

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KOLON KANSERİNDE ERKEN TANI AMACIYLA BELİRTEÇ
POTANSİYELİ TAŞIYACAK EKSOZOM VE miRNA İÇERİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Mehmet Sait YILMAZ

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2020**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Mehmet Sait YILMAZ tarafından hazırlanan “KOLON KANSERİNDE ERKEN TANI AMACIYLA BELİRTEÇ POTANSİYELİ TAŞIYACAK EKSOZOM VE miRNA İÇERİKLERİNİN İNCELENMESİ” adlı tez çalışması 27/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr., Emel EMREGÜL



Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr., Fatma ARSLAN
Gazi Üniversitesi / Kimya Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr., Emel EMREGÜL
Ankara Üniversitesi / Kimya Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr., Fadime KIRAN
Ankara Üniversitesi / Biyoloji Anabilim Dalı



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

27/01/2020



Mehmet Sait YILMAZ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KOLON KANSERİNDE ERKEN TANI AMACIYLA BELİRTEÇ POTANSİYELİ TAŞIYACAK EKSOZOM VE miRNA İÇERİKLERİNİN İNCELENMESİ

Mehmet Sait YILMAZ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Danışman: Prof. Dr. Emel EMREGÜL

Kolorektal kanser (CRC), dünyada kanser bağlantılı ölümlerin ana nedenlerinden birisidir. Gaitada gizli kan testi ve görüntüleme tekniği olarak esnek sigmoidoskopi ile CRC tespit edilmektedir. Maalesef bu tekniklerin bazı kısıtlamaları bulunmaktadır; gaitada gizli kan testinin duyarlılığı düşüktür ve esnek sigmoidoskopinin incelenmesi için ucu ışıklı bir hortumla kalın bağırsağın makattan itibaren yaklaşık 60 cm lik kısmının taranması hasta açısından zorluklar yaratmaktadır. Eksozomlar, salındığı hücre orijinine bağlı olarak protein, lipid, mRNA, miRNA'lar içeren yaklaşık 100 nm'lik küçük membran keseciklerdir. Kan, idrar, hücre/doku lizatları gibi pek çok vücut sıvısından elde edilebilen eksozomlar; hücreler arası iletişim, sinyal iletimi, genetik materyal transferi ve immünolojik yanıtın düzenlenmesi gibi farklı biyokimyasal süreçlerde görev almaktadır. Birçok miRNA'nın kanser dokularında yüksek ekspresyon göstermesi, onları teşhis ve hastalığın seyrinin belirlenmesinde oldukça önemli kılmaktadır. Eksozomal miRNA'lar potansiyel kanser belirteçleri olarak büyük ilgi çekmektedir. Yapılan bu tezin amacı, sağlıklı ve HT-29 kolon kolorektal karsinom hücrelerinden eksozomal miRNA'ların qRT-PCR ile ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi ve geleneksel kolon kanseri teşhisine alternatif, pratik ve hassas bir sıvı biyopsi tekniği önermektir. Ancak hem yapılan deneysel verilerin hem de hasta sayısının az olması sebebiyle miR-19a-3p, miR-21 ve miR-1246'nın kolorektal kanser tanısında kullanılabilmesi için daha kapsamlı bir araştırma yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Ocak 2020, 69 sayfa

Anahtar Kelimeler: Eksozom, mikroRNA, Kolorektal Kanser, qRT-PCR, Likit Biyopsi

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF EXOSOME AND miRNA CONTENT AS A POTENT MARKER OF COLON CANCER FOR EARLY DIAGNOSIS

Mehmet Sait YILMAZ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Emel EMREGÜL

Colorectal Cancer (CRC) is one of the causes cancer and cancer-related deaths in the World. CRC is detected by occult blood test and which of imaging techniques as flexible sigmoidoscopy. Unfortunately, these techniques have some limitations; the sensitivity of occult blood test is low and the screening of a portion of the intestinal caudate about 60 cm long is difficult for the patient to illuminate the flexible sigmoidoscopy. Exosomes are small membrane vesicles about 100 nm for protein, lipid, mRNA, miRNA, depending on the cell culture released. Exosomes that can obtain many body fluids such as blood, urine, cell/tissue lysates; intercellular communication, signal transduction, genetic material transfer, and different biochemical processes. The high expression of many miRNAs in cancer tissues makes them very important in the identification of the diagnosis and the course of the disease. Exosomal miRNAs are of great interest as potential cancer biomarkers. This thesis aims to propose an alternative, practical and sensitive fluid biopsy technique to identify expression levels of exosomal miRNAs in healthy and HT-29 colon colorectal carcinoma cells by qRT-PCR and to diagnose traditional colon cancer. However, it was concluded that more comprehensive research should be conducted to use miR-19a-3p, miR-21 and miR-1246 in the diagnosis of colorectal cancer due to both experimental data and the low number of patients.

January 2020, 69 pages

Key Words: Exosome, microRNA, Colorectal Cancer, qRT-PCR, Liquid Biopsy

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanması için beni bugünlere getiren anne ve babama,engin bilgi ve tecrübesini benden esirgemeyerek her koşulda beni destekleyen, tezimde de okuyacağınız tüm çalışma ve altyapıları sunan, saygıdeğer hocam, danışmanım, Prof. Dr. Emel Emregül'e, gerek Laboratuvar koşulları, gerek teorik altyapıyı sunan saygıdeğer Hocam, Prof. Dr. Kaan Cebesoy Emregül'e, tezin hem teorik hem deneysel bölümlerinde bilgi ve becerisini esirgemeyen Dr.Öğr.Üyesi Burak Derkuş hocama, hem Laboratuvar hem dışarda her zaman yanımda hissettiğim canım arkadaşlarım; Can Berk Camcı, Sıla Bilgin, Mesutcan Şahin, Seda Kök', Hüseyin Korkmaz'a, yorulup bunaldığımda yanımda olan arkadaşım Çağrı Karataş'a, Lisans ve Yüksek Lisans Öğrenim hayatımın her aşamasında desteğini hissettiğim Ankara Üniversitesi'nin tüm çalışanlarına ayrı ayrı teşekkür ediyorum.

Bu tezin yazılması aşamasında, gecesini gündüzüne katıp bana asla yorgunluğumu hissettirmeyen kıymetli eşim, Feride Yılmaz'a, biricik çocuklarım Hazal Vera ve Mehmet Akif'e ayrıca teşekkür ediyor, bu tezi onlara ithaf ediyorum. Sizin desteğiniz olmasa ben yapamazdım.

Mehmet Sait YILMAZ
Ankara, Ocak 2020

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	v
1.1 Kanser ve Kanser Araştırmalarının amacı	1
1.2 Kolorektal Adenokarsinom	1
1.2.1 Etiyolojik ve risk faktörleri	2
1.2.2.1 Risk faktörleri	2
1.2.2.2 Diyet içermeyen faktörler	3
1.2.2.3 Genetik etmenler	4
1.2.3 Teşhisi	4
1.2.3.1 Aletli ve patolojik değerlendirme	4
1.2.3.2 Radyolojik teknikler ve teşhis sorusuna göre endikasyonları	6
1.2.3.3 Biyolojik belirteçler	7
1.3 Evrelendirme	8
1.3.1 Evre sınıflaması kriterleri	8
1.3.2 TNM sınıflaması	8
1.3.3 Evreleme prosedürleri	10
1.3.3.1 Preoperatif evreleme: standart ve opsiyonel prosedürler	10
1.3.3.2 Cerrahi evreleme	11
1.4 Eksozom ve Kanser İlişkisi	12
1.4.1 Eksozomların oluşumu ve salgılanması	12
1.4.2 Eksozom trafiği	15
1.4.3 Eksozomların işlevi	16
1.5 miRNA ve Görevleri	19

1.5.1 Çekirdekte MikroRNA'nın kanıtı	21
1.5.2 Nükleer MikroRNA'ların Fonksiyonları	22
1.5.2.1 RNA'ların düzenlenmesi	22
1.5.3.2 MikroRNA'lar, çekirdekte arttırıcı tetikleyici görevi görür.....	24
1.5.3.3 MicroRNA'nın nükleer ve Sitoplazmik fonksiyonları arasındaki benzerlikler ve farklılıklar.....	25
1.5.4 Kanserde MikroRNA'nın nükleer fonksiyonları	26
1.5.5 Metastaz ve Anjiyogenez	28
1.6 Kolon Kanserinde Eksozomal miRNA'ların Rolü	30
1.7 Eksozomal miRNA'lar ve Kansere İlişkisi	34
2. MATERYAL VE METOT	38
2.1 Hücre Kültürü Çalışmaları	38
2.2 Serum/Plazmadan Eksozom İzolasyonu	40
2.3 RNA İzolasyonu.....	43
2.4 cDNA Sentezi	44
2.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	45
3. ANALİZ VE BULGULAR.....	49
3.1 Eksozomların Karakterizasyonu	49
3.1.1 Western Blot analizi.....	49
3.1.2 Yüksek kontrastlı transmisyon emisyon mikroskopisi analizi	50
3.1.2.1 TEM için örnek hazırlanması	50
3.2 RNA Miktarları Ölçüm Sonuçları.....	51
3.3 PCR Sonuçları.....	52
4. SONUÇ.....	54
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ.....	69

SİMGELER DİZİNİ

AFP	Ailevi adenomatöz polipozis
APC	Adenomatöz polipozis coli
BSA	Bovin Serum Albumin
BT	Bilgisayarlı tomografi
CA19-9	Karbohidrat Antijen 19-9
CC	Kolon kanseri
CD	Yüzey farklılaşma Antijeni
cDNA	Komplementer DNA
CEA	KarsinoEmbriyonik Antijen
Cq	Kuantifiye edilebilir döngü
CRC	Kolorektal kanser
cTNM	Klinik Tümör, Lenfnodu, Metastaz
DMEM	Dulbecco's Modifiye Eager Medium
DMSO	DimetilSülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ECL	Geliştirilmiş Kemilüminesans
ESCRT	Endozomal Ayırma Kompleksi
FBS	Ölü Sığır Serum
GIS	Gastro İntestinal Sistem
HDI	İnsan ölüm indeksi
HNPCC	Hereditör Non-Polipozis Kolon Kanseri
HRP	Yaban Turpu Peroksidazı
HSP	Isı-Şok Proteinleri
IL	İnterlökin
ISH	İn-situ Hibridizasyon
MIF	Makrofaj migrasyon inhibitör Faktörü
MiRNA	Mikro Ribonükleik Asit
MMP	Matriks Metalloproteinaz
MR	Manyetik Rezonans
Mrna	Mesajcı RNA

MV	Mikrovezikül
MVB	Mikroveziküler Cisimcik
M _w	Moleküler Ağırlık
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PBS	Fosfat ile tamponlanmış tuzlu su
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PTGS	Post-Transisyonel Gen Susturma
pTNM	Patolojik Tümör, Lenfnodu, Metastaz
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RISC	RNA ile indüklenen Susturma Kompleksi
RNA	Ribonükleik Asit
RT-PCR	Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
siRNA	Küçük İnterferans RNA
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskopisi
TGA	Transkripsiyonel Gen Aktivasyonu
TGS	Transkripsiyonel Gen susturma
TNM	Tümör, Lenf nodu, Metastaz
TV	Tam Vasat
UTR	Kodlanmamış bölge

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.1.1 Gaitada Gizli Kan Testi'nin şematize edilmiş hali	6
Şekil 1.2 Ekzosom içeriğinin ve etkilediği yolların şematize hali	14
Şekil.1.3 MikroRNA-Promoter etkileşim mekanizması	23
Şekil.1.4 Sinyal yolları, miRNA'ların geniş fonksiyonlar sergilediği kolorektal kanser mekanizmasını inceleyen çeşitli gruplardan üretildi.....	32
Şekil.1.5 Kolorektal kanserde sinyalleşme yolları	33
Şekil.1.6 Kolon Kanseri gelişiminde rol oynayan miRNA'lar	34
Şekil 2.1 FCH normal kolon hücrelerinin ve HT-29 hücre hattının İnvert faz/kontrast mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri.....	39
Şekil 2.2 24 saat inkübasyondan sonra çöken eksozomların toplanması için santrifüj edilmesi	40
Şekil 2.3 Serum/Plazma'nın mikrosantrifüj tüpüne alınarak (A,B) üzerine eksozom çöktürme reaktifi (C, D) ilave edilerek bir gece +4 °C'de inkübe edilmesi (E).....	41
Şekil 2.4 1 gece inkübasyondan sonra çöken eksozomların toplanması için santrifüj edilmesi	41
Şekil 2.5 RNA izolasyon görüntüleri	44
Şekil 2.6 Uygulanan polimeraz zincir reaksiyon protokolü.....	47
Şekil 3.1 CoEpi ve HT-29 hücre hattından izole edilen eksozomların CD9 ve CD63 eksozom yüzey belirteçlerinin varlığını gösteren Western Blot analizi	50
Şekil 3.2 İzole edilen eksozomların Yüksek Kontrastlı Transmisyon Emisyon Mikroskopisi görüntüleri	51
Şekil 3.3 Sağlıklı ve Kolon kanserli hücre hatlarında miRNA'ların ekspresyon seviyeleri.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Kolon Kanseri’nde ADJJ ve TNM evrelemesi ve evreleme kriterleri.....	9
Çizelge 1.2 MikroRNA’nın nükleer ve sitoplazmik fonksiyonları arasındaki benzerlik ve farklılıklar	26
Çizelge 2.1 Hasta, sağlıklı kan örnekleri ve sağlıklı-HT-29 Hücre hatları üzerine ilave edilen çöktürme reaktifleri.....	42
Çizelge 2.2 S1-5 ve H1-5 numunelerinin cDNA sentez tasarımı	44
Çizelge 2.3 H6-10 ve Hücre Kültür Atıklarının cDNA sentez tasarımı	44
Çizelge 2.4 Hasta-gönüllü ve hücre hattı atık vasatlarının PCR için eklendiği tabakanın varsayımsal görüntüsü	46
Çizelge 3.1 Nanodrop Cihazı ile eksozomlardan izole edilen RNA miktarları	52
Çizelge 3.2 CoEpi’ye kıyasla HT-29 hücre hattı atık vasatından izole edilen eksozomlardaki ekspresyon seviyeleri	53

1. GİRİŞ

1.1 Kanser ve Kanser Araştırmalarının Amacı

Kanser, normal hücre döngüsünün bozularak o dokuda anormal büyüyen hücre topluluklarının görülmesidir. Özellikle Dünya nüfusunun %82 sinin bulunduğu az gelişmiş ülkelerde önde gelen ölüm nedenlerinden bir tanesidir. Sigara içimi, yetersiz ve kötü beslenme, fiziksel hareketsizlik gibi sosyoekonomik sebepler de bu ölüm sebebini biraz daha öne çıkarmaktadır. 2018 yılında yayımlanan “Küresel Kanser İstatistiği” başlıklı makalesinde GLOBOCAN tahminlerine dayanarak, dünya çapında yaklaşık 18.1 milyon yeni kanser vakası ve 9.5 milyon ölüm gerçekleşti. Yıllar geçtikçe, yük, şu anda vakaların yaklaşık % 57’sini ve dünya çapındaki kanser ölümlerinin % 65’ini oluşturan az gelişmiş ülkelere kaymıştır [Lindsey ve ark (2012)., Jemal A ve ark (2009).]. Bu yük ve bu ölümler göz önüne alındığında yaptığımız bu çalışmada hastalığın erken teşhis edilerek ölümlerin azaltılması hem insani bir görev hem de vicdani bir sorumluluk bilincimize katkı sağlayacaktır.

1.2 Kolorektal Adenokarsinom

Kolorektal kanser (CRC), dünyada kanser ölümünün dördüncü ve en yaygın teşhisi konan kanser hastalığının üçüncü en büyük nedeni olup, 2018’de yaklaşık 1.85 milyon yeni vaka ve yaklaşık 550.000 ölüm meydana gelmiştir [Globocan (2018)]. CRC yükünün dağılımı, tüm vakaların üçte ikisinden fazlası ve insan ölüm endeksinin (HDI) yüksek veya çok yüksek olduğu ülkelerde meydana gelen ölümlerin yaklaşık % 60’ında görülmektedir [Bosetti vd. (2011)]. CRC, kanser geçişinin en belirgin belirteçlerinden biri olarak kabul edilmekte olup, hastalığa maruz kalan ülkelerdeki enfeksiyonla ilişkili kanserlerin yerine geçmektedir. Bu sebeple de yüksek gelirli ülkelerde sıklıkla bulunan Batı yaşam tarzlarıyla bağlantılı, diğer kanserlerle birlikte toplumsal ve ekonomik değişiklikler hem CRC insidansında hem de mortalitede hızlı artışlar görülmektedir. Buna karşın, CRC insidansı ve mortalite oranları, HDI endeksi yüksek olan ülkelerde istikrarlı bir düşüş göstermiştir. Son zamanlarda düşen endeks bu ülkelerdeki eğilimlerinin sebepleri açıkça tanımlanmamış ancak poliplerin endoskopi yardımıyla

çıkarılması olan polipektomi yoluyla erken teşhisin kolaylaşması ve önlenmesinin bu durumu meydana getirdiği öne sürülmüştür. İnsidansı düşüren faktörlerle birlikte CRC mortalitesinde eşit oranda düşüş, perioperatif bakımın yanı sıra kemoterapi ve radyoterapi gelişiminin de etkisi ile meydana gelmektedir [Bosetti vd. (2011), Bray F. vd.(2014)]. Demografik projeksiyonlar göz önüne alındığında, CRC'nin küresel yükünün % 20 artışla 2.2 milyondan fazla yeni olguya ve 2030 yılına kadar 1.1 milyon kanser ölümüne kadar artması beklenmektedir [Lindsey vd.(2012)]. Bu nedenle, CRC'nin mevcut kalıplarını ve uluslararası bir perspektiften evrimini anlamak zorunlu hale gelmiş olup bu çalışmada da CRC'nin erken teşhisi ile bu ölüm oranlarının artmasının önüne geçilmesi amaçlanmıştır.

1.2.1 Etiyolojik ve risk faktörleri

1.2.2.1 Risk faktörleri

Kolorektal kanser en yaygın olarak idiopatikdir ve olguların sadece %5 inde genetik yatkınlığa rastlanmıştır [Kwak E. Vd. (2007)]. Göç araştırmaları, nüfusun Japonya gibi düşük riskli bir alandan ABD gibi nispeten daha riskli bir bölgeye geçtiğinde, birinci nesil göçmenlerin kolorektal kanser insidansı hızla artmakta ve ABD'de doğan Japonların beyaz nüfustan daha yüksek bir risk oranına sahip olduğu gösterilmiştir [Tomatis L. vd.(1990)]. Diyet kolorektal kanser etiyolojisinde şimdiye kadar tespit edilen en önemli dış faktördür. Son zamanlarda, Dünya Kanser Araştırma Fonu ve Amerikan Kanser Araştırmaları Enstitüsü [WCRF&AICR (2007)], diyet, fiziksel aktivite ve kanseri önlemeye ilişkin bilimsel literatür hakkındaki kapsamlı raporunda, kolorektal kanserin çoğunlukla uygun diyetler ve ilişkili faktörler tarafından önlenabilir olduğu sonucuna varmıştır. Kanıtların kolondan rektum kanserinden daha güçlü olmasına rağmen, fiziksel aktivitenin kolorektal kansere karşı korunduğuna dair kanıtlar inandırıcı gelmektedir. Kırmızı et, işlenmiş et, alkollü içeceklerin (erkekler tarafından ve muhtemelen kadınlar tarafından) yaklaşık 30 g'dan fazla tüketimi (vücut yorgunluğu ve abdominal yağlanma) ve yetişkin erişkin yüksekliğine neden olan faktörlerin veya bunun sonuçları, kolorektal kanserin nedeni olması daha inandırıcı gelmektedir. Diyet lifi ve sarımsak, süt ve kalsiyum içeren gıdalar muhtemelen bu kansere karşı koruma

sağladığı düşünülmektedir. Narkastasız sebzeler, meyveler, folat içeren gıdaların yanı sıra balık, D vitamini içeren gıdalar ve ayrıca selenyum ve bunları içeren gıdaların kolorektal kansere karşı korunduğunu gösteren sınırlı kanıtlar olmasının yanı sıra, demir içeren gıdalar, peynir, hayvansal yağ içeren gıdalar ve şeker içeren gıdalar bu kanserin nedenleri arasında sayılmaktadır.

1.2.2.2 Diyet içermeyen faktörler

Tütün ürünleri, non-steroid antiinflamatuvar ilaçların (NSAID'ler) ve aspirin'in kronik kullanımı ile bazı kolorektal hastalıklar, genetik yatkınlıklar ve metabolik sendrom gibi bazı durumlar, kolon kanserinin diyet dışı risk faktörlerini oluşturur [Stewart vd (2003)]. Sigara, sürekli olarak kolorektal kanser için öncü lezyonlar olarak kabul edilen geniş kolorektal adenomlarla pozitif olarak ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, tütün bileşenlerine maruz kalma, kolorektal karsinogenezde başlatıcı bir faktör olabileceği literatürde belirtilmiştir [Giovannuci vd (2001)]. Güncel derleme makalesinde, genotoksik maruz kalma ile kolorektal kanser tanısı arasında üç ila dört dekad arasında bir indüksiyon periyoduyla tutarlı geçici bir model önermiştir. ABD'de her beş kolorektal kanser vakasından birinin potansiyel olarak tütün kullanımı sebebiyle olduğu düşünülmektedir.. Kolorektal adenomların ve kanserin önlenmesi ya da regresyonu için nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçların etkisini belirlemek için sistemik olmayan bir inceleme yapılmış ve bu incelemelerin sonuçları, üç randomize çalışmanın aspirinin, sporadik adenomatöz poliplerin rekürrensini önemli ölçüde azalttığına dair kanıtlar olduğu yönünde kanıya varılmıştır. Kısa vadeli denemelerden ailesel adenomatöz polipozide kolorektal poliplerin regresyonu desteklemeye, ancak ortadan kaldırılmasına veya önlenmesine yönelik olmadığına dair bulgulara varılmıştır[Asano TK. vd.(2004)]. İnflamatuvar bağırsak hastalığı (Crohn hastalığı ve ülseratif kolit) kolon kanseri riskini arttırmaktadır. Yeni bir meta-analiz, Crohn hastalığından etkilenen kişilerde kolon kanseri gelişme riskinin arttığını bildirmiştir (görel risk, 2.6;% 95 güven aralığı, 1.5 4.4) [Von Roon AC. Vd. (2007)]. Eaden ve ark.nın meta-analizi; [Eaden vd. (2001)] ülseratif kolit ile kolorektal kanser arasında pozitif bir ilişki bulmuştur. Ülseratif kolit için on yıllar boyunca ve pankolitik risk söz konusudur. Daha önce malign tümörü olan hastalar ikinci bir kolorektal tümör gelişme riski altındadır [Cali vd. (1993)]. Metabolik

sendrom (aşağıdaki bileşenlerin ≥ 3 'ü: yüksek tansiyon, artmış bel çevresi, hipertrigliseridemi, düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol düzeyi veya şeker hastalığı/hiperglisemi), Retrospektif toplum ateroskleroz risk çalışmalarında kolorektal kanser insidansı ile erkekler arasında pozitif ve az bir ilişki bulunmasına rağmen kadınlar arasında bu ilişkinin bulunmadığı ancak mevcut bileşenlerin sayısına göre bir doz yanıtı olduğu kanısına varılmıştır [Ahmed vd. (2006)]. Önemli bulgulara dayanarak, postmenapozal östrojen ve progesteron hormonu kullanımı kolorektal tümör insidansını azaltmış, ancak östrojen tek başına istihdam için karşılaştırılabilir olmayan fayda gösterilmiştir [Chlebowski vd. (2004)].

1.2.2.3 Genetik etmenler

Kolon kanserine karşı genetik açıdan yatkınlık, polipozis veya nonpolipoz sendromlarına atfedilmiştir. Ana polipozis sendromu, mutasyon veya FAP kaybı (adenomatöz polipozis coli (APC) olarak da adlandırılır) ile ilişkili ailevi adenomatöz polipozis (FAP) genidir. Herediter nonpolipozisli kolorektal kanser (genellikle HNPCC olarak anılır) sendromu, altı DNA uyuşmazlığı tamir geninde germline mutasyonları ile ilişkilidir [Stewart vd. (2003)]. Kolorektal kanser insidansı Finlandiya Kanser Kayıtlarında 70 yaşına kadar olan HNPCC gen taşıyıcılarında saptanmıştır. 70 yaşına kadar kümülatif kolorektal kanser insidansı % 82'dir [Aarnio vd. (1999)].

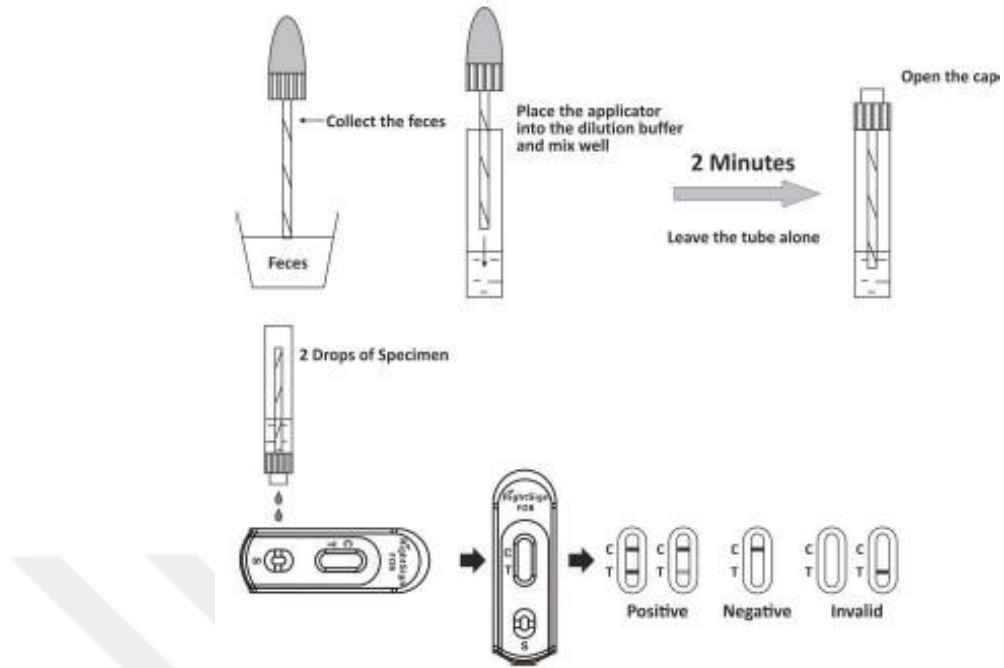
1.2.3 Teşhisi

1.2.3.1 Aletli ve patolojik değerlendirme

Kolonoskopi, Kalın bağırsağın incelenmesi amacıyla, ucunda kamera ve ışığın olduğu, bükülebilen, yaklaşık bir insan parmağı kalınlığında tıbbi bir cihaz (kolonoskop) ile makattan başlayarak yapılan muayene işlemine denmektedir. Bağırsak ile ilgili yakınmalar ya da bulguların incelenmesinde kolon ve rektum kanseri taramasında kullanılmaktadır. Kolonoskopi işleminden bir-iki gün öncesinde (uzmanın karına göre), hastanın sulu, yumuşak bir diyeti ile beslenmesi gerekiyor ve aynı zamanda bağırsak

temizliği yapacak (müshil) ilaçlarını da hekiminin belirttiği gibi işlem öncesinde alması gerekmektedir.

İşleme başlamadan hastanın aç olması istenmekte ve işlemten 4-5 gün ile 1 hafta öncesinde, eğer kullanıyorsa, kan sulandırıcı ilaçlarını (aspirin, heparin, kumadin gibi) mümkünse kesilmesi istenir. Her iki bacak göğse doğru çekilerek, sola yana yatar pozisyonunda muayeneye başlanıyor. Hastaya anestezi hekimi eşliğinde, derin uyku dalmasını sağlayan yüzeysel anestezi verilir. Hasta tam olarak uyuduktan sonra, uzman doktor, kolonoskop cihazını önce kalın bağırsağın son kısmına (rektum) doğru ilerletir. Bundan sonra kolonoskop ile hava verilerek, bağırsak şişirilir ve bağırsak iç yüzeyinin görünür hale gelmesi sağlanır. Kolonoskop ileri doğru itilerek, ince bağırsak ile kalın bağırsak birleşim yerine kadar olan tüm kalın bağırsak bölümleri incelenir. Bu işlem ortalama 20-30 dakika sürmektedir. En son kalın bağırsaktan ince bağırsağa da geçilerek ince bağırsağın son kısmı olan terminal ileum da incelenerek girişim sonlandırılır. Doktor, kolonoskopi işlemi sırasında karşılaştığı normal olmayan oluşumları (polip gibi) kolonoskop yardımıyla çıkarabilmektedir. Uygun ve gerekli görüldüğü durumlarda, hastanın şikayetleri de göz önünde bulundurularak bağırsağın çeşitli yerlerinden biyopsiler de alınabilmektedir. İşlem bittikten sonra verilen ilaçların etkisinin geçmesi ve hastanın bilincinin işlem öncesi hale dönmesi amacıyla hasta, dinlenme odasına alınarak istirahati sağlanır [<https://www.acibadem.com.tr/ilgi-alani/kolonoskopi/#nasil-uygulanir>].



Şekil 1.1 Gaitada Gizli Kan Testi'nin şematize edilmiş hali

Feçese daldırılan numune çubuğu tırtıklı bölge ile numuneyi yüzeyine bulaştırır. Ardından dilüsyon tamponunun ve reaksiyon karışımının olduğu tüpe daldırılarak 2 dakika bekletilir. Numune ekleme bölgesine karışımdan 2 damla eklenerek pad üzerinde yürütülür. Numune karışımında hemoglobinin varsa test bölümünde hemoglobinin sekonder antikoruna tarafından tutularak pozitif sonucun olduğunu gösterir. (<http://turkish.custom-monoclonalantibody.com/sale-2051941-rapid-ce-marked-fob-fecal-occult-blood-test-kit-for-clinical-lab.html> adresinde Bi-Trumed ticari isimli gaitada gizli kan testinin ürün tanıtım reçetesinden alınmıştır.)

1.2.3.2 Radyolojik teknikler ve teşhis sorusuna göre endikasyonları

İdeal olarak lezyon histolojisini teyit etmek için önce kolonoskopi yapılmalıdır. Bununla birlikte, baryumlu bir lavman, dolambaçlı sigmoid kolonlarda oynamak için tamamlayıcı bir araştırmacı role sahiptir. Kolonoskopi, kanser surveians muayeneleri ve takibi için en iyi yöntemdir. Tek hüküm, anatomik nedenlerle kolonoskopi çok zorlayan birkaç hastanın, sınırlı sol taraflı kolonoskopi (sigmoid kolondaki çift kontrastlı baryum lavmanından çok daha doğru) ile birlikte proksimal kolonu göstermek için baryum lavman ile kombine edilmesiyle en iyi şekilde incelenebilmesidir. Çok

sayıda yüksek adenomu olan hastalar gibi yüksek riskli hastalarda, çift kontrastlı baryumlu lavmanın kolonoskopi ile ekstra doğrulukta olması uygun olabilir. Esnek sigmoidoskopi ile yapılan sınırlı inceleme, sol iliyak fossa ağrısı olan hastalarda veya bağırsak alışkanlığının değiştirilmesinde önemli bir role sahip olabilir; ancak tek başına çift kontrast baryumlu lavman kabızlığı olan hastalarda veya daha az fonksiyonel semptomu olan diğer hastalarda daha etkili ve etkilidir normal veya küçük divertiküler hastalığı göstermek. Sanal kolonoskopi olarak da adlandırılan bilgisayarlı tomografik (BT) kolonografi ilk kez 1994 yılında Vining ve ark. Tarafından tanıtıldı. [Vining vd. (1994)]. Bu teknik, helezonik veya spiral BT taraması kullanarak veri alır ve özel post-processing yazılımı kullanarak kolon lümeninde yüksek kaliteli iki ve üç boyutlu görüntüler üretir. İnvaziv olmayan bir prosedür olup, tüm kalın bağırsağın kısa bir süre içinde taranmasını sağlar ve diğer organlar hakkında ek bilgi sağlar. Yakın zamana kadar, BT-kolonografinin kullanımı, CC'nin mevcut olmadığı üst kolon muayeneleri ile sınırlıydı, ancak semptomları olmayan erişkinlerde prekanseröz adenomların tarama testi olarak kullanımı giderek arttı. Birkaç çalışma prekanseröz polipler ve kolorektal kanserlerde BT-kolonografi ve kolonoskopi karşılaştırmasına rağmen [Pickhardt vd. (1994), Cotton vd. (2004)] Son yıllarda birçok araştırmacı semptomatik popülasyonlarda manyetik rezonans (MR) kolonografinin kullanımını araştırmış; Bu araştırmacıların çoğu MR kolonografinin tanısal değeri olduğuna karar vermiştir [Lubwold vd. (2000)-Hartmann vd. (2006)]. Bu teknikler sadece başlığı olan merkezlerde uygulanması gerektiği bildirilmiştir.

1.2.3.3 Biyolojik belirteçler

Kolorektal kanserlerin erken tanınması ve teşhis edilmesine izin verecek serolojik belirteçlerin araştırılması için çok çaba harcanmaktadır. Potansiyel tümör belirteçleri olarak çeşitli proteinler, glikoproteinler ve hücrel ve humoral maddeler araştırılmıştır, ancak bunların hiçbirisi kolorektal kanser için spesifik olmadığı bulunmuştur [Bresnahan vd. (1989)]. En yaygın olarak çalışılan belirteç Karsinoembriyonik antijen(CEA), bağırsak kanseri hastalarının preoperatif evreleme ve postoperatif takiplerinde yararlı olabilmekte, ancak asemptomatik hastada tanı için prediktif değeri düşüktür [Leung vd. (2004)]. Testin nispeten düşük duyarlılığı ve özgünlüğü, asemptomatik büyük hastaların

taranması için uygun değildir. Erken kolorektal kanseri saptamada duyarlılığının olmaması CEA kararlılığını tarama için sınırlamaktadır. Dukes 'A ve B lezyonları için duyarlılık % 36, Dukes' C için % 74 ve Dukes 'D hastalığında % 83, normalin üst sınırları olarak 2.5 mg / ml kullanıldığında. Karbohidrat Antijen 19-9 (CA19-9) gibi birkaç yeni karbohidrat antijeni incelenmekte ve kolonda preneoplastik ve erken neoplastik lezyonlara özgüllük açısından bir takım taahhütler bulunmaktadır [Breasalier vd. (1989)]. Tarama için etkinlikleri belirlenmeye devam etmektedir.

1.3 Evrelendirme

1.3.1 Evre sınıflaması kriterleri

Tedavi kararları genellikle eski Dukes veya Modified Astler-Coller (MAC) sınıflandırma şemasına [Fletcher vd. (1986)] referans olarak yapılır. Evreler tercihen TNM sınıflamasına göre tanımlanmalıdır [Cohen vd. (1993), Eisenberg vd. (1982), Newland vd. (1981), Olson vd. (1980), Zinkin vd. (1983)].

1.3.2 TNM sınıflaması

TNM [Zinkin vd. (1983)], klinik (ön tedavi) ve patolojik (cerrahi sonrası histopatolojik) sınıflandırma içeren çift bir sistemdir. Farklı inceleme yöntemlerine dayanan ve farklı amaçlara hizmet edeceğinden ikisini ayırt etmek zorunludur. Klinik sınıflandırma, cTNM, patolojik pTNM olarak tasarlanmıştır. TNM öneksiz kullanıldığında, klinik sınıflandırmayı ima eder. Genel olarak, cTNM tedavi seçiminin temelidir ve pTNM, prognostik değerlendirmenin temelidir.

Çizelge 1.1 Kolon Kanseri’nde ADJJ ve TNM evrelemesi ve evreleme kriterleri

ADJJ Evrelemesi	TNM Evrelemesi	TNM Kriteri
Evre 0	T is N0, M0	Mukozaya sınırlı tümör
Evre 1	T1, N0, M0	Tümör mukozaaalt epitelini istila etmiş
Evre 1	T2, N0, M0	Tümör kas tabakasını istila etmiş
Evre 2A	T3, N0, M0	Tümör bağ dokusunu istila etmiş
Evre 2B	T4, N0, M0	Tümör bitişik organı istila etmiş
Evre 3A	T1-2, N1, M0	Tümör 1-3 lenf noduna metastaz yapmış
Evre 3B	T3-4, N2, M0	Tümör 1-3 lenf noduna metastaz yapmış
Evre 3C	T yok, N2, M0	Tümör 4’ten fazla lenf noduna metastaz yapmış
Evre 4	T yok, N yok, M1	Başka bölgeye metastaz

TNM sınıflandırması.

Primer tümör (T)

TX: Primer tümör değerlendirilemez

T0: Primer tümör bulgusu yok

Tis: Karsinoma in situ: intraepitelyal veya lamina proprianın invazyonu *

T1: Tümör submukozayı istila eder

T2: Tümör muskularis invazyonlarına inversiyon yapar

T3: Tümör, muskularis propriadan subserosa girer,

veya peritoneal olmayan perikolik veya perirektal dokulara

T4: Tümör doğrudan diğer organları veya yapıları istila eder ve / veya delik açar

visseral periton **, ***

Bölgesel lenf düğümleri (N)

NX: Bölgesel düğümler değerlendirilemiyor

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1: 1-3 bölgedeki lenf nodlarında metastaz

N2: 4 veya daha fazla bölgesel lenf nodlarında metastaz

Uzak metastaz (M)

MX: Uzak metastaz varlığı değerlendirilemez

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz

* Not: Muskularis mukozasında submukozaya hiç uzatılmaksızın glandüler taban zarında (intra-epitel) veya lamina propriada (intramukozal) sınırlanmış kanser hücreleri içerir.

** Not: T4'teki doğrudan invazyon, kolorektumun diğer bölümlerinin seroz yoluyla tutulmasını içerir; örneğin, sigmoid kolonun çekum karsinomu tarafından işgal edilmesi.

*** Makroskopik olarak diğer organlara veya yapılar yapışmış olan tümörler T4 olarak sınıflandırılır. Ancak, yapışmada mikroskopik olarak hiçbir tümör mevcut değilse, sınıflandırma pT3 olmalıdır. Vasküler veya lenfatik istilanın varlığını veya yokluğunu belirlemek için V ve L altbaşlığı kullanılmalıdır. Dukes 'B, Dukes' C (herhangi T, N1, M0 ve T0) olduğu gibi daha iyi (T3, N0, M0) ve kötü (T4, N0, M0) prognostik grupların bir bileşimidir herhangi bir T, N2, M0).

1.3.3 Evreleme prosedürleri

1.3.3.1 Preoperatif evreleme: standart ve opsiyonel prosedürler

Aşağıda, potansiyel olarak iyileştirilebilen kolorektal kanserli hastaların evrelendirilmesi için genel kurallar bulunmaktadır: Tarihçe: Kişisel tıbbi geçmiş ek olarak, aile öyküsü olan kolorektal kanser, polipler ve diğer kanserler elde edilmelidir. Fizik muayene: Hepatomegali, asit ve lenfadenopati olup olmadığını kontrol edin.

Kadınlarda, eşzamanlı yumurtalık patolojisi, göğüs, yumurtalık ve endometriyal kanseri göz ardı et.

Laboratuvar verileri: Kan sayımı, CEA ve karaciğer kimyası. Bağırsak değerlendirmesi: Tam kolonoskopi veya proktosigmoidoskopi ve hava kontrast baryumlu lavman (tıkanıklık veya perforasyon yokluğunda) .CT ve MR-kolonografi, yalnızca yüksek tecrübeli merkezlerde teşhis ve evrelemede rolü vardır. Transmural penetrasyonu belirlemek için rektum kanserinde (bilgisayarlı tomografi kadar iyi) eko-endoskopi önemli bir role sahiptir; mevcut teknikler lenf nodu yayılımını güvenilir şekilde algılamaktadır: penetrasyon derinliğinin sıklıkla bir fazla ifadesi tanımlanmıştır ve sadece T4 olguların 50-60 % 'si organ sınırlarının histolojik olarak kesiştiğini gösterdi [Dershaw vd. (1990)].

Enstrümental inceleme: Preoperatif göğüs radyografisi ve BT taraması uygundur. Nükleer manyetik rezonans tomografi (NMR) lokal ileri evreli olgularda yararlı olabilir, ancak göreceli rolü tam olarak saptanamamıştır [Butch vd. (1986),Guinet vd. (1990)]. Pozitron emisyon tomografisi (PET) ve immunosintigrafi, değerlendirilmekte olan ve halen cerrahi ve / veya radyoterapi sonrası skar ve tümör dokusunu ayırt etmek için önerilen yöntemlerdir.

1.3.3.2 Cerrahi evreleme

Kolorektal kanserlerin cerrahi evrelendirilmesi, karaciğer metastazlarının değerlendirilmesi, hastalığın nodal yayılımı ve bağırsak duvarı boyunca komşu yapılara doğru tümörün uzatılmasını içerir. Düzgün pN evrelemesi için en az 12 düğüm çıkarılmalıdır [Van Cutsem vd. (2002), Compton vd. (2003)]. Bu, evre II hastalar için özellikle önemlidir. PN0 hastalarında prog-nozun> 14'ün altındaysa prognoz daha iyi olduğu, daha az düğüm çıkarılmış hastaların aksine prognoz daha iyi olduğu gösterilmiştir. Bunun bir cerrahi (daha fazla düğümün kesilmesi) veya patolojik (daha fazla düğüm bulma) meselesi olup olmadığı net değildir [Tepper vd. (2001)]. İntraoperatif ultrason karaciğer metastazları için daha doğru bir değerlendirmedir. Preoperatif ultrasonografi ve bilgisayarlı tomografi ile birlikte intraoperatif inceleme ve

palpasyon ile karşılaştırıldığında, intraoperatif ultrasonografi kolorektal karsinomların karaciğer metastazlarının saptanmasında en yüksek duyarlılığa sahiptir. Bu yöntemle okült karaciğer metastazları hastaların% 15'inde bulunur; Bunların% 5'inde kolayca çıkarılan tekli metastazlardır [Holscher vd. (1995)]. Karaciğer tümörlerinin rezeksiyonu sırasında intraoperatif ultrasonografi, multifokal tümör gelişimini veya uydu metastazlarını hariç tutmak için kullanılabilir; Ayrıca, rezeksiyon düzleminin ve uygun emniyet marjının planlanması önemlidir. İntraoperatif ultrasonografi yapılmadan modern karaciğer ameliyatı yapılamaz. Laparoskopik ultrasonografi, kolorektal tümörlerin laparoskopik evrelendirilmesi için endikedir ve aynı zamanda okült karaciğer metastazlarının saptanmasına hizmet eder.

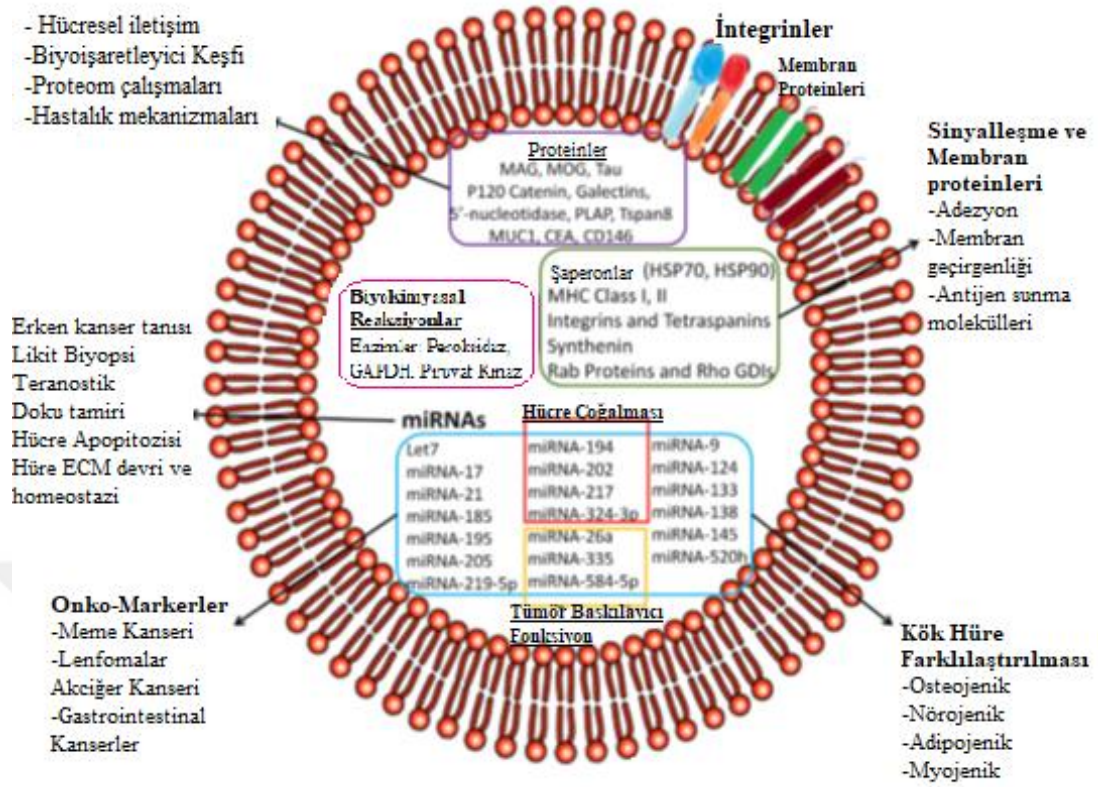
1.4 Eksozom ve Kanser İlişkisi

Hemen hemen tüm biyolojik sıvılarda 40-100 nm çapında membrana bağlı veziküller olan eksozomlar bulunur [Simons vd. (2009), Mathivanan vd. (2010), Gross vd. (2012)]. Plazma membranı ile füzyondan sonra çoğu hücre tipinden hücre dışı boşluğa salınırlar [Simons vd. (2009), Mathivanan vd. (2010), Gross vd. (2012)]. Lipidler ve proteinler, lipitlerce zenginleştirilmiş eksozom membranların ana bileşenleridir [Simons vd. (2009), Mathivanan vd. (2010), Gross vd. (2012)].

Şekil 1.2 de de belirtildiği gibi Proteinlere ek olarak, eksozomal lümende mRNA'lar, microRNA'lar (miRNA'lar) ve diğer kodlayıcı olmayan RNA'lar (ncRNA'lar) dahil olmak üzere çeşitli nükleik asitler yakın zamanda tanımlanmıştır [Sato-Kuwahara vd. (2015)]. Bu eksozomal RNA'lar, eksozomlar dolaştığında komşu hücreler veya uzak hücreler tarafından alınabilir ve daha sonra alıcı hücreleri modüle edebilir. Hücreler arasındaki genetik değiş tokuşdaki işlevlerinin keşfi, eksozomlara olan ilgiyi artırmıştır. MikroRNA'lar, hedef mRNA'ların 3'-translasyona uğramamış bölgesine (UTR) veya açık okuma çerçevesi (ORF) bağlanarak transkripsiyon sonrası gen susturulmasına aracılık eden 17-24 nt küçük, kodlayıcı olmayan RNA sınıfıdır [Bartel vd. (2004)]. MiRNA'ların hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, hücre göçü, hastalığın başlaması ve hastalığın ilerlemesi gibi birçok biyolojik aktiviteye katılımı bir çok çalışma da gösterilmiştir [Png vd. (2012), Gee vd. (2008), Tay vd. (2008), Kota vd.

(2009), Ma vd. (2007)]. Çalışmalar, miRNA'ların tükürük [Gallo vd. (2012), Michael vd. (2010)], idrar [Lv vd. (2013)], anne sütü [Zhou vd. (2012)] ve kan [Hu vd. (2010), Arroyo vd. (2011), Tabet vd. (2014)] dahil vücut sıvılarında kararlı bir şekilde var olabileceğini göstermiştir. Eksozomlara veya mikro-taneciklere paketlenmesine ek olarak, hücre dışı miRNA'lar yüksek yoğunluklu lipoproteine (HDL) [Vickers vd. (2011), Kuroiwa vd. (1999)] yüklenebilir veya veziküllerin dışındaki AGO2 proteini ile bağlanabilir [Harvey vd. (2014)]. Bu üç etki modu da miRNA'ları bozulmaya karşı korur ve kararlılıklarını garantilemektedir. Veziküllerin taşınabilirliği göz önüne alındığında, miRNA'ların eksozomlardaki rolü giderek daha fazla ilgi görmektedir. Dolaşımdaki veziküller yoluyla bilgi iletimi, hücre-hücre temasına bağlı sinyalleşme ve çözünür moleküllerin transferi yoluyla sinyalleşme kadar önemli olan hücreler arası iletişimin üçüncü yolu olarak kabul edilir. Eksozomların oluşumu ve salgılanması enzimler [Kosaka vd. (2010), Kosaka vd. (2013)] ve ATP [Pan vd. (1983)] gerektirir ve eksozomların miRNA ve mRNA profilleri ana hücrelerinkinden farklıdır [Valadi vd. (2007)]. Bu nedenle hücreler, eksozomlar ve bunların kargoları için aktif bir seçim mekanizmasına sahip olabilir. Ayrıca, alıcı hücrelerdeki transfer edilen eksozomal moleküler bileşenlerin fonksiyonları araştırılmaktadır.

Ekstraselüler veziküler (eksozomlar, prostasomlar, mikroveziküller, ektozomlar ve oncosomes), hücrelerarası iletişim ve moleküler aktarımın bir modeli olarak işlev görür. Bunlar, plazma membranından (MV'ler) veya bir ekzositoz işlemi yoluyla multivesiküler endozom olarak serbest bırakılır [Cicero vd., (2015)]. 'Ectocytosis' terimi, plazma membranından sağ taraftaki membran vezikülleri serbest bırakmanın başlangıcını tanımlamak için kullanılır, ancak 'ektozom' terimi daha çok nötrofil tarafından salınan veziküller ile ilgilidir. Ekstraselüler veziküller, iki genel gruba ayrılabilir: doğrudan hücre zarından salınan MV'ler ve multiveziküler vücutlar (MVB'ler) plazma membranı ile kaynaştığında ekzositozdan salınan eksozomlardır. Burada ana odağı, veziküllerin ikinci grubu, yani eksozomlardır. Eksozomlar, genellikle, 50-100 nm çap aralığında endozomlardan türetilen ve ekstrensek yolak aracılığıyla aktif olarak salınabilen organellerdir ve sadece 100 000 g ultra-santrifüjlemeden sonra pelet oluşturabilmektedir.



Şekil 1.2 Ekzozom içeriğinin ve etkilediği yolların şematize hali

Derkus Burak, Cell Biology International dergisindeki “Mechanisms of exosomes by cellular pathways” isimli yayınından alıntılanmıştır 2017.

1.4.1 Eksozomların oluşumu ve salgılanması

Eksozomlar ilk kez 1983 yılında Pan ve Johnstone tarafından keşfedilmiştir [Pan vd. (1984)]. Koyun retikülositlerinin olgunlaşması sırasında transferrin reseptörlerinin hücre dışı boşluğa salınmasının bir tür küçük vezikül ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir [Pan vd. (1984), Pan vd. (1983)]. 1989'da Johnstone bu fonksiyonel vezikülleri eksozom olarak tanımlamıştır [Johnstone vd. (1989)]. Bugüne kadar bir dizi hücre dışı vezikül tanımlanmıştır [Cocucci vd. (2009)]. Bununla birlikte, son otuz yılda, hücre dışı veziküller için birleşik bir terminoloji sunulmamıştır. Mikroveziküller, eksozomlar ve mikropartiküller olarak adlandırılan bu tür hücre dışı veziküllerin tanımı, farklı raporlar arasında kafa karıştırıcı kalmaktadır [Hunter vd. (2008), Skog vd. (2008), Silva vd. (2011)]. Hücrelerden veziküler sekresyon yoluna göre, hücre dışı veziküller iki genel sınıfa ayrılabilir. Bu sınıflardan biri, doğrudan hücre zarından ayrılan mikroveziküller

olarak bilinir. Diğeri, multivesiküler cisimler (MVB'ler) plazma membranı ile birleştğinde ekzositoz tarafından salınan eksozomlar olarak bilinir [Heijnen vd. (1999)]. Burada, esas olarak ikinci vezikül grubuna, yani eksozomlara odaklanılmaktadır. Eksozomlar, TEM mikroskopisi kullanılarak küresel bir morfolojiye sahip olduğu tespit edilmiştir [Simons vd. (2009), Mathivanan vd. (2010), Gross vd. (2012)]. Tetraspanin proteinleri, CD63, CD9 ve CD81 gibi çoğu eksozomda ortak proteinlerin varlığıyla da tanımlanabilirler.

Yukarıda belirtildiği gibi, eksozomlar başlangıçta endositoz tarafından oluşturulur. İlk olarak, hücre zarı endozomlar üretmek için yeniden işlenir. Daha sonra, endozom zarlarının parçalarını istila ederek endosom içinde birçok küçük vezikül oluşur. Bu tür endozomlara MVB'ler denir. Son olarak, MVB'ler hücre zarı ile kaynaşır ve eksozom haline gelmek için intralüminal endozomal vezikülleri hücre dışı boşluğa salar [Gruenberg vd. (2006)]. Eksozomların salınmasına katılan düzenleyici moleküller, Rab27a ve Rab27b'nin eksozom sekresyonu ile ilişkili olduğunu gözlemleyen Ostrowski vd. tarafından tanımlanmıştır. Rab27 veya bunların efektörleri SYTL4 ve EXPH5'in yıkılması, HeLa hücrelerinde eksozomların sekresyonunu inhibe edebileceği rapor edilmiştir [Ostrowski vd. (2010)]. Ayrıca, Yu vd. hem tümör baskılayıcı protein p53'ün hem de down-stream efektör TSAP6'nın eksozom üretimini artırabildiğini keşfetmiştir [Yu vd. (2006)]. Baietti ve diğ. syndecan-syntenin'in, eksozom oluşumunda önemli bir adım olan endozomal membranların intralüminal tomurcuklanmasını desteklemek için Leu-Tyr-Pro-X (n) -Leu motifi üzerinden ALIX proteini ile doğrudan etkileşime girdiğini bulmuşlardır [Baietti vd. (2012)]. Bu çalışmaların tümü, bir dizi molekülün düzenleyici bir ağ olarak hareket ettiğini ve eksozomların şeffaf hücrelerin oluşumundan ve salgılanmasından sorumlu olduğunu göstermektedir.

1.4.2 Eksozom trafiği

Vücut sıvılarında bulunan eksozomlar, hücreler arasında bilgi alışverişinde önemli bir rol oynamaktadır. Genel olarak, eksozomlar ve alıcı hücreleri arasında üç etkileşim mekanizması vardır. İlk olarak, eksozomların zar ötesi proteinleri, doğrudan hedef hücrelerin sinyal reseptörleri ile etkileşime girmektedir [Munich vd. (2012)]. İkinci

olarak, eksozomlar alıcı hücrelerin plazma membranı ile kaynaşır ve içeriklerini sitozole iletir [Mulcahy vd. (2014)]. Üçüncü olarak, eksozomlar alıcı hücrelere içselleştirilir ve iki akıbeti bulunmaktadır. İlkinde, kaynaşan bazı eksozomlar endozomlarla birleşebilir ve eksozomları alıcı hücreler arasında hareket ettirecek ve komşu hücrelere bırakacak transsitoz geçirebilir. Diğer durumda, yutulan eksozomlardan kaynaşmış endozomlar lizozomlara olgunlaşacak ve degradasyona uğrayacaktır [Tian vd. (2013), Koumangoye vd. (2011)]. Bazı yeni çalışmalar, alıcı hücrelerde eksozomların içselleştirilmesini etkileyen faktörleri bildirmiştir. Koumangoye vd. eksozomal lipid yığınlarının bozulmasının, eksozomların içselleştirilmesinin inhibisyonu ile sonuçlandığını ve hücre yapışması ve büyümesi ile ilişkili olan aneksinlerin, meme karsinomu hücre dizisi BT-549'da eksozomların alınması için gerekli olduğunu gözlemlemiştir [Koumangoye vd. (2011)]. Escreveite vd. yumurtalık karsinomu hücre hattı SKOV3 ve bu hücre hattı kaynaklı eksozomları, eksozom içselleştirmesine aracılık eden proteinlerin hem hücrelerin hem de eksozomların yüzeyinde sunulduğunu gösteren proteaz K ile tedavi edildikten sonra eksozom alımında bir azalmayı tarif etmiştir [Escreveite vd. (2011)]. Bununla birlikte, eksozom içselleştirmesinin ayrıntılı mekanizması hala iyi anlaşılmamıştır.

1.4.3 Eksozomların işlevi

Eksozomlar kan hücreleri, endotel hücreleri, immünoisitler, trombositler ve düz kas hücreleri gibi birçok hücre tipinden salınabilir [Liao vd. (2014), Saunderson vd. (2014), Wieckowski vd. (2006)]. Eksozomların, hücre dışı alanda dolaşırken, lipidlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin taşınmasıyla alıcı hücrelerin biyoaktivitelerini düzenleyebileceğine inanılmaktadır. Bazı raporlar, eksozomların immün cevap, tümör ilerlemesi ve nörodejeneratif bozukluklarda önemli rol oynadığını göstermiştir. Esther ve diğ. aktive edilmiş T hücrelerinin, T hücrelerinin ve DC'lerin etkileşimi sırasında immün yanıt down-regüle etmek için majör histo-uyumluluk kompleksi (MHC) sınıf II içeren dendritik hücre (DC) kaynaklı eksozomları toplayabileceğini bildirmiştir [Nolte vd. (2009)]. Trombin ve kollajen ile tedavi edilen trombosit kaynaklı eksozomlar, akciğer adenokarsinom hücre hattı A549'da proliferasyonu ve artmış kemoinvaziviteyi uyarmıştır [Janowska vd (2005)]. Ek olarak, epitelyal yumurtalık kanseri hücrelerinden

türetilen CD147-pozitif eksozomlar, in vitro endotelial hücrelerde anjiyogenezi arttırmıştır [Millimaggi vd. (2007)]. İlginçtir ki, Webber vd. bir mezotelyoma hücre hattı, bir prostat kanseri hücre hattı, bir mesane kanseri hücre hattı, bir kolorektal kanser hücre hattı ve primer fibroblastlar ile bir meme kanseri hücre hattından in vitro türetilmiş inkübe eksozomlar ve fibroblastların miyofibroblastlara dönüştürülebildiğini bulmuşlardır [Webber vd. (2010)]. Tümör türevi eksozomların mezenkimal kök hücrelerini tümör dokusunun stromasında kansere bağlı miyofibroblastlara dönüştürdüğünü açıklayan Cho vd. tarafından da benzer bir çalışma gözlemlenmiştir [Cho vd. (2012)]. Her ne kadar eksozomların işlevi yukarıda belirtilen çalışmalarda belgelenmiş olsa da, eksozomlarda bulunan belirli molekül sınıfının alıcı hücreleri etkilediği açık bir soru olmaya devam etmektedir.

Yukarıda belirtildiği gibi eksozomal miRNA'lar için ayırma mekanizması, ExoCarta veritabanına kaydedilen; proteinler, lipitler, DNA'lar, mRNA'lar ve miRNA'lar dahil olmak üzere eksozomlarda çok çeşitli moleküller bulunur [Simpson vd. (2012)]. Bu moleküller arasında, miRNA'lar gen ekspresyonundaki düzenleyici rolleri nedeniyle en çok dikkat çekmiştir. Goldie vd. küçük RNA'lar arasında miRNA oranının eksozomlarda ana hücrelerine göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir [Goldie vd. (2014)]. Bazı profillemeye çalışmalarının gösterdiği gibi, miRNA'lar eksozomlara rasgele dahil edilmez. Guduric-Fuchs vd. miRNA ekspresyon seviyelerini çeşitli hücre hatlarında ve bunlardan kaynaklı eksozomlarda analiz etmiş ve bir miRNA alt grubunun (örn., miR-150, miR-142-3p ve miR-451) tercihen eksozomlara girdiğini bulmuştur [Guduric vd. (2012)].

Benzer şekilde Ohshima ve arkadaşları, mide kanseri hücre hattı AZ-P7a'dan türetilen eksozomlardaki let-7 miRNA ailesi üyelerinin ekspresyon düzeylerini, akciğer kanseri hücre hattı SBC-3 / DMS-35 / NCI-H69 da dahil olmak üzere, kolorektal kanser hücre dizisi SW480 / SW620 ve mide kanseri hücre dizisi AZ-521 gibi diğer kanser hücre hatlarından olanlar ile karşılaştırmaktadır.

Tüm bu çalışmalar, ana hücrelerin, spesifik hücre içi miRNA'ları eksozomlara girmeye yönlendiren bir sıralama mekanizmasına sahip olduğunu göstermektedir.

Bütün bu çalışmalar, bir dizi molekülün anne hücrelerinde eksosom oluşumundan ve salgılanmasından sorumlu düzenleyici bir ağ olarak hareket ettiğini göstermektedir [Zhang vd. (2015)]. Eksozomların tam giriş mekanizması belirsizdir. Bununla birlikte, reseptör aracılı endositoz (örneğin, LFA 1, TIM 1 ve TIM 4), fagositoz ve plazma membranı ile doğrudan füzyon önerilmektedir. Tümör mikro-ortamında düşük pH değerinin, in vitro koşullarda insan metastatik melanomuna eksozomlar çekmek için şarttır olduğu gösterilmiştir. Bu durum, asidik bir ortamda eksozomal membranın stabilitesinde ve lipid / kolesterol içeriğinde bir artışın eksozomların gelişimi ile ilişkili olduğunu göstermektedir [Greening vd.(2015)]. Farklı hücre tiplerinin eksozom bileşikleri, ExoCarta veritabanından toplanmaktadır. Vesikül pedi ve ekstraselüler vesikül pedi, eksozomlar ve MV'ler hakkında yayınlanmış karmaşık bilgileri içeren iki veri tabanında bulunmaktadır. Eksozomların iç muhteviyatı ile ilgili bilgiler, kütle spektrometrisiyle incelenebilir. Az miktarda izole edilmiş eksozomların incelenmesi için geçerli bir yöntem flüoresan problarla salınan veziküllerin etiketlenmesine dayanan flüoresanla aktive edilmiş hücre ayırma optimal metodudur. Daha detaylı çalışmalar, eksozomların yüksek çeşitlilik gösteren kodlamayan RNA parçalarını taşıdıklarını göstermektedir [Cicero vd. (2015)]. Eksozomların T-hücresi aktivitesinde rolü olduğu ve muhtemelen immünosupresif aktiviteleri olduğu görülmektedir. Bunlar, sfingomiyelin, kolesterol ve GM3 glikolipidinden zengin olan spesifik bir lipid kompozisyonunun iki katmanlı zar tarafından oluşturulmuştur [Shih vd. (2008)]. Çeşitli raporlar, fosfatidilinositol, serin ve prostaglandinler gibi bazı lipid bileşenlerinin eksozomların fonksiyonunu düzenlediklerini göstermektedir. Yüksek frekans ile tanımlanan proteinler, füzyon proteinleri, zar nakil proteinleri (GTPazlar, anneksinler ve flotilin), ısı şoku proteinleri (örneğin HSC70), tetraspaninler (örneğin CD9, CD63 ve CD81), MVB biyo-proteinleri (örneğin, Alix ve TSG101), lipoproteinler ve fosfolipidlerdir ve bu proteinler eksozom belirteçleri olarak bilinir. Bunların arasında tetraspaninler, CD63 ve CD81 en sık kullanılan belirteçlerdir. Günümüzde, eksozomların protein, lipid, mRNA ve miRNA gibi farklı ana hücre materyalleri taşıdığını bilmekteyiz. Eksozomlar; CD'ler, lenfositler, trombositler, mast hücreleri, epitel hücreleri, endotel hücreleri ve nöronlar gibi farklı hücrelerden salınırlar. Kan, idrar, tükürük, amniyotik sıvı, anne sütü, hidrotermal sıvı, asitik sıvı ve çoğu hücrenin kültür ortamı da dahil olmak üzere tüm vücut sıvılarında bulunur [Lin vd. (2015)].

İlginç bir şekilde, plazma zarından eksozomların salınması sadece bir özellik değildir (MVB içerisindeki) intramuminal vezikülün in vitro olarak değil, mikrobiyal yaşam, bakteri, virüs, mantar ve parazitler tarafından da enfeksiyon esnasında in vivo olarak ortaya çıktığı görülmektedir [Silverman vd. (2011)]. On yıllar boyunca, memeli hücrelerinin plazma membranlarının MV'leri şeklindeki parçalarını atarlar [Trams vd. (1981)]. Bu nedenle, eksozomların miRNA'sı kanser gelişimiyle ilişkili olabilir. Yeni çalışmalar, belirli eksozomların tanımlanmasının yeni bir tanı aracı sağlayabileceğini göstermektedir. Aslında, çok sayıda çalışma, içeriği iletmek ve ilaç tedavisi aktarmak için biyobelirteçler ve kapsüller olarak eksozomların kullanımını araştırıyor. Bu nedenle, eksozomlardaki miRNA'lar biyobelirteç sağlayabilir ve terapötik potansiyel hedeflerine ulaşabilir. Eksozomların işlevine göre, eksozomlar yoluyla hücre-hücre iletişimi kanser gelişiminde önemli bir role sahip olabilir. Çeşitli raporlar, belirli eksozomal miRNA'ların bazı kanser fenotipleri ile ilişkili olduğunu ve dolayısıyla önemli biyolojik belirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Buna ek olarak, birçok çalışma, Gastro Intestinal kanserlerin moleküler seviyesinin tedavisinde miRNA kullanımını incelemiştir. Kanser hücrelerinin kanda yayılması yoluyla kanserin uzak bölgelere metastazı, GİS kanseri hastalarında kötü prognoza doğrudan bağlıdır. Dahası, GI kanseri hücreleri eksozomları kan dolaşımına salarlar. Bu nedenle serum eksozomları içindeki miRNA'ların teşhisi, Gastrointestinal kanserlerde nüksün biyolojik belirteçleri biçimindedir.

1.5 miRNA ve Görevleri

MikroRNA (miRNA), çoklu metabolik süreçlerde önemli rol oynayan küçük kodlamayan RNA grubudur. 1993'teki keşfinden bu yana [Lee vd. (1993)] sayısız çalışma, çapraz tür araştırmaları başlangıçta sitoplazmada translasyonel baskıya odaklanan, miRNA biyogenezi ve işlevleri ile ilgili bir dizi teori ortaya atmış ve kurulmuştur. Transkripsiyon, bölünme ve işleme sonrasında olgun miRNA çekirdeğinden sitoplazmaya taşınır ve RNA ile indüklenen sessizleştirme kompleksine (RISC) yüklenir. Sitoplazmada güçlü inhibitör fonksiyonlara ek olarak, 2008'deki araştırmalar, miR-373'ün ve prekürsörünün (pre-miR-373) sokulmasının soğuk şok etki alanını içeren protein C2 (CSDC2) ve E- kadherin [Place vd.(2008)]. Bu, miR-373'ün

dizi tamamlayıcılığına ve bu genlerin hızlandırıcılarına atfedilir. 2004'te, kodlayıcı olmayan küçük RNA üyesi olan küçük interfering RNA'nın (siRNA), promotör etkileşimi olsa da uzama faktör 1 alpha (EF1A) transkripsiyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir [Morris vd. (2004)]. Bunları takiben, promotör-hedefleyen siRNA'daki araştırma ilgi önemli ölçüde artmıştır [Ross vd. (2014)]. Mikroarray ve RNA-seq gibi yeni geliştirilen teknikler kullanıma girdiğinde çekirdekte zenginleşmiş birçok olgun miRNA bulunmuştur; bu da nükleer miRNA'ların düşündüğümüzden daha yaygındır olduğunu göstermektedir. Bu arada, promotör etkileşimi, kodlamayan RNA bağlama, RNA-DNA tripleksi ve arttırıcı etkileşimi içeren transkripsiyonel gen susturma (TGS) ve transkripsiyonel gen aktivasyonu (TGA) geliştiren birkaç model oluşturuldu. Buna ek olarak, son zamanlarda, RNA etkileşimindeki (RNAi) kilit katılımcıların çekirdeksitoplazması mekikasyonuna aracılık eden birkaç protein teyit edilmiştir [Schraivogel vd. (2014)].

miRNA'nın biyogenezisi hem nükleer hem de sitoplazmik makinelerin yer aldığı çok adımlı bir süreçtir. İlk olarak, miRNA geni RNA polimeraz II ile transkribe edilerek uzun bir pri-miRNA [Bartel vd. (2009)] üretilir ve daha sonra RNA bağlayıcı protein DGCR8 ve RNase III Drosha'dan oluşan mikro işleme kompleksine bağlanır [Kwon vd. (2016)]. Drosha pri-miRNA'yı saç tokası yapılı pre-miRNA'yı oluşturmak üzere parçalayarak miRNA olgunlaşmasını başlatır [Lee Y. vd.(2003)]. Daha sonra üretilen pre-miRNA, olgunlaşmanın tamamlandığı Exportin 5 aracılığıyla sitoplazmaya aktarılır [Yi vd. (2003)]. Sitoplazmada, ön miRNA, pre-miRNA'nın saç tokasının terminal halkasını kesen ve bir miRNA dupleks üreten Dicer [Park vd. (2011)] tarafından karakterize edilen 2-nt 3 'çıkıntısı ile tanınır. TRBP proteini, Dicer'ı stabilize eder ve şaperonları, dicing fonksiyonlarıyla dengeler [Wilson vd. (2015)]. Son olarak, miRNA dupleks, sitoplazmik Argonaute proteini (Ago) tarafından taşınır ve açılır. Bir iplikçik fonksiyonel miRNA-kaynaklı sessizleştirme kompleksi (miRISC) oluşturmak için tutulurken diğer iplikçik degrade olur [Kwak vd. (2012)]. Sitoplazmada transkripsiyon sonrası gen susturulması (PTGS), miRISC ile miRNA'nın aracılık ettiği klasik bir işlemdir. Örneğin, miR-139-5p ve miR-144, hem mRNA hem de protein seviyesinde TET2 ve TET3 ekspresyonunu azaltabilir [Jia vd. (2017)]. PTGS'in ilk adımı tanımanın yapılmasıdır. Bazalama temel prensipleri kanonik Watson Crick A-U, G-C eşleştirme

ve kanonik olmayan G-U eşleştirmesini içerir. MiRNA tanıma ve bağlama için hedef mRNA üzerinde miRNA yanıt elementi (MRE) olarak adlandırılan özel bir sekans vardır. MRE tET2 ve TET3 mRNA gibi çoğunlukla mRNA'nın 3'-UTR'sinde bulunur [Jia vd. (2017)]. Fakat bazı çalışmalar, bunun 5'-UTR'de ve hatta protein kodlayıcı dizilerde [Friedman vd. (2009), Subramanian vd. (2010), Yvonne vd. (2008)] gerçekleştiğini ileri sürmektedir. Memeliler için, baz eşleştirme her zaman kusurludur. Bir örnek let-7 ve lin-41 arasındaki temel eşleştirmedir. Lin-41'de iki MRE vardır, buna rağmen let-70'in 5'-ucuyla hiçbir mükemmel tamamlayıcılık göstermez [Friedman vd. (2009)]. Buna ek olarak, son çalışmalar, çevirinin üç yol ile engelleneceğini belirtti: (i) CAF1 / CCR4 / NOT1 kompleksinin aracılık ettiği deadenilasyon ve bozunma; (ii) Dcpl / 2 dekapping kompleksi tarafından kolaylaştırılan 5'-dekapping; (iii) Hedef mRNA'dan ribozom ayrılması (Şekil 1).

1.5.1 Çekirdekte MikroRNA'nın kanıtı

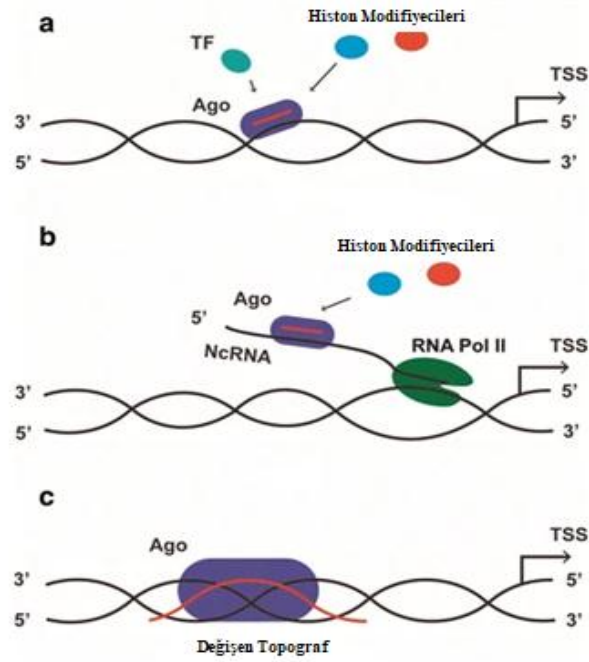
Kanıtları biriktiren, çekirdekte miRNA'lar bulunduğunu düşündürse de, miRNA'nın biyogenezinden sonra sitoplazmada kalması düşünülmektedir [Weinberg vd. (2016), Catalanotto vd. (2016), Calantari vd. (2015), Rasko vd. (2017), Huang vd. (2017), Ramchandran vd. (2017)]. Mikro RNA ilk olarak HeLa hücre çekirdeğinde tanımlandığından [Meister vd. (2004)], nükleer olgun miRNA'ların varlığı, mikroRNA profillerini sitoplazmik ve nükleer fraksiyonlara ayıran birkaç çalışma tarafından daha da desteklenmiştir. Mikroarray ve derin dizilim gibi yüksek verimli profil oluşturma teknolojileri ile, çeşitli hücre çizgilerinde yüzlerce çekirdek zenginleştirilmiş mikro RNA'sı belirlenmiştir (Tablo 1) [Politz vd. (2009), Liao vd. (2010), Park CW vd. (2010), Khudayberdiyev vd. (2013), Li vd. (2013), Chen vd. (2012), Wong vd. (2014)]. Bu sonuçlardan bazıları öncü sinyalleri ortadan kaldırmak için Northern Blot, qRT-PCR, RT-PCR ve in situ hibridizasyon (ISH) ile teyit edilmiştir. MikroRNA'nın nükleer lokalizasyonu nispeten genel bir fenomen iken, çekirdeğin içindeki mikroRNA profili, doku tipleri arasında değişmekte olduğunu belirtmek ilginçtir. Örneğin, insan miR-29b'nin nükleer zenginleştirilmesi HeLa hücrelerinde [Hwang vd. (2007)] bildirilmiştir, ancak diğer hücre dizilerinde [Yvonne vd. (2008)] bildirilmemiştir. Özellikle miRNA nükleer sitoplazmik oranı, üç farklı meme kanseri hücre hattını ayırt etmek için önemli

bir özellik olarak tanımlanmaktadır [Kalantari vd. (2015)]. Buna ek olarak, web erişilemeyen bir veritabanı RNALocate (<http://www.rna.society.org/rnalocate/>), Mayıs 2016'dan önce PubMed veritabanında yayınlanan makalelerden manuel olarak elde edilen RNA hücre altı lokalizasyon bilgisi sağlar. Nükleer lokalizasyonu olan bazı miRNA'lar RNALocate'de [RNA Locate, 2017]] bulundu.

1.5.2 Nükleer MikroRNA'ların Fonksiyonları

1.5.2.1 RNA'ların düzenlenmesi

Nükleer RISC'nin çekirdekte olduğu gibi sitoplazmada da miRNA ile transkripsiyon sonrası gen susturma (PTGS) 'ya aracılık edebileceği uzun zamandır gözlemlendi. Böyle bir patikada, diğer endonükleer kodlamayan RNA'lar veya miRNA öncülleri bozunabilir. 2005 yılında araştırmacılar nükleer lokalize 7SK snRNA'yı mükemmel şekilde tamamlayıcı siRNA transfeksiyonuyla etkin bir şekilde parçalamışlardır [Robb vd. (2005)]. Uzun olmayan kodlayıcı RNA (lncRNA), aynı zamanda 200 nükleotid uzunluğunda kodlanmamış RNA'ların bir grubunun da endonükleer PTGS kontrolüne tabi olduğu gösterilmiştir. Örneğin, metastaza bağlı akciğer adenokarsinom transkript 1 (MALAT1), çekirdekte Ago2'ye bağımlı bir şekilde miR-9'un bir hedefidir [Leucci vd. (2013)]. Çekirdekte, miR-15a / 16-1'in olgunlaşması, miRNA-709 tarafından pri-miR-15a / 16-1 ve miR-709 [Tang vd. (2012)] arasında bağlanarak inhibe edilir ve bu da bir miRNA'nın sentezlenmesinin ve olgunlaşmasının başka bir miRNA'ya tabi olmak.



Şekil.1.3 MikroRNA-Promoter etkileşim mekanizması

(Liu, H., Lei, C., He, Q. *et al.* Nuclear functions of mammalian MicroRNAs in gene regulation, immunity and cancer. *Mol Cancer* **17**, 64 (2018) doi:10.1186/s12943-018-0765-5)

Promotörlerle etkileşim yoluyla transkripsiyonel regülasyon siRNA yönlendirmeli transkripsiyonel regülasyonun gözlemlenmesine dayanan MicroRNA-promotör etkileşimi için üç model vardır [Subramanian vd. (2010), Liv d. (2017)] (Şekil 2). Bu üç modelin tümü Ago proteini ile ilişkilidir, ancak Ago1 veya Ago2'nin dahil olup olmamasına ilişkin bazı çelişkili sonuçlar vardır [Liv d. (2014)]. Regülasyon ya aktivasyon ya da bastırma olabilir ve hangi modun olduğu hedef bölgenin konumuna (TATA kutusu motifi ve CpG adası bölgesi gibi) ve promotörün epigenetik statüsüne (DNA metilasyonu gibi) karşı duyarlıdır [Li vd.(2006)]. Dahası, hedef bölge transkripsiyon başlatma alanından çok uzakta olabilir. Örneğin, en etkili küçük aktive edici RNA hedefleme sitesi, transkripsiyon başlangıç alanının (TSS) 1611 bp üstünde bulunur [Meng vd. (2016)]. Bazı histon düzenleyicilerinin promotör bölgeye dahil edildiği kanıtlanmıştır. Nazofaringeal karsinomda [He vd. (2016)] fumarat hidratazın ekspresyonunu bastıran histometil transferaz ökromatik histon lizin metiltransferaz 2 (EHMT2), zeste homolog 2'nin (EZH2) arttırıcı ile miR-584-3p tarafından Ago2'ye bağlı bir şekilde uyarılır ve böylece gastrik kanserde matriks metalloproteinaz 14 (MMP-14) ekspresyonu [Zheng vd (2017)]. Kısa süre önce yayınlanan bir araştırma,

RNA ile indüklenen transkripsiyonel aktivasyon kompleksini hedefleyen genomun en az üç elemandan oluştuğunu gösterdi: küçük RNA yüklü Ago2, RHA (bir nükleer DNA helikaz II) ve CTR9 (transkripsiyon başlatmada yer alan PAF1 kompleksinin bir bileşenidir) ve uzama). P21 promotörünü hedefleyen kompleks RNA polimeraz II ile etkileşerek transkripsiyon başlatmayı uyarır ve p21 geninde histon H2B'nin ubiquitasyonu eşliğinde mRNA uzamasına neden olur. Bu yaygınlaştırma, H3K4 metilasyonu ve asetilasyon için bir ön şart olarak kabul edilir ve ardından histon modifikasyonu izlenir [Portnoy vd. (2016)]. Bununla birlikte, düzenleme sürecinde yer alan epigenetik modifikasyonların karmaşıklığı ile birlikte miRNA'nın DNA metilasyonuna aracılık edip edemeyeceği şüpheli kalmaktadır [Morris vd. (2004), Li vd. (2014), Ting vd. (2005)].

1.5.3.2 MikroRNA'lar, çekirdekte arttırıcı tetikleyici görevi görür

Arttırıcılar, gen transkripsiyonunu upregüle edebilen genetik cis düzenleyici elementlerdir. H3K27ac de dahil olmak üzere arttırıcı bazı işaretleyicileri, bazı MIR'ler ve çoğaltıcılar örtüştüğü anlamına gelen microRNA genlerinde (MIR'ler) bulunur. MiR-26a-1, miR-339, miR-3179, miR-24-1, miR-24-2 gibi bazı miRNA'ların komşu genlerin ekspresyonunu indükleyebildikleri kanıtlanmıştır [Xiao vd. (2016)]. Örneğin, miR26a-1 geni ITGA9, CTDSPL, VILL ve PLCD1 protein kodlayıcı genlerle çevrilidir. MiR26a-1'in aşırı ekspresyonu, HEK293T'de ITGA9 ve VILL'in transkripsiyonel aktivasyonuna yol açacaktır. MiRNA tohum bölgesi silindiğinde veya mutasyon geçirildiğinde veya arttırıcı lokus silindiğinde, bu işlevin, bu işlevin miRNA-arttırıcı baz eşleştirmesine dayandığına işaret ettiği durumlarda bozulur. Başka bir miRNA, miR-24-1 de komşu genlerin, FBP1 ve FANC ekspresyonunu arttırır. Artan miR-24-1, hepsi aktif düzenleyici işlevleri gösteren RNA polimeraz II, p300 / CBP, zenginleştirici RNA'ların zenginleşmesine yol açacaktır. İlginçtir, ChIP-qPCR, Ago2'nin arttırıcı lokusta olduğunu gösterir. Dahası, Ago2 elenirse, miR-24-1 komşu genlerin transkripsiyonel aktivasyonu meydana gelmez [Xiao vd. (2016)]. Dolayısıyla, miRNA'lar tarafından indüklenen arttırıcı aktivasyonun, Ago2'nin doğrudan lokusta işlev görmesini veya sitoplazmadan çekirdeğe kadar olgun miRNA taşıdığını ileri sürülebilir.

1.5.3.3 MicroRNA'nın nükleer ve Sitoplazmik fonksiyonları arasındaki benzerlikler ve farklılıklar

Yüksek verim profili sonuçlarına göre, miRNA'ların büyük bir kısmı çekirdek ile sitoplazma arasında dolaşmakta ve bu da hem Liu hem de diğerlerine sahip olabileceklerini göstermektedir. Moleküler Kanser (2018) 17:64 Sayfa 6/14 nükleer ve sitoplazmik fonksiyonlar. Mevcut olan, miRNA nükleer ve sitoplazmik fonksiyonlar arasındaki benzerlikler ve farklılıklar hakkındaki bilgiler şu şekildedir (Tablo 2). Her iki fonksiyon da birden fazla prosesinin düzenlenmesinde etkilidir ve miRNA nükleer ve sitoplazmik işlevlerin arabulucuları kısmen örtüşür. Nükleer RISC'nin sitoplazmik RISC'den daha küçük olduğunu gösteren kanıtlar olmasına rağmen [Ohrt vd. (2008)]. Çekirdek RISC olarak Ago2 ve TNRC6'nın nükleer lokalizasyonu kanıtlanmıştır. Bu nedenle, PTGS, hem çekirdekte hem de sitoplazmada indüklenebilir. Bununla birlikte, benzerlikler dışında, sitoplazmik ve nükleer miRNA'lar arasındaki farklılıklar, lokalizasyonu, hedefleri ve mekanizmaları farklı olduğu için açıktır. Sitoplazmadaki MiRNA'lar yalnızca olgun mRNA'ya erişebilir ancak DNA'ya erişemezler. Burada sitoplazmik işlevler, yalnızca miRNA-mRNA hibrid etkileşimi yoluyla post-transkripsiyonel modifikasyonu içerir. Translasyon baskısına bölünme, de-adenilasyon, 5'-dekapaj veya ribozom ayrılması vasıtasıyla aracılık edilir. Halbuki çekirdekteki miRNA, nükleoplazmada DNA ve RNA ile etkileşime girme şansına sahiptir. Bu nedenle çekirdekte transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası regülasyon mevcuttur. Bununla birlikte, nükleer miRNA sitoplazmik miRNA ile aynı post-transkripsiyonel gen susturma (PTGS) mekanizmasını paylaşır. Çekirdekte hedefler, kodlanmamış RNA'lar ve miRNA'ların öncülleri de dahil olmak üzere endonükleer RNA'lardır. Transkripsiyon düzenleme esas olarak miRNA-promotör etkileşimi vasıtasıyla sağlanır. Üç tane miRNA-promotörü etkileşim modeli, yukarıda incelendiği gibi, RNA-RNA hibrid, RNA-DNA hibrid ve RNA-DNA tripleksidir. RNA-RNA hibrid modeli için, miRNA-Ago kompleksi kodlayıcı olmayan transkriptleri hedefler ve promoter bölgedeki epigenetik modifikasyonu değiştirmek için epigenetik faktörleri alır [Lee vd. (2003)]. MiRNA ayrıca, histon modifikasyonunu değiştirmek için transkripsiyon preinitiasyon kompleksi tarafından kolaylaştırılan promotörü doğrudan hedefleyebilir [Portnoy vd. (2016)]. RNA-DNA tripleks modelinde miRNA, DNA topografisini değiştirerek transkripsiyonu etkinleştirmek veya bastırmak için DNA ile üçlü sarmal

yapı oluşturur [Paugh vd. (2016), Toscano vd. (2014)]. Yakın zamanda, arttırıcı ilişkili mekanizma da keşfedilmiştir [Xiao vd. (2016)]. Sonuç olarak, nükleer ve sitoplazmik fonksiyonlar arasında hedef ve mekanizmaların farklılıkları vardır.

Çizelge 1.2 MikroRNA'nın nükleer ve sitoplazmik fonksiyonları arasındaki benzerlik ve farklılıklar

	Sitoplazmik	Nükleer
Düzenlenme düzeyi	Transkripsiyon sonrası	Transkripsiyon sonrası veya Transkripsiyonel
Hedef	mRNA	Kodlanmamış RNA, pri-miRNA, promoter,
Mekanizma	RNA-RNA hibridi	RNA-RNA hibridi, RNA-DNA hibridi, RNA-DNA triplex
Etki	Susturma	Aktivasyon veya susturma

1.5.4 Kanserde MikroRNA'nın nükleer fonksiyonları

Kanser progresyonu, tümörün başlatılması, yükseltilmesi, progresyonu, anjiyogenez ve metastazı içeren metabolik olarak dinamik bir süreçtir. Klasik sitoplazmik bir biçimde, çok sayıda çalışma, miRNA'ların kanserde oynadığı rolün önemli olduğunu göstermektedir. Örneğin, glioma'da miR200c, moesin (MSN) mRNA'sı ile etkileşerek tümör büyümesini ve metastazı baskı altına alır [Qin vd. (2017)]. MiR-4260 tümör süpresör kolorektal mutant kanser proteinini (MCC) ve SMAD4'ü hedef alarak kolorektal kanserde bir onkopromoter olarak görev yapmaktadır [Zheng vd. (2017)]. Buna ek olarak, nükleer miRNA'ların, ilgili gen loküsünün promotörüne etki ederek kansere bağlı çeşitli tümör yükseltici / baskılayıcı genlerin veya transkripsiyonel regülasyona dahil oldukları bildirilmiştir. İlginç olarak, miRNA'nın diğer aktive mekanizmaları da bildirilmiştir [Cui vd. (2014)]. Son yıllarda, gelişen bir literatür nükleer miRNA'lar ve kanser üzerine yoğunlaştı. Süregelen zorluklara rağmen, oldukça büyük sonuçlar elde edilmiştir. Tümör başlatma, kendi kendine yetme ve apoptoz Kanser başlangıcı ve ilerlemesinin, kendi kendine yetebilme ve otomatik yenilenme yeteneğine sahip ölümsüzleştirilmiş hücre gruplarına yol açabilecek anormal kontrol ve büyüme, farklılaşma ve apoptoz düzenleyici sinyallerin entegrasyonundan kaynaklandığı genel bir fikir birliğidir [Scott vd. (1984)]. Apoptoz, hücrelerin fizyolojik ve patolojik koşullar altında programlanmış hücre ölümü yaşadığı düzenlenmiş ve

düzenlenmiş bir hücreyel süreçtir. Kusurlar, apoptotik yollar boyunca herhangi bir noktada ortaya çıkabilir ve etkilenen hücrelerin malign transformasyonuna, tüm metastaz ve ilaç direncine neden olabilir [Xiao vd. (2016)]. Nükleer miRNA ve transkripsiyonel gen susturma / aktivasyon mekanizmalarıyla ilgili son zamanlarda yapılan araştırmalar, tümörigenez ve apoptoz süreçlerinde anlayışımızı zenginleştirebilecek bilgiler sağlamıştır. Kromatin immüno çökeltme ve RNA taklitlerini kullanarak yapılan çalışmalar, miR-423-5p'nin RNA polimeraz II doluluk oranını azalttığını ve insan meme kanseri hücrelerinin progesteron reseptör (PR) hızlandırıcısında histon H3'ün lisin 9 dimetilasyonunu (H3K9me2) arttırdığını ve bunun bir kromatin seviyesinde susturma mekanizmasını gösterdiğini ortaya koymaktadır meme bezi ve göğüs kanserinin gelişiminde endokrin etkilere aracılık eden PR ifadesinin düzenlenmesi için [Conneely vd. (2003)].

Onkogenik bir intronik miRNA olan MiR-483'ün en baskın imprinted insülin benzeri büyüme faktörü 2 (IGF2) gen promoteri P2'ye bağlandığı bildirilmiştir. MiR-483'ün ektopik ekspresyonu, IGF2 ekspresyonunun upregülasyonunu, aynı zamanda tümör hücre çoğalması, migrasyon, invazyon ve tümör koloni oluşumunda bir artışa neden olur [Zhang vd. (2017)]. Alfa metilasil-CoA racemase (AMACR), prostat kanserinde (PCa) aşırı miktarda aşırı eksprese edilir ve transkripsiyonel düzenleyicileri, çeşitli transkripsiyon faktörleri ve CTNNB1 / β -katenin içerir. PCacells'de in vitro olarak Erdmann K et al. Tarafından yürütülen çalışmalar [Erdmann vd. (2017)], miR-138'in CTNNB1'in transkripsiyonel indüksiyonu yoluyla dolaylı olarak AMACR'yi yukarı-regüle ettiğini ortaya koymuştur.

Üç miRNA (miR-370, miR-1180 ve miR-1236), p21-promotör bağlanması yoluyla nükleer p21 ifadesine neden olur. Üç miRNA'nın ekspresyon seviyeleri, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında mesane kanseri dokularında azalmaktadır. Bu arada, bu miRNA'ların ekspresyonu p21 mRNA ekspresyonu ile pozitif korelasyon gösterir. Bu üç miRNA'nın aşırı ekspresyonu esas olarak p21'i düzenleyerek mesane kanseri hücrelerinin çoğalmasını inhibe eder [Wang vd. (2014)]. MiR-211, pro-apoptotik transkripsiyon faktörü C / EBP-homolog proteini (CHOP) stres ve PERK'ya bağımlı şekilde aşağı regüle eden bir sağıkalım öncesi mikroRNA'dır. Bu, hücrenin CHOP'un

erken birikimini önlemesine ve apoptotik aktivasyondan önce homeostazı yeniden inşa etmesine izin verir [Chitnis vd. (2012)]. Fonksiyonel proteomik kullanan çalışmalar, miR-124'ün bir RNA-aktivasyon fonksiyonu olduğunu ortaya koymuştur; bunun sonucu olarak, p27 promotörü bölgesi üzerine transkripsiyona bağlanarak ve indükleyerek bir sonraki G1 arrestine yol açarak p27 protein ekspresyonunun doğrudan indüksiyonuna neden olmuştur. Bir xenograft modelini kullanan in vivo çalışmaların ortaya çıkması, nanopartikül aracılı MIR 124'ün verilmesinin, tümörün büyümesini azaltabileceğini ve apoptozu artırmak için hücrelerin etoposide sensitize olabileceğini göstermiştir [Seviour vd (2016)]. Benzer şekilde, miR-6734'ün, p21 gen ekspresyonunu düzenleyerek ve daha sonra hücre döngüsü durması ve apoptozu indükleyerek kolon kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bulundu [Kang vd. (2016)]. MiR-877-3p'nin bağlanma bölgesi, tümör süpresör geni p16'nın promotör alanında bulundu. P16, mesane kanserinin proliferasyonunu ve tümörigenezisini inhibe etmek için G1 fazının indüksiyonu ile benzer bir fonksiyona sahiptir [Li vd. (2016)]. P16 / INK4a'nın, EPC yaşlanmasını telomeraz ile modüle ettiği varsayılmıştır [Yang vd. (2008)]. Genel olarak, promotör bölgeler üzerinde esas olarak hareket eden nükleer miRNA'ların, kanser başlatma sürecinde onkogenler, tümör süpressörleri veya diğer kansere bağlı genlerin ekspresyon profilini etkilediği gözlemlenmektedir.

1.5.5 Metastaz ve Anjiyogenez

Tümör metastazı malign hücrelerde genetik ve epigenetik değişikliklerin oluşmasını içerir ve bu da kanser hücrelerinin küresel yayılımına ve hastalarda yaşamı tehdit eden koşullara neden olabilir. Metastatik kaskadın ani bir basamağında anjiyogenezis ve primer tümörün vaskülatür vasıtasıyla taşınması için ana güzergahı sağlar [Valatsyan vd. (2011)]. Son yıllarda, matriks metalloproteinaz (MMP) [Qu vd.(2015), Xiang vd. (2015), Zheng vd. (2016)], protokadherin 9 (PCDH9) [Jingting vd. (2007)], E-cadherin [Place vd. (2008)], soğuk şok alan adı da dahil olmak üzere, miRNA endonükleer mekanizmaların hedefleri olan bir dizi metastaz regülatörü keşfedilmiştir Bunların birçoğu, epitelial mezenşimal geçişin ekstrasellüler matriks (ECM) bütünlüğünün veya efektörlerinin düzenlenmesinde yer alan C2 (CSDC2) [Place vd. (2008)] vb.

E-cadherin, cadherin süper familyasına aittir ve hücreler arasında adezyon düzenleyicisi olarak işlev görür. Bu gen tümör baskı geni olarak düşünülür ve kaybı birçok malign tümörde gözlenir. MiR-373, promoter bağlanması yoluyla E-cadherin ve CSDC2 ekspresyonunu indüklemektedir [Place vd. (2008)]. MiR-205, prostat kanserinde IL24 ve IL32 tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu artırır. MiR-205 transfekasyonu, hücre büyümesi, metastaz ve prostat kanseri hücrelerinin invazivitesinde azalmaya neden olur [Majid vd. (2010)].

Matris metalloproteinaz 14 (MMP-14), çeşitli tümörlerde göç ve invazivliği arttıran bir membranlaşmış MMP'dir. Hem miR-337-3p hem de miR-584-5p, insan neuroblastomasında MMP-14 transkripsiyonunu inhibe eder. Her iki miRNA'nın aşırı ekspresyonu in vitro ve in vivo insan neuroblastomunun büyümesi, metastazı ve anjiyogenezinde azalmaya neden olur [Xiang vd. (2015), Wang vd. (2017)]. Gastrik kanserde, miR-337-3p, Ago2'yi işe almak ve mide-bağırsak baskılayıcı kromatin yeniden modellenmesini sağlayarak, miyeloid zinc parmak 1'i (MZF1) indüklenen transkripsiyonal aktivasyonu MMP-14'ü inhibe eder. MiR-337-3p gastrik kanser hücrelerinin büyümesini, göçünü ve anjiyogenezini in vitro ve in vivo zayıflatır [Zheng vd. (2017)]. MiR-558, Heparanaz (HPSE) promotörüne bağlanabilir ve Ago-1-bağımlı bir tarzda ekspresyon etkinliğini artırır. Heparanaz polimerik heparan sülfat moleküllerini parçalayan ve koryokarsinomadaki gibi tümörün göç ve invazivitesi ile ilişkili olan bir endoglikosidazdır [Jingting vd. (2007)]. Tutarlı bir şekilde, miR-558'in knockdown ve aşırı ekspresyonu, nöroblastoma hücrelerinde tümöröjeniz ve saldırganlık üzerindeki pozitif fonksiyonunu göstermektedir [Qu vd. (2015)].

Kaderin süper ailesi üyesi olan Protokadherin 9 (PCDH9), hücre-hücre yapışmasını kolaylaştırır ve glioma'da aşağı regüle edilir. MiR-215-5p, PCDH9'un hem promotörüne hem de 3'UTR'ye bağlanır ve glioma'da PCDH9 ekspresyonunu inhibe eder [Wang vd. (2017)].

Nükleer uzunluktaki kodlamayan bir RNA olan Metastazla İlişkili Akciğer Adenocarcinoma Transkript 1 (MALAT-1), küçük hücreli dışı akciğer karsinomasında (KHDAK) metastazda önemli bir rol oynamaktadır. Daha önceki çalışmalarda, miR-9

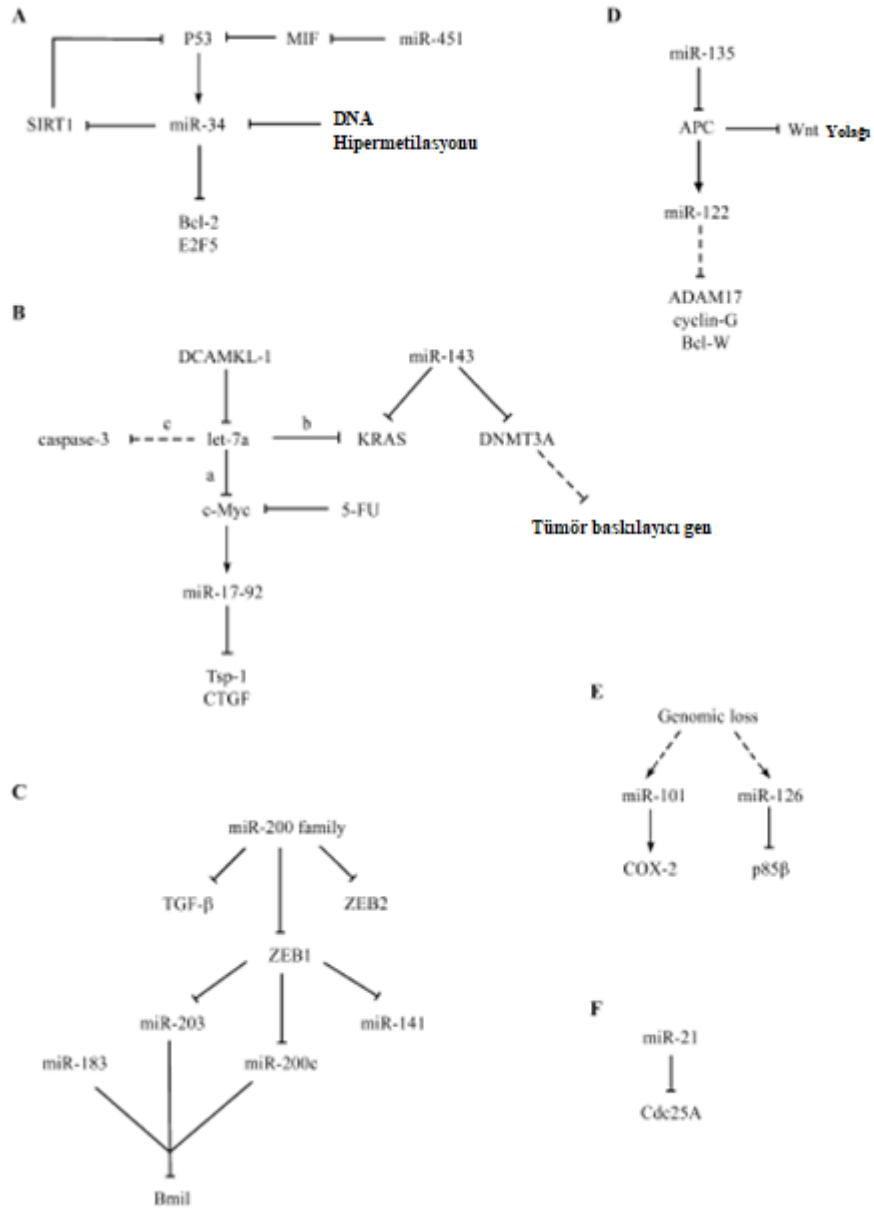
post-transkripsiyonel olarak MALAT1'i çekirdekte Ago2'ye bağılı olarak regüle eder [Leucci vd. (2013)]

1.6 Kolon Kanserinde Eksozomal miRNA'ların Rolü

miRNA'lar biyolojik süreçlerin düzenlenmesi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir ve miRNA'ların anormal ifadesi farklı kanserlerle ilişkilidir [Lu vd. (2005)]. CRC'nin gelişimi, gen mutasyonunun ve anormal metilasyonun büyük bir kısmını oluşturduğu ilerleyici bir olay olarak kabul edildiğinden, miRNA'ların bu karmaşık ağlarda yer aldığı bulunmuştur [Faber vd. (2009)]. CRC'nin gelişimindeki miRNA'lara ilişkin mekanizmaları, CRC'nin tanı ve prognozunda biyobelirteçler olarak potansiyel miRNA'ları ve bunların moleküler düzeyde kanser tedavisinde ümit verici etkilerini kapsayan ilgili bulgular aşağıda özellikle ele alınacaktır.

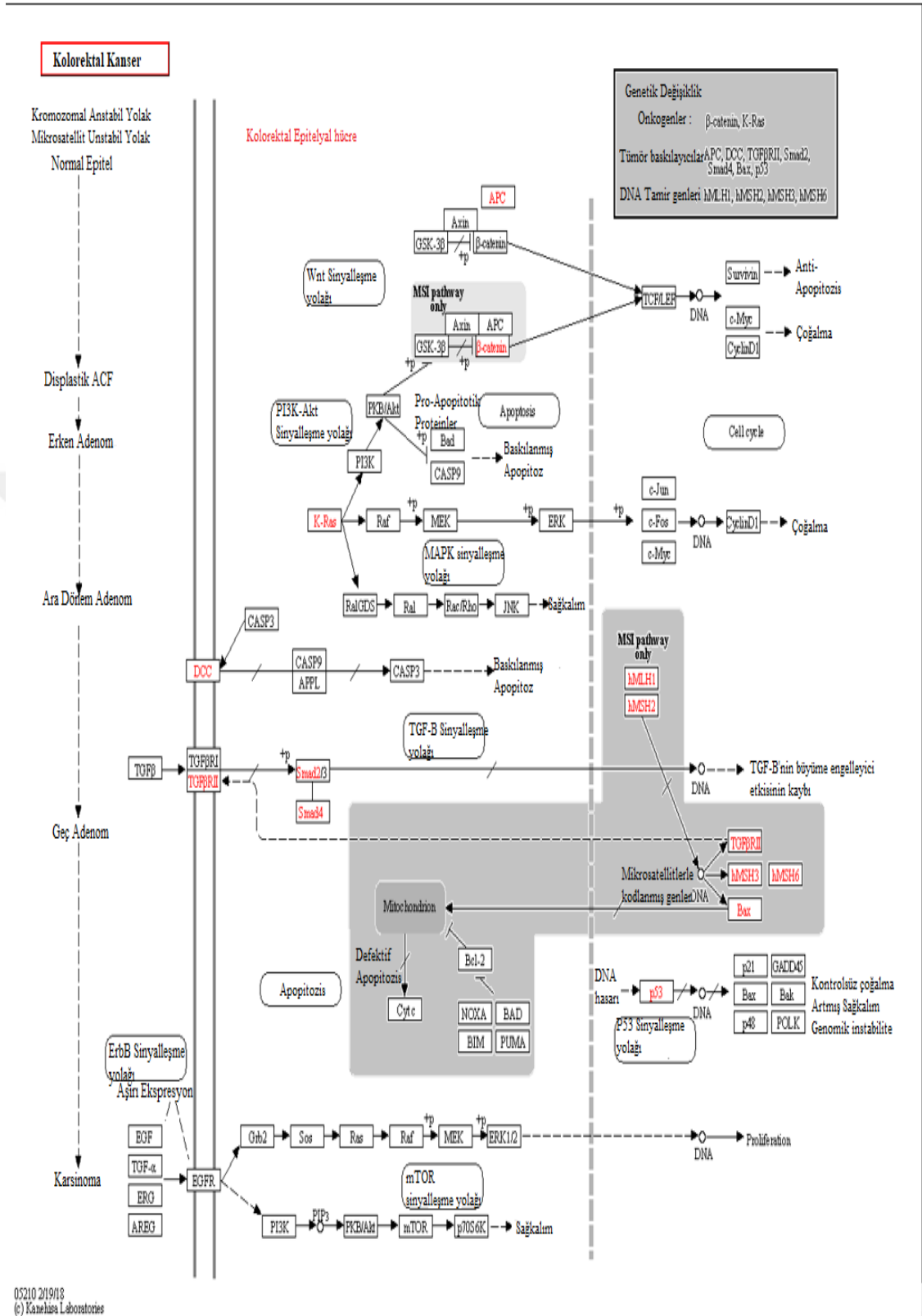
Şekil 1.3 de şematize edilen bir çalışmada, üç üyeli miR-34 ailesinin hücre çizgileri ve dokularında p53 tarafından doğrudan düzenlendiğini ve hücre döngüsü düzenleyici genlerin mikrodiziler ve algoritma tahminlerine dayanarak doğrudan miR-34 tarafından düzenlendiğini bulmuştur. Fonksiyonel kanıtlar, Bcl-2 proteininin, antisens oligonükleotid transfeksiyonuna dayanan miR-34a fonksiyon kaybı ile fare embriyonik kök hücrelerinde miR-34 tarafından doğrudan düzenlendiğini gösterdi. MiR-34 ailesinin iki üyesinin ifadesi, küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinin (KHDAK) 14'ünde (% 43) önemli ölçüde azalırken, miR-34 ekspresyonunun restorasyonu, KHDAK hücrelerinin büyümesini inhibe etti [Bommer vd. (2007)]. Ek olarak miR-34a'nın iki insan kolon kanseri hücre çizgisine (HCT 116 ve RKO) geçici olarak sokulması, hücre proliferasyonunu tamamen bastırdı ve E2F yolunun aşağı regülasyonu ve p53 yolunun yukarı regülasyonu yoluyla yaşlanmaya benzer fenotipleri indükledi. Ayrıca miR-34a'nın 25 insan kolon kanseri dokusunun 9'unda eşleşen normal dokulara kıyasla azaldığı bulunmuştur [Tazawa vd. (2007)]. Öte yandan Şekil 1.4 ve 1.5 de de gösterildiği gibimiR-34a ayrıca SIRT1 ekspresyonunu inhibe ettiği görülmüş ve asetillenmiş p53 seviyesini arttırmaktadır.. SIRT1'in miR 34a tarafından baskılanması eninde sonunda geniş tip insan kolon kanseri hücrelerinde apoptoza yol açmış, ancak p53 içermeyen insan kolon kanseri hücrelerinde bu durum söz konusu olmamıştır. miR-

34a geninin kendisi p53'ün bir hedefi olduğundan, p53 ve miR-34a arasında pozitif bir geri besleme döngüsü olduğunu ve miR-34a'nın SIRT1-p53 yolu boyunca bir tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceği öne sürülmüştür [Yamakuchi vd. (2008)]. Makrofaj migrasyon inhibitör faktörü (MIF), inflamasyon ve bağışıklığın konakçı kontrolünde kritik bir rol oynayan doğal bir sitokindir ve MIF, p53 tümör baskılayıcı aktivitesini inhibe edebilir [Hudson vd. (1999)]. İlginç bir şekilde, MIF'nin kolorektal karsinogenez ve hipoksiye bağlı apoptozda önemli bir rol oynadığı bulunmuştur [Ohkawara vd. (2005), Wilson vd. (2005), He vd. (2009)]. MIF, CRC'nin tanı ve prognozunda umut verici bir biyobelirteç olarak kabul edilirken, miR-451'in aşağı regülasyonu, mide kanseri olan hastalarda daha kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur [Legendre vd. (2003), Yasasever vd. (2007), Lee vd. (2008)]. Biyoinformatik analiz, MIF'nin miR 451'in potansiyel bir hedefi olduğunu göstermiştir. Mide kanseri ve CRC hücrelerinde miR-451'in aşırı ekspresyonu, hücre proliferasyonunun azalmasıyla sonuçlanmış, radyoterapiye yatkınlıklarını arttırmış, hem mRNA'da MIF'nin aşağı regüle ifadesi hem de protein seviyesinde azalma gözlemlenmiştir. Ayrıca, mide tümörlerinin biyopsilerinde miR-451 ile MIF ekspresyonu arasında, tümör baskılayıcı olarak miR-451'in rolünü öneren ters bir bağlantı gözlenmiştir [Bandres vd. (2009b)]. Bir bütün olarak, miRNA'lar enflamasyon ve tümör oluşumunu bağlayan sinyal yolunda rol oynamaktadır.



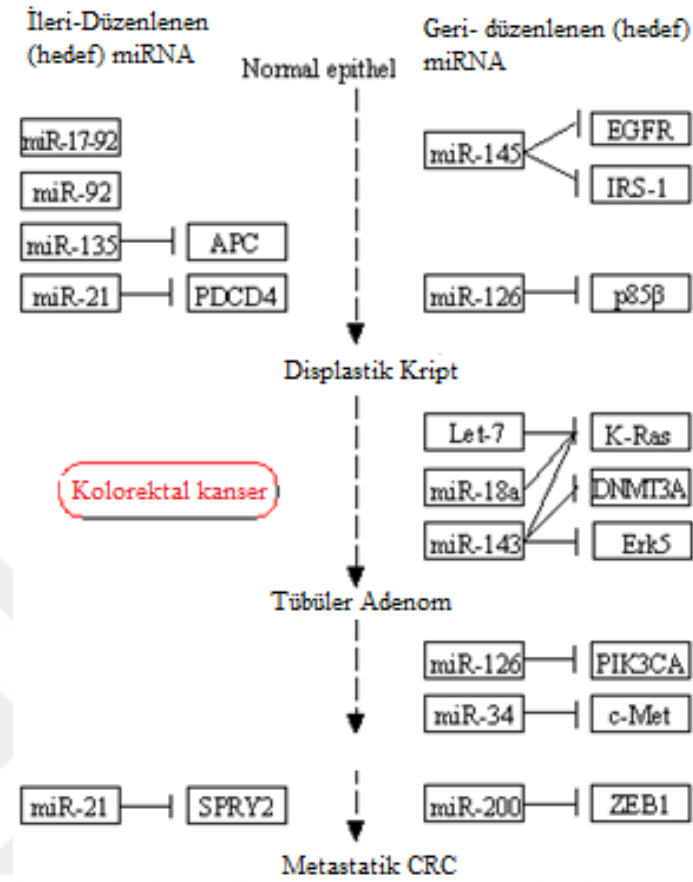
Şekil 1.4 Sinyal yolları, miRNA'ların geniş fonksiyonlar sergilediği kolorektal kanser mekanizmasını inceleyen çeşitli gruplardan üretildi

A: MIF, göç engelleyici faktör; SIRT, sessiz bilgi düzenleyici iki protein. B: DCAMKL-1, çiftkörtin ve CaM kinaz benzeri-1; DNMT3A, DNA metiltransferaz 3A; 5-FU, fluorourasil; Tsp-1, trombospodin 1; CTGF, bağ dokusu büyüme faktörü ve "a", "b" ve "c" sırasıyla "let-7a" tarafından "c-Myc", "KRAS" ve "kaspaz-3"ün baskılanmasını ifade eder. C: miR-200 ailesi miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 ve miR-429'u içerir; TGF-β, dönüştürücü büyüme faktörü--; ZEB1, çinko parmak E-kutusu bağlayıcı homeobox 1; ZEB2, çinko parmak E-kutusu bağlayıcı homeobox 2; Bmi-1, B-hücrelerine özgü moloney murin lösemi virüsü yerleştirme yeri 1. D: APC, adenomatoz polipozis coli geni; ADAM17, metallopeptidaz domen 17; Bcl-w, Bcl-2 ailesinin bir üyesi. E: COX-2, siklooksijenaz-2. F: Cdc25A, hücre bölünme döngüsü 25 homolog A. " " ve " " sırasıyla "stimülasyon" ve "supresyon" anlamına gelir ve kesik çizgi CRC'de hala kanıtlanmayı bekleyen olası bir ilişkiyi temsil eder. Cdc25A, hücre bölünme döngüsü 25 homolog A. " " ve " " sırasıyla "stimülasyon" ve "supresyon" anlamına gelir ve kesik çizgi CRC'de hala kanıtlanmayı bekleyen olası bir ilişkiyi temsil eder. sırasıyla "stimülasyon" ve "supresyon" anlamına gelir ve kesik çizgi CRC'de hala kanıtlanmayı bekleyen olası bir ilişkiyi temsil eder. [133]



Şekil 1.5 Kolorektal kanserde sinyalleşme yolları

Kolorektal Kanser



Şekil 1.6 Kolon Kanseri gelişiminde rol oynayan miRNA'lar

1.7 Eksozomal miRNA'lar ve kanser ilişkisi

Kolorektal kanser, gastrointestinal sistemde en sık rastlanan habis tümördür. Kolorektal kanserin ortaya çıkma sıklığı son 10 yılda dünya çapında yaklaşık 2 ila 4 kat artmıştır. Erkeklerde CRC, akciğer kanseri ve prostat kanseri sonrasında 3. Sırada gelirken kadınlarda akciğer ve meme kanserinden sonra yine 3. Sırada en çok görülen kanser türüdür. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl ortalama 140.000 vakaya kanser teşhisi konulmakta ve bu tür kanserler ülkede 2. En çok ölüm sebebi olarak gözlemlenmektedir. Eğer hastalığın patofizyolojisi tam olarak belirlenir ve erken evrede hastalara sistemik bir tanı konulabilirse mortalite oranı düşmüş olacaktır. Tarama yöntemi olarak Gaitada Gizli Kan Testi ve Kolonoskopi gibi ağırlı ve rahatsız yöntemlerin haricinde rutinde kandan Karbonhidrat Antijen 19-9 (CA19-9) ve

Karsinoemriyonik Antijen (CEA); Kolon, Karaciğer, Pankreas ve Mide Kanseri dahil pek çok kanser türünün tanısı için tümör biyobelirteci olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ancak bu belirteçlerin CRC için tanısı için duyarlılığı özellikle hastalığın erken aşamalarında düşüktür. Bu nedenle; CRC için yüksek duyarlılık, daha az ağrı ve daha hızlı tanı için spesifik belirteçlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Pek çok çalışmada CRC'nin gelişimi ile ve prognozu ile ilişkili miRNA'ların kullanılabileceği belirtilmiştir. Tümör dokularında büyük oranda artan birkaç miRNA'ların kan, idrar, süt, tükürük gibi vücut sıvıları içinde de eksozomlar yoluyla saptanabileceği öne sürülmüştür. Hücreler arası iletişimde rol oynayan eksozomların içerisinde protein, lipid, karbonhidrat, miRNA da içeren nükleik asit materyali bulundurmaktadır. Dolayısıyla; vücut sıvılarındaki eksozomların miRNA'ları, kanser tanısı için yararlı biyobelirteçler olarak kullanılabilir. Tümör hücreleri, miRNA'ların transferi de dahil olmak üzere genetik bilginin tümör büyümesini ve ilerlemesini destekleyen çevre hücrelere aktarılması için eksozom dahil pek çok farklı yöntem kullanmaktadır. Huang ve Ark., CRC'nin erken evrelerinde kan dolaşımındaki miRNA'ların dolaşımdaki profillerini araştırmıştır. Araştırma neticesi olarak , dolaşımdaki miRNA profillerinin sağlıklı kontrol grubuna kıyasla adenomu olan hastalarda %73 duyarlılık ve %79 özgüllükle bulduklarını belirtmişlerdir. Bu veriler, ekstraselüler miRNA'ların tümörlerin erken tespiti için güvenilir göstergeler olduğunu göstermektedir. miR-17-3p, kolon kanserinin tanısasal bir markeri olarak doğrulanmaktadır. Bu miRNA, patojenik kanserde rolü olan miRNA-17-92 gen kümesine aittir. Buna ek olarak, dışkı, içindeki miRNA'ların muhafaza edilmesiyle incelenebilecek başka bir biyolojik materyaldir. Dışkıda artan bir ekspresyon ile tanımlanan en önemli miRNA'lar, miR-218, miR-203, miR-126 ve miR-16'dır; burada miR-320 ve miR-192'nin ekspresyonu azalmıştır.48,49 % 91 duyarlılık ve% 72 özgüllük ile dışkıdaki miR-16 ve miR-126b'nin düşük ekspresyonu CRC varlığını saptamak için kullanılabilir. Farklı aşamalarındaki kanser hastalarında eksozom varlığı mutlaka incelenmelidir çünkü muhtemelen Bu popülasyonda eksozomlar yüksek sıklıkta tespit edilebilir. Dahası, dolaşımdaki kinetik miRNA'lar, bulaşıcı hastalıkların veya yaşam biçiminin değişiminin eksozomlar içinde dolaşan çeşitli miRNA'larda değişikliğe neden olup olamayacağını belirlemek için ayrıntılı olarak analiz edilmelidir. Bu, ilerdeki çalışmalarda eksozomların biyolojik belirteç potansiyelinin düzeltilmesine

yol açar. Primer CRC hastalarının serumunda mikro-dizilimli ekzozomal miRNA profillemesine dayanan çalışmalarda, sekiz miRNA (let-7a, miR-1224-5p, miR-1229, miR-1246, miR-150, miR-21, miR-223 ve miR-23a) serum ekzozomlarında önemli ölçüde artmış ve ameliyattan sonra aşağı düzenlenmiştir. CRC hücreleri sırasıyla kan akışına miRNA'lar içeren ekzozomlar salmaktadır alıcı hücelere sinyal gönderir. Serum ekzozomlarındaki miR-19a CRC'nin tekrarını öngörmek için potansiyel bir biyolojik belirteç olabilir. Serum miR-19a ekzozomlarının ekspresyonu, CRC'li hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksekti. Üstelik, miR-25-106b ve miR-17-92a kümeleri, malignite derecelerini yükseltmede etkilidir. Özellikle, tümör yapımcısı miRNA kümesi olarak bilinen miR-17-92a'nın, kolon kanseri, akciğer kanseri ve lenfoma gibi farklı kanser türlerini arttırdığı gösterilmiştir. Bu bulgular, CRC hücrelerinin hayatta kalabilmek için ekzozomal miRNA'lar saldığını düşündürmektedir. Genomik değişiklikler için miR-19a'nın aşırı ekspresyonu olan hücreler, miR-19a'dan zengin ekzozomları serbest bırakabilir. MiR-19a'nın kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve istilasını arttırdığı veya işlev kaybı ile sağladığı bildirilmektedir. MiR-19a'nın işlevi henüz tamamen net değildir. Bununla birlikte, çeşitli raporlar, lenfoma hücrelerinde, gastrik kanser hücrelerinde ve mesane kanseri hücrelerinde tümör büyümesini baskılayan baskılayıcı gen PTEN'li miR-19a'nın tümör oluşumunda rol oynadığını göstermiştir. Ekzozomal miR-19a yüksek ekspresyonu CRC'de kötü prognoz potansiyel belirleyicisiyle ilişkilendirilmiştir. Genel olarak, CRC hastalarının serumunda büyük miktarda miR-19a ekzozomu tümör rekürrensi ile ilişkilidir. miR-19a, CRC'nin erken ve ileri evrelerinde hastalarda artar. Elde edilen sonuçlar, miR-19a'nın kolorektal onkogenezin erken evrelerinde kullanılabileceğini göstermektedir. Diğer çalışmalar, MV'lerdeki proteaz yükünün işlevsel olarak sağlam olduğunu ve matris bozunumunu arttırdığını belirtmektedir. Bu çalışmaların ilginç kısmı, tümör hücrelerinden salınan MV'lerin proteolitik aktivitelerinin malignite ve invazivlik ile doğrudan ilişkili olduğunu gösterdiklerini göstermektedir [Lee vd. (2003)]. Ancak kanser hücrelerinin ve diğer hücrelerin hem MV'leri hem de ekzozomları ilgili özelliklerle serbest bıraktıkları inkar edilemez. Bu durum trombositlerde, endotel hücrelerinde ve diğer bazı hücrelerde de görülebilir [Lee vd. (2003)]. Ekzozomların moleküler kompozisyonu fizyolojisi, orijin dokusu veya hücredeki patofizyolojik değişiklikler olduğunu göstermekte; bu da, hastalık teşhisi için biyolojik belirteç olarak

eksozomların belirgin potansiyelinden kaynaklanmaktadır. Bu sonuçlar, en azından bağışıklık sisteminde, hücrelerarası eksozom iletişiminde etkin bir role sahip olan bir hipotezin temeli olup, ilk klinikte onları eksozom-bazlı hücre içermeyen yeni bir tip olarak kullanmaya teşvik etmektedirler. Bunlar, tümör büyümesini baskılamak için dendritik hücrelere alternatif tedavi olarak atfedilmektedir.



2. MATERİYAL VE METOT

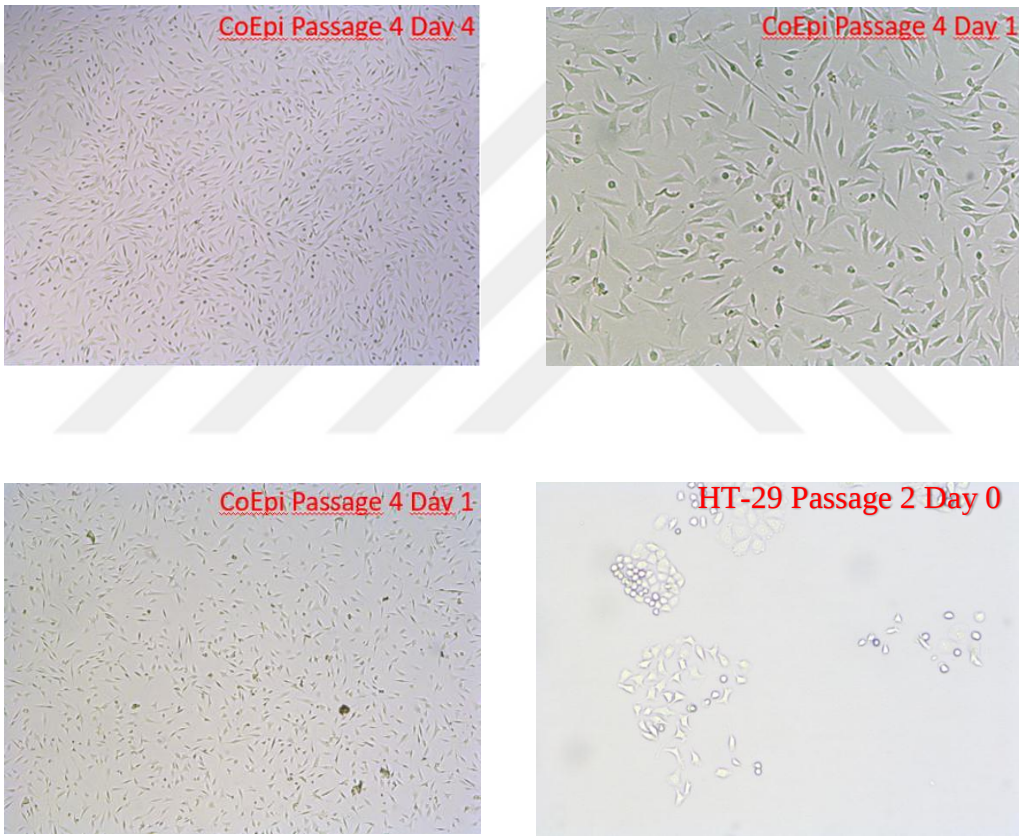
2.1 Hücre Kültürü Çalışmaları

Yapılan bu tez çalışması kapsamında kolon kanseri eksozomal miRNA'larının hücre kültürü boyutunda incelenebilmesi için HT-29 kolon adenokarsinom ve FCH normal kolon hücreleri kültür edilmiş ve atık vasatları eksozom izolasyonu amacıyla saklanmıştır. Epitelyal morfolojideki FCH hücrelerinin kültürü 10 mM HEPES, 10 mg.mL⁻¹ kolera toksini, 0.005 mg.mL⁻¹ insülin, 100 ng.mL⁻¹ hidrokortizon, %10 fetal bovin serum (FBS) içeren DMEM:F12 kültür ortamında (tam vasat, TV) yapılmıştır. DMSO'nun uzaklaştırılması için TV eklenerek 300 g'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant atılmıştır. Pellet 4 mL TV ile resüspanse edilip, T25 kültür kabına yayılmıştır. 1 hafta süren kültürasyon işleminin 4. gününde medium çekilerek atılmış, hücreler soğuk PBS ile 3 kez yıkanmış ve taze besi yeri ilave edilerek kültür edilmeye devam edilmiştir (Şekil 2.1). Kültürasyon işlemi %95 bağıl nem, %5 karbon dioksit ve 37°C sıcaklıktaki Panasonic marka inkübatörde gerçekleştirilmiştir. 7. günde besi yeri çekilip atılmış, soğuk PBS ile 3 kez yıkama yapılmış ve ardından 1 mL %0.25 Tripsin/EDTA ile inkübatör ortamında 5 dakika etkileştirilerek hücrelerin kültür plastiğinden kalkmaları sağlanmıştır. İnvert faz/kontrast mikroskobu (Leica DM IL) ile hücrelerin yüzeyden ayrıldıklarının belirlenmesinin ardından kültür kabına 9 mL TV ilave edilerek tripsin aktivasyonu inhibe edilmiş ve ardından 300 g'de 5 dk santrifüjlenerek hücreler çöktürülmüştür. Hücre pelleti 12 mL TV'de resüspanse edilerek 3 T25'e dağıtılmış ve bağıl bolluğa ulaşınca dek kültürasyon devam ettirilmiştir. 1. pasajdan sonraki her aşamada atık vasat 50 mL'lik Falcon tüplerine alınarak eksozom izolasyonuna kadar -20°C'ta saklanmıştır.

HT-29 İnsan Kolorektal Kanser Hücre Hattı ATCC firmasından temin edilmiştir. Kültürasyon işlemi için 5A McCoy's, 2mM Glutamin ve %10'luk FBS ile resüspanse edilerek hücrelerin Freezing Medium'undan kurtulmaları sağlanmıştır. Karışım 13000 g'de 5 dk santrifüjlenmiş ve tekrar resüspanse edilerek T25 kültür kabına alınmıştır. Ancak hücre yoğunluğundan dolayı T75 e aktarılmıştır. T75 kültür mediumunda alınan

hücrelerin canlılığı, yapışkanlığı ve çoğalmaları incelenmiştir. Hücre ekiminden sonraki 6. Gün kültür mediumunun yarısı çekilerek atık vasat olarak -20 °C’ da saklanmıştır.

Hücre sayımı hemasitometre ile yapılmıştır. Bu amaçla santrifüjleme işleminin ardından 1 mL TV’de resüspanse edilen hücrelerden 10 uL alınarak 10 uL trypan blue ile karıştırılmış ve hemasitometre’nin 2 bölmesine 10’ar uL enjekte edilmiştir. Sayım işlemi faz/kontrast mikroskobu altında yapılmıştır. Laboratuvar kurallarınca üst-sol kenardaki hücreler sayılırken sağ-alt kenardakiler hesaba katılmamıştır.



Şekil 2.1 FCH normal kolon hücrelerinin ve HT-29 hücre hattının İnvert faz/kontrast mikroskobu ile çekilmiş görüntüleri

Eksozom izolasyonu amacıyla hücre kültür vasatları için 1:1 oranında %30 ‘luk Poli Etilen Glikol çözeltisi (Mw: 6000) eklenerek alt-üst edilerek homojen karışım sağlandıktan sonra 1 gece +4 °C’de bekletilmiştir.

Ertesi gün bekletilen örneklerden eksozomların izolasyonu için masaüstü EPPENDORF Mini Spin mikrosantrifüj ile 13400 rpm de 15 dk santrifüjlenerek tüp dibinde çökelti gözlemlenmiştir. Süpernatant hücre debrisleri içerdiğinden atılmıştır. Deneye eksozom pelleti üzerinden devam edilmiştir.



Şekil 2.2 24 saat inkübasyondan sonra çöken eksozomların toplanması için santrifüj edilmesi

Elde edilen çökelti 400 μ L pH 7.4 sterilize edilmiş PBS ile resüspanse edilerek mikro RNA da içeren Total RNA izolasyonuna geçilmiştir.

2.2 Serum/Plazmadan Eksozom İzolasyonu

Serum ve plazma ayrıldıktan sonra 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne alınır ve aşağıdaki tabloda verildiği gibi ExoQuick™ Eksozom Çöktürme Solüsyonu (Cat# EXOQ5A-1 Cat# EXOQ20A-1) ile 250 μ L serum/plazma örneği başına 67 μ L Eksozom Çöktürme Solüsyonu olacak şekilde ve hücre kültür vasatları için de 1:1 oranında %30'luk Poli Etilen Glikol çözeltisi (Mw: 6000) eklenerek alt-üst edilerek homojen karışım sağlandıktan sonra 1 gece +4 °C'de bekletilmiştir.



Şekil 2.3 Serum/Plazma'nın mikrosantrifüj tüpüne alınarak (A,B) üzerine eksozom çöktürme reaktifi (C, D) ilave edilerek bir gece +4 °C'de inkübe edilmesi (E).

Ertesi gün bekletilen örneklerden eksozomların izolasyonu için masaüstü EPPENDORF Mini Spin mikrosantrifüj ile 13400 rpm de 15 dk çevrilerek tüp dibinde çökelti gözlemlenmiştir. Süpernatant hücre debrisleri içerdiğinden atılmıştır. Deneye çökelti üzerinden devam edilmiştir.



Şekil 2.4 1 gece inkübasyondan sonra çöken eksozomların toplanması için santrifüj edilmesi

Çizelge 2.1 Hasta, sağlıklı kan örnekleri ve sağlıklı-HT-29 Hücre hatları üzerine ilave edilen çöktürme reaktifleri

Tüp İçeriği	Tüp Kodu	Eklenen Serum/Plasma/ Hücre Kültürü Atık Vasatı	Eklenen Exoquick Eksozom Çöktürme Solüsyonu ve PEG hacmi
Sağlıklı 1. Gönüllü	S1	500 μ L	134 μ L Exoquick
Sağlıklı 1. Gönüllü	S2	500 μ L	134 μ L Exoquick
Sağlıklı 1. Gönüllü	S3	500 μ L	134 μ L Exoquick
Sağlıklı 1. Gönüllü	S4	500 μ L	134 μ L Exoquick
Sağlıklı 1. Gönüllü	S5	500 μ L	134 μ L Exoquick
1. Hasta	H1	500 μ L	134 μ L Exoquick
2. Hasta	H2	500 μ L	134 μ L Exoquick
3. Hasta	H3	500 μ L	134 μ L Exoquick
4. Hasta	H4	500 μ L	134 μ L Exoquick
5. Hasta	H5	500 μ L	134 μ L Exoquick
6. Hasta	H6	500 μ L	134 μ L Exoquick
7. Hasta	H7	500 μ L	134 μ L Exoquick
8. Hasta	H8	500 μ L	134 μ L Exoquick
9. Hasta	H9	500 μ L	134 μ L Exoquick
HT-29 Kolorektal Adenokarsinom Hücre Hattı Atık Vasatı	HT-29	16 mL	16 mL Poli Etilen Glikol
Sağlıklı Kolon Hücre Hattı Atık Vasatı	Co-Epi	50 mL	50 mL Poli Etilen Glikol

Elde edilen çökelti 400 μ L pH 7.4 sterilize edilmiş PBS ile resüspanse edilerek mikro RNA da içeren Total RNA izolasyonuna geçilmiştir.

2.3 RNA İzolasyonu

Bu çalışma için 400 μ L de resüspanse edilen eksozom çözeltilerinden 200 ‘er μ L alınarak QİAGEN miRNeasy Serum / Plasma Kit protokolü ile aşağıda verildiği şekilde izolasyon yapılmıştır.

200 μ L eksozom çözeltisi 2 mL'lik DNaz ve RNaz içermeyen santrifüj tüpüne alınmıştır. Her birinin üzerine 60 μ L RPL tamponu (hücre lizisini sağlayan deterjan çözeltisi) eklendikten sonra 5 sn vortekslenmiştir. Ardından 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra üzerine 20 μ L RPP (Asetik Asit ve Çinko Klorür içeren Protein çöktürme reaktifi) tamponu eklenerek 20 sn vorteklenmiştir. Tekrar 3 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 12.000 g'de 3 dk santrifüjlenmiştir. Bu sayede RPL ile hücre lizis edilerek RPP ile proteinler çöktürülerek tüp dibinde beyaz çökelti gözlemlenmiştir. Elde edilen süpernatant ($\approx$ 230 μ L) yeni bir mikro santrifüj tüpüne alınarak üzerine %100 derişimdeki İzopropanol çözeltisi ile DNA' ların çökmesi için önce vortekslenmiştir. Ardından çözelti miRNeasy Spin Kolon tüpüne alınarak kapağı kapalı bir şekilde 8.000 g'de 15 sn santrifüjlenmiştir. Spin kolonunun içinde bulunduğu toplama tüpünün içerisindeki sıvı atılmıştır. Ardından Spin kolonuna 700 μ L RWT tamponu eklenerek 15 sn 8.000 g'de santrifüjlenmiş ve toplama kabındaki sıvı atılmıştır. Spin Kolonu'nun üzerine 500 μ L % 80'lik Etanol çözeltisi eklenerek 2 dk maksimum hızda santrifüjlerek kolon membranı yıkanmıştır. Santrifüjden sonra spin kolonu yeni 2 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alınarak kapağı açık şekilde maksimum hızda membranı kurutmak için 5 dk santrifüjlenmiştir. Toplama tüpündeki sıvı tüp ile beraber atılarak spin kolonu 1,5 mL'lik yeni tüpüne alınmış ve üzerine membranın merkezine gelecek şekilde 20 μ L RNaz içermeyen su eklenerek oda sıcaklığında 1 dk inkübe edilmiştir. Ardından RNA'yı elüe etmek için maksimum hızda 1 dk santrifüjlenmiş ve spin kolonu atılmıştır. Toplama tüpünde 18 μ L RNA içeren elüat bulunur. Bu elüattan 2 μ L alınarak NanoDrop Cihazında RNA miktarları aşağıdaki gibi ölçülmüştür:

S1-5 ve H1-5 deneylerinde RNA içerikleri 10 ng/ μ L olacak şekilde H6-10 ve hücre kültür vasatlarının RNA içerikleri 3,5 ng/ μ L olacak şekilde cDNA sentezi dizayn edilmiştir.



Şekil 2.5 RNA izolasyon görüntüleri

2.4 cDNA Sentezi

cDNA sentezi için yukarıda RNA içerikleri belirlenen örneklerden miScript Ters Transkripsiyon kiti kullanılarak aşağıdaki miktarlarda alınarak deney dizayn edilmiştir:

Çizelge 2.2 S1-5 ve H1-5 numunelerinin cDNA sentez tasarımı

Tüp Kodu	S1	S2	S3	S4	S5	H1	H2	H3	H4	H5
Alınan miktar (μL)	3,22	0,88	6,25	1,45	4,54	1,72	1,12	4	1,69	3,3
5x Reaction Buffer (μL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
10x Enzim Mix (μL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RNaz içermeyen su (μL)	3,78	6,12	0,75	5,55	2,46	5,28	5,88	3	5,31	3,7
Toplam Hacim (μL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Çizelge 2.3 H6-10 ve Hücre Kültür Atıklarının cDNA sentez tasarımı

Tüp Kodu	H6	H7	H8	H9	HT-29	Co-Epi
Alınan miktar (μL)	7,00	5,00	1,60	4,38	0,92	2,50
5x Reaction Buffer (μL)	2	2	2	2	2	2
10x Enzim Mix (μL)	1	1	1	1	1	1
RNaz içermeyen su (μL)	-	2	5,40	2,72	6,08	4,50
Toplam Hacim (μL)	10	10	10	10	10	10

Buz üzerinde hazırlanan bu karışımlar BİORAD Thermal Cycler cihazında 60 dk boyunca 42°C 'de inkübe edilerek içeriğinde bulunan ters transkriptaz enzimi ile mikro RNA'lar dahil olmak üzere toplam RNA içeriği cDNA'ya çevrilmiştir. İnkübasyondan sonra ters transkripsiyonu inhibe etmek için 95 °C' de 5 dk ısıtılarak Kantitatif Real-Time PCR bölümüne geçilmiştir.

2.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Reaksiyonun başlamaması ve degradasyonu önlemek için karışımlar hazırlanırken buz üzerinde çalışılmıştır. S1-5 ve H1-5 te cDNA miktarları 10 ng/ μ L ve H6-9 ile Co-Epi ve HT-29 da 3,5 ng/ μ L numune içermektedir. PCR için yapılacak olan seyreltmede S1-5 ile H1-5 numuneleri 1/40 oranında H6-9 ile Co-Epi ve HT-29 numunelerinde 1/13 oranında numuneler dilüe edilerek çalışılmıştır. PCR için 2 ml'lik tüpte aşağıdaki gibi primerler ve SYBER GREEN flüoresans boyası içeren master mix'lerden eklenmiştir.

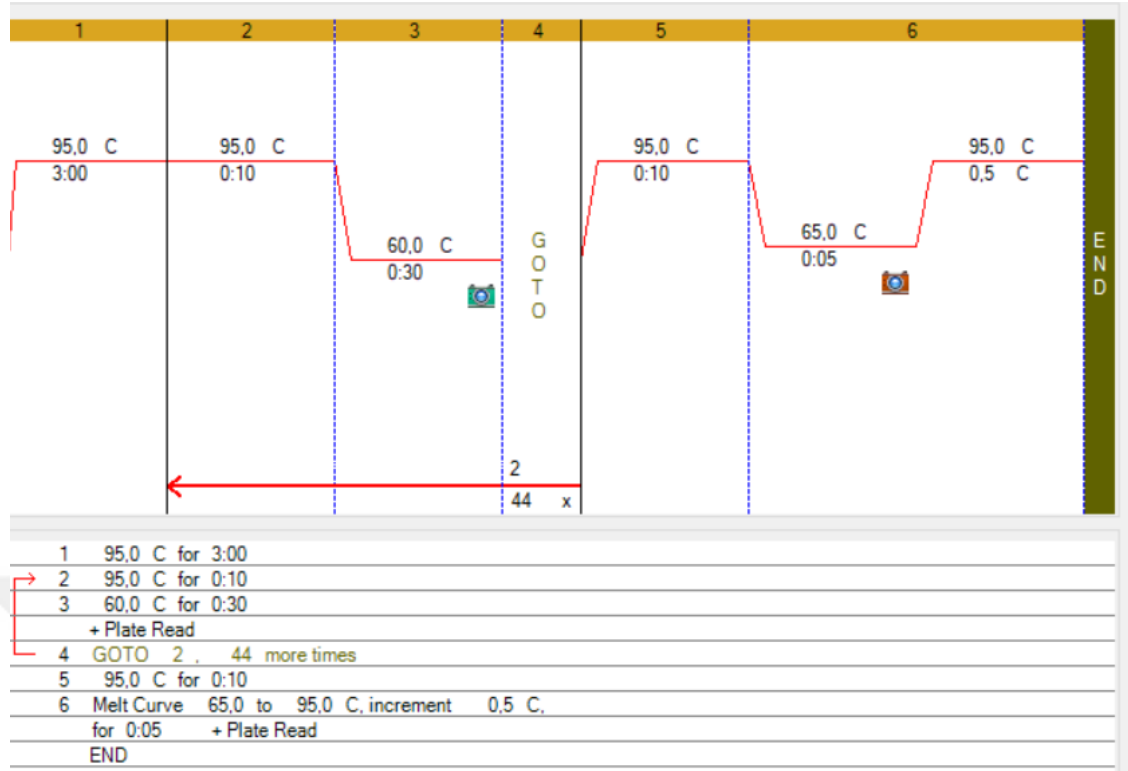
60 μ L SYBR Enzim Karışımı + 12 μ L U6 primeri	60 μ L SYBR Enzim Karışımı + 12 μ L miR- 19a-3p primeri	60 μ L SYBR Enzim Karışımı + 12 μ L miR-21 primeri	60 μ L SYBR Enzim Karışımı + 12 μ L miR-92a primeri	60 μ L SYBR Enzim Karışımı + 12 μ L miR- 1246 primeri
---	--	---	--	--

Hazırlanan bu enzim ve primer karışımları Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun yapıldığı 96 kuyucuklu tabakalara her kuyucuğa toplam hacim 10 μ L olacak şekilde her kuyucuk için enzim karışımından 6 μ L ve cDNA'dan da 4 μ L eklenmiştir. Tabaka aşağıda verildiği gibi tasarlanmıştır:

Çizelge 2.4 Hasta-gönüllü ve hücre hattı atık vasatlarının PCR için eklendiği tabakanın varsayımsal görüntüsü

	S1	S2	S3	S4	S5	Boş	H1	H2	H3	H4	H5	Boş
U6												
MiR-19a-3p												
miR-21												
miR-92a												
miR-1246												
F												
G												
H												
	S2	S4	S5	H6	H7	H8	H9	SU	BOŞ	Co-Epi	HT-29	SU
U6												
MiR-19a-3p												
miR-21												
miR-92a												
miR-1246												
F												
G												
H												

Çizelge 2.4’de verildiği şekilde tasarlanarak kuyucuklara eklenen enzim karışımları ve cDNA örnekleri aşağıda yazılımı üzerinden reaksiyon koşullarının fotoğrafı verilen BİORAD CFX-96 qRT-PCR cihazı ile analizler yapılmıştır.



Şekil 2.6 Uygulanan polimeraz zincir reaksiyon protokolü

Yukarıda cihaz yazılımı üzerinden verilen protokol şu şekildedir:

- 1- 95 °C ‘ de 3 dk ısıtılarak DNA’nın denatüre edilerek zincirlerinin ayrılması sağlanmıştır.
- 2- 95 °C ‘ de 10 sn bekleme basamağında döngü tekrarında primerlerin bağlanması sağlanmıştır.
- 3- 60 °C ‘ de 30 sn bekletilerek Taq Polimeraz enzimi ile zincirlerin uzaması sağlanmıştır. Ve bu bağlanma sebebiyle enzim karışımında bulunan SYBR Green boyası yapılan ayrılarak flüoresan ışımaya meydana getirmiştir. Bu ışımaya kaydedilmesi ile de bağlanmanın gerçekleştiği ve dolayısıyla ekspresyonları ölçülmüştür.
- 4- Bu basamakta döngü tekrar 2. Basamağa giderek 44 defa aynı işleme tabi tutulmuştur.

- 5- 95 °C ' ye tekrar ısıtılma ile Taq Polimeraz inaktive edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır.
- 6- 6. Basamakta sıcaklığın 65 °C'ye indirilip 0,5 °C'lık artışlarla tekrar 95 °C'ye çıkarılması Melting Curve (Erime eğrisi) olarak adlandırılmaktadır. Bu aşama çoğalan DNA bölgesinin hedef bölge olduğunu kesinleştirmek için yapılmıştır. Erime eğrisinin analizinde SYBR-Green gibi, floresan boyaların kullanıldığı analizlerde ikili sarmal DNA örneğinin sıcaklığı yavaş yavaş artırılarak flöresan sinyalin sıcaklığa bağlı değişimini gösteren bir grafik oluşturulur. Flöresan sinyalin ani düştüğü tepecikler sayesinde DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılmaları gösterilir.



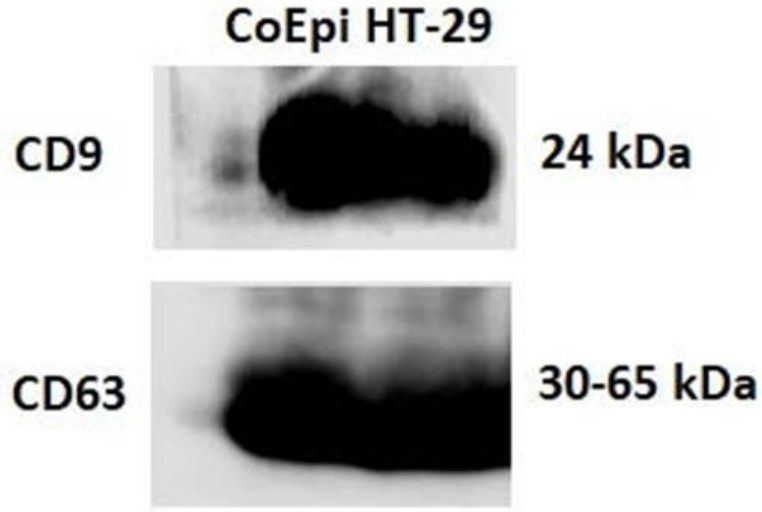
3. ANALİZ VE BULGULAR

3.1 Eksozomların Karakterizasyonu

3.1.1 Western Blot analizi

Eksozom izolasyonu sonrası western blotlama için jellere 30 µL eksozom resüspansiyonu yüklenmiştir. Yüklenecek eksozom resüspansiyonu 6X Laemmli (10 ml için; 1.2g SDS, 6mg bromfenol mavisi, 4.7 ml gliserol, 1.2 ml 0.5M Tris pH 6.8) tamponu ile 5:1 oranında karıştırılıp; 95°C’de 5 dakika kaynatılıp, proteinlerin denatüre olması sağlandıktan sonra jellere yüklenmiştir. %5’lik ayırma ve %10’luk koşturma jeli kullanılmıştır. Örnekler PVDF membrana transfer edildikten sonra %3’lük Bovin Serum Albümin (BSA)’da bloklanmıştır. Bloklamayı takiben membran primer antikora alınmıştır.

Primer antikorlar +4C’de gece boyu bırakıldıktan sonra 3 kez 10 dk PBS (Fosfat tamponu) -Tween’de yıkanmıştır. Sekonder antikorlar primer antikorlara uygun olarak 1 saat oda sıcaklığında ve 1:5000 dilüsyonda uygulanmış ve devamında 3 kez PBS-Tween ile yıkanmıştır. Sekonder antikorlar Horse Radish Peroksidaz (HRP) konjuge olarak alındığı için ECL (Geliştirilmiş Kemilüminesans) ile görüntüleme yapılmıştır.

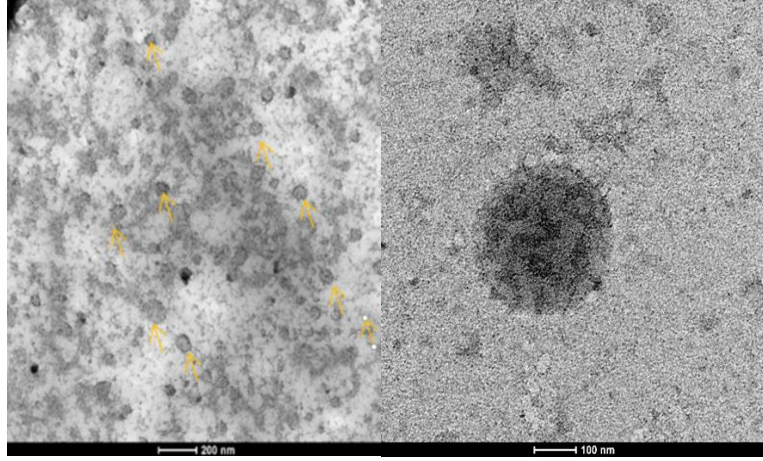


Şekil 3.1 CoEpi ve HT-29 hücre hattından izole edilen eksozomların CD9 ve CD63 eksozom yüzey belirteçlerinin varlığını gösteren Western Blot analizi

3.1.2 Yüksek kontrastlı transmisyon emisyon mikroskopisi analizi

3.1.2.1 TEM için örnek hazırlanması

Eksozom resüspansiyonu sonrası numuneden 5 μ L alınarak %4'lük Paraformaldehit ile grid üzerinde inkübe edilmiştir. Ardından grid üzerine yapışmayan fazla numune ve safsızlıkları ortamdan uzaklaştırmak için saf su ile 3 defa yıkama yapılmıştır. Çapraz bağlayıcı olarak %1'lik Gluteraldehit ile 5 dk muamele edilmiş ve yine saf su ile 2 defa yıkama yapılmıştır. Eksozom zarlarının boyanması için %0,5'lik 5 μ L Uranil Asetat ile boyama işlemi gerçekleştirilmiştir (Bu aşama TEM analizi alınmadan yarım saat önce yapılmıştır). TEM görüntüsü FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin CTEM Mikroskop ile alınmıştır.



Şekil 3.2 İzole edilen eksozomların Yüksek Kontrastlı Transmisyon Emisyon Mikroskopisi görüntüleri

Şekil 2.4’de de görüldüğü gibi izole edilen pelletlerde eksozom varlığı Western Blot analizinde eksozom yüzey belirteçleri olan CD9 ve CD63 antikorları işaretlenip aynı bantta görüntülendiği ve TEM analizinde de elde edilen keseciklerin literatüre göre 50-200nm çapında olan eksozomlar olduğu ve bu sonuçlarla uyduğu gözlemlenmiştir.

3.2 RNA Miktarları Ölçüm Sonuçları

Çizelge 3.1 Nanodrop Cihazı ile eksozomlardan izole edilen RNA miktarları

TÜP KODU	RNA MİKTARI (ng/ μ L)
S1	3,1
S2	22,6 (cDNA için 1:1 dilüe edilmiştir = 11,3)
S3	1,6
S4	6,9
S5	2,2
H1	5,8
H2	18,2 (cDNA için 1:1 dilüe edilmiştir = 9,1)
H3	2,5
H4	5,9
H5	3,0
H6	0,5
H7	0,7
H8	2,2
H9	0,8
HT-29	1,4
Co-Epi	3,8

3.3 PCR Sonuçları

Çizelge 3.2 CoEpi'ye kıyasla HT-29 hücre hattı atık vasatından izole edilen eksozomlardaki ekspresyon seviyeleri

Numune Kodu	Cq Değerleri				Ekspresyon Seviyeleri		
	U6	miR-19a-3p	miR-21	miR-1246	miR-19a-3p	miR-21	miR-1246
S1	31,11	31,34	-	34,96	22,57229	-	5,96471
S2	29,11	N/A	36,11	N/A	N/A	0,01699	N/A
S3	29,3	34,46	-	32,31	0,73844	-	10,6430
S4	31,67	36,39	34,04	38,09	1,00000	1,00000	1,00000
S5	30,03	32,33	30,85	35,29	5,37181	0,21980	2,24117
Ortalama	30,24	33,63	33,67	35,16	7,42064	0,41226	4,96237
H1	32,14	32,27	-	35,35	24,08517	-	9,28363
H2	32,58	32,59		40,36	26,18232	-	0,38912
H3	28,01	28,81	-	30,49	15,27717	-	15,42354
H4	30,47	29,56	-	34,21	49,84305	-	6,45138
H5	32,36	30,84	-	33,02	75,69287	-	54,48830
H7	35,17	28,44	27,58	34,55	396,66314	72,88626	95,12392
H8	35,14	36,16	34,28	38,02	1,84666	0,69074	8,40521
H9	30,30	35,48	34,76	38,83	0,10319	0,01730	0,16729
Ortalama	31,13	31,77	32,21	35,60	73,7116	24,5314	23,7169
Co-Epi	25,50	29,40	26,20	25,31	1,00000	1,00000	1,00000
HT-29	43,93	N/A	33,03	36,30	N/A	N/A	172,2969

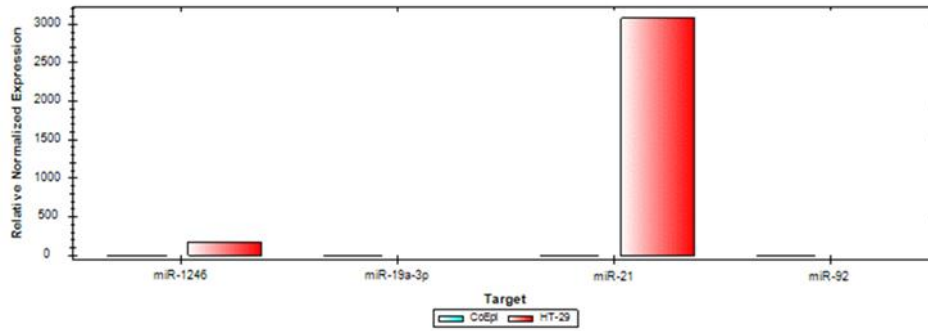
Ekspresyon için aşağıda verilen formüller kullanılarak cihaz yazılımı sayesinde göreceli ekspresyonlar yukarıda verilmiştir. Cq değeri kantifiye olabilecek miktara gelen döngü sayısıdır. Bu değerden sonra hangi numune ile ve hangi primer ile çalışıyorsa o numune ve primer ilgili gen bölgesini çoğaltarak sayılabilecek seviyeye getirmiş olmaktadır. Bu değere de Cq değeri yani QuantifiedCycles değeri denilmektedir. Buna göre;

$$Cq_{hedef} - Cq_{U6} = \Delta Cq_{hedef} \quad (3.1)$$

$$Cq_{kontrol} - Cq_{U6} = \Delta Cq_{kontrol} \quad (3.2)$$

$$2^{-(\Delta Cq_{hedef} - \Delta Cq_{kontrol})} = \Delta \Delta Cq = \text{Ekspresyon} \quad (3.3)$$

Denklemlerinden 1.sinde hedef genin quantifiye edilebilen döngü değeri ile housekeeping gen arasındaki farklılığı ölçmek için bu değer kullanılmıştır. 2. denklemde ise kontrol grubu olarak kullanılan gönüllü sağlıklılarda bu denklem kullanılarak 3. denklem için gönüllü ve hasta grubu arasındaki fark ile artan ekspresyon oranları hesaplanarak biyobelirteç olarak kullanılabilecek miRNA'ların belirlenmesi sağlanmıştır.



Şekil 3.3 Sağlıklı ve Kolon kanserli hücre hatlarında miRNA'ların ekspresyon seviyeleri

4. SONUÇ

Başlangıçta biyobelirteç olarak kullanılabilecek 5 farklı eksozomal mikro RNA'lar olan miR-19a-3p, miR-21, miR-92a, miR-196b-5p ve miR-1246'nın primerleri sipariş edilmiştir. Ancak gelen miR-196b-5p primeri çalışmadığı için analizden ekarte edilmiştir. Kalan 4 eksozomal miRNA'dan yapılan çalışma sonuçları yukarıdaki tabloda verilmiştir. Bu tabloda N/A olarak yazılan değerlerin 45 döngüde belli bir Cq değerine ulaşmadığı gözlenmiştir. Dolayısıyla sağlıklı kolon hücre hattında belirli bir Cq değeri ve ekspresyon seviyesi olmasına rağmen kolorektal adenokarsinom hücre hattı olan HT-29 hücre hattında 45 döngüden önce Cq değerinin olmaması ve dolayısıyla ekspresyon seviyelerinin ölçülememesi bu hücre hattında miR-19a-3p, miR-21 ve miR-92a'nın ekspresyonlarının azaldığını ve miR-1246'nın ekspresyon seviyesinin 172 kat up regüle olduğu gözlenmiştir. Yine hasta grubunda gönüllü sağlıklılara kıyasla miR-1246'nın en düşüğü 6 kat en yüksekini 95 kat ve ortalama 24 kat up regüle olduğu gözlenmiştir (2 hastada 1'den küçük olan ekspresyon seviyeleri gözardı edilmiştir). Hasta grubunda miR-19a-3p ekspresyon seviyelerinin en düşüğü 2kat ve en yüksekini 396 kat olmak üzere ortalama 74 kat up regüle olduğu gözlenmiştir. miR-21'in 3 hasta da sonuç vermesi ancak 1 hasta da 73 kat up regüle olduğu gözlenmiştir. Yine miR-92a'nın ekspresyon seviyesinin çok düşük olması sebebiyle ölçülemediği gözlenmiştir. Buna göre hasta gruplarında miR-19a-3p'nin ve miR-1246'nın artan ekspresyon seviyelerine bakarak Kolorektal Adenokarsinom hastalarında erken biyobelirteç olabileceğini öne sürmekteyiz ancak yapılan bu çalışmada hasta sayısının az olması sebebiyle daha kapsamlı bir çalışma ile bu sonuçların valide edilmesiyle sonuçların kesinleştirilmesi gerektiğini bildirmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999;81:214–8.
- Ahmed RL, Schmitz KH, Anderson KE, Rosamond WD, Folsom AR. The metabolic syndrome and risk of incident colorectal cancer. *Cancer* 2006;107:28–36.
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:5003–8.
- Asano TK, McLeod RS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and aspirin for the prevention of colorectal adenomas and cancer: a systematic review. *Dis Colon Rectum* 2004;47:665–73.
- B. Chen, B. Zhang, H. Luo, J. Yuan, G. Skogerbø, R. Chen. Distinct microRNA subcellular size and expression patterns in human cancer cells. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:672462.
- Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol* 2012; 14: 677–685
- Bandres, E., Bitarte, N., Arias, F., Agorreta, J., Fortes, P., Agirre, X., Zarate, R., Diaz-Gonzalez, J.A., Ramirez, N., Sola, J.J., Jimenez, P., Rodriguez, J., and Garcia-Foncillas, J. (2009b). microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 15: 2281–2290.
- Barh D, Malhotra R, Ravi B, Sindhurani P. MicroRNA let-7: an emerging next-generation cancer therapeutic. *Curr Oncol* 2010; 17: 70–80.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–97.
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136:215–33.
- Bommer, G.T., Gerin, I., Feng, Y., Kaczorowski, A.J., Kuick, R., Love, R.E., Zhai, Y., Giordano, T.J., Qin, Z.S., Moore, B.B., MacDougald, O.A., Cho, K.R., and Fearon, E.R. (2007). p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr. Biol.* 17: 1298–1307.
- Bosetti C, Rodríguez T, Chatenoud L, et al. Trends in cancer mortality in Mexico, 1981–2007. *Eur J Cancer Prev* 2011;20:355–63.
- Bray F. Transitions in human development and the global cancer burden. In: Steward BW, Wild CP, eds. *World Cancer Report 2014*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014, 54–68
- Bresalier RA, Boland CR, Itzkowitz SH, Kim YS. Basic gastrointestinal oncology. In: Kern Jr F, Blum AL, editors. *The gastroenterology annual*, vol. 2. Amsterdam: Elsevier/North Holland; 1989. p. 271–319.

- Butch RJ, Stark DD, Wittenberg J, et al. Staging rectal cancer by MR and CT. *AJR Am J Roentgenol* 1986;146:1155–60.
- Cali RL, Pitsch RM, Thorson AG, et al. Cumulative incidence of metachronous colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1993;36:388–93.
- Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. *Int J Mol Sci.* 2016;17:1712.
- Center MM, Jemal A, Smith RA, et al. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin* 2009;59:366–78.
- Chitnis NS, Pytel D, Bobrovnikova-Marjon E, Pant D, Zheng H, Maas NL, Frederick B, Kushner JA, Chodosh LA, Koumenis C, Fuchs SY, Diehl JA. miR- 211 is a prosurvival microRNA that regulates chop expression in a PERKdependent manner. *Mol Cell.* 2012;48:353–64.
- Chlebowski RT, Wactawski-Wende J, Ritenbaugh C, et al. Estrogen plus progestin and colorectal cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2004;350:991–1004.
- Cho JA, Park H, Lim EH, Lee KW. Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *Int J Oncol* 2012;40:130–8.
- Cicero AL, Stahl PD, Raposo G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. *Curr Opin Cell Biol* 2015; 35: 69–77.
- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 2009;19:43–51
- Cohen AM, Minsky BD, Schilsky RL. Colon cancer. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: principles and practice of oncology*. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1993. p. 929–77.
- Compton CC. The pathology report in colorectal cancer: a user's guide. *ASCO Educ* 2003;502–16.
- Conneely OM, Jericevic BM, Lydon JP. Progesterone receptors in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2003;8:205–14.,
- Cotton PB, Durkalski VL, Pineau BC, et al. Computed tomographic colonography (virtual colonoscopy): a multicenter comparison with standard colonoscopy for detection of colorectal neoplasia. *JAMA* 2004;291:1713–9.
- Cui C, Yu J, Huang S, Zhu H, Huang Z. Transcriptional regulation of gene expression by microRNAs as endogenous decoys of transcription factors. *Cell Physiol Biochem.* 2014;33:1698–714.
- Dershaw DD, Enker WE, Cohen AM, Sigurdson ER. Transrectal ultrasonography of rectal carcinoma. *Cancer* 1990;66:2336–40.
- Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001;48:526–35.

- Eisenberg B, DeCosse JJ, Harford F, Michalek J. Carcinoma of the colon and rectum: the natural history reviewed in 1704 patients. *Cancer* 1982;49:1131–4.
- Erdmann K, Kaulke K, Rieger C, Wirth MP, Fuessel S. Induction of alaphamethylacyl-CoA racemase by miR-138 via up-regulation of beta-catenin in prostate cancer cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2017; 143:2201-2210.
- Escrevente C, Keller S, Altevogt P, Costa J. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer* 2011;11:108.
- Faber, C., Kirchner, T., and Hlubek, F. (2009). The impact of microRNAs on colorectal cancer. *Virchows Arch*. 454: 359–367.
- Fletcher RH. Carcinoembryonic antigen. *Ann Intern Med* 1986;104:66–73.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19:92–105.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19:92–105.
- Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One* 2012;7:e30679.
- Gee HE, Camps C, Buffa FM, Colella S, Sheldon H, Gleadle JM, et al. MicroRNA-10b and breast cancer metastasis. *Nature* 2008;455:E8–9.
- Giovannucci E. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:725–31.
- Global Cancer Statistics, 2012, Lindsey A. Torre, MSPH1; Freddie Bray, PhD2; Rebecca L. Siegel, MPH3; Jacques Ferlay, ME4; Joannie Lortet-Tieulent, MSc5; Ahmedin Jemal, DVM, PhD6; *CA CANCER J CLIN* 2015;65:87–108
- Goldie BJ, Dun MD, Lin M, Smith ND, Verrills NM, Dayas CV, et al. Activity-associated miRNA are packaged in Map1b-enriched exosomes released from depolarized neurons. *Nucleic Acids Res* 2014;42:9195–208.
- Greening DW, Gopal SX, Xu R, Simpson RJ, Chen W. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2015: 72–81.
- Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol* 2012;14:1036–45.
- Gruenberg J, van der Goot FG. Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:495–504.
- Guduric-Fuchs J, O'Connor A, Camp B, O'Neill CL, Medina RJ, Simpson DA. Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics* 2012;13:357.
- Guinet C, Buy JN, Ghossain MA, et al. Comparison of magnetic resonance imaging and computed tomography in the preoperative staging of rectal cancer. *Arch Surg* 1990;125:385–8.

- Hartmann D, Bassler B, Schilling D, et al. Colorectal polyps: detection with dark-lumen MR colonography versus conventional colonoscopy. *Radiology* 2006;238:143–9.
- Harvey S, Martinez-Moreno CG, Luna M, Aramburo C. Autocrine/paracrine roles of extrapituitary growth hormone and prolactin in health and disease: an overview. *Gen Comp Endocrinol* 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.11.004>
- He X, Yan B, Liu S, Jia J, Lai W, Xin X, Tang C-e, Luo D, Tan T, Jiang Y. Chromatin remodeling factor LSH drives cancer progression by suppressing the activity of fumarate hydratase. *Cancer Res.* 2016;76:5743–55.
- He, X.-X., Chen, K., Yang, J., Li, X.-Y., Gan, H.-Y., Liu, C.-Y., Coleman, T.R., and Al-Abed, Y. (2009). Macrophage migration inhibitory factor promotes colorectal cancer. *Mol. Med.* 15: 1–10.
- Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* 1999;94:3791–9.
- Hoeferlin LA, Oleinik NV, Krupenko NI, Krupenko SA. Activation of p21- dependent G1/G2 arrest in the absence of DNA damage as an Antiapoptotic response to metabolic stress. *Genes Cancer.* 2011;2:889–99.
- Holscher AH. Invasive ultrasound: value of intraoperative and laparoscopic ultrasound imaging. *Bildgebung* 1995;62(Suppl. 1):39–42.
- <https://www.acibadem.com.tr/ilgi-alani/kolonoskopi/#nasil-uygulanir>
- https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map05210&keyword=colorectal%20cancer
- https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map05206&keyword=colorectal%20cancer
- Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:1721–6
- Huang, V. Endogenous miRNAa: miRNA-Mediated Gene Upregulation. *RNA Activation.* Singapore: Springer; 2017. p. 65–79.
- Hudson, J.D., Shoaibi, M.A., Maestros, R., Carnero, A., Hannon, G.J., and Beach, D.H. (1999). A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J. Exp. Med.* 190: 1375–1382.
- Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008;3:e3694.
- Hwang H-W, Wentzel EA, Mendell JT. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science.* 2007;315:97–100.

- Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez- Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer* 2005;113:752–60.
- Johnstone RM, Bianchini A, Teng K. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. *Blood* 1989;74:1844–51
- Jia J, Shi Y, Chen L, Lai W, Yan B, Jiang Y, Xiao D, Xi S, Cao Y, Liu S. Decrease in lymphoid specific Helicase and 5-hydroxymethylcytosine is associated with metastasis and genome instability. *Theranostics*. 2017; <https://doi.org/10.7150/thno.21389>.
- Jingting C, et al. Heparanase expression correlates with metastatic capability in human choriocarcinoma. *Gynecol Oncol*. 2007;107(1):22–9.
- Kalantari R, Chiang C-M, Corey DR. Regulation of mammalian transcription and splicing by nuclear RNAi. *Nucleic Acids Res*. 2015;44:524–37.
- Kang MR, Park KH, Yang JO, Lee CW, Oh SJ, Yun J, Lee MY, Han SB, Kang JS. miR-6734 up-regulates p21 gene expression and induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells. *PLoS One*. 2016;11:e0160961.
- Khudayberdiev SA, Zampa F, Rajman M, Schratt G. A comprehensive characterization of the nuclear microRNA repertoire of post-mitotic neurons. *Front Mol Neurosci*. 2013; <https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00043>.
- Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 2010;285:17442–52.
- Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem* 2013;288:10849–59.
- Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang H, et al. Therapeutic delivery of miR- 26a inhibits cancer cell proliferation and induces tumor-specific apoptosis. *Cell* 2009;137:1005–17.
- Koumangoye RB, Sakwe AM, Goodwin JS, Patel T, Ochieng J. Detachment of breast tumor cells induces rapid secretion of exosomes which subsequently mediate cellular adhesion and spreading. *PLoS One* 2011;6:e24234.
- Kuroiwa T, Lee EG, Danning CL, Illei GG, McInnes IB, Boumpas DT. CD40 ligand-activated human monocytes amplify glomerular inflammatory responses through soluble and cell-to-cell contact-dependent mechanisms. *J Immunol* 1999;163: 2168–75.
- Kwak EL, Chung DC. Hereditary colorectal cancer syndromes: an overview. *Clin Colorectal Cancer* 2007;6:340–4.
- Kwak PB, Tomari Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19:145–51.
- Kwon SC, Nguyen TA, Choi YG, Jo MH, Hohng S, Kim VN, Woo JS. Structure of human DROSHA. *Cell*. 2016;164:81–90.

- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843–54.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425:415–9.
- Lee, H., Rhee, H., Kang, H.J., Kim, H.S., Min, B.S., Kim, N.K., and Kim, H. (2008). Macrophage migration inhibitory factor may be used as an early diagnostic marker in colorectal carcinomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 129: 772–779.
- Legendre, H., Decaestecker, C., Nagy, N., Hendlisz, A., Schuring, M.P., Salmon, I., Gabius, H.J., Pector, J.C., and Kiss, R. (2003). Prognostic values of galectin-3 and the macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human colorectal cancers. *Mod. Pathol.* 16: 491–504.
- Leucci E, Patella F, Waage J, Holmstrøm K, Lindow M, Porse B, Kauppinen S, Lund AH. microRNA-9 targets the long non-coding RNA MALAT1 for degradation in the nucleus. *Sci Rep*. 2013;3:2535.
- Leung WK, Lam WW, Wu JC, et al. Magnetic resonance colonography in the detection of colonic neoplasm in high-risk and average-risk individuals. *Am J Gastroenterol* 2004;99:102–8.
- Li L-C, Okino ST, Zhao H, Pookot D, Place RF, Urakami S, Enokida H, Dahiya R. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103:17337–42.
- Li L-C. Chromatin remodeling by the small RNA machinery in mammalian cells. *Epigenetics*. 2014;9:45–52.
- Li S, Zhu Y, Liang Z, Wang X, Meng S, Xu X, Xu X, Wu J, Ji A, Hu Z, Lin Y, Chen H, Mao Y, Wang W, Zheng X, Liu B, Xie L. Up-regulation of p16 by miR-877-3p inhibits proliferation of bladder cancer. *Oncotarget*. 2016;7:51773–83.
- Li ZF, Liang YM, Lau PN, Shen W, Wang DK, Cheung WT, Xue CJ, Poon LM, Lam YW. Dynamic localisation of mature microRNAs in human nucleoli is influenced by exogenous genetic materials. *PLoS One*. 2013; 8:e70869.
- Li, L-C. Small RNA-Guided Transcriptional Gene Activation (RNAa) in Mammalian Cells. *RNA Activation*. Singapore: Springer; 2017. p. 1-20.
- Liao J-Y, Ma L-M, Guo Y-H, Zhang Y-C, Zhou H, Shao P, Chen Y-Q, Qu L-H. Deep sequencing of human nuclear and cytoplasmic small RNAs reveals an unexpectedly complex subcellular distribution of miRNAs and tRNA 3' trailers. *PLoS One*. 2010;5:e10563.
- Liao J, Liu R, Yin L, Pu Y. Expression profiling of exosomal miRNAs derived from human esophageal cancer cells by Solexa high-throughput sequencing. *Int J Mol Sci* 2014;15:15530–51.
- Lin J, Li J, Huang B, Liu J, Chen X, Chen X-M et al. Exosomes: novel biomarkers for clinical diagnosis. *Scientific World Journal* 2015; 2015: 657086.

- Liu, H., Lei, C., He, Q. et al. Nuclear functions of mammalian MicroRNAs in gene regulation, immunity and cancer. *Mol Cancer* 17, 64 (2018) doi:10.1186/s12943-018-0765-
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebet, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R., and Golub, T.R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834–838.
- Lv LL, Cao Y, Liu D, Xu M, Liu H, Tang RN, et al. Isolation and quantification of microRNAs from urinary exosomes/microvesicles for biomarker discovery. *Int J Biol Sci* 2013;9:1021–31.
- Luboldt W, Bauerfeind P, Wildermuth S, et al. Colonic masses: detection with MR colonography. *Radiology* 2000;216:383–8.
- Majid S, Dar AA, Saini S, Yamamura S, Hirata H, Tanaka Y, Deng G, Dahiya R. MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer
- Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007;449:682–8.
- Mao Liu et al. / *Journal of Genetics and Genomics* 37 (2010) 347–358
- Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010;73:1907–20.
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*. 2004;15:185–97.
- Meng X, Jiang Q, Chang N, Wang X, Liu C, Xiong J, Cao H, Liang Z. Small activating RNA binds to the genomic target site in a seed-region-dependent manner. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:2274–82.
- Michael A, Bajracharya SD, Yuen PS, Zhou H, Star RA, Illei GG, et al. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis* 2010;16:34–8.
- Millimaggi D, Mari M, D’Ascenzo S, Carosa E, Jannini EA, Zucker S, et al. Tumor vesicle-associated CD147 modulates the angiogenic capability of endothelial cells. *Neoplasia* 2007;9:349–57.
- Morris KV, Chan SWL, Jacobsen SE, Looney DJ. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*. 2004;305:1289–92.
- Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 2014. [http:// dx.doi.org/10.3402/jev.v3.24641](http://dx.doi.org/10.3402/jev.v3.24641).
- Munich S, Sobo-Vujanovic A, Buchser WJ, Beer-Stolz D, Vujanovic NL. Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncoimmunology* 2012;1:1074–83.
- Newland RC, Chapuis PH, Pheils MT, MacPherson JG. The relationship of survival to staging and grading of colorectal carcinoma: a prospective study of 503 cases. *Cancer* 1981;47:1424–9.

- Nolte-Hoehn EN, Buschow SI, Anderton SM, Stoorvogel W, Wauben MH. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood* 2009;113:1977–81.
- Ohkawara, T., Nishihira, J., Takeda, H., Asaka, M., and Sugiyama, T. (2005). Pathophysiological roles of macrophage migration inhibitory factor in gastrointestinal, hepatic, and pancreatic disorders. *J. Gastroenterol.* 40: 117–122.
- Ohrt T, Mütze J, Staroske W, Weinmann L, Höck J, Crell K, Meister G, Schwillke P. Fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy reveal the cytoplasmic origination of loaded nuclear RISC in vivo in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:6439–49.
- Olson RM, Perencevich NP, Malcolm AW, Chaffey JT, Wilson RE. Patterns of recurrence following curative resection of adenocarcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 1980;45:2969–74.
- Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 2010;12, 19–30; sup pp 1–13.
- Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 1983;33:967–78.
- Pan BT, Johnstone R. Selective externalization of the transferrin receptor by sheep reticulocytes in vitro. Response to ligands and inhibitors of endocytosis. *J Biol Chem* 1984;259:9776–82.
- Park CW, Zeng Y, Zhang X, Subramanian S, Steer CJ. Mature microRNAs identified in highly purified nuclei from HCT116 colon cancer cells. *RNA Biol.* 2010;7:606–14.
- Park JE, Heo I, Tian Y, Simanshu DK, Chang H, Jee D, Patel DJ, Kim VN. Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature.* 2011;475:201–5.
- Paugh SW, Coss DR, Bao J, Laudermilk LT, Grace CR, Ferreira AM, Waddell MB, Ridout G, Naeve D, Leuze M. MicroRNAs form triplexes with double stranded DNA at sequence-specific binding sites; a eukaryotic mechanism via which microRNAs could directly alter gene expression. *PLoS Comput Biol.* 2016;12:e1004744.
- Pickhardt PJ, Choi JR, Hwang I, et al. Computed tomographic virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults. *N Engl J Med* 2003;349:2191–200.
- Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:1608.
- Png KJ, Halberg N, Yoshida M, Tavazoie SF. A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature* 2012;481:190–4.

- Politz JCR, Hogan EM, Pederson T. MicroRNAs with a nucleolar location. *RNA*. 2009;15:1705–15.
- Portnoy V, Lin SHS, Li KH, Burlingame A, Hu Z-H, Li H, Li L-C. saRNA-guided Ago2 targets the RITA complex to promoters to stimulate transcription. *Cell Res*. 2016;26:320.
- Qin Y, Chen W, Liu B, Zhou L, Deng L, Niu W, Bao D, Cheng C, Li D, Liu S. MiR-200c inhibits the tumor progression of Glioma via targeting Moesin. *Theranostics*. 2017;7:1663.
- Qu JL, Qu XJ, Zhao MF, Teng YE, Zhang Y, Hou KZ, et al. Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation. *Dig Liver Dis* 2009;41:875–80.
- Qu H, Zheng L, Pu J, Mei H, Xiang X, Zhao X, Li D, Li S, Mao L, Huang K. miRNA-558 promotes tumorigenesis and aggressiveness of neuroblastoma cells through activating the transcription of heparanase. *Hum Mol Genet*. 2015;24:2539–51.
- Ramchandran, Ramani, and Pradeep Chaluvaly-Raghavan. miRNA-mediated RNA activation in mammalian cells. *RNA Activation*. Singapore: Springer; 2017. p. 81–89.
- Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief C et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996; 183: 1161–1172
- Rasko JE, Wong JJ-L. Nuclear microRNAs in normal hemopoiesis and cancer. *J Hematol Oncol*. 2017;10:8.
- RNAlocate: a resource for RNA subcellular localizations. *Nucleic Acids Research*. 2017.
- Robb GB, Brown KM, Khurana J, Rana TM. Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. *Nat Struct Mol Biol*. 2005;12:133–7.
- Ross JP, Kassir Z. The varied roles of nuclear argonaute-small RNA complexes and avenues for therapy. *Mol Ther-Nucleic Acids*. 2014;3:e203.
- Sato-Kuwabara Y, Melo SA, Soares FA, Calin GA. The fusion of two worlds: non-coding RNAs and extracellular vesicles – diagnostic and therapeutic implications (Review). *Int J Oncol* 2015;46:17–27.
- Saunderson SC, Dunn AC, Crocker PR, McLellan AD. CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node. *Blood* 2014;123:208–16.
- Schraivogel D, Meister G. Import routes and nuclear functions of Argonaute and other small RNA-silencing proteins. *Trends Biochem Sci*. 2014;39:420–31.
- Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena- Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008;10:1470–6.
- Scott RE, Wille JJ Jr, Wier ML. Mechanisms for the initiation and promotion of carcinogenesis: a review and a new concept. *Mayo Clin Proc*. 1984;59:107–17.

- Seviour EG, Sehgal V, Lu Y, Luo Z, Moss T, Zhang F, Hill SM, Liu W, Maiti SN, Cooper L, Azencot R, Lopez-Berestein G, Rodriguez-Aguayo C, Roopaimoole R, Pecot CV, Sood AK, Mukherjee S, Gray JW, Mills GB, Ram PT. Functional proteomics identifies miRNAs to target a p27/Myc/phospho-Rb signature in breast and ovarian cancer. *Oncogene*. 2016;35:691–701.
- Shih KK, Levine DA. Exosomal microRNAs step into the biomarker arena. *Gynecol Oncol* 2008; 110: 1–2.
- Silva J, Garcia V, Zaballo A, Provencio M, Lombardia L, Almonacid L, et al. Vesicle-related microRNAs in plasma of nonsmall cell lung cancer patients and correlation with survival. *Eur Respir J* 2011;37:617–23.
- Silverman JM, Reiner NE. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cell Microbiol* 2011; 13: 1–9.
- Simpson RJ, Kalra H, Mathivanan S. ExoCarta as a resource for exosomal research. *J Extracell Vesicles* 2012. <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v1i0.18374>.
- Simons M, Raposo G. Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:575–81.
- Stewart BW, Kleihus P, editors. World cancer report. Lyon: IARC Press; 2003.
- Subramanian S, Ajay, Brian D, Athey, Inhan Lee. Unified translation repression mechanism for microRNAs and upstream AUGs. *BMC Genomics*. 2010;11(1): 155.
- Tabet F, Vickers KC, Cuesta Torres LF, Wiese CB, Shoucri BM, Lambert G, et al. HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. *Nat Commun* 2014;5:3292.
- Tang R, Li L, Zhu D, Hou D, Cao T, Gu H, Zhang J, Chen J, Zhang C-Y, Zen K. Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1 biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: evidence for a microRNA hierarchy system. *Cell Res*. 2012;22:504.
- Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* 2008;455:1124–8.
- Tazawa, H., Tsuchiya, N., Izumiya, M., and Nakagama, H. (2007). Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 15472–15477
- Tepper JE, O’Connell MJ, Niedzwiecki D, et al. Impact of Number of nodes retrieved on outcome in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:157–63.
- Tian T, Zhu YL, Hu FH, Wang YY, Huang NP, Xiao ZD. Dynamics of exosome internalization and trafficking. *J Cell Physiol* 2013;228:1487–95.
- Ting AH, Schuebel KE, Herman JG, Baylin SB. Short dsRNA induces transcriptional gene silencing in human cancer cells in the absence of DNA methylation. *Nat Genet*. 2005;37:906.

- Tomatis L. Cancer, causes, occurrence and control. Lyon: IARC Press. Pubbl. no. 100; 1990.
- Toscano-Garibay JD, Aquino-Jarquín G. Transcriptional regulation mechanism mediated by miRNA–DNA• DNA triplex structure stabilized by Argonaute. *Biochim Biophys Acta, Gene Regul Mech.* 2014;1839:1079–83.
- Trams EG, Lauter CJ, Salem JN, Heine U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1981; 645: 63–70.
- UICC (International Union Against Cancer). TNM classification of malignant tumours, 6th ed. Sobin LH, Wittekind Ch, editors. New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: Wiley- Liss. 2002.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic Exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 654–659.
- Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell.* 2011;147:275–92.
- Van Cutsem E, Dico M, Wils J, et al. Adjuvant treatment of colorectal cancer (current expert opinion derived from the Third International Conference: Perspectives in Colorectal Cancer, Dublin, 2001). *Eur J Cancer* 2002;38:1429–36.
- Vining DJ, Gelfand DW, Bechtold RE. Technical feasibility of colon imaging with helical CT and virtual reality. *AJR Am J Roentgenol* 1994;162(Suppl.):104.
- von Roon AC, Reese G, Teare J, et al. The risk of cancer in patients with Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2007;50:839–55.
- Wang C, Chen Q, Li S, Li S, Zhao Z, Gao H, Wang X, Li B, Zhang W, Yuan Y. Dual inhibition of PCDH9 expression by miR-215-5p up-regulation in gliomas. *Oncotarget.* 2017;8:10287.
- Wang C, Chen Z, Ge Q, Hu J, Li F, Hu J, Xu H, Ye Z, Li LC. Up-regulation of p21(WAF1/CIP1) by miRNAs and its implications in bladder cancer cells. *FEBS Lett.* 2014;588:4654–64.
- WCRF& AICR. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC: AICR; 2007.
- Webber J, Steadman R, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res* 2010;70:9621–30.
- Weinberg MS, Morris KV. Transcriptional gene silencing in humans. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:6505–17.
- Wieckowski E, Whiteside TL. Human tumor-derived vs dendritic cell-derived exosomes have distinct biologic roles and molecular profiles. *Immunol Res* 2006;36:247–54.
- Wilson RC, Tambe A, Kidwell MA, Noland CL, Schneider CP, Doudna JA. Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Mol Cell.* 2015;57:397–407.

- Wilson, J.M., Coletta, P.L., Cuthbert, R.J., Scott, N., MacLennan, K., Hawcroft, G., Leng, L., Lubetsky, J.B., Jin, K.K., Lolis, E., Medina, F., Brieva, J.A., Poulson, R., Markham, A.F., Bucala, R., and Hull, M.A. (2005). Macrophage migration inhibitory factor promotes intestinal tumorigenesis. *Gastroenterology* 129: 1485–1503.
- Wong JJ, Ritchie W, Gao D, Lau KA, Gonzalez M, Choudhary A, Taft RJ, Rasko JE, Holst J. Identification of nuclear-enriched miRNAs during Mouse granulopoiesis. *J Hematol Oncol.* 2014;7:42.
- Xiang X, Mei H, Zhao X, Pu J, Li D, Qu H, Jiao W, Zhao J, Huang K, Zheng L. miRNA-337-3p suppresses neuroblastoma progression by repressing the transcription of matrix metalloproteinase 14. *Oncotarget.* 2015;6:22452.
- Xiao M, Li J, Li W, Wang Y, Wu F, Xi Y, Zhang L, Ding C, Luo H, Li Y. MicroRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger. *RNA Biol.* 2016:00–0.
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:654–9.
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011;13:423–33.
- Yamakuchi, M., Ferlito, M., and Lowenstein, C.J. (2008). miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 13421–13426.
- Yang DG, Liu L, & Zheng XY. Cyclin-dependent kinase inhibitor p16 ink4a, and telomerase may co-modulate endothelial progenitor cells senescence. *Ageing Res Rev.* 2008;7(2):137.
- Yasasever, V., Camlica, H., Duranyildiz, D., Oguz, H., Tas, F., and Dalay, N. (2007). Macrophage migration inhibitory factor in cancer. *Cancer Investig.* 25: 715–719.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003;17:3011–6.
- Yvonne Tay, Jinqiu Zhang, Andrew M. Thomson, Bing Lim, Isidore Rigoutsos. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature.* 2008;455(7216):1124–1128
- Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res* 2006;66:4795–801.
- Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2015; 13: 17–24.
- Zhang Y, Hu JF, Wang H, Cui J, Gao S, Hoffman AR, Li W. CRISPR Cas9-guided chromatin immunoprecipitation identifies miR483 as an epigenetic modulator of IGF2 imprinting in tumors. *Oncotarget.* 2017;8:34177–90.

- Zheng L, Chen Y, Ye L, Jiao W, Song H, Mei H, Li D, Yang F, Li H, Huang K, Tong Q. miRNA-584-3p inhibits gastric cancer progression by repressing Yin Yang 1- facilitated MMP-14 expression. *Scientific reports*. 2017;7:8967
- Zheng L, Jiao W, Mei H, Song H, Li D, Xiang X, Chen Y, Yang F, Li H, Huang K. miRNA-337-3p inhibits gastric cancer progression through repressing myeloid zinc finger 1-facilitated expression of matrix metalloproteinase 14. *Oncotarget*. 2016;7:40314.
- Zhou Q, Li M, Wang X, Li Q, Wang T, Zhu Q, et al. Immunerelated microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *Int J Biol Sci* 2012;8:118–23
- Zinkin LD. A critical review of the classifications and staging of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1983;26:37–43.
- Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D et al. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nat Med* 1998; 4: 594–600.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mehmet Sait YILMAZ

Doğum Yeri : Kahta

Doğum Tarihi: 01/01/1991

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durum Kurum ve Yılı

Lise : Sokullu Mehmet Paşa Lisesi (2010)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2015)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı
(2016 - 2020)

Çalıştığı Kurum ve Yılı:

Kimyager: Ankara Şehir Hastanesi Acil Biyokimya Laboratuvarı, 2019- Halen

Laboratuvar Teknisyeni: Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2015- 2019
Acil Biyokimya Laboratuvarı

Kolon Kanseriinde Erken Tanı Amacıyla Biyobelirteç Potansiyeli Taşıyan Eksozomal MikroRNA'ların incelenmesi, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Proje No: 17B0430005, Yüksek Lisans Tez Çalışması, Araştırmacı

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Zorunlu Yaz Stajı, Ankara, 2014

Kriminal Polis Laboratuvarı, Zorunlu Yaz Stajı, Antalya, 2013

Yayın

C.C. Eylem, **M. Yılmaz**, B. Derkus, E. Nemutlu, C.B. Camci, E. Yılmaz, M.A.Turkoglu, B. Aytac, N. Ozyurt, E. Emregul, Untargeted Multi-Omic Analysis of Colorectal Cancer-Specific Exosomes Reveals Joint Pathways of Colorectal Cancer in both Clinical Samples and Cell Culture, Cancer Letters, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.10.038>.

M.S. Yılmaz et al., Investigation of the Use of Collagen-Gelatin-Gold Nanoparticle Nanocomposite System as an Aptasensor Matrix, Hacettepe J. Biol. & Chem., 2018, 46 (4), 523–531