoshino, D., Kirkbride, K.C., Costello, K., Clark, E.S., Sinha, S., Grega-Larson, N. et al. (2013) 'Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior'. *Cell Rep*, 5(5), pp. 1159-1168.
- Hough, K.P., Wilson, L.S., Trevor, J.L., Strenkowski, J.G., Maina, N., Kim, Y. et al. (2018) 'Unique Lipid Signatures of Extracellular Vesicles from the Airways of Asthmatics'. *Sci Rep*, 8(1), pp. 10340.
- Hu, Y., Yan, C., Mu, L., Huang, K., Li, X., Tao, D. et al. (2015) 'Fibroblast-Derived Exosomes Contribute to Chemoresistance through Priming Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer'. *PLoS One*, 10(5).
- Husni, R.E., Shiba-Ishii, A., Iiyama, S., Shiozawa, T., Kim, Y., Nakagawa, T. et al. (2016) 'DNMT3a expression pattern and its prognostic value in lung adenocarcinoma'. *Lung Cancer*, 97, pp. 59-65.
- Jadli, A.S., Ballasy, N., Edalat, P., Patel, V.B. (2020) 'Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake'. *Mol Cell Biochem*, 467(1-2), pp. 77-94.
- Jeppesen, D.K., Hvam, M.L., Primdahl-Bengtson, B., Boysen, A.T., Whitehead, B., Dyrskjot, L. et al. (2014) 'Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation'. *J Extracell Vesicles*, 3, pp. 25011.
- Josson, S., Gururajan, M., Sung, S.Y., Hu, P., Shao, C., Zhau, H.E. et al. (2015) 'Stromal fibroblast-derived miR-409 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and prostate tumorigenesis'. *Oncogene*, 34(21), pp. 2690-2699.
- Kalluri, R., LeBleu, V.S. (2020) 'The biology, function, and biomedical applications of exosomes'. *Science*, 367(6478).

- Kim, J., Morley, S., Le, M., Bedoret, D., Umetsu, D.T., Di Vizio, D. et al. (2014) 'Enhanced shedding of extracellular vesicles from amoeboid prostate cancer cells: potential effects on the tumor microenvironment'. *Cancer Biol Ther*, 15(4), pp. 409-418.
- Kosaka, N., Yoshioka, Y., Hagiwara, K., Tominaga, N., Katsuda, T., Ochiya, T. (2013) 'Trash or Treasure: extracellular microRNAs and cell-to-cell communication'. *Front Genet*, 4, pp. 173.
- Kowal, J., Tkach, M., Théry, C. (2014) 'Biogenesis and secretion of exosomes'. *Curr Opin Cell Biol*, 29, pp.116-125.
- Kulis, M., Esteller, M. (2010) 'DNA methylation and cancer'. *Adv Genet*, 70, pp. 27-56.
- Le, M.T.N., Hamar, P., Guo, C., Basar, E., Perdigão-Henriques, R., Balaj, L. et al. (2014) 'miR-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis'. *J Clin Invest*, 124(12), pp. 5109-5128.
- Lee, T.H., Chennakrishnaiah, S., Audemard, E., Montermini, L., Meehan, B., Rak, J. (2014) 'Oncogenic ras-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells'. *Biochem Biophys Res Commun*, 451(2), pp. 295-301.
- Lemoinne, S., Thabut, D., Housset, C., Moreau, R., Valla, D., Boulanger, C.M. et al. (2014) 'The emerging roles of microvesicles in liver diseases'. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 11(6), pp. 350-361.
- Leonard, S., Pereira, M., Fox, R., Gordon, N., Yap, J., Kehoe, S. et al. (2016) 'Overexpression of DNMT3A predicts the risk of recurrent vulvar squamous cell carcinomas'. *Gynecol Oncol*, 143(2), pp. 414-420.
- Li, X.Q., Liu, J.T., Fan, L.L., Liu, Y., Cheng, L., Wang, F. et al. (2016) 'Exosomes derived from gefitinib-treated EGFR-mutant lung cancer cells alter cisplatin sensitivity via up-regulating autophagy'. *Oncotarget*, 7(17), pp. 24585-24595.
- Lorenc, T., Klimczyk, K., Michalczywska, I., Słomka, M., Kubiak-Tomaszewska, G., Olejars, W. (2020) 'Exosomes in Prostate Cancer Diagnosis, Prognosis and Therapy'. *Int J Mol Sci*, 21(6):2118.
- Lyu, L., Wang, H., Li, B., Qin, Q., Qi, L., Nagarkatti, M. et al. (2015) 'A critical role of cardiac fibroblast-derived exosomes in activating renin angiotensin system in cardiomyocytes'. *J Mol Cell Cardiol*, 89, pp. 268-279.
- Ma, H.S., Wang, E.L., Xu, W.F., Yamada, S., Yoshimoto, K., Qian, Z.R. et al. (2018) 'Overexpression of DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 1 (DNMT1) And DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 3A (DNMT3A) Is Associated with Aggressive Behavior and Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes in Human Pituitary Adenomas'. *Med Sci Monit*, 24, pp. 4841-4850.
- Mashouri, L., Yousefi, H., Aref, A.R., Ahadi, A.M., Molaei, F., Alahari, S.K. (2019) 'Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance'. *Mol Cancer*, 18(1), pp. 75.
- Matsumoto, A., Takahashi, Y., Nishikawa, M., Sano, K., Morishita, M., Charoenviriyakul, C. et al. (2017) 'Accelerated growth of B16BL6 tumor in mice through efficient uptake of their own exosomes by B16BL6 cells'. *Cancer Sci*, 108(9), pp. 1803-1810.

- Menck, K., Sönmezer, C., Worst, T.S., Schulz, M., Dihazi, G.H., Streit, F. et al. (2017) 'Neutral sphingomyelinases control extracellular vesicles budding from the plasma membrane'. *J Extracell Vesicles*, 6(1), 1378056.
- Nabet, B.Y., Qiu, Y., Shabason, J.E., Wu, T.J., Yoon, T., Kim, B.C. et al. (2017) 'Exosome RNA Unshielding Couples Stromal Activation to Pattern Recognition Receptor Signaling in Cancer'. *Cell*, 170(2), pp. 352-366.
- Nazarenko, I., Rana, S., Baumann, A., McAlear, J., Hellwig, A., Trendelenburg, M. et al. (2010) 'Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation'. *Cancer Res*, 70(4), pp. 1668-1678.
- Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A. et al. (2010) 'Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway'. *Nat Cell Biol*, 12(1), pp. 19-30.
- Pan, B.T., Johnstone, R. M. (1983) 'Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor'. *Cell*, 33(3), pp. 967-978.
- Panigrahi, G.K., Praharaj, P.P., Peak, T.C., Long, J., Singh, R., Rhim, J.S. et al. (2018) 'Hypoxia-induced exosome secretion promotes survival of African-American and Caucasian prostate cancer cells'. *Sci Rep*, 8(1), pp. 3853.
- Perez-Hernandez, D., Gutiérrez-Vázquez, C., Jorge, I., López-Martín, S., Ursa, A., Sánchez-Madrid, F. et al. (2013) 'The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes'. *J Biol Chem*, 288(17), pp. 11649-11661.
- Qian, Z., Shen, Q., Yang, X., Qiu, Y., Zhang, W. (2015) 'The Role of Extracellular Vesicles: An Epigenetic View of the Cancer Microenvironment'. *Biomed Res Int*, 2015, pp. 649161.
- Qu, L., Ding, J., Chen, C., Wu, Z.J., Liu, B., Gao, Yi. et al. (2016) 'Exosome-Transmitted lncARSR Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by Acting as a Competing Endogenous RNA'. *Cancer Cell*, 29(5), pp. 653-668.
- Rajagopal, C., Harikumar, K.B. (2018) 'The Origin and Functions of Exosomes in Cancer'. *Front Oncol*, 8:66.
- Ramteke, A., Ting, H., Agarwal, C., Mateen, S., Somasagara, R., Hussain, A. et al. (2015) 'Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules'. *Mol Carcinog*, 54(7), pp. 554-565.
- Rinaldi, L., Avgustinova, A., Martín, M., Datta, D., Solanas, G., Prats, N. et al. (2017) 'Loss of Dnmt3a and Dnmt3b does not affect epidermal homeostasis but promotes squamous transformation through PPAR- γ '. *Elife*, 6, pp. e21697.
- Ronquist, K.G., Ek, B., Stavreus-Evers, A., Larsson, A., Ronquist, G. (2013) 'Human prostasomes express glycolytic enzymes with capacity for ATP production'. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 304(6), pp. 576-582.
- Saini, S. (2016) 'PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers'. *Cellular Oncology*, 39(2), pp. 97-106.

- Sakha, S., Muramatsu, T., Ueda, K., Inazawa, J. (2016) 'Exosomal microRNA miR-1246 induces cell motility and invasion through the regulation of DENND2D in oral squamous cell carcinoma'. *Sci Rep*, 6, pp. 38750.
- Salehi, M., Sharifi, M. (2018) 'Exosomal miRNAs as novel cancer biomarkers: Challenges and opportunities'. *J Cell Physiol*, 233(9), pp. 6370-6380.
- Savina, A., Fader, C.M., Damiani, M.T., Colombo, M.I. (2005) 'Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner'. *Traffic*, 6(2), pp. 131-143.
- Savina, A., Vidal, M., Colombo, M.I. (2002) 'The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11'. *J Cell Sci*, 115, pp. 2505-2515.
- Schiera, G., Di Liegro, C.M., Saladino, P., Pitti, R., Savettieri, G., Proia, P. et al. (2013) 'Oligodendrogloma cells synthesize the differentiation-specific linker histone H1° and release it into the extracellular environment through shed vesicles'. *Int J Oncol*, 43(6), pp. 1771-1776.
- Sharma, A. (2014) 'Novel transcriptome data analysis implicates circulating microRNAs in epigenetic inheritance in mammals'. *Gene*, 538(2), pp. 366-372.
- Sharma, A., Khatun, Z., Shiras, A. (2016) 'Tumor exosomes: cellular postmen of cancer diagnosis and personalized therapy'. *Nanomedicine*, 11(4), pp. 421-437.
- Shephard, A.P., Yeung, V., Clayton, A., Webber, J.P. (2017) 'Prostate cancer exosomes as modulators of the tumor microenvironment'. *J Cancer Metastasis Treat*, 3, pp. 288-301.
- Song, M., Wang, Y., Shang, Z., Liu, X., Xie, D., Wang, Q. et al. (2016) 'Bystander autophagy mediated by radiation-induced exosomal miR-7-5p in non-targeted human bronchial epithelial cells'. *Sci Rep*, 6, pp. 30165.
- Tadokoro, H., Umezu, T., Ohyashiki, K., Hirano, T., Ohyashiki, J.H. (2013) 'Exosomes derived from hypoxic leukemia cells enhance tube formation in endothelial cells'. *J Biol Chem*, 288(48), pp. 34343-34351.
- Takahashi, K., Yan, I.K., Haga, H., Patel, T. (2014) 'Modulation of hypoxia-signaling pathways by extracellular linc-RoR'. *J Cell Sci*, 127, pp. 1585-1594.
- Théry, C., Ostrowski, M., Segura, E. (2009) 'Membrane vesicles as conveyors of immune responses'. *Nat Rev Immunol*, 9(8), pp. 581-593.
- Thind, A., Wilson, C. (2016) 'Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets'. *J Extracell Vesicles*, 5, pp. 31292.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F. et al. (2008) 'Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes'. *Science*, 319(5867), pp. 1244-1247.
- Trams, E.G., Lauter, C.J., Jr, N.S., Heine, U. (1981) 'Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles'. *Biochim Biophys Acta*, 645(1), pp. 63-70.
- Tricarico, C., Clancy, J., D'Souza-Schorey, C. (2017) 'Biology and biogenesis of shed microvesicles'. *Small GTPases*, 8(4), pp. 220-232.

- Tschuschke, M., Kocherova, I., Bryja, A., Mozdziak, P., Volponi, A.A., Janowicz, K. et al. (2020) 'Inclusion Biogenesis, Methods of Isolation and Clinical Application of Human Cellular Exosomes'. *J Clin Med*, 9(2), pp. 436.
- Turek-Plewa, J., Jagodziński, P.P. (2005) 'The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression'. *Cell Mol Biol Lett*, 10(4), pp. 631-647.
- Tzelepi, V., Logotheti, S., Efstathiou, E., Troncoso, P., Aparicio, A., Sakellakis, M. et al. (2020) 'Epigenetics and prostate cancer: defining the timing of DNA methyltransferase deregulation during prostate cancer progression'. *Pathology*, 52(2), pp. 218-227.
- Varol, N., Konac, E., Onen, I.H., Gurocak, S., Alp, E., Yilmaz, A. et al. (2014) 'The epigenetically regulated effects of Wnt antagonists on the expression of genes in the apoptosis pathway in human bladder cancer cell line (T24)'. *DNA Cell Biol*, 33(7), pp. 408-417.
- Wolf, P. (1967) 'The nature and significance of platelet products in human plasma'. *Br J Haematol*, 13(3), pp. 269-288.
- Yan, F., Shen, N., Pang, J., Xie, D., Deng, B., Molina, J.R. et al. (2014) 'Restoration of miR-101 suppresses lung tumorigenesis through inhibition of DNMT3a-dependent DNA methylation'. *Cell Death Dis*, 5(9), pp. e1413.
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P., Andreu, Z., Zavec, A.B., Borràs, F., Buzas, E. et al. (2015) 'Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions'. *J Extracell Vesicles*, 4:27066.
- Yeung, C.L.A., Co, N., Tsuruga, T., Yeung, T., Kwan, S., Leung, C.S. et al. (2016) 'Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1'. *Nat Commun*, 7, pp. 11150.
- Yogev, Y., Perez, Y., Noyman, I., Madegem, A.A., Flusser, H., Shorer, Z. et al. (2017) 'Progressive hereditary spastic paraplegia caused by a homozygous KY mutation'. *European Journal of Human Genetics*, 25, pp. 966-972.
- Yokoi, A., Yoshioka, Y., Yamamoto, Y., Ishikawa, M., Ikeda, S., Kato, T. et al. (2017) 'Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer'. *Nat Commun*, 8, pp. 14470.
- Zerlinger, E., Barta, T., Li, M., Vlassov, A.V. (2015) 'Strategies for isolation of exosomes'. *Cold Spring Harb Protoc*, 2015(4), pp. 319-323.
- Zhang, J., Yang, C., Wu, C., Cui, W., Wang, L. (2020) 'DNA Methyltransferases in Cancer: Biology, Paradox, Aberrations, and Targeted Therapy'. *Cancers (Basel)*, 12(8), pp. 2123.
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., Tang, W.H. (2019) 'Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential'. *Cell Biosci*, 9:19.
- Zhao, H., Yang, L., Baddour, J., Achreja, A., Bernard, V., Moss, T. et al. (2016) 'Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism'. *Elife*, 5, pp. 10250.

Zhou,W., Fong, M.Y., Min, Y., Somlo, G., Liu, L., Palomares, M.R. et al. (2014) 'Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis'. *Cancer Cell*, 25(4), pp. 501-515.

Zhu,X., You, Y., Li, Q., Zeng, C., Fu, F., Guo, A. et al. (2014) 'BCR-ABL1-positive microvesicles transform normal hematopoietic transplants through genomic instability: Implications for donor cell leukemia'. *Leukemia*, 28(8), pp. 1666–1675.



EKLER

EK-1: Etik Kurul İzin Belgesi



EK-2 : İntihal Yazılım Programı Raporu



ÖZGEÇMİŞ

EĞİTİM

Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2018)

YABANCI DİL

İngilizce : 63,75 YÖKDİL- 2022/1

ESERLER

A. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler :

A1. Durgut Ş.G., Varol N. “The Role of Exosomal Inhibitors in Epigenetic Regulation”, *2nd International Multidisciplinary Cancer Research*, 21-24 July, Giresun, 2022 (Sözlü Sunum olarak kabul edildi).