T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GEN DÜZENLEME YÖNTEMİ İLE KONTROL EDİLEBİLİR MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN ÜRETİMİ

FATMA ZEHRA ARMAĞAN

KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ

DANIŞMAN
DR.ÖĞR.ÜYESİ AYCA ZEYNEP İLTER

İSTANBUL-2022

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS)

GEN DÜZENLEME YÖNTEMİ İLE KONTROL EDİLEBİLİR MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN ÜRETİMİ

FATMA ZEHRA ARMAĞAN

DANIŞMAN
DR.ÖĞR.ÜYESİ AYCA ZEYNEP İLTER

KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Bu çalışma, İstinye üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2020/B13

İSTANBUL-2022

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak sunduğum, “Gen Düzenleme Yöntemi İle Kontrol Edilebilir Mezenkimal Kök Hücre Üretimi” adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Fatma Zehra ARMAĞAN

İTHAF

Anneme ve Babama

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarımda danışmanlığımı yapan, bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen, tez dönemim boyunca üstümden ilgisini ve emeğini eksik etmeyen, her konuda daima yardımcı olan değerli hocam, Dr. Öğr. Üyesi Ayca İLTER'e, yüksek lisans ve laboratuvar hayatım boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yardımcı olan hocam, Dr. Öğr. Üyesi Özgür TATAROĞLU'na

Bilimsel çalışmalarıyla her zaman örnek ve yol gösterici olan, tecrübelerini ve bilgi birikimini esirgemeyen, araştırma yapmamız için bize her zaman her koşulu sağlayan saygı değer Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e

Yüksek lisans dönemimde ve yıllardır her zaman yanımda olan tez sürecimde yardımlarını esirgemeyen her zaman destekleyen, zorlu süreçlerde hep yan yana olduğumuz hayatımdaki yerleri çok başka olan arkadaştan öte bildiğim kız kardeşlerim Sevde EKİCİ'ye ve Meral BAŞER'e,

Yüksek lisans hayatımda bana her konuda yardımcı olan, her zaman destekleyen bilgilerini esirgemeyen, üniversitenin bana kazandırdığı arkadaşlarım, Burcu UĞURLU'ya, Hatice YAZICI'ya, Berk Alp EMİR'e, Kaan ADACAN'a ve aynı zamanda İSUGE & İSUKÖK ailesine,

Tez dönemimin son zamanlarına denk gelse de son süreçlerimde bana yardımcı olan arkadaşım Menekşe AKKÖSE'ye,

Her zaman her koşulda yanımda olan destekçim, yol arkadaşım Okan AKAR'a

Hayatımdaki en büyük şansım, beni her zaman destekleyen, azimlendiren, her koşulda arkamda duran, eğitimim için ellerinden gelen her şeyi yapan, her açıdan bana her zaman örnek olan ebeveynlerim annem Şerife ARMAĞAN'a, babam Ali ARMAĞAN'a ve bana her anlamda yardımcı olan bir tanecik kardeşim Sena ARMAĞAN'a, canım ablam Büşra BAĞDAŞ'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstinye Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2020/B13

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI ..... İ
İTHAF ..... İİ
TEŞEKKÜR ..... İİİ
İÇİNDEKİLER ..... İV
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Vİİİ
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... Xİ
ÖZET ..... XİV
ABSTRACT XV
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER 3
1.1. Mezenkimal Kök Hücreler 3
1.1.1. Mezenkimal Kök Hücre İmmunmodulatör Özellikleri 4
1.2. Mezenkimal Kök Hücreler İle Doğal Öldürücü Hücrelerin Etkileşimi 5
1.2.1. Doğal Öldürücü (NK) Hücreler 5
1.2.2. NK Hücrelerinin MKH'lar Üzerindeki Etkisi 7
1.3. CD47 9
1.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Fonksiyonlarini Geliştirme Stratejileri 10
1.4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Ön Koşullandırılması 10
1.4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Genetik Manipülasyon İle Fonksiyonlarının Arttırılması 11
1.4.3. CRISPR-Cas9 11
1.4.4. Gen Aktarım Metotları 13
1.4.5. Lentivirüs Aracılı Kontrol Edilebilir Kİ-MKH Oluşturulması 15
2. MATERYAL METOT 17
2.1. Materyal 17
2.1.1. Kimyasal Malzemeler 17
2.1.2. Sarf Malzemeler 18
2.1.3. Cihazlar 18
2.2. Metot 19

2.2.1. Hücre Kültürü 19
2.2.2. Plazmitlerin Oluşturulması 21
2.2.3. Kİ-MKH'larda Lentivirüs Aracılı Gen Manipülasyonu 25
2.2.4. Lentivirüs Üretimi.....29
2.2.5. CD47 Protein Seviyesinin Belirlenmesi 32
2.2.6. CD47 Yüzey Protein ifadesinin Akış Sitometrisi ile Belirlenmesi.....35
2.2.7. qPZR ile CD47'nin mRNA Seviyesinin Belirlenmesi.....35
2.2.8. Kİ-MKH ve NK Hücrelerinin Ko-kültürlenmesi.....37
2.2.9. Kİ-MKH'larda Hücre Ölümünün WST-1 İle Gösterilmesi 38
2.2.10. Kİ-MKH'larda ve iC9-GFP Kİ-MKH'larda Apoptozun Annexin V/PI İle Gösterilmesi 38
2.2.11. Kİ-MKH'larda ve iC9-GFP Kİ-MKH'larda Hücre Ölümünün Propidium İyodur (PI) Boyaması İle Gösterilmesi 39
2.2.12. Floresan Mikroskopta Hızlandırılmış Fotoğraf Çekimi.....39
2.2.13. Akış Sitometrisi İle GFP İfadesi 39
2.2.14. GFP İfade Eden Kİ-MKH'ların Floresan Mikroskobunda İncelenmesi.....40
2.2.15. qPZR Yöntemi İle Lentivirüs İle Gen Aktarımı Yapılmış Kİ-MKH'ların Karakterizasyonu 40
3. BULGULAR.....42
3.1. Plazmitlerin Oluşturulması ve Lentivirüs Üretimi.....42
3.1.1. İzole Edilen Plazmit DNA'larının Agaroz Jel Elektroforezi İle Doğrulanması42
3.1.2. Lentivirüs Titrasyonun Kantitatif PZR (qPZR) Bulguları 43
3.2. Kİ-MKH'larda Gen İfade Etme Deneylerinin EF1α ve CMV Promotörleri Kullanılarak Optimize Edilmesi 44
3.2.1. EF1α-GFP ve CMV-GFP Kİ-MKH'ların Floresan Mikroskopi Görüntüleri....44
3.2.2. EF1α-GFP Kİ-MKH ve CMV-GFP Kİ-MKH'larda GFP ifadesinin Akış Sitometrisi Analiz Bulguları 44
3.3. Lentiviral Transdüksiyon Yöntemi İle CD47 Proteinini Aşırı İfade Eden (CD47 o/e) ve CD47 Geni Nakavt Edilen Kİ-MKH Hatlarının Oluşturulması.....47
3.3.1. EF1α ve CMV Promotörü Kullanılarak Oluşturulan CD47 o/e Kİ-MKH'ların CD47 Yüzey Proteini İfade Seviyelerinin Akış Sitometrisi İle Belirlenmesi.....47
3.3.2. CD47 Geni Nakavt Edilmiş Kİ-MKH'larda CD47 Yüzey Proteinin Akış Sitometrisi İle Belirlenmesi 50

3.3.3. Lentiviral Transdüksiyon Sonrası Genetiği Değiştirilen Kİ-MKH'larda CD47 mRNA Seviyesinin Belirlenmesi 51
3.3.4. CD47 Protein İfadesinin Western Emdirim İle Belirlenmesi 53
3.4. CD47 Proteinine Bağlı Olarak Genetiği Değiştirilmiş Kİ-MKH'ların NK92 Hücreleri İle Etkileşimi 54
3.4.1. IL-2 İle İndüklenmiş NK92 Hücrelerinin Yabanil Kİ-MKH'lar Ko-Kültüre Edilmesi 54
3.4.2. Sitotoksik NK92 Hücrelerinin Yabanil Tip ve EF1α-CD47 Kİ-MKH'lar Üzerinindeki Etkisinin Morfolojik Olarak İncelenmesi.....55
3.5. Kontrol Edilebilir Kİ-MKH Hatlarının Oluşturulmasının Optimizasyonu.....57
3.5.1. Kİ-MKH'larda iC9-GFP Gen İfadesinin Farklı Enfeksiyon Çeşitliliği (MOI) Kullanılarak Belirlenmesi 57
3.6. Kİ-MKH ve iC9-GFP Kİ-MKH'larda Hücre Ölümünün Gösterilmesi 59
3.6.1. H_2O_2 İle Muamele Edilen Kİ-MKH'larda WST-1 ile Hücre Canlılığı Ölçülmesi 59
3.6.2. H_2O_2 ile Muamele Edilen Kİ-MKH'ların Hücre Ölümünün PI Boyaması ile Gösterilmesi 60
3.6.3. H_2O_2 İle Muamele Edilen Kİ-MKH'ların Hücre Ölümünün Annexin-V/PI İle Değerlendirilmesi 63
3.6.4. CID İle Muamele Edilen Yabanil Tip Ve iC9-GFP Kİ-MKH'ların Hücre Ölümünün Annexin-V/PI İle Değerlendirilmesi 64
3.6.5. CID İle Muamele Edilen iC9-GFP Ve Yabanil Tip Kİ-MKH'ların Hücre Ölümünün PI Boyaması İle Gösterilmesi 66
3.6.6. CID İle Muamele Edilen iC9-GFP Kİ-MKH'ların Floresan Mikroskopi Hızlandırılmış Görüntüleri 69
3.7. Gen Düzenleme Sonrası Elde Edilen Hücrelerin qPZR İle Karakterizasyonu 70
3.8. İleriye Yönelik Çalışmalar 71
4. TARTIŞMA 72
5. SONUÇ 78
KAYNAKÇA.....79
İNTİHAL RAPORU 93

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Kullanılan hücre tipleri ve özellikleri 20
Tablo 2.2: CD47 nakavt (k/o) rehber RNA sekansları 21
Tablo 2.3: Reaksiyon Bileşenleri 22
Tablo 2.4: Reaksiyon Bileşenleri 24
Tablo 2.5: Reaksiyon Döngüsü 24
Tablo 2.6: Reaksiyon Bileşenleri 26
Tablo 2.7: Reaksiyon Döngüsü 26
Tablo 2.8: Reaksiyon Bileşenleri 27
Tablo 2.9: Reaksiyon Döngüsü 27
Tablo 2.10: Reaksiyon Bileşenleri 31
Tablo 2.11: qRT-PCR Programı 31
Tablo 2.12: Yığma ve ayırma jeli bileşenleri 33
Tablo 2.13: CD47 ve GAPDH ileri geri primerleri 36
Tablo 2.14: Reaksiyon Bileşenleri 36
Tablo 2.15: Reaksiyon aşamaları 36
Tablo 2.16: Reasiyon Bileşenleri 41
Tablo 2.17: Reaksiyon aşamaları 41
Tablo 3.1: Üretilen lentivirüslerin qPZR sonrası analiz edilen titrasyon sonuçları 43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1: Mezenkimal kök hücrelerin elde edilebildiği kaynaklar 3
Şekil 1.2: NK hücre reseptörleri (Shankar ve ark., 2020)..... 6
Şekil 1.3: NK hücre sitotoksisitesi (Shankar ve ark., 2020) 7
Şekil 1.4: Aktive edilmemiş NK hücreleri ve önceden uyarılan NK hücre aktivasyonunun MKH'lar üzerindeki etkisi (P. De Miguel ve ark., 2012)'den Türkçeleştirilmiş..... 8
Şekil 1.5: CD47/IAP'nin yapısı (Lian ve ark., 2019b)..... 10
Şekil 1.6: CRISPR-Cas9 mekanizması (Ha, 2019)..... 12
Şekil 1.7: CID uygulanması sonrası kaspaz bağımlı apoptozun şematik gösterimi (Xie ve ark., 2001) 16
Şekil 2.1: LentiCRISPR v2-Puro plazmitinin şematik gösterimi (addgene #52961) 23
Şekil 2.2: Klonlanmış plazmit DNA'sı ile bakteriyel trasnformasyonun şematik gösterimi 24
Şekil 2.3: pLentiCMVblast plazmiti 28
Şekil 2.4: pLentiEF1ablast plazmiti..... 28
Şekil 2.5: GFP geninin klonladığı EF1α promotör içeren plazmit yapısı..... 29
Şekil 2.6: GFP geninin klonladığı CMV promotör içeren plazmit yapısı 29
Şekil 2.7: iC9 ve GFP geninin klonladığı EF1α promotör içeren plazmit yapısı 29
Şekil 2.8: Lentivirüslerin oluşturulmasının şematik gösterimi (ProMAb'dan alınarak modifiye edilmiştir) 30
Şekil 3.1: Plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi 42
Şekil 3.2: (A) iC9-GFP ve EF1α-CD47, (B) CD47 k/o ve scr k/o kontrol (C) CMV-CD47 ve EF1α-CD47, (D) EF1α-GFP ve CMV-GFP lentivirüslerinin qPZR amplifikasyon plotları 43
Şekil 3.3: EF1α-GFP Kİ-MKH ve CMV-GFP Kİ-MKH'larda GFP ifadesinin floresan mikroskopi sonuçları (ölçek çubuğu = 100µm; 10X objektif) 44
Şekil 3.4: Yabanil tip, EF1α-GFP ve CMV-GFP Kİ-MKH'larda akış sitometrisi ile değerlendirilen GFP ifadesinin histogram grafikleri 46
Şekil 3.5: (A) İzotip kontrol ve Yabanil tip Kİ-MKH, (B) EF1α-CD47 ve CMV-CD47 Kİ-MKH'ların CD47 yüzey protein ifade grafikleri, (C) Yabanil tip Kİ-MKH'lar ile EF1α-CD47 ve CMV-CD47 Kİ-MKH grafiklerinin birlikte gösterimi 48

Şekil 3.6: Yabanil tip, EF1α-CD47 ve CMV-CD47 Kİ-MKH'larda akış sitometrisi ile analiz edilen CD47 ifadesinin grafik hâlinde gösterimi 49
Şekil 3.7: Yabanil tip (YT/Kİ-MKH), CD47 k/o ve Scr k/o kontrol Kİ-MKH'larda CD47 yüzey proteinin akış sitometrisi ile gösterilmesi. (A) İzotip kontrol ve YT/Kİ-MKH'larda CD47 ifadesi (B) Yabanil tip Kİ-MKH'lar ile CD47 k/o ve Scr k/o kontrol Kİ-MKH grafiklerinin birlikte gösterimi 50
Şekil 3.8: Yabanil tip, CD47 k/o ve Scr k/o kontrol Kİ-MKH'larda akış sitometrisi ile analiz edilen CD47 ifadesinin grafik hâlinde gösterimi 51
Şekil 3.9: CD47 mRNA seviyesinin qPZR ile değerlendirilmesi. (A) CD47 mRNA ifadesinin kontrole oranla katlık artış grafiği, (B) Standart örneklerin doğrusal eğri grafiği (C) qPZR amplifikasyon grafiği (*:p<0,0332, **:p<0,0021,****:p<0,0001) 52
Şekil 3.10: Total protein izolasyonu sonrası CD47 proteinin western emdirim yöntemi ile gösterilmesi. (A) CD47 ve GAPDH antikorlarının protein ifadelerinin Western emdirim ile alınan sonuçları (B) CD47 protein ifadesinin grafik hâlinde gösterimi..... 53
Şekil 3.11: Naif ve sitotoksik NK92 hücreleriyle yabanil tip Kİ-MKH'ların 1:1 ve 1:5 oranlarında (Kİ-MKH:NK) ko-kültüre edilmesinin mikroskopi görüntüleri (ölçek çubuğu = 100µm; 10X objektif) 54
Şekil 3.12: Sitotoksik NK92 hücreleri ile yabanil tip ve EF1α-CD47 Kİ-MKH'ların farklı oranlarda ko-kültüre edilmesinin mikroskopi görüntüleri (ölçek çubuğu = 100µm; 10X objektif)..... 56
Şekil 3.13: iC9-GFP Kİ-MKH'lara MOI 20 ve MOI 40 ile yapılan transdüksiyon sonrası GFP ifadesinin akış sitometri sonuçları. (A) İzotip kontrol ve Yabanil tip Kİ-MKH'ların, (B) iC9-GFP MOI 20 ve iC9-GFP MOI 40 Kİ-MKH'ların GFP ifadesinin histogram grafikler..... 58
Şekil 3.14: MOI 40 ile yapılan transdüksiyon sonrası iC9-GFP Kİ-MKH'ların floresan mikroskobunda GFP ifade görüntüleri (ölçek çubuğu = 100µm; 10X objektif) 58
Şekil 3.15: H_2O_2'nın Kİ-MKH'lar üzerinde toksisitesini gösteren WST-1 hücre canlılığı testi analiz sonuçları (**:p<0,0021, ***:p<0,0002, ****:p<0,0001)..... 59
Şekil 3.16: H_2O_2'nın farklı dozlara maruz bırakılan Kİ-MKH'ların hücre ölümünün PI boyaması ile floresan mikroskobunda görüntülenmesi (ölçek çubuğu = 100µm; 10X objektif)..... 61

Şekil 3.17: H_2O_2'ye maruz bırakılan yabanil tip Kİ-MKH'larda oksidatif strese bağlı hücre ölümünün PI boyaması sonrası canlı ve ölü hücre sayılarının yüzde olarak grafik hâlinde gösterimi (*:p<0,0114, ****:p<0,0001) 62
Şekil 3.18: H_2O_2'nın 300 µM ve 400 µM konsantrasyonlarında 24 saat inkübasyon sonrası Kİ-MKH'lar üzerindeki apoptotik etkisinin Annexin-V/PI ile değerlendirilmesi sonuçları 64
Şekil 3.19: CID molekülünün 50nM konsantrasyonda 24 saat uygulaması sonrası yabanil tip ve iC9-GFP Kİ-MKH'lara etkisinin Annexin-V/PI ile değerlendirilmesinin histogramı 65
Şekil 3.20: CID molekülüne maruz bırakılan yabanil tip ve iC9-GFP Kİ-MKH'larda hücre ölümünün PI boyaması sonrası canlı ve ölü hücre sayılarının yüzde olarak grafik hâlinde gösterimi (***:p<0,0004) 66
Şekil 3.21: 50 nM CID molekülü ile 24 saat muamele edilen/edilmeyen yabanil tip Kİ-MKH'larda hücre ölümünün PI boyaması ile floresan mikroskobunda görüntüleme sonuçları (ölçek çubuğu = 100µm; 10X objektif) 67
Şekil 3.22: 50 nM CID molekülü ile 24 saat muamele edilen/edimeyen iC9-GFP Kİ-MKH'larda hücre ölümünün PI boyaması ile floresan mikroskobunda görüntüleme sonuçları (ölçek çubuğu = 100µm; 10X objektif), (ölçek çubuğu = 50 µm; 20X objektif) 68
Şekil 3.23: iC9-GFP hücrelerinin 50 nM CID'a maruz bırakılmalarının ardından 2 saatlik floresan mikroskobu çekim sonuçları (ölçek çubuğu = 100µm; 10X objektif) 69
Şekil 3.24: MKH yüzey belirteçleri olan CD44, CD90, VCAM, ICAM genlerinin mRNA ifadeleri (ns:p>0,05) 70
Şekil 3.25: MKH osteojenik farklılaşma belirteci olan RUNX2 ve hücre yapısının korunmasında rol oynayan Vimentin geninin mRNA ifadesi (ns:p>0,05) 71
Şekil 3.26: MKH pluripotensi belirteçleri olan, SOX2, OCT4 ve TERT genlerinin mRNA ifadeleri (ns:p>0,05) 71

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

AAV : Adeno ilişkili virüs

ADCC : Antikora bağımlı hücresel sitotoksisite

ALS : Amyotrofik Lateral Skleroz

APS : Amonyum per sulfat

CARD : Kaspaz aktivasyon ve çağrıcı domain

Cas9 : CRISPR ile ilişkili protein 9

cDNA : Komplementer DNA

CID : Kimyasal dimerizasyon indükleyicisi

CMV : Sitomegalovirüs

CO_2 : Karbondioksit

CRISPR : Düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar

DMSO : Dimetilsülfoksit

DNA : Deoksiribonükleik asit

DSB : Çift iplik kırığı

EF1α : Human elongation factor-1 alpha

FACS : Floresan aktive hücre sıralıyıcı

FSS : Fetal sığır serumu

FITC : Floresan izotiyosiyanat

FKBP12 : FK506 bağlayıcı protein 12

GFP : Yeşil floresan protein

GVHD : Graft versus host hastalığı

HDR : Homolojiye yönelimli onarım

HGF : Hepatosit büyüme faktörü

HIV-1 : İnsan immün yetmezlik virüsü tip 1

IAP : İntegrin ilişkili protein

iC9 : İndüklenebilir Kaspaz-9

ICAM1 : Hücreler arası yapışma molekülü 1

ICM : Embriyo iç hücre kitlesi

IDO : İndolamin 2,3-dioksijenaz

IFN-ɣ : Interferon gama

IgG1 : İmmünoglobulin G1

IL : Interlökin

iPKH : İndüklenmiş pluripotent kök hücre

ISCT : Uluslararası hücresel tedavi derneği

k/o : Nakavt

Kİ : Kemik iliği

KIR : Öldürücü hücre immünoglobulin benzeri reseptör

LB : Lizojen broth

LV : Lentivirüs

MHC : Majör histo-uyumluluk kompleksi

MI : Miyokard enfarktüsü

MKH : Mezenkimal kök hücre

MOI : Multiplicity of Infection

MS : Multiplskleroz

NHEJ : Homolog olmayan uç birleştirme

NK : Natural killer

o/e : Aşırı ifade

Oct-4 : Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4

P : Pasaj

PAM : Protospacer bitişik motif

PBS : Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

PGE2 : Prostaglandin E2

pH : Hidrojen gücü

PI : Propidyum iyodür

POU5F1 : POU sınıf 5 homeobox 1

qPZR : Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

RNA : Ribonükleik asit

ROS : Reaktif oksijen türevi

rpm : Dakikadaki devir sayısı

RUNX2 : RunX ailesi transkripsiyon faktörü 2

SCI : Omurilik yaralanmaları

SDS : Sodyum dodesil sülfat

sgRNA : Rehber RNA

SLE : Sistemik lupus eritematozus

Sox-2 : Sex determining region Y-box 2

TAE : Tris – Astetik asit – EDTA

TALEN : Transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleaz

TERT : Telomeraz ters tranferaz

TGF-β : Transforme Edici Büyüme Faktörü- β

THY1 : THY-1 hücre yüzeyi antijeni

TLR : Toll benzeri reseptör

TNF-α : Tümör nekroz faktörü alpha

TracrRNA : Trans-activating CRISPR RNA

VCAM1 : Vasküler hücre yapışma molekülü 1

VIM : Vimentin

WJ : Wharton jeli

WST-1 : Suda çözünür tetrazolyum tuzu-1

ZFN : Çinko parmak nükleaz

ÖZET

Armağan, Z. (2022). Gen düzenleme yöntemi ile kontrol edilebilir mezenkimal kök hücrelerin üretimi. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre ve Doku Mühendisliği, ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler (Kİ-MKH'lar) yüksek rejenerasyon kapasitesi ve immünmodülasyon özelliği sayesinde hücresel tedavilerde sıklıkla kullanılan teröpatik etkinliğe sahip hücreler olarak bilinmektedir. Mezenkimal kök hücrelerin doğal öldürücü (NK) hücreler üzerinde immün baskılayıcı etkileri olduğu bilinse de yapılan bazı çalışmalar önceden aktive edilmiş NK hücrelerinin farklı oranda MKH'lar ile kültüre edildiğinde, NK hücrelerinin sitokin salınımını arttırarak MKH'lar üzerinde sitotoksik bir etkisi olduğunu göstermiştir. Bu sebeple MKH ve NK hücreleri arasındaki etkileşim tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan bu çalışmada bir gen düzenleme aracı olan lentiviral vektörler kullanılarak Kİ-MKH'larda CD47 protein seviyesi aşırı ifade edilerek önceden aktive edilmiş sitotoksik NK92 hücrelerinden kaçan Kİ-MKH'lerinin oluşturulması amaçlanmıştır. Oluşturulan hücre hatlarında yüzeyde bulunan CD47 protein seviyesi akış sitometrisi ile belirlenirken total protein seviyesi Western emdirimi yöntemi ile belirlenmiştir. CD47 aşırı ifade eden Kİ-MKH'ları sitotoksik NK92 hücreleri ile farklı oranlarda ko-kültüre edilmiş ve morfolojik olarak sağ kalım oranları belirlenmiştir. MKH'larda yapılan lentiviral aracılı genetik modifikasyonun hücrelerde oluşturabilecek kanserleşme potansiyeline karşılık uyarılabilir kaspaz-9 (iC9) proteinine dayalı intihar sistemi kullanılarak kontrol edilebilir Kİ-MKH hattı oluşturulmuştur. Oluşturulan iC9-GFP Kİ-MKH'ların spesifik bir kimyasal dimerizasyon indükleyicisi (CID) ile muamele edilerek hücrelerdeki apoptoz düzeyi Annexin-V/PI boyaları kullanılarak akış sitometrisi ile belirlenmiştir. Yapılan genetik modifikasyonlar sonucunda Kİ-MKH'lerin karakterizasyon analizi qPZR ile gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, lentiviral vektörler ile CD47 proteinin aşırı ifade eden Kİ-MKH'ların önceden aktive edilmiş sitotoksik NK92 hücrelerinden kaçabildiği gösterilmiş ve iC9 proteinine dayalı intihar sistemi geni aktarılan Kİ-MKH'ların CID kullanılarak seçici olarak apoptoza gittiği kontrol edilebilir MKH'lar oluşturulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, Gen düzenleme, İmmun sistem, CD47, ikaspaz-9

Bu çalışma, İstinye Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. *Proje No*: **2020/B13**

ABSTRACT

Armagan, Z. (2022). Generation of controllable mesenchymal stem cell by gene editing method. Istinye University, Institute of Health Science, Anabilim Dalının İngilizce Adı. Master Thesis. Istanbul.

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) are frequently used in cellular therapies, due to their high regeneration capacity and immunomodulation potential. Accumulating evidence showed that mesenchymal stem cells have immunosuppressive effects on natural killer (NK) cells however NK cells may exert cytolytic activity on MSCs when they pre-activated with IL-2 and subsequently co-cultured with MSCs in different ratios. A very recent study displayed that induced pluripotent stem cells could escape from cytotoxic NK cells when they overexpressed CD47 protein on their cell surface. In the light of these evidence the aim of this thesis is to generate BM-MSCs which can escape from cytolytic activity of NK cells. For this purpose, CD47 protein is overexpressed (CD47 o/e) in BM-MSCs by using lentiviral vectors and CD47 protein levels in BM-MSCs were characterized by using flow cytometry, qPCR and Western blot analysis. CD47 o/e BM-MSCs were co-cultured with IL-2 induced NK92 cells with different ratios and survival rates were determined morphologically. Lentivirus mediated gene transfer methods have still safety concerns therefore inducible Caspase 9 based suicide gene system is delivered to wild type BM-MSCs to create a controllable BM-MSC model. Apoptosis levels of successfully iC9 suicide gene delivered BM-MSCs were analyzed by Annexin-V/PI staining following an induction with a specific chemical dimerization inducer (CID). Finally mesenchymal stem cell marker expression of genetically modified BM-MSCs' was determined by quantitative PCR. Results from this study showed that, CD47 o/e BM-MSCs can escape from IL-2 induced cytotoxic NK92 cells, and apoptosis of iC9 based suicide gene delivered BM-MSCs can be selective induced by CID.

Key Words: Mesenchymal stem cell, Gene editing, Immune system, CD47, icaspase9

The present work was supported by the Scientific Research Projects Unit of Istinye University. *Project No*: **2020/13**

GİRİŞ

Multipotent özellik gösteren ve çeşitli kaynaklardan elde edilebilen mezenkimal kök hücreler (MKH) anjiyogenez, proliferasyon ve anti-apoptotik etkilere sahip sitokinleri salgılayarak doku onarımını desteklemektedir. Çoğu ön klinik çalışma, kemik iliğinden türetilen MKH'ler (Kİ-MKH'lar) ile yapılmıştır; bununla birlikte, yağ dokusundan türetilen ve göbek kordonu kanından türetilen MKH'lar da son yıllarda büyük ilgi görmüştür. MKH'lar immünomodülatör özelliklere sahiptir ve düşük immünojenisiteleri nedeniyle yenileyici tıpta ret reaksiyonlarına neden olmadan tedavide umut verici bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir (Gnecchi & Melo, 2009; Karaöz ve ark., 2017; Nolta ve ark., 2020; Secco ve ark., 2008)

MKH'lar salgıladığı faktörler ile doğal ölüdürücü (NK) hücre proliferasyonunu, sitotoksisitesini ve sitokin salgılanmasını baskılamaktadır (Boissel ve ark., 2008; W. Jiang & Xu, 2020). Ancak IL-2'ye önceden maruz bırakılmış NK hücrelerinde bu işlemi yalnızca kısmen baskılayabildiği gösterilmiştir (Glenn, 2014). Ayrıca NK:MKH oranına bağlı olarak IL-2'ye önceden maruz bırakılan NK hücreleri otolog ve allojenik uygulanan MKH'ları lizis ettiği bildirilmiştir. Bu nedenle son yıllarda yapılan çalışmalarda MKH'ların immün sistem tarafından tanınmamasını sağlamak amacıyla çeşitli gen düzenleme yolları kullanılmaktadır (D. Wang ve ark., 2019).

Yüzey proteini olan CD47 doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin konakçı hücrelere saldırmasını önlemek için bir "beni yeme" sinyali sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda hücrelerdeki yüksek CD47 ifadesinin NK hücreleri tarafından tanınmayı engellediği gösterilmiştir (Deuse ve ark., 2021; Dizman & Buchbinder, 2021; Lian ve ark., 2019a; Zou ve ark., 2019). CD47'nin, MKH'ların çoğalmasını sürdürmek ve düzenlemek için hücre yaşlanmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Kim ve ark., 2021). Ayrıca Kİ-MKH'larda CD47 ile genetik modifikasyonunun kök hücre tedavilerini geliştirebileceği öne sürülmüştür (Deng ve ark., 2015). Bu bilgiler ışığında CD47 ifadesinin MKH bazlı tedavinin tedavi edici etkisini arttırmaya için olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

MKH'larda gen düzenlenmesi sonrası oluşabilecek güvelik problemleri sebebiyle klinik kullamında limitasyonlar vardır (Cofano ve ark., 2019; M. Wang ve ark., 2018).

İnhihar geni olarak adlandırılan indüklenebilir kaspaz-9 (iC9) geni, genetiğiyle oynanmış bir insan kaspaz-9 proteinidir. FKBP12 gibi aktive edilebilir bir dimerizasyon domaininin kaspaz-9 ile füzyonu sağlandığında, kaspaz-9'un proapoptotik işlevi toksik olmayan bir dimerleştirici ilaç ile koşullu olarak indüklenebilmektedir (Ivics, 2015). Kaspaz-9'un kaspaz aktivasyon ve çağırıcı domain (CARD), mutant insan FK506 bağlayıcı proteininin (F36V) ilaç bağlayıcı domaini ile değiştirilerek tasarlanmıştır (C. Wu ve ark., 2014). Sentetik, biyolojik olarak etkisiz küçük bir molekül B/B homodimerizer AP20187 gibi bir kimyasal dimerizasyon indükleyicisi (CID), iC9 ifade eden hücrelere verildiğinde doğrudan kaspaz yolu aktive olur ve birkaç saat içinde apoptoz indüklenmektedir. Bu yaklaşım, immünojenisiteyi önlemek için uygun koşul olarak proteinin insan kaynaklı olması gibi diğer intihar stratejilerine göre avantaj sunar. Ayrıca, intihar tetikleyicisi hücre döngüsü fazından bağımsızdır (Iuliucci ve ark., 2001; Straathof ve ark., 2005a; Tsujimura ve ark., 2019). Bu strateji ile MKH'ların klinik kullanımı kısıtlayan durumları aşmak için kontrol edilebilir MKH'lar üretilebilir.

Bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında immün sistemden kaçabilen, kontrol edilebilir Kİ-MKH'ların lentiviral transdüksiyon yöntemi ile oluşturulması amaçlanmıştır. Tezin ilk bölümünde farklı promotörler kullanılarak (CMV ve EF1α) CD47 proteinini aşırı ifade eden hücre hatları ve CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak CD47 geni nakavt olan hücre hatları oluşturulmuştur. Oluşturulan bu hücre hatlarından EF1α promotörü ile CD47 proteinini aşırı ifade eden hücre hattı seçilerek sitotoksik NK92 hücreleri ile ko-kültüre edilmiştir.

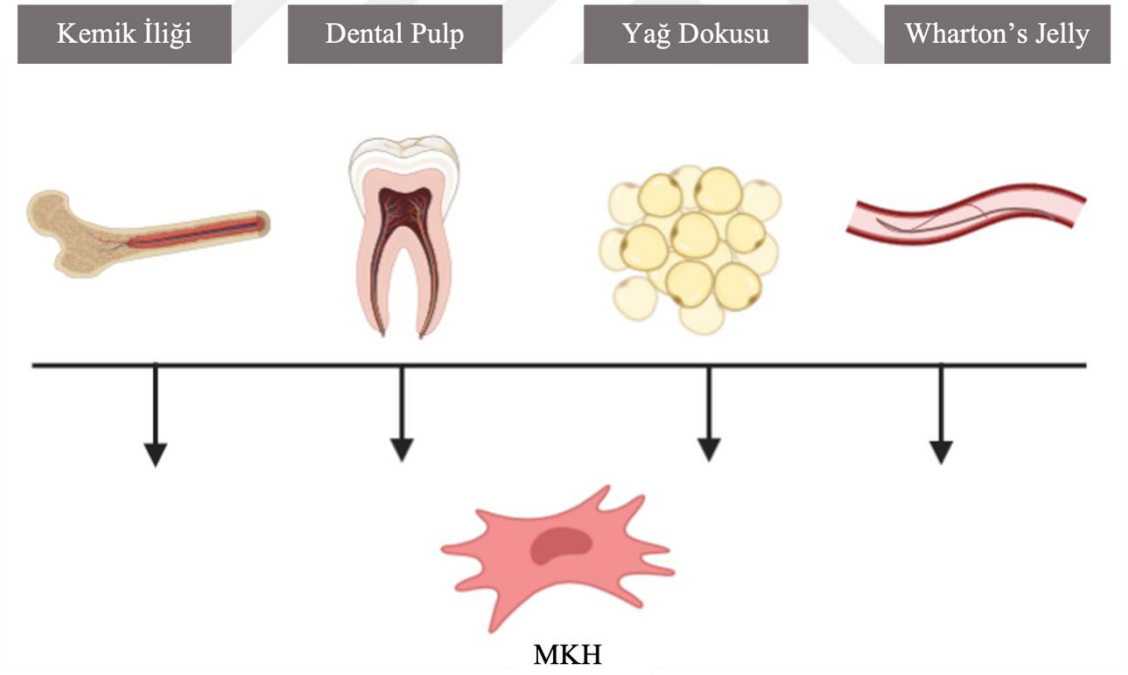
Tezin ikinci bölümünde kontrol edilebilir mezenkimal kök hücrelerin oluşturulması optimize edilmiştir. Genetik manipülasyonlar sonrası MKH'ların kanserleşmesi riskine bağlı olarak intihar geni içeren kontrol edilebilir mezenkimal kök hücreler oluşturulması hedeflenmiştir (Shahror ve ark., 2020). Bunun için literatürde bulunan ve kaspaz geninin FKBP ilaç bağlanma etki alanı ile füzyon olan ve ilaç ile aktive olabilen lentiviral plazmit yapısı kullanılmıştır. Hücre ölüm deneyleri mezenkimal kök hücrelerde optimize edildikten sonra iC9 geni içeren Kİ-MKH'lar ile ölüm deneyleri gerçekleştirilmiştir.

İleriki deneylerin amacı yapılan bu optimizasyonların birleşimi olan kaspaz geni içeren ve CD47 proteini ifade eden/etmeyen hücreler ile sitotoksik NK92 hücrelerin etkileşimini incelemektir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH) ilk olarak Friedenstein ve diğerleri tarafından kemik iliğinin stromal matrisinde gösterilmiştir. Bu hücrelerin kemik iliğinde hematopoetik olmayan bir grup öncü hücre olduğunu ortaya çıkarmıştır (Friedenstein ve ark., 1966, 1968; Javan ve ark., 2019). Temel olarak bu hücreler plastiğe yapışmaları ve *in vitro* çoğalmaları ile tanımlanmaktadır. MKH'lar, üç laminer germ yaprağı, mezoderm tabakası ve nöral krest hücrelerinin alt popülasyonlarından kaynaklanır, hızla büyüyebilir, yüksek bir kendini yenileme kapasitesine sahiptir. MKH'lar, çeşitli faktörlerle uyarıldığında kas, yağ, kemik, karaciğer ve nöron gibi birçok hücre tipine farklılaşma potansiyeli gösterirler. Bu hücreler Wharton jölesi, göbek kordonu kanı, kemik iliği, dental pulpa, yağ dokusuplasental doku, amniyotik sıvı, adet kanı gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilmektedir (Gnecchi & Melo, 2009; Hauser ve ark., 2010; Hida ve ark., 2008; Karaöz ve ark., 2010, 2017b; Secco ve ark., 2008; Zannettino ve ark.,2008)



Şekil 1.1: Mezenkimal kök hücrelerin elde edilebildiği kaynaklar

Uluslararası Hücresel Terapi Derneği'ne (ISCT) göre, MKH olarak tanımlanan bir hücre, plastiğe standart kültür koşulları altında yapışma özelliği göstermeli; osteoblast, kondrosit ve adiposit farklılaşma kapasitesi göstermeli CD105, CD73 ve CD90 ve CD45, CD34, CD14 veya belirli yüzey belirteçleri pozitif, CD11b, CD79, CD19 ve HLA-DR yüzey belirteçleri negatif olmalıdır (Dominici ve ark., 2006). Ek olarak, bazı çalışmalar MKH'ların CD105 yüzey işaretleyicisi için negatif bir alt popülasyon içerdiğini göstermiştir (Anderson ve ark., 2013; Pham ve ark., 2019; Ugurlu & Karaoz, 2020)

MKH'lar, birçok hücre tipine farklılaşma kapasiteleri nedeniyle doku mühendisliği ve yenileyici tıp uygulamalarında hasarlı dokuları onarmak için tohum hücreleri olarak kullanılır. Aynı zamanda, MKH'lar anjiyogenez, proliferasyon ve anti-apoptotik etkilere sahip sitokinleri salgılayarak doku onarımını destekler. Ek olarak, MKH'lar immünomodülatör özellikleğe sahiptir (Karaöz ve ark., 2017a; Nolta ve ark., 2020; J. Zhang ve ark., 2015)

MKH'ların hipoimmunolojik özellik göstermerleri klinikte hem otolog hem de allojenik olarak kullanımına izin vermektedir. 2021 yılı Aralık ayı itibari ile NIH sistemine bağlı olan www.clinicaltrials.gov sitesine bakıldığında 101 kadar tamamlanmış, 182 kadar devam eden allojenik MKH'ların kullanıldığı birçok klinik çalışma bulunmaktadır. MKH'lerin hipoimmünojenik ve immünomodülatör özellikleri nedeniyle allojenik transplantlarda kullanılabileceği varsayılmaktadır. Otolog kullanımlar, allojenik uygulamalarda olduğu gibi immünosüpresyona ihtiyaç duymazlar, ancak klinik uygulamalarda yeterli sayıya ulaşmak için yeterli zamanda *in vitro* çoğaltılamazlar bu nedenle, allojenik MKH'lar avantaj sağlayan ve tercih edilen yöntemdir (C. Li ve ark., 2021).

1.1.1. Mezenkimal Kök Hücre İmmunmodulatör Özellikleri

Mezenkimal kök hücreler immünomodüle edici potansiyele sahiptir. Sınıf I yüzey molekülünün büyük doku uyumluluk kompleksi (MHC) düşük seviyeli ifadesi ve MHC sınıf II yüzey molekülünü ifade etmemeleri MKH'ları hipoimmünojenik olarak tanımlar (Ryan ve ark., 2005). Salgıladıkları belirli sitokinler [indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO), prostaglandin E2 (PGE2), nitrik oksit (NO), hepatosit büyüme faktörü (HGF), vb.] ve hücre-hücre teması ile sitotoksik T hücre proliferasyonunu ve aktivasyonunu baskıladığı bilinmektedir (W. Jiang & Xu, 2020; Karaöz ve ark., 2017; Nicola ve ark., 2002). MKH'lar G_0 / G_1 geçişinde B hücrelerinin çoğalmasını durdurur, ayrıca B hücresi

tarafından immünoglobulin üretimini de baskılayabilir. Aynı zamanda MKH'lar, dendritik hücrelerin olgunlaşmasını engeller (Corcione ve ark., 2006; W. Jiang & Xu, 2020). MKH'ların naif doğal öldürücü hücrelerinin (NK) çoğalmasını ve sitokin salgılanmasını baskılayabildiği ve MKH'lar tarafından salgılanan IDO, PGE2 ve TGF- β (Transforme Edici Büyüme Faktörü- β) faktörlerinin bu baskılayıcı etkilerde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Glenn, 2014; Spaggiari ve ark., 2008). Ancak IL-2'ye önceden maruz bırakılmış NK hücrelerinde bu işlemi yalnızca kısmen baskılayabildiği gösterilmiştir (Glenn, 2014). Ayrıca NK:MKH oranına bağlı olarak IL-2'ye önceden maruz bırakılan, NK hücreleri otolog ve allojenik MKH'ları lize ettiği bildirilmiştir (Boissel ve ark., 2008; Glenn, 2014; W. Jiang & Xu, 2020; Najar ve ark., 2018; P. De Miguel ve ark., 2012; Spaggiari ve ark., 2006).

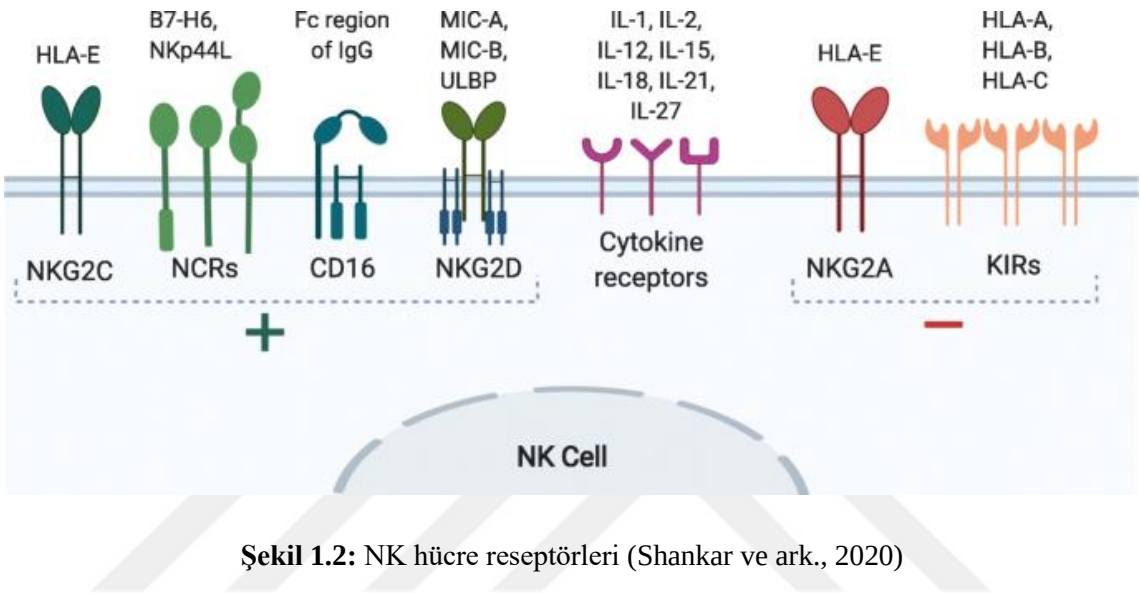
1.2. Mezenkimal Kök Hücreler İle Doğal Öldürücü Hücrelerin Etkileşimi

1.2.1. Doğal Öldürücü (NK) Hücreler

İnsan doğal öldürücü hücreleri (NK) yüzey belirteçleri CD16 ve CD56'nın göreceli ifadesine dayalı olarak farklı popülasyonlara bölünebilir. Bu popülasyonlar arasından bilinen iki ana alt küme, sırasıyla $CD56^{bright}$ $CD16^{dim/-}$ ve $CD56^{dim}$ $CD16^{+}$'dır. Dim ($CD3^{-}$ $CD56^{dim}$ $CD16^{+}$) NK hücreleri sitolitiktir ve $CD3^{-}$ $CD56^{+}$ NK hücrelerinin % 90'ından fazlasını içerirken, bright ($CD3^{-}$ $CD56^{bright}$ $CD16^{-}$) NK hücreleri, esas olarak sitokin üretimi yoluyla immün düzenleyicidir (A. W. Lin ve ark., 2004).

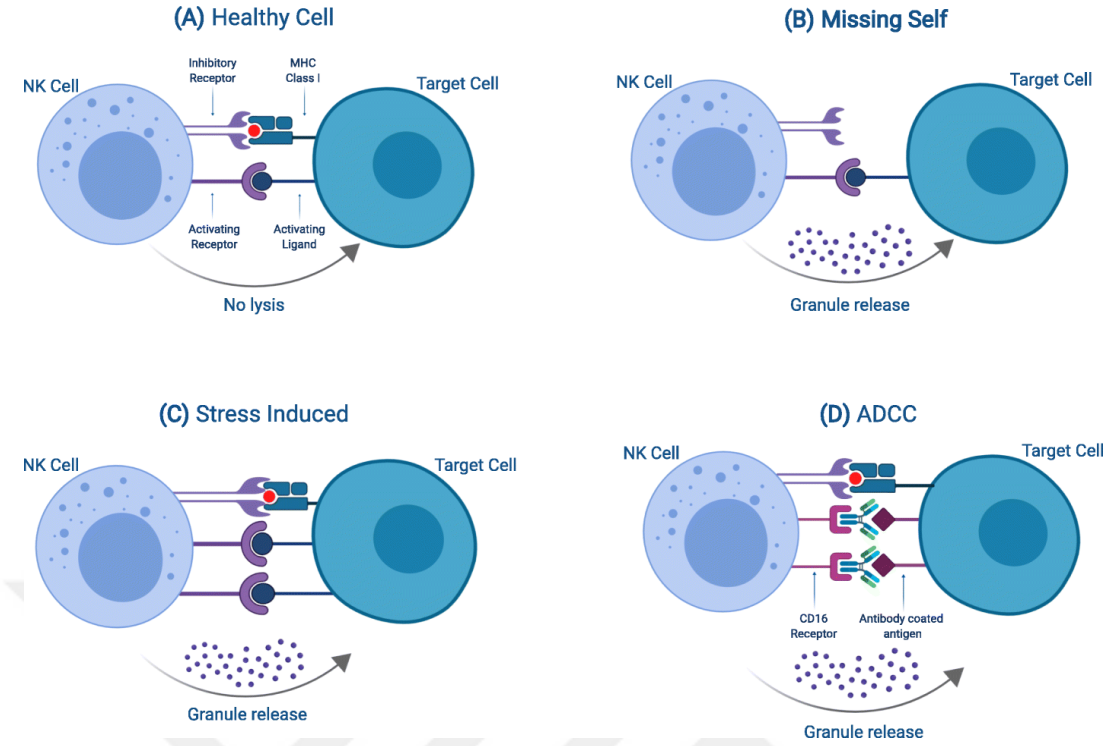
NK hücrelerinin efektör işlevi, aktive edici ve inhibe edici reseptör sinyalleri arasındaki denge ile düzenlenir (Şekil 1.2). NK hücreleri, hedef hücrenin yüzeyinde stresle indüklenen ligandları tanıyan aktive edici, NKG2D, NKp46, NKp30, NKp44 ve CD226 gibi sitotoksisite reseptörlerini ifade eder. Ayrıca, çoğu NK hücresi, immünoglobulin G1'in (IgG1) Fc bölümünü bağlayan ve antikora bağımlı hücresel sitotoksisiteye (ADCC) aracılık eden düşük afiniteli aktive edici reseptör FcyRIIIa'yı (CD16) ifade eder ve bu şekilde hedef hücrenin tanır (Brandstadter & Yang, 2011). Hedef hücrede MHC sınıf I molekülünün aşağı regülasyonu NK hücresinin sitotoksisitesine sebep olabilir. NK hücre inhibisyonu ise hedef hücrelerdeki MHC sınıf I moleküllerini tanıyan öldürücü hücre immünoglobulin benzeri reseptörler (KIR'ler) ve CD94 / NKG2A tarafından düzenlenir (Şekil 1.2). MHC sınıf I'i ifade edilen hücreler NK inibitor reseptörleri ile etkileşime girerek NK sitotoksisitesinin inhibisyonuna neden olur. Ancak, bazı hücreler MHC sınıf I'i ifade etsede NK hücreleri üzerindeki stresle indüklenen

aktivasyon reseptörlerinin yukarı regülasyonu ile NK sitotoksisitesi indüklenebilir (Şekil 1.3.). Sitokinler ve Toll benzeri reseptör (TLRs) ligandları gibi faktörler de NK hücre aktivitesini modüle eder (Abumaree ve ark., 2019). Bağışıklık tepkisini güçlendirmek için diğer immun sistemi hücreleri üzerinde etki yapan interferon (IFN) -ɣ ve tümör nekroz faktörü (TNF)-α gibi sitokinler salgılarlar (Choi ve ark., 2019).



Şekil 1.2: NK hücre reseptörleri (Shankar ve ark., 2020)

NK hücreleri uzun süreli kültürde canlı tutulma yeteneklerinin yanı sıra, farklı sitokin türleri ile mıuamele edildiğinde aktive olmaktadırlar. NK hücre tepkilerini kontrol etmede sitokinlerin rolü önemlidir. NK hücrelerinin hayatta kalmasını, proliferasyonunu uyaran ve sitotoksisitesini artıran interlökin (IL) -2, IL-15, IL-21ve IL-18 gibi çeşitli proinflamatuar sitokinler veya bunların kombinasyonları sağlamaktadır (Anft ve ark., 2020; Choi ve ark., 2019). Genelde IL-2, kemirgen ve insan NK hücrelerini büyütmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. IL-15, NK hücrelerinin hayatta kalmasında rol oynayan bir gama zinciri sinyal sitokinidir. IL-18 ise IFN-ɣ sekresyonu dahil olmak üzere NK hücre efektör fonksiyonlarını güçlendirmektedir.



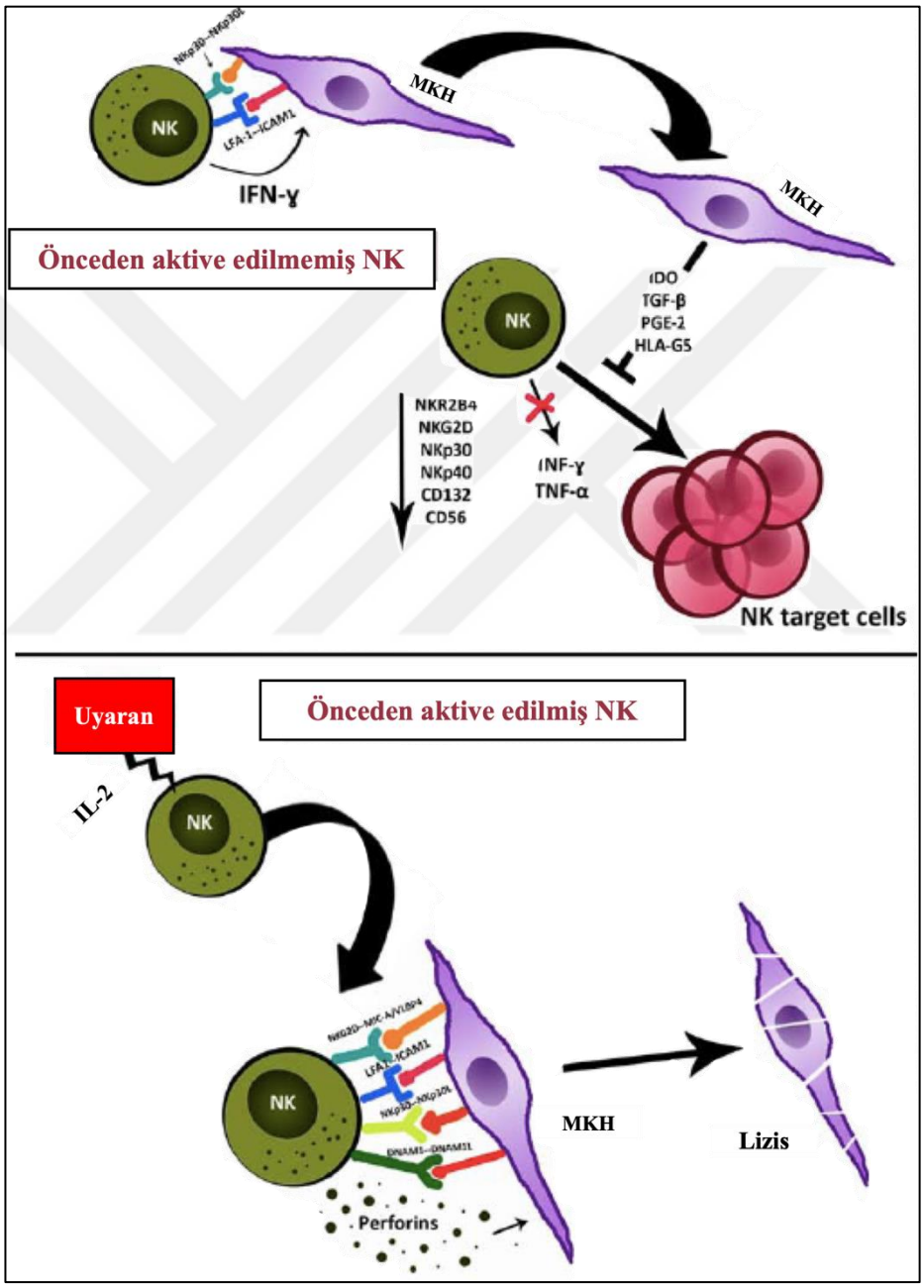
Şekil 1.3: NK hücre sitotoksisitesi (Shankar ve ark., 2020)

1.2.2. NK Hücrelerinin MKH'lar Üzerindeki Etkisi

NK hücreleri, bağışıklık sisteminde kilit oyunculardır ve adaptif ve doğuştan gelen bağışıklık sistemleri arasında bir köprü görevi görür (Gianchecchi ve ark., 2018). MKH-NK hücre etkileşimlerinin etkileri tam olarak anlaşılmamasına rağmen, MKH'ların NK hücre proliferasyonunu, sitotoksisiteyi ve sitokin salgılanmasını baskıladığı rapor edilmiştir. MKH aracılı NK hücre baskılama mekanizması, yalnızca TGF-β, PGE2, IDO gibi çözünür faktörlerin salgılanmasıyla değil, aynı zamanda MKH'lar ve NK hücrelerinin temas aracılı iletişimi ile de ilişkilendirilir (Aggarwal & Pittenger, 2005). Ancak IL-2'ye önceden maruz bırakılmış NK hücrelerinde bu mekanizmanın kısmen baskılanabildiği gösterilmiştir (Glenn, 2014). Ayrıca NK:MKH oranına bağlı olarak IL-2'ye önceden maruz bırakılan NK hücreleri otolog ve allojenik uygulanan MKH'ları lize ettiği bildirilmiştir (Şekil 1.4) (Abumaree ve ark., 2019; Aggarwal & Pittenger, 2005; W. Jiang & Xu, 2020; P. De Miguel ve ark., 2012; Spaggiari ve ark., 2006).

Najar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Kİ-MKH'lar ile birlikte kültüre edilen IL-2 ile aktive olan NK hücrelerinden granzim salınımının Kİ-MKH'larda reaktif oksijen türü (ROS) üretimini tetiklediği ve bu nedenle hücre ölümü gerçekleştiği gösterilmiştir (Najar ve ark., 2018). NK aracılı hücre ölümü sırasında salgılanan granzim A ve granzim

K'nın mitokondri kaynaklı ROS arttırdığı ve hücreleri apoptoz benzeri ölüme götürdüğü bilinmektedir (Prager & Watzl, 2019). Ayrıca ROS'un bağışıklık hücreleri için temel ikinci haberciler olduğundan, ROS seviyelerinin modüle edilmesi, inflamatuar yanıtın yönü için de kritiktir (Chen ve ark., 2016).



Şekil 1.4: Aktive edilmemiş NK hücreleri ve önceden uyarılan NK hücre aktivasyonunun MKH'lar üzerindeki etkisi (P. De Miguel ve ark., 2012)'den Türkçeleştirilmiş

MKH’ların sitotoksik NK hücreleri tarafından tanınmamasını sağlamak amacıyla son zamanlarda genetik olarak tasarlanmış MKH’lar elde edilmesi amaçlanmaktadır (Huang ve ark., 2020; Lee & Kang, 2020). MKH ve NK hücresi arasındaki etkileşimlerin daha fazla aydınlatılması hem *in vitro* hem *in vivo* çalışmalar için önem taşımaktadır.

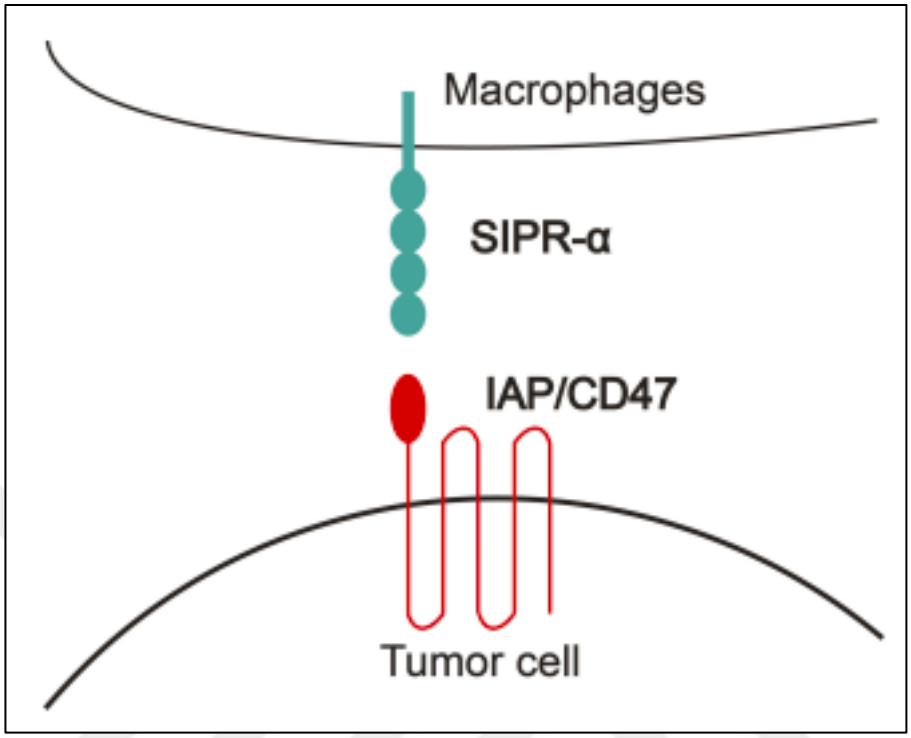
1.3. CD47

İntegrin ilişkili protein (IAP) olarak da bilinen CD47, immünoglobulin süper ailesinin bir transmembran proteinidir. CD47 apoptoz, proliferasyon, migrasyon ve hücre yapışması gibi hücresel süreçte ve anjiyojenik, bağışıklık yanıtlarında rol oynar (Deng ve ark., 2015). CD47, doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin konakçı hücrelere saldırmasını önlemek için sinyal düzenleyici protein alfa'ya (SIRPα) bağlanarak bir "beni yeme" sinyali sağlar (Şekil 1.5). CD47 aşırı ifade olduğu durumlarda SIRPα ile etkileşime girerek, T hücreleri, B hücreleri, makrofajlar ve NK hücreleri tarafından tanınmamalarını sağlar (Y. Li ve ark., 2017). CD47 ifadesinin olmaması, bir transplant ortamında kırmızı kan hücrelerinin yanı sıra T hücrelerinin ve tam kemik iliği hücrelerinin fagositozuna neden olur. Kanser hücreleri üzerindeki CD47 sinyalini engellemenin, makrofajların, NK hücrelerinin uyarılmasını ve tümöre özgü sitotoksik $CD8^+$ T hücrelerinin makrofajlar veya dendritik hücreler tarafından aktivasyonunu teşvik edebileceğini göstermiştir (Lian ve ark., 2019a; McCracken ve ark., 2015).

CD47'nin, MKH’ların çoğalmasını sürdürmek ve düzenlemek için hücre yaşlanmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu sebeple CD47'nin MKH’larda yaşlanmayı tahmin etmek veya iyi çoğalan hücreleri seçmek için kalite kontrol değerlendirmesinde kullanılabilceği düşünülmektedir (Kim ve ark., 2021).

CD47'nin aşırı ifadesi, kök hücre kaynaklı NK hücrelerinin *in vivo* ve *in vitro* olarak IFN-γ salınımını önleyebilir (Deuse ve ark., 2019; Lian ve ark., 2019a). 2019 yılında Deuse ve ark.larının yaptığı çalışmada, iPKH’ların yapısını CRISPR yöntemi kullanılarak MHC sınıf I ve sınıf II moleküllerini inaktive edildiği aynı zamanda CD47’nin yüksek düzeyde ifade edildiği hücre hatları oluşturulmuştur. iPKH’lar ve aktive edilmiş insan NK hücrelerinin etkileşiminin incelenmesi sonucu iPKH’da yüksek düzeyde ifade edilen CD47 yüzey molekülünün NK hücrelerinin sitolitik aktivitesini engellediği belirtilmiştir (Deuse ve ark., 2019). Ayrıca Kİ-MKH’larda CD47 ile genetik modifikasyonunun kök hücre tedavilerini geliştirebileceği öne sürülmüştür (Deng ve ark.,

2015). Bu bilgiler ışığında CD47 ifadesinin MKH bazlı tedavinin tedavi edici etkisini arttırmak için olanak sağlayacağı düşünülmektedir.



Şekil 1.5: CD47/IAP'nin yapısı (Lian ve ark., 2019b)

1.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Fonksiyonlarini Geliştirme Stratejileri

1.4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Ön Koşullandırılması

MKH'lar plastisiteye sahiptir; bu nedenle MKH uygulamasından önce hedeflenen hastalıklara uygun olacak şekilde hücrelerin özelliklerinde manipülasyon yapılmaktadır. Bu manipülasyonlar sitokinler/kemokinler, büyüme faktörleri, reseptör agonistleri, hormonlar, ilaçlar ve hipoksik ortam olarak sayılabilir. Sitokinler ve büyüme faktörleri kullanan ön koşullandırma çalışmaları doğrultusunda, doğuştan gelen bağışıklık reseptörü agonistleri gibi diğer biyoaktif maddelerle hazırlama, seçici olmayan veya spesifik olmayan bir hazırlama stratejisi olarak MKH'ların tedavi edici potansiyelini artırabilmektedir (Lee & Kang, 2020).

Ayrıca MKH'ların genetik manipülasyon, MKH'ların tedavi edici potensiyelini dışsal uyaranlarla bağımsız olarak geliştirmek için kullanılabilir. MKH'ların tedavi edici işleviyle ya da sağ kalımıyla ilgili bir dizi gen, sürekli ve geliştirilmiş ifadesi için bir hedef olabilir.

1.4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Genetik Manipülasyon İle Fonksiyonlarının Arttırılması

Bir hücrenin genetik manipülasyonu veya genom mühendisliği, DNA'sının spesifik modifikasyonunu gerektirir. Bu modifikasyon belirli hücrede gen ekleme, silme veya DNA değiştirme yoluyla gerçekleştirilebilir. DNA dizilerini hedeflemek için sıklıkla kullanılan sistemler çinko parmak proteinleri (ZNF), transkripsiyon aktivatör benzeri efektörler (TALEN) ve düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) / CRISPR ile ilişkili protein 9 (Cas9) (CRISPR-Cas9) uygulamalarıdır (Arora & Narula, 2017; Savić & Schwank, 2016).

Bu teknolojiler çeşitli hastalıklarda tedavi etmeyi amaçlayan özel genom mühendiliği stratejileri sunar. Bu uygulamalara dayanan sentetik nükleazlar, hastalığa neden olan mutasyonları düzeltmek ve tedavi edici etkiler için gen susturulmasını, hedeflenen genin eklenmesini sağlar (Song ve ark., 2014; Thakore & Gersbach, 2015). Ayrıca, herhangi bir genin ifadesini arttırıp azaltarak kontrol etmek ve insan genomundaki DNA sekansını değiştirme potansiyeli ile rejeneratif tıbbı geliştirmek ve yeni tedaviler sağlamak için genom mühendisliği uygulamaları yüksek bir potansiyele sahiptir (Thakore & Gersbach, 2015).

Bununla birlikte, stabil ve yüksek potansiyel sağlamasına rağmen, MKH'ların genetik manipülasyonu, klinik alanda uygulanmak için güvenli değildir. Spesifik genin stabil aktivasyonu, kök hücre kaynaklı malign tümörlerin gelişiminin ana nedeni olabilme riskini taşımaktadır (Lee & Kang, 2020). Bu nedenle, tedavi edici potansiyeli arttırmak için geçici manipülasyon etkilerine ihtiyaç duyulmaktadır.

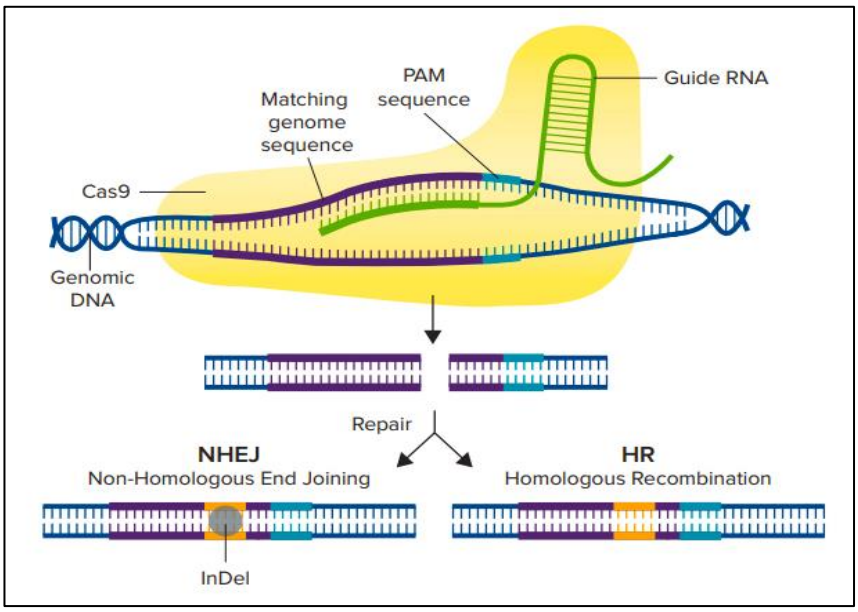
1.4.3. CRISPR-Cas9

Genom mühendisliğinde CRISPR-Cas9 sistemleri, DNA bağlama ve nükleaz bazlı genom düzenleme yeteneklerinin programlama ve uygulama kolaylığı sayesinde yaygın olarak kullanılan bir teknolojidir (Doudna, 2020). Bu sistem 2020 yılında Nobel Kimya ödülü de almıştır.

CRISPR, fajlar ve plazmit DNA gibi yabancı istilacı nükleotitlere karşı bakteriyel ve arkeal bağışıklık sağlamak için CRISPR ile ilişkili (Cas) genlerle uyum içinde hareket eden tekrarlanan DNA dizilerinin sınıflarıdır. Şimdiye kadar tanımlanan üç tip CRISPR/Cas sisteminden en çok tip II sistem incelenmiştir. Bu bağışıklık tepkisi sırasında istilacı DNA önce küçük parçalara bölünür ve CRISPR lokusuna dahil edilir.

Lokus daha sonra tek bir kodlamayan öncü CRISPR RNA (pre-crRNA) olarak kopyalanır ve kısa olgun crRNA uzantıları halinde daha fazla işlenir. İkinci bir kodlamayan RNA, trans-aktive edici CRISPR RNA (tracrRNA) ile birlikte crRNA, sonunda istilacı DNA'yı tanıyan ve kesen endonükleaz Cas9 ile bir ribonükleoprotein kompleksi oluşturur (Hille & Charpentier, 2016; Savić & Schwank, 2016).

CRISPR ile ilişkili Cas9 enzimi tek kılavuz RNA (sgRNA) ile birleşerek DNA'da çift iplik kırılması (DSB) oluşturarak genom mühendisliğini mümkün kılan bir proteindir. CRISPR/Cas9, ~100 nükleotid (nt) sgRNA dizisi yardımıyla spesifik genomik lokusları hedeflemektedir. sgRNA 5′ ucundaki 17-20 nt aracılığıyla Watson ve Crick baz eşleştirmesi yoluyla, hedeflenen DNA üzerindeki protospacer bitişik motifine (PAM) bağlanır ve spesifik kesilim için Cas9'a rehberlik etmektedir (Tsai ve ark., 2014). Cas9 tarafından oluşturulan DSB hataya açık homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ya da yüksek doğrulukta homoloji yönelimli onarımla (HDR) onarılır. NHEJ yolu kesilim bölgesinde küçük rastgele eklemeler ve/veya silmeler (indeller) ile sonuçlanırken HDR yolu homolog bir onarım şablonu kullanılarak DSB bölgesinde genom modifikasyonu sağlanır (Şekil 1.6). NHEJ yolu hem aktif olarak bölünen hem de bölünmeyen hücrelerde görülürken HDR yolu aktif olarak bölünen hücrelerde görülmekte ve fonksiyon kazandırma (gain-of-function) çalışmalarında kullanılmaktadır (F. Jiang & Doudna, 2017).



Şekil 1.6: CRISPR-Cas9 mekanizması (Ha, 2019)

1.4.4. Gen Aktarım Metotları

Bir hücrenin gen düzenlemesi veya genomik mühendisliği, DNA'sının spesifik modifikasyonunu gerektirmektedir. Gen düzenleme yönteminde gen aktarımı viral veya viral olmayan metotlar ile gerçekleştirilebilir.

Viral olmayan Gen Aktarım Metotları:

Viral olmayan gen aktarım metotları hazırlanış şekline göre fiziksel veya kimyasal olarak sınıflandırılır. En yaygın fiziksel yöntemler mikroenjeksiyon, elektroporasyon, gen tabancası ve hidrodinamik uygulamalardır. Genel olarak, fiziksel yöntemleri hücre zarının geçirgenliğini arttırmak için fiziksel kuvvet uygulanması yoluyla genin aktarılmasını ifade eder. Kimyasal yöntemler ise gen aktarımı için doğal veya sentetik taşıyıcılar kullanır. Bu gen aktarım taşıyıcıları arasında polimeler, lipozomlar ve katyonik lipid sistemler sıklıkla kullanılmaktadır (Cevher ve ark., 2012; Miyazaki ve ark., 2006). Ancak viral olmayan gen aktarım metotlarının gen aktarım verimliliği, özgünlüğü ve gen ifadesi süresi ile ilgili dezavantajları vardır (Kane ve ark., 2008; Ramamoorth & Narvekar, 2015; Zu & Gao, 2021). Özellikle MKH'larda gen aktarım verimliliği oldukça düşüktür.

Viral Gen Aktarım Metotları:

Viral gen aktarım metotları genom düzenleme uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok hücre tipini enfekte edebilme kapasitesine sahip olan viral genom modifikasyon metotlarından adeno-asosiye virüsler (AAV) ve lentivirüsler (LV) sıklıkla tercih edilmektedir (Kaygisiz & Synatschke, 2020). Rekombinant olarak kullanılan modifiye edilmiş rAAV'ler hücrenin genomuna entegre olmadan genom modifikasyonu yapma kapasitesine sahip olduğunda klinik olarak uygulanan gen terapi çalışmalarında tercih edilmektedir (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00749957, NCT03970278). Alternatif serotiplerden türetilen AAV vektörlerinin sistemik ve rasyonel uygulaması, tedavi edici genlerin hedef dokulara başarılı bir şekilde verilmesi için güçlü bir strateji olduğundan, verimli transgen iletimi için kullanılabilecek uygun bir AAV serotip kapsidinin seçilmesi gerekmektedir (Grimm & Kay, 2003; Yoon ve ark., 2021). MKH'larda yapılan bir çalışmalarda, AAV serotip 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 8'in MKH'larda transdüksiyon etkinliği karşılaştırılmış ve serotip 2'nin en verimli transdüksiyonu sağladığı görülmüştür (Brown ve ark., 2017; Chng ve ark., 2007).

AAV kullanımının bazı limitasyonları vardır. Bunlardan biri, CRISPR / Cas9 çalışmalarında, Cas9'u (~ 4,2 kb) ve gerekli tüm CRISPR bileşenlerini tek bir AAV vektörüne dahil etmek için yetersiz paketleme (~ 4,5 kb) kapasitesine sahip olmasıdır (Z. Wu ve ark., 2010). AAV'nin bir başka limitasyonu, AAV'lerin transdüksiyon etkinliğinin MKH'larda yapılan çalışmalarda değişiklik göstemesidir; bu durum AAV'lerin MKH tedavisine gen eklenmesi için klinik beklentilerini sınırlar (Brown ve ark., 2017; Ju ve ark., 2004; M. Li ve ark., 2010). Ayrıca, klinik sınırlamalar arasında, insan popülasyonunun çoğunun vektörün etkinliğini azaltan AAV antikorlarına sahip olmasıdır ve bu bağışıklık reaksiyonlarının AAV serotip 2'ye karşı daha yaygın olduğu bulunmuştur (Oggu ve ark., 2017; S.Nayak ve ark., 2010).

Hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri yüksek verimlilikte enfekte etme yeteneğine sahip lentivirüsler klinik olarak uygulanan gen terapi çalışmalarında kullanılmaktadır (Connoly, 2002; Levine ve ark., 2017; Mamcarz ve ark., 2019; Picanco-Castro ve ark., 2019; H. Zhang ve ark., 2018). Ayrıca, AAV'ler ile karşılaştırıldığında, LV'ler transgen ifadesini daha hızlı indüklemektedir .

LV'ler, 8 kbp'ye kadar genetik materyal taşıyabilen RNA virüsleridir. İnsan immün yetmezlik virüsü tip 1 (HIV-1) elementlerinin kombinasyonları ve laboratuvar koşullarında kullanımları için güvenliği sağlayan fragmanlar kullanılarak tasarlanmıştır. Bu yeni nesil lentivirüsler ayrıca kendi kendini etkisiz hâle getirme ve etkinliklerini ve özgüllüğünü artıran ve genetik içeriklerini hem bölünen hem de bölünmeyen hücrelere iletebilen çeşitli modifikasyonlar gibi güvenlik önlemlerini benimsemiştir. Ayrıca, MKH'lerin hem *in vitro* hem de *in vivo* transdüksiyonunda %95'e varan verimlilikle oldukça etkilidirler ve yayınlanmış çalışmalarda minimum sitotoksisiteye sahiptirler. Ek olarak, MKH'lerin morfolojisini, canlılığını veya farklılaşma potansiyelini etkilediği ile ilgili bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda CRISPR-Cas9 gen düzenlemesi metodu MKH'ların gen modifikasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır (Chang ve ark., 2014; P. Lin ve ark., 2012; McGinley ve ark., 2011; Meyerrose ve ark., 2008; Pisano ve ark., 2018; Ryø ve ark., 2019; H. Zhang ve ark., 2018).

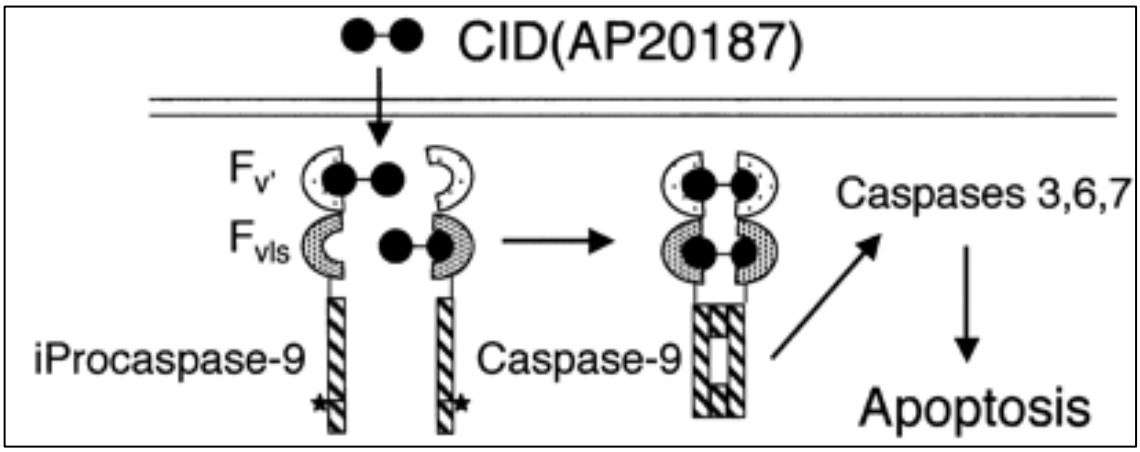
LV aracılı transdüksiyon, genetik materyalin konakçı genomuna stabil entegrasyonu ile sonuçlandığından, eklenen modifikasyonlar uzun ömürlüdür. Amaç, belirli genlerin aşırı ifadesi veya aşağı regülasyonu gibi protein ifade seviyelerini

değiştiren MKH'leri tasarlamaksa, bu yararlı bir özelliktir. Bununla birlikte, memeli olmayan promotörlerin ve elementlerin stabil ifadesi veya gen düzenlemesi durumunda, MKH genomunda istenmeyen sonuçlara yol açabilir (Lee & Kang, 2020). Bu sebeple MKH'larda lentivirüs aracılı trasdüksiyonun klinik çalışmalarda oluşabilecek risklerini önlemek amacıyla kontrol edilebilir MKH'lar tasarlanabilir.

1.4.5. Lentivirüs Aracılı Kontrol Edilebilir Kİ-MKH Oluşturulması

MKH'larda teröpotik etkilerini arttırmak amacı ile kullanılan gen düzenleme yöntemleri gelecekteki klinik çalışmalarda önemli rol oynamaktadır.Ancak yapılan genetik modifikasyonlar MKH'lerde farklılaşma potansiyeline bağlı olarak genomunda kalıcı değişikliklere sebep olma riski bulunmaktadır. Gen düzenleme yöntemleri ile modifiye edilmiş MKH'ların ileride yaratabileceği sorunlardan ve klinik uygulamalarda oluşabilecek risklerden kurtulmak için intihar geni olan indüklenebilir kaspaz-9 aracılığıyla kontrol edilebilir bir sistem kullanılması literatürde ve klinik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (Rossignoli ve ark., 2018; Tsujimura ve ark., 2019, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03016377: NCT03721068: NCT03696784).

İnhihar geni olan indüklenebilir kaspaz-9 (iC9) geni, genetiğiyle oynanmış bir insan kaspaz-9'dur. FKBP12 gibi aktive edilebilir bir dimerizasyon alanına kaynaştırıldığında, kaspaz-9'un proapoptotik işlevi, toksik olmayan bir dimerleştirici ilaç ile koşullu olarak indüklenebilmektedir (Ivics, 2015). İnsan FK506 bağlayıcı proteininden mutasyona uğramış (F36V) bir dimerizer ilaç bağlama alanı ile değiştirilerek tasarlanmıştır (C. Wu ve ark., 2014). Sentetik, biyoinert küçük bir molekül B/B homodimerizer AP20187 gibi bir kimyasal dimerizasyon indükleyicisi (CID), iC9 ifade eden hücreler eklendiğinde, iC9 proteini dimerleşir, ardından doğrudan kaspaz yolunu aktive eder ve birkaç saat içinde hücre apoptozu indükler (Şekil 1.7) (Straathof ve ark., 2005b; Tsujimura ve ark., 2019; C. Wu ve ark., 2014). Bu yaklaşım, immünojenisiteyi önlemek için uygun koşul olarak proteinin insan kaynaklı olması gibi diğer intihar stratejilerine göre avantaj sunar. Ayrıca, intihar tetikleyicisi hücre döngüsü fazından bağımsızdır ve herhangi bir ilaç programına müdahale etmez. Birkaç çalışma, iC9'un yüksek etkinliğini ve özgünlüğünü göstermiştir (Ramos ve ark., 2010; Rossignoli ve ark., 2018).



Şekil 1.7: CID uygulanması sonrası kaspaz bağımlı apoptozun şematik gösterimi (Xie ve ark., 2001)

2. MATERYAL METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal Malzemeler

1000 bp DNA ladder, İntron, Kat no:24074

1000 bp/ 1kb DNA ladder, GeneON, Kat no:305-105

10X Yürütme tamponu, BioRad

4X Laemmli Sample Buffer, Chemcruz

cDNA Sentez Kit, Appliedbiosystems, Kat no:4368814

CellFIX (10X), BD, Kat no:340181

Dimetil sülfoksit(DMSO),

DMEM/F12, Sigma, Kat no:D6421, Lot:RNBH6005

Fetal sığır serumu (FBS), Diagnovum, Cat:D154-500ml, Lot:D3575

Fetal sığır serumu (FBS), Diagnovum, Kat no:D154-500ml, Lot:D3575

Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco, Cat:14190-094, Lot:2062217

GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo Scientific, Kat no:K0503, Lot no:00941185

Glutamax (100X), Gibco, Cat:35050-061, Lot:205998

LB, Bioshop, Cat:LBL405.1, Lot:9A58609

Lentivirüs Titration Kit, ABM

Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco

Peqlab agaroz 100g, Lot no:h45120043

Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo, Cat:23227, Lot:UD284359

PureLink™ Midiprep Kit, İnvitrogen, Cat:K210015, Lot: 513.07.15.05

PureLink™ RNA Mini Kit, Thermo

TEMED, BioRad

Tripan mavisi (%0,5), Sigma, Cat:93595, Lot:BCBS5990V

Trizma Base, Sigma

TrypLE, Gibco, Cat:12604-013, Lot:2053187

Tween-20, Sigma

2.1.2. Sarf Malzemeler

0,22 ve 0,45 mikron çapında steril tek kullanımlık filtre, Sartarius-Minisart

0,5 ml, 1,5 ml ve 2 ml'lik santrifüj tüpleri, Isolab

10 cm^2 petri tabağı, Corning

10µl, 200 µl, 1000µl'lik pipet uçları, Rainin

15 ml ve 50 ml steril santrifüj tüpü, Nest

250 ml cam erlen, Isolab

25cm^2, 75cm^2, 175cm^2 ve 225cm^2'lik flask, Sunub

5 ml, 10 ml, 25 ml ve 50 ml'lik serolojik pipet, Isolab

5ml, 10ml, 50ml şırınga, Set

6 kuyulu plate, 24 kuyulu plate, 96 kuyulu plate, Sunub

Filtre sistemi, Corning

Hemasitometri lamı, Neubauer improved, Isolab

Kriyovial, Nest

Otoklavlanabilir cam şişe, Isolab

2.1.3. Cihazlar

-80°C buzdolabı, Panasonic, MDF-U5386S-PE.

10 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik pipet seti, Rainin

CO_2 inkübatörü, Nüve

FACS Calibur, BD

Hassas terazi, KERN, ABJ-NM/ABS-N

Image Quant Las 500, GE

Inverted mikroskop, Nikon, Kat no:TS2-S-SM

Jel görüntüleme sistemi, General Electric, ImageQuant LAS 500

Laminer hava kabini class II, Thermo scıentıfıc

Micro ultrasantrifüj, Hitachi, CS150FNX

Nanodrop One/OneC, Thermo scıentıfıc

Nanodrop One/OneC, Thermo Scıentıfıc

Otoklav, Nüve, OT90L

pH Metre, Ohaus

Pipetör, Isolab

Santrifüj, Hitachi, CF16RN

Soğutmalı santrifüj, Hitachi, CT15RE

Spin santrifüj, Sprout

StepOne Plus qRT-PCR cihazı , Applied Biosystem

Su banyosu, Nuve, BM 15

Transfer cihazı, BioRad, 10016505C

Vorteks, Scılogex, MX-SFloresan Miksroskobu, Zeiss Axio

Yatay elektroforez ünitesi, GE, Kat no:HE33

2.2. Metot

2.2.1. Hücre Kültürü

2.2.1.1. Hücre Tipleri

ATCC'den (American Type Cell Collection) temin edilen Kİ-MKH hücre hattı aksi belirtilmedikçe, %10 (h/h) Fetal Sığır Serumu (FSS) (BI), %1 (h/h) Penisilin-Streptomisin (P/S) Solüsyonu (10.000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin, Gibco) ve 2 mM l-glutamin içeren DMEM:F12 (Gibco) bes yeri ile kültürlenmiştir.

DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)' den temin edilen NK-92 hücre hattı %12,5 (h/h) FSS, %12,5 (h/h) at serumu, 5 ng/ml rekombinant IL-2 içeren RPMI 1640 (Gibco) besi yeri ile kültürlenmiştir.

HEK293T hücre hattı aksi belirtilmedikçe, %10 (h/h) FSS, %1 (h/h) P/S Solüsyonu içeren yüksek glikoz içeren DMEM besi yeri ile kültürlenmiştir. Hücre hatları, kullanılan media ve özellikleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Kullanılan hücre tipleri ve özellikleri

Hücre Tipi	Katalog numarası	Besi yeri	Büyüme Özelliği	Hücrenin iki katına çıkma süresi
Kİ-MKH, Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre	PCS-500-012	DMEM F12	Adherent	61 saat
HEK293T	Başka çalışma ekibinden temin edilmiştir.	Yüksek glikoz içeren DMEM	Adherent	24-30 saat
NK-92, natural killer cells	ACC 488	RPMI 1640	Süspansiyon	40-50 saat

2.2.1.2. Hücre Koşulları:

Adherent Hücre Kültürü:

Hücre kültür kabına yapışma özelliği göstereren, Kİ-MKH ve HEK293T hücre hatlarının pasajı, hücreler %80'lik bir doluluk oranına ulaştığında gerçekleştirilmiştir. Üzerinden besi yeri uzaklaştırılan hücrelerin yüzeyi DPBS, pH 7,4 (Dulbecco's Fosfat-Tampon Tuzu) ile yıkandıktan sonra rProteaz enzimi içeren "Tryple" solüsyonu eklenmiştir. Hücreler inkübatörde 3-5 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda solüsyonda bulunan enzim FSS içeren önceden tanımlanmış besi yeri kullanılarak (2.2.1.1) inaktive edilmiştir (1:1 oranı kullanılmıştır). 300 g'de 5 dk santrifüjlenerek çöktürüldükten sonra uygun besi yeri ile yeni hücre kültürü kaplarına ekim yapılmıştır. Hücre canlılık testleri rutin olarak %0,4 Tripan mavisi kullarak test edilmiştir. Hücreler uzun süre saklama için %10 (h/h) DMSO, %90 (h/h) FSS içeren dondurma besi yeri içerisinde 1×10^6 hücre/ml yoğunlukta olacak şekilde kriyo tüplere aktarılmış ve -80 °C'de stoklanmıştır.

Süspansiyon Hücre Kültürü:

Süspanse immortalize NK-92 hücre hattı DSMZ (menşei: Almanya) firması tarafından temin edilmiştir. Hücre kültürü sırasında süspanse hücreler için kullanılan özel kültür kapları kullanılmıştır. Hücrelerin yüzeye yapışma özelliği olmadığı için rutin Tripan mavi boyaması yapılarak canlı/ölü hücre oranı belirlenmiştir. 1,5 ml'lik ependorf

tüpe sayım için en az 20 µl hücre ayrılmış ve üzerine eşit miktar %0,4 Tripan mavi boyası eklendikten sonra içinden 10 µl alınarak hemasitometrede canlı/ölü hücre oranı belirlenmiştir. Mililitre başına hücre sayısı sayılan hücre sayısı × dilüsyon faktörü ×10.000 formülüne göre hesaplanmıştır. Kalan hücreler 15 ml falkon tüplerde toplanarak 130 *g*'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası hücre peleti önceden belirtilmiş olan besi yeri (Bölüm 2.2.1.1) ile yeniden süspanse edilmiştir. Süspanse hücreler yeni hücre kültürü kaplarına ekilerek inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücreler uzun süre saklama için %10 (h/h) DMSO, %20 (h/h) FSS, %70 serum içeren besi yeri kullanılarak hazırlanan dondurma besi yerisi içerisinde 1×10^6 hücre/ml yoğunlukta olacak şekilde kriyo tüplere aktarılmış ve -80 °C'de stoklanmıştır.

2.2.2. Plazmitlerin Oluşturulması

2.2.2.1. sgRNA'ların Tasarlanması

CD47 gen fonksiyonunu nakavt etmek için ilgili rehber RNA'lar (sgRNA) Deskgen, E-CRISP ve Crispr Direct sgRNA tasarlama siteleri kullanılarak yapılmıştır. Tasarlama sırasında genin mRNA'sında bulunan ilk ekzonlar hedef alınmıştır. Tasarlanan sgRNA'ların skorlarına bakılarak 3 sgRNA seçilmiştir (Tablo 2.2). Bu skolar değerlendirilirken başka genleri hedef almayan sgRNA'ların seçilmesine dikkat edilmiştir (off-target etkisi). Deney sırasında kullanılacak plazmit *BbsI* klonlama bölgeleri içermektedir. Bu sebeple seçilen sgRNA oligolarının başına *E.coli BbsI* enzimi tarafından tanınıp kesilmek üzere ilgili sekanslar eklenmiştir (Ran ve ark., 2013).

Tablo 2.2: CD47 nakavt (k/o) rehber RNA sekansları

sgRNA'lar	sgRNA	PAM Sekansı
CD47 sgRNA-1	CTGGTAGCGGCGCTGTTGCT	GGG
CD47 sgRNA-2	GGTCCTGCCTGTAACGGCGG	CGG
CD47 sgRNA-3	CCTGGTAGCGGCGCTGTTGC	TGG

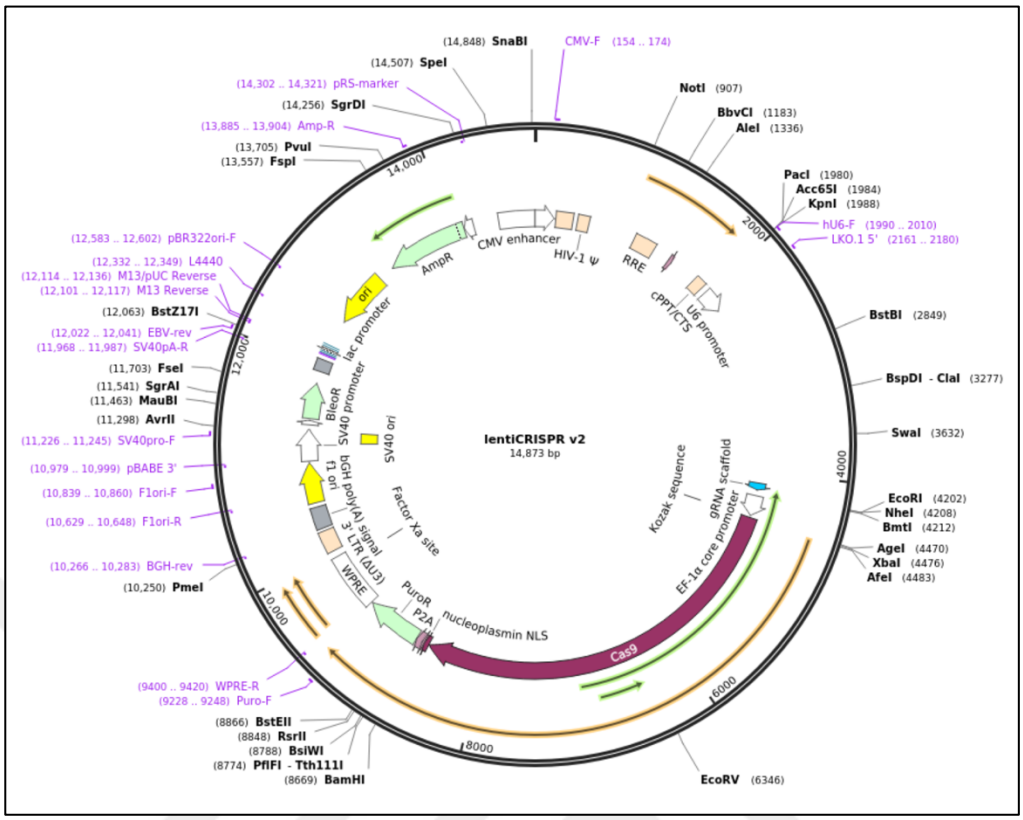
2.2.2.2. CRISPR Metodu İle sgRNA'ların Vektöre Klonlanması

sgRNA'ların vektöre klonlanması 2013 yılında Ran ve arkadaşlarının Nature dergisinde yayınlamış protokolune göre yapılmıştır (Ran ve ark., 2013). Seçilen 100 µM konsantrasyonundaki sgRNA oligoları, T4 polinükleotid kinazı ve T4 ligasyon solüsyonu

kullanılarak PZR cihazında 37 °C'de 30 dk, 95 °C'de 5 dk, ve daha sonra dakika başına 5 °C düşecek şekilde 25 °C'ye getirilerek inkübe edilmiştir. Bu metot kullanılarak fosforlanan ve birleştirilen fosforile edilen ve birleştirilen sgRNA oligo çiftleri 1:200 oranında sulandırılarak ve şekil 2.1 gösterilmiş olan lentiCRISPR v2-Puro (Addgene no: #52961) plazmitine aşağıdaki reaksiyon tablosu (Tablo 2.3) izlenerek klonlanmıştır. Ligasyon bir döngüsü: 5 dk 37 °C, 5 dk 21 °C olacak şekilde 6 döngü boyunca inkübe edildi. Bu reaksiyonun sonunda lentiCRISPR v2-Puro plazmiti ilgili sgRNA'ları içeren bir plazmit hâline gelmiştir.

Tablo 2.3: Reaksiyon Bileşenleri

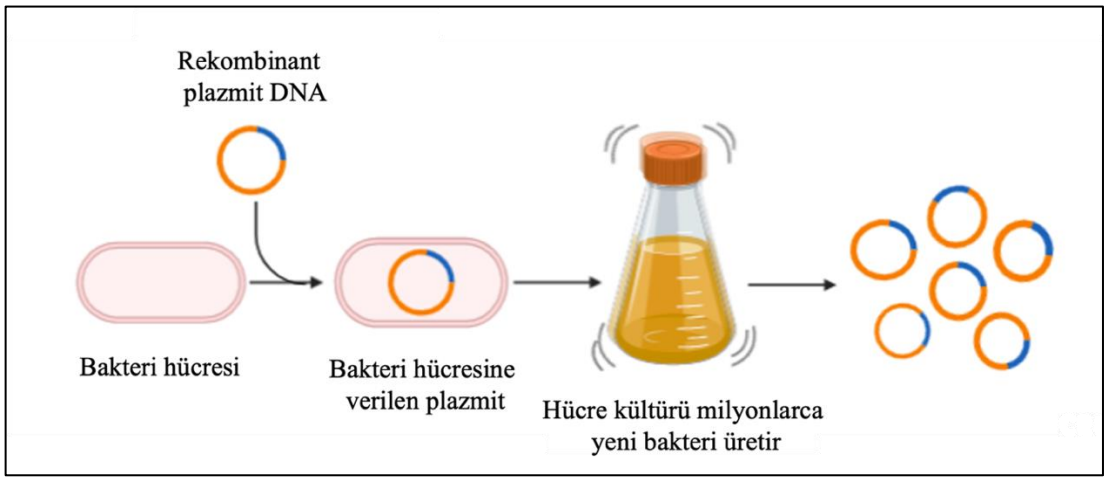
Bileşenler	Miktar
LentiCRISPR v2-Puro, 100 ng	-
1:200 oranında dilue edilmiş oligo dubleksi	2 µl
10X Tango Tampon Çözeltisi	2 µl
10 mM Ditiotreitol (DTT)	1 µl
10 mM Adenozintrifosfat (ATP)	1 µl
BbsI Enzimi	1 µl
T7 Ligaz enzimi	0,5 µl
ddH_2O	20 µl'ye tamamlanır
Toplam	20 µl



Şekil 2.1: LentiCRISPR v2-Puro plazmitinin şematik gösterimi (addgene #52961)

2.2.2.3. CD47 Rehber RNA'sı İçeren LentiCRISPR v2-Puro Vektörünün *E.coli* DH5α Suşuna Transformasyonu

Transformasyon için Zymo Mix&Go kiti ile hazırlamış hazırlanmış *E.coli* DH5α kompetent hücreleri kullanılmıştır. 50 µl kompetent hücreye 20 ng/µl plazmit eklenerek 2 dk buzda bekletilmiştir. LentiCRISPR v2-Puro plazmit omurgası bakteri için ampisilin, memeli hücre için puromisin direnç genleri içermektedir. Plazmit ile buzda bekletilen kompetent hücreler 100 µg/ml konsantrasyon ampisilin içeren katı agarlara ekilerek 16 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra katı agar üzerindeki kolonilerden en az 5 tanesi seçilerek, 15 ml'lik tüplerde 3 ml hacimi geçmeyecek şekilde 100 µg/ml konsantrasyon ampisilin içeren sıvı LB Broth besi yerine aktarılmıştır. Sıvı besi yeri içeren tüpler 37 ºC'de 200 rpm hızda 16 saat boyunca çalkalanmıştır. Aynı koloniler ile tablo 2.4'teki reaksiyon bileşenleri kullanırak ve tablo 2.5'teki reaksiyon basamakları izlenerek Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri 1X TAE tampon solüsyonu içerisinde hazırlanan %0,7 (k/h) agaroz içeren jel kullanılarak yapılan elektroforez yöntemi sonrası kolonilerin klonlanan sekansları içerip içermediği tespit edilmiştir.



Şekil 2.2: Klonlanmış plazmit DNA'sı ile bakteriyel trasnformasyonun şematik gösterimi

Tablo 2.4: Reaksiyon Bileşenleri

Bileşenler	Miktar
CD47 Geri Primer (100 µM)	0,1 µl
U6 İleri Primer (100 µM)	0,1 µl
Taq Buffer	5 µl
Polimeraz Enzimi	0,5 µl
Koloni	-
ddH_2O	25 µl'ye tamamlanır
Total	25 µl

Tablo 2.5: Reaksiyon Döngüsü

Döngü	**Sıcaklık**	**Süre**
1X	95 °C	2 dk
35 X	95 °C 55 °C 72 °C	15 sn 15 sn 10 sn
1X	72 °C	5 dk
	12 °C	∞

Ampisilin içeren LB Broth sıvı besiyerinde büyütülen plazmitler QIAGEN plazmid izolasyon kiti kullanılarak izole edilmiştir. İzole edilen plazmitlerin konsantrasyonu NanoDrop One/OneC Spektrofotometre (Thermo) kullanılarak ölçülmüştür. İzolasyonu yapılan plazmid DNA'sını Sanger sekanslamaya gönderilerek ilgili sgRNA'nın varlığının doğrulanması yapılmıştır. Sekansın doğrulanması için plazmitin omurgasında bulunan U6 promotörünü tanıyan ileri primeri "GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC" kullanılmıştır.

2.2.3. Kİ-MKH'larda Lentivirüs Aracılı Gen Manipülasyonu

2.2.3.1. RNA İzolasyonu

Kİ-MKH'lardan RNA izolasyonu Zymo Resaarch Direct-zol RNA miniprep Kit protokolüne göre yapılmıştır. Tryple ile kaldırılıp sayılan 1×10^6 hücre 500 *g*'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Pelet DPBS, pH:7,4 ile yıkanmış ve tekrar santrifüj edilmiştir. Pelet üzerine kitin içerisinden çıkan TRI reagent tamponu eklenmiştir. TRI reagent tamponu ile 1:1 orandan %100 absolute etanol eklenmiştir. Karıştırılan örnekler, kitin içerisinden çıkan kolon tüplerine aktarılmış ve 1600 rpm'de 30 sn santrifüj edilmiştir. Kolonların alltındaki sıvı atılmış ve 400 µl ön yıkama tamponu eklenerek 1600 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. 700 µl RNA yıkama tamponu eklenerek 1 dk santrifüj edilmiştir. Kolon tüplerinin alt kısmı atılıp, yeni 1,5 ml'lik santrifüj tüpü ile değiştirilmiştir. RNA'yı elüsyon etmek için 50 µl DNase/RNase içermeyen su tüplere eklenmiş ve 1600 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen RNA konsantrasyonu Nanodrop One/One spektrofotometre ile belirlenmiştir.

2.2.3.2. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA örnekleri SensiFAST cDNA Sentez Kit'i (Bioline) kullanarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu üreticinin protokolüne ve programlamasına göre gerçekleştirilmiştir (Tablo 2.6, Tablo 2.7). cDNA örnekleri NanoDrop OneC/One Spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür.

Tablo 2.6: Reaksiyon Bileşenleri

Bileşenler	**Miktar**
Total RNA	Değişken
5X TransAmp Buffer	4 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
DNase/RNase free-water	20 µl'ye tamamlanır

Tablo 2.7: Reaksiyon Döngüsü

Sıcaklık	**Süre**
25 °C	10 dk
42 °C	15 dk
48 °C (isteğe bağlı adım)	15 dk
4 °C	∞

2.2.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Elde edilen cDNA'dan CD47 cDNA'sına özgü primerler ile istenen bölge PZR reaksiyonu ile amplifiye edilmiştir. PZR reaksiyonu tablo 2.8 ve tablo 2.9'da gösterildiği düzenlenmiştir. PZR reaksiyonu sonrası, elde edilen PZR ürünü %0,7'lik (k/h) agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve sinyal görüntülemesi GE Image Quant Las 500 cihazında yapılmıştır.

Tablo 2.8: Reaksiyon Bileşenleri

Bileşenler	**Miktar**
İleri Primer	0,5 µl
Geri Primer	0,5 µl
dNTP 10 mM	2 µl
cDNA	2 µl
Dream Taq polimeraz	0,5 µl
10x Dream Taq Buffer	10 µl
dH_2O	100 µl'ye tamamlanır
Total	100 µl

Tablo 2.9: Reaksiyon Döngüsü

Döngü	**Sıcaklık**	**Süre**
1X	95 °C	3 dk
35 X	95 °C	30 sn
	55 °C	30 sn
	72 °C	60 sn
1X	72 °C	10 dk
	4 °C	∞

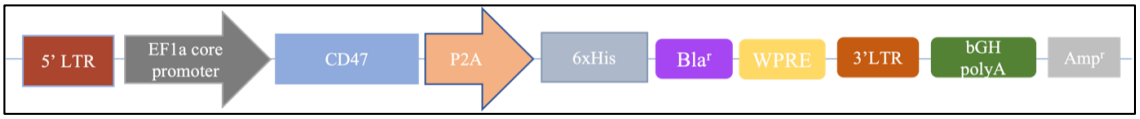
Örneklerin agaroz jelde yürütülmesinin ardından QIAquick Jel Ektraksiyon Kiti ile jelden DNA izolasyonu yapılmıştır. Kısaca agaroz jelden DNA parçası temiz bir neşter ile UV ışığı altında gözlemlenerek çıkarılmıştır. Kesilen jel 15 ml santrifüj tüpüne alınmış ve 1 hacim jele 3 hacim QG tamponu eklenmiştir. 50 °C'de yaklaşık 10 dk jel kesitleri tamamen eriyene kadar inkübe edilmiştir. Örnek üzerine 1 jel hacminde izopropanol ilave edilerek karıştırılmıştır. DNA'yı bağlamak için örnek QIAquick kolonuna aktarılmış ve 1 dakika 17×10^3 *g*'de santrifüjlenmiştir. Yıkamalar için kolona 750 µl PE tamponu eklenmiş ve 1 dakika 17×10^3 g'de santrifüjlenmiştir. Kolon 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. DNA'yı kolondan ayrıştırmak için membran üzerine 50 µl EB tamponu eklenmiştir ve kolon 1 dakika 17×10^3 *g*'de santrifüj edilmiştir. Ayrıştırılan DNA konsantrasyonu NanoDrop One/OneC Spektrofotometre ile değerlendirilmiştir.

2.2.3.5. cDNA'nın Plazmite Klonlanması

CD47 geninin cDNA'sı, Addgene'den temin edilen pLentiCMVblast (Şekil 2.3) ve pLentiEF1αblast (Şekil 2.4) plazmitinin promotörden sonra gelen gen bölgesine çift kesim enzim yöntemi ile yerleştirilmiştir. Oluşturulan plazmitin doğruluğu sanger sekanslama yöntemi ile belirlenmiştir. Doğruluğu belirlenen plazmitin *E.coli*'nin DH5α suşuna metot 2.2.2.3'de anlatıldığı gibi transforme edilmiştir. Transformasyonu yapılan plazmitler çoğaltılıp metot 2.2.2.3'te anlatıldığı gibi izole edilmiştir.



Şekil 2.3: pLentiCMVblast plazmiti



Şekil 2.4: pLentiEF1ablast plazmiti

2.2.3.6. Kontrol Hücre Hattı Plazmitlerinin Oluşturulması

CMV ve EF1α promotörleri ile oluşturulan CD47 cDNA içeren plazmitlerin kontrolü sağlanması amacıyla CMV ve EF1α promotörü içeren temel plazmitlerine GFP geni klonlanmıştır. Klonlama metot 2.2.3.5'te belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.5: GFP geninin klonladığı EF1α promotör içeren plazmit yapısı



Şekil 2.6: GFP geninin klonladığı CMV promotör içeren plazmit yapısı

2.2.3.7. iC9-GFP Plazmit Yapısının Oluşturulması

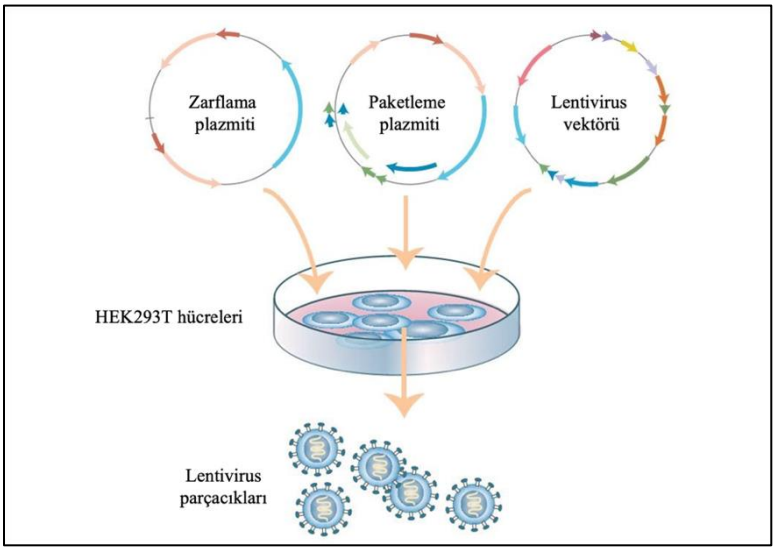
iC9 ve GFP genleri EF1α promotörü içeren plazmit içerisine 2.2.3.5'de anlatıldığı gibi klonlanmıştır. Oluşturulan plazmit şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7: iC9 ve GFP geninin klonladığı EF1α promotör içeren plazmit yapısı

2.2.4. Lentivirüs Üretimi

İzole edilen plazmiti hücrelere aktarmak için lentivirüs üretimi gerçekleştirilmiştir. Kısaca belirli oranda ekilen HEK293T hücrelerine paketleme, zarflama ve EF1α-CD47 plazmiti, CMV-CD47 plazmiti, EF1α-GFP plazmiti, CMV-GFP plazmiti, CD47 k/o plazmiti, k/o kontrol plazmiti ve iC9-GFP plazmiti ayrı ayrı FuGENE transfeksiyon ajanı ile hücrelere transfekte edilmiştir. İlk olarak, 1,5 ml'lik santrifüj tüplerindeki 500 µl optim-MEM medyum içerisine plazmitler eklenmiş ve FuGENE ile 3:1 [3(FuGENE):1(DNA)] oranında karıştırılmıştır. Ardından 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sırasında, hücrelerin medyumu serum içermeyen DMEM (yüksek glikoz) ile değiştirilmiştir. İnkübasyon sonrası karışım hücrelerin mediasına damla damla eklenmiş ve 48 saat sonra hücre medyumunda bulunan lentivirüsler toplanmıştır. Lentivirüsler, laboratuvarımızda optimize edilen yöntem ile santrifüj edilerek konsantre edilmiştir.



Şekil 2.8: Lentivirüslerin oluşturulmasının şematik gösterimi (ProMAb'dan alınarak modifiye edilmiştir)

2.2.4.1. Lentivirüslerin qPZR Yöntemi İle Fonksiyonel Titrasyonu

Konsantre edilen lentivirüslerin miktarı, qPZR Lentivirus Titration Kit'i (abmgood, LV900) kullanılarak belirlenmiştir. 2 µl viral örnek 18 µl virüs liziz tamponu ile 3 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Üreticinin protokolüne uygun olarak qPZR reaksiyonu cihazı ile gerçekleştirilmiştir (Tablo 2.10, Tablo 2.11). Reaksiyon sonrası viral titre kit protokolünde belirtildiği gibi hesaplanmıştır;

Viral lizat titresi = $5 \times 10^7 / 2^{3\,(Ctx-Ct1)\,/\,(Ct2-Ct1)}$

Ctx = Bilinmeyen numunenin 3 Ct değerlerinin ortalaması

Ct1 = STD1'in 3 Ct değerlerinin ortalaması

Ct2 = STD2'nin 3 Ct değerlerinin ortalaması

Viral örnek ilk aşamada 1:10 dilue edildiği için çıkan sonuç 10 ile çarpılmıştır.

Tablo 2.10: Reaksiyon Bileşenleri

	Viral Lizat	**STD1**	**STD2**	**NTC**
2X qPCR master mix (SensiFAST SYBR no-RoX)	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
Viral Lizat (liziz tamponu ile lize edilen örnek)	2,5 µl	-	-	-
STD1	-	2,5 µl	-	-
STD2	-	-	2,5 µl	-
Reagent-mix	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Son hacim	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Total reaksiyon numarası	3	3	3	1

Tablo 2.11: qRT-PCR Programı

Adım	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü Numarası**
Ters Transkripsiyon	42 °C	20 dk	1
Enzim Aktivasyonu	95 °C	10 dk	1
Denatürasyon	95 °C	15 sn	30
Bağlanma/Uzama	60 °C	1 dk	

2.2.4.2. Kİ-MKH'lara Lentivirüs Aracılı Transdüksiyonu

Kİ-MKH'lar, 24 kuyucuklu kültür plakasına 4×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Her bir lentivirüs örneğinin miktarına göre MOI 40 olacak şekilde hesaplanmıştır. Hücreler ekildikten 24 saat sonra transdüksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Transdüksiyon verimini arttırmak için ayrı bir tüpte DMEM F12 (ekleri tam) besi yeri içerisine protamine sülfat (100 µg/ml) eklenmiş ve Kİ-MKH'ların besi yeri protamin sülfat içeren medyum ile değiştirilmiştir. Ayrı ayrı, EF1α-CD47, CMV-CD47, EF1α-GFP, CMV-GFP, CD47 k/o, k/o kontrol ve iC9-GFP plazmit DNA'larını içeren lentivirüsler hesaplanan MOI oranında yabanıl tıp Kİ-MKH'ların besi yerine verilmiştir. Hücreler %5 CO_2 içeren 37 °C'deki inkübatöre kaldırılmıştır. Transdüksiyondan 24 saat sonra hücrelerin medyumu atılmış ve hücreler 1X DPBS, pH:7,4 ile yıkanmıştır. Antibiyotik seçilimi EF1α-CD47, CMV-CD47, EF1α-GFP, CMV-GFP, CD47 k/o ve scrambled k/o kontrol plazmitleri ile transdüksiyon yapılmış Kİ-MKH'larda blastisidin antibiyotiği ile gerçekleştirilmiştir. İlgili geni almış hücreleri selekte etmek için ölüm eğrisi analizi ile belirlenen oranda plazmite göre seçilen seleksiyon belirteci olan blastisidin, ilgili konsantrasyonda (8 µg/ml) alınarak hücrelerin besi yerine verilmiştir. iC9-GFP transdüksiyonu yapılmış Kİ-MKH'lar, iC9-GFP plazmitinin seleksiyon belirteci puromisin olduğundan dolayı ölüm eğrisi analizi ile belirlenen konsantrasyonda (1,5 µg/ml) puromisin, hücre besi yerine eklenmiş ve hücreler inkübatöre kaldırılmıştır. Hücre besi yeri üç günde bir değiştirilerek on gün boyunca antibiyotik seçilimi yapılmıştır. Kontrol grubu olarak transdüksiyon yapılmamış yabanil tip Kİ-MKH'lara yukarıda belirtildiği şekilde puromisin ve blastisidin verilmiştir.

2.2.5. CD47 Protein Seviyesinin Belirlenmesi

2.2.5.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Yabanıl tip, CD47 k/o, k/o kontrol, EF1α-CD47, CMV-CD47, EF1α-GFP ve CMV-GFP Kİ-MKH olmak üzere yedi ayrı hücre hattı için hücreler bulundukları kültür plakalarından "Tryple" solüsyonu ile kaldırılmıştır. Enzim inaktivasyonu sonrası hücreler sayılmış ve 300 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Pelet liziz solüsyonu (50 mM Tric-Cl, 150 mM NaCl, %2 Triton-X-100, 2 mM EDTA, m-per) ile yeniden süspanse edilmiş ve 30 dk buzda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası lizat 21.000 rpm'de 4 °C'de 5 dk santrifüj edilmiştir ve DNA uzaklaştırılmıştır. Süpernatant ayrı bir tüpe alınmış ve protein

konsantrasyonu NanoDrop One/OneC Spektrofotometre (Thermo) 280 nm'de absorbsiyonu ölçülerek belirlenmiştir. 40 µg protein örnekleri ile 4X Laemmli tamponu karıştırılmış ve 95 °C'de 5 dk bekletilerek proteinler denatüre edilmiştir.

2.2.5.2. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Denatürasyon sonrası proteinler SDS-PAGE yöntemi kullanılarak moleküler ağırlıklarına göre ayrılmıştır. %4'lük yığma jeli ve %10'luk ayırma jeli tabloda gösterildiği gibi hazırlanmıştır (Tablo 2.12).

Tablo 2.12: Yığma ve ayırma jeli bileşenleri

Solüsyonlar	%4 Yığma Jeli	%10 Ayırma Jeli
%30 Akrilamit-Bis Akrilamit	1,98 ml	5 ml
1M Tris-HCL (pH:8.8)	1,89 ml	5,63 ml
%10 SDS	150 µl	150 µl
dH_2O	10,89 ml	4,22 ml
%10 APS	75 µl	75 µl
TEMED	15 µl	7,5 µl

SDS-PAGE, GE Healthcare Elektroforez Sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayırma jeli karışımı elektroforez kaseti içine aktarılmış ve düzgün bir jel yüzeyi oluşmasını sağlamak için jelin üzerinde 1 ml kadar izopropanol eklenmiştir. Ardından jel 20 dk süre ile polimerleşmeye bırakılmıştır. Polimerleşmeden sonra izopropanolden tamamen arındırmak için dH_2O ile jelin üstü yıkanmış ve kalan su filtre kâğıdı ile alınmıştır. Yığma jeli karışımı doğrudan ayırma jelinin üzerine dökülmüştür. Taraklar, hava kabarcığından kaçınarak yığma jelinin içine yerleştirilmiştir. Polimerizasyonun ardından taraklar çıkarılmış ve kasetler elektroforez sistemine yerleştirilmiştir. Tank, 1X yürüme tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin, %1 SDS) ile doldurulmuş ve kuyular yıkanmıştır. Protein ladder ve örnekler kuyulara yüklenmiştir. Sistem güç kaynağına bağlanmış ve örnekler yığma jelinden çıkana kadar 80 V'da yürütülmüştür. Örnekler ayırma jeline geçince 120 V uygulanmıştır. Bromo fenol mavisi jelin alt kısmına gelene kadar örnekler yürütülmüştür.

2.2.5.3. Western Emdirim

Proteinlerin SDS-PAGE elektroforezinden sonra jel çıkarılmış, whatmann kağıtları ve nitroselüloz membran 1X Semi-Dry transfer tamponunda (25 mM Tris-Base, 192 mM glisin, %20 metanol) ıslatılmıştır. Transfer işleminde Biorad-Trans Emdirim Turbo Transfer Sistemi kullanılmıştır. Kasete dört whatmann kâğıdı altta, nitroselüloz membran, jel ve dört whatmann kâğıdı üstte olacak şekilde yerleştirilmiş ve hava kabarcıklarını engellenmek için tek taraflı roller yapılmıştır. Transfer kaseti kapatılıp 10V, 1A, 30 dk transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfer sonrası nitroselüloz membran dH_2O ile yıkanmıştır. Transfer verimini kontrol etmek için nitoselüloz membran 5 dk Ponceau boyası çalkalanmıştır. Membran önce dH_2O sonra 1X TBS ile yıkanmıştır. Membran %5 süt (5 gr süt tozu + 100ml 1X TBS) ile 45 dk oda sıcaklığında 60 rpm'de çalkalanarak bloke edilmiştir. %5 süt tozu içerisinde 1:500 seyreltilerek hazırlanan birincil insan koyun CD47 antikoru (R&D, AF4670) ile membran, bir gece 4 °C'de 60 rpm'de çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası birincil antikor uzaklaştırılmıştır. Membran, 1X TBS ile 3 kez 50 rpm'de çalkalanarak yıkanmıştır. Yıkama sonrası membran %5'lik süt tozunda 1:10000 seyreltilerek hazırlanan eşek anti-koyun IgG (H+L) ikincil antikoru (invitrogen, A16041) ile oda sıcaklığında 60 rpm'de 2 saat çalkalanmıştır. Membran 1X TBS ile 3 kez 50 rpm'de çalkalanarak yıkanmıştır. Kemilüminesans görüntüleme için ECL solüsyonu hazırlanmış (100 mM Tris-HCl, Luminol, Coumaric asit, H_2O_2) ve membran 30 sn boyunca ECL solüsyonu ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası sinyal GE Image Quant Las 500 cihazında görüntülenmiştir.

2.2.6. CD47 Yüzey Protein ifadesinin Akış Sitometrisi ile Belirlenmesi

Yabanıl tip, CD47 k/o, k/o kontrol, EF1α-CD47, CMV-CD47, EF1α-GFP ve CMV-GFP Kİ-MKH olmak üzere yedi ayrı hücre hattı bulundukları kültür plakalarından "Tryple" solüsyonu ile kaldırılmış ve 300 *g*'de 5 dk çöktürülmüştür. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet DPBS, pH:7,4 ile sulandırılıp 4 °C'de çöktürülmüştür. İkiye ayrılan yabanıl tıp Kİ-MKH'ların biri DPBS, pH:7,4 ile hazırlanan %1 BSA (k/h) içerisinde seyreltilmiş fare IgG izotip kontrol (11471442) ile işaretlenmiştir. 0,5 mg/ml konsantrasyonda pürifiye fare CD47 birincil antikoru (556044, BD) final konsantrasyonu 1 µg/µl olacak şekilde 2 ml %1 BSA (k/h) içerisinde hazırlanmış ve örneklere 200 µl eklenmiştir. Örnekler buz üzerinde 45 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 300 *g*'de 5 dk santrifüj yapılmış ve yıkamalar DPBS, pH:7,4 ile gerçekleştirilmiştir. Yıkama sonrası izotip kontrol DPBS, pH:7,4, pH:7,4 ile çözülüp 4 °C'de karanlıkta muhafaza edilmiştir. Diğer örnekler %1 BSA (k/h) içerisinde seyreltilmiş FITC keçi anti-fare IgG (405305, Biolegend) ikincil antikor ile 45 dk buz üzerinde inkübasyona bırakılarak işaretlenmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler çöktürülmesinin ardından DPBS, pH:7,4 ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası örnekler 500 µl DPBS, pH:7,4 ile sulandırılarak FACS tüplerine aktarılıp okutmaya alınmıştır (FACS calibur,BD).

2.2.7. qPZR ile CD47'nin mRNA Seviyesinin Belirlenmesi

Total RNA, Zymo Research Direct-zol RNA miniprep Kit protokolüne göre izole edilmiş ve cDNA, yüksek kapasiteli cDNA reverse transkripsiyon kiti (4368814, applied biosystems) kullanılarak sentezlenmiştir. CD47 mRNA seviyesinin belirlenmesi için SYBRGreen qPZR master mix (1725120, Biorad) kullanılarak ve StepOnePlus qPZR sistemi (Applied Biosystems) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. qPZR reaksiyonu tablo 2.14'deki gibi hazırlanmış ve tablo 2.15'deki şekilde qPZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primerler tablo 2.13'te verilmiştir. Veriler, GAPDH ifadesi seviyelerine göre normalize edilmiştir ve nispi ifadesi, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm deneyler üç tekrar hâlinde yapılmıştır.

Tablo 2.13: CD47 ve GAPDH ileri geri primerleri

CD47 ileri primer (5’-3’)	TCCGGTGGTATGGATGAGAAA
CD47 geri primer (5’-3’)	ACCAAGGCCAGTAGCATTCTT
GAPDH ileri primeri (5’-3’)	GTCTCCTCTGACTTCAACAGC
GAPDH geri primeri (5’-3’)	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCA

Tablo 2.14: Reaksiyon Bileşenleri

Bileşenler	**Miktar**
iTaq SYBRGreen qPZR master mix	5 µl
İleri primer	0,5 µl
Geri primer	0,5 µl
cDNA (50 ng/µl)	2 µl
DNase/RNase free-water	10 µl’ye tamamlanır

Tablo 2.15: Reaksiyon aşamaları

Adım	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü Numarası**
Enzim Aktivasyounu ve cDNA Denatürasyonu	95 °C	20-30 sn	1
Denatürasyon	95 °C	1-3 sn	40
Bağlanma ve Uzama	60 °C	20-30 sn	
Erime Eğrisi	65-95 °C	0,5 °C/2 sn artış	1

2.2.8. Kİ-MKH ve NK Hücrelerinin Ko-kültürlenmesi

2.2.8.1. Naif ve Sitotoksik NK92 Hücreleri İle Kİ-MKH'ların Ko-Kültürü

NK hücreleri genellikle naif durumundadır, ancak IL-2 aktivasyonu üzerine çoğalır ve hedef hücrelerin verimli bir şekilde parçalanmasını sağlayan aktifleştirilmiş sitolitik ve sitokin üreten hücrelere farklılaşır. MKH'ler, naif haldeki NK hücre aktivasyonunu ve proliferasyonunu önler, ancak IL-2'ye önceden maruz bırakılmış NK hücrelerinde artan MKH: NK oranına bağlı olarak sitotoksik NK hücreleri tarafından lize edilebilir (Najar ve ark., 2018; Glenn ve ark., 2014; Spaggiari ve ark., 2005). Bu etkiyi Kİ-MKH'lar üzerinde gözlemlemek için Kİ-MKH'lar artan MKH: NK92 oranlarında naif NK92 hücreleri ve IL-2 ile sitotoksik hale getirilmiş NK92 hücreleriyle birlikte kültürlenmiştir. Öncelikle Kİ-MKH'lar 5.000 hücre/kuyu olacak şekilde 8 kuyulu plakalara ekilmiştir. Ertesi gün naif NK92 hücreleri (100 U/ml IL-2 ile kültürlenmiş) ve sitotoksik NK92 hücreleri (24 saat boyunca 200 U/ml IL-2 ile önceden kültürlenmiş) farklı Hedef (MKH): Efektör (NK92) oranlarında Kİ-MKH'ların üzerine eklenmiştir. (1:1 ve 1:5 H:E oranları kullanılmıştır). Kontrol olarak, Kİ-MKH'lar ve NK92'ler, NK92 hücre besi yeri içerinde tek başına kültürlenmiştir. 24 saat sonra hücreler mikroskopta görüntülenmiş ve fotoğrafları alınmıştır.

2.2.8.2. Yabanil Tip ve EF1α-CD47 Kİ-MKH'ların Sitotoksik NK92 Hücreleri İle Ko-Kültürü

Sitotoksik hâle getirilmiş NK92 hücrelerinin (24 saat boyunca 200 U/ml IL-2 ile önceden kültürlenmiş) yabanıl tip ve CD47 aşırı ifade (o/e) Kİ-MKH'lara karşı olan etkisini ön deney olarak belirlemek için sitotoksik NK hücreleri ile yabanıl tip ve EF1α-CD47 Kİ-MKH'lar birlikte kültüre edilmiştir. Öncelikle, yabanil tip ve EF1α-CD47 Kİ-MKH'lar 48 kuyulu plakalara 15,000 hücre/kuyu olacak şekilde DMEM F12 (ekleri tam) besi yeri içerisinde ekilmiştir. Bir gece sonra, sitotoksik NK92 hücreleri farklı MKH: NK oranlarında kültürlenmiştir. NK'nin Kİ-MKH'lara oranları 1:1 ve 1:5 aralığındaydı. Kontrol olarak, yabanıl tip Kİ-MKH'lar, CD47 o/e Kİ-MKH'lar ve NK92'ler, NK92 hücre besi yerinin içerinde tek başına kültürlenmiştir. 24 saat sonra hücreler mikroskopta görüntülenmiş ve fotoğrafları alınmıştır.

2.2.9. Kİ-MKH'larda Hücre Ölümünün WST-1 İle Gösterilmesi

Kİ-MKH'ların hücre ölümünü göstermek için hücreler farklı dozlarda H_2O_2 ile farklı dozlarda muamele edilmiş ve WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1.3-benzene disulfonate) tahlili kullanılarak analizi sağlanmıştır. WST-1, hücre proliferasyonu, hücre canlılığı ve hücre toksisitesinin radyoaktif olmayan miktar tayini için kullanılan kolorimetrik bir tahlildir. Test prosedürü, mitokondriyal enzimler tarafından formazan molekülüne parçalanan tetrazolyum tuzlarına dayanmaktadır. Artan canlı hücre sayısı, mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesinin artmasına neden olur. Enzim aktivitesindeki bu artış, metabolik olarak aktif hücre sayısı ile ilişkili olarak canlı hücrelerde artan formazan boyar madde sayısını takip eder. WST-1 tahlil yöntemi kullanılarak hücre canlılığı testi gerçekleştirilmiştir. Kısaca, Kİ-MKH'lar, 96 kuyulu plakaya kuyu başına 0.8×10^4 hücre yoğunluğunda ekilmiştir. H_2O_2 ile 24 saatlik inkübasyondan sonra 5 µl WST-1 (Roche, 05015944001) çözeltisi 45 µl büyüme ortamında çözülmüş ve her bir kuyuya 50 µl nihai hacim ilave edilmiştir. 37 °C'de 1 saat inkübasyonun ardından, spektrofotometri (BMG lab lumistar) kullanılarak her örneğin absorbansı 630 nm (referans dalga boyu) ve 450 nm'de ölçülmüştür. Elde edilen değerler tüm deneylerde kontrole karşı normalleştirilmiştir.

2.2.10. Kİ-MKH'larda ve iC9-GFP Kİ-MKH'larda Apoptozun Annexin V/PI İle Gösterilmesi

Kİ-MKH'larda yukarıda belirtildiği gibi farklı dozlarda H_2O_2 muamelesi yapılarak hücre ölümü metabolik parametre üzerinden WST-1 ile gösterilmiş ve 400 µM ve 500 µM H_2O_2 uygulamasında hücrelerin öldüğü gözlemlenmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak belirlenen bu dozlar ile hücreler tekrar 24 saat H_2O_2 ile muamele edilmiştir. 24 saat ardından hücre canlılığı Annexin V/PI (640932, Biolegend) apoptoz saptama kiti kullanılarak FACS analizi ile belirlenmiş, Kİ-MKH'larda apoptotik hücre ölümü gösterilmiştir. Bu optimizasyonların ardından iC9-GFP Kİ-MKH ve yabanıl tip Kİ-MKH'lar 6 kuyulu kültür plakalarına ekilmiştir. Dimerizasyonun kimyasal indükleyicisi (CID), iC9-GFP Kİ-MKH kültürüne DMEM F12 tam besi yerinin içerisine 50 nM olacak şekilde eklenmiştir. Yabanıl tip Kİ-MKH kültürü aynı oranda CID ile inkübasyona bırakılmıştır. Yabanıl tip Kİ-MKH kültürü aynı oranda CID ile inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak ise iC9-GFP Kİ-MKH'lar ve yabanıl tip Kİ-MKH'lar CID ile muamele edilmeden kültürde tutulmuştur. Hücreler 24 saat sonra mikroskopi yoluyla

morfolojik olarak analiz edilmiştir. Hücre canlılığı Annexin V/PI apoptoz saptama kiti kullanılarak FACS analizi ile değerlendirilmiştir.

2.2.11. Kİ-MKH'larda ve iC9-GFP Kİ-MKH'larda Hücre Ölümünün Propidium İyodur (PI) Boyaması İle Gösterilmesi

Kİ-MKH'ların H_2O_2 ile muamele edildikten sonra hücre ölümünün WST-1 ve Annexin V/PI ile akış sitometrisinde analiz edilmesinin ardından hücrelerdeki ölüm Propidyum iyodür (PI) boyaması ile de gösterilmiştir. PI, DNA'ya bağlanan interkalar bir floresan ajandır. PI boyası plazma membranın bütünlüğünün kaybolduğu/geçirgen olduğu hücrelere girerek DNA'sına bağlanabilmektedir. H_2O_2 ile hücre ölümünün PI boyaması ile gösterilmesinin ardından CID ile muamele edilen iC9-GFP Kİ-MKH'lar PI ile boyanmıştır. Kısaca, 50 nM CID ile 1 saat inkübasyona bırakılan iC9-GFP Kİ-MKH'lar ve yabanıl tip Kİ-MKH'ların besi yerinin içerisine 2 µM PI (BioShop, PPI777.10) eklenmiş ve 15 dk inkübasyonun ardından floresan mikroskobunda (ZEİSS Axio), %5 CO_2 ve 37 °C inkübatör koşullarında hücre ölümü gösterilmiştir. Mikroskopta transdüksiyon yapılmış hücreler 10X objektifte, 500,000 ışık yoğunluğunda ve GFP filtresi altında gösterilmiştir. Ölü hücreler ise PI filtresi uygulanarak görüntülenmiştir. PI boyama sonrası 4 ayrı bölgeden alınan görüntülerdeki hücreler Image J programında sayılarak % hücre canlılığı belirlenmiştir.

2.2.12. Floresan Mikroskopta Hızlandırılmış Fotoğraf Çekimi

iC9-GFP Kİ-MKH'lar CID ile muamelesi sırasında hücrelerin morfolojisi floresan mikroskopi çekimi ile gösterilmiştir. Hücreler 24 kuyulu plakalara kuyu başına 4×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 50 nM CID hücre besi yerine eklenmiş ve 37 °C'de %5 CO_2 ortamında EGFP filtresi uygulanarak 2 saatlik hızlandırılmış fotoğraf çekimi ile görüntü alınmıştır.

2.2.13. Akış Sitometrisi İle GFP İfadesi

iC9-GFP, EF1α-GFP ve CMV-GFP Kİ-MKH'ların GFP ifadesi seviyelerini akış sitometri ile analiz edilmiştir. Öncelikle yabanıl tip hücreler biri kontrol hücresi diğeri izotip kontrol olacak şekilde ikiye ayrılmıştır. İzotip kontrol için ayrılan hücreler, DPBS, pH:7,4 içerisinde hazırlanan %1 BSA (k/h) kullanılarak seyreltilmiş fare IgG izotip kontrol antikoru (cat:11471442) ile 4 °C'de 45 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol hücreleri, iC9-GFP, EF1α-GFP ve CMV-GFP Kİ-MKH'lar işaretlenmeden sadece

DPBS, pH:7,4 ile yıkanmış ve santrifüj sonrasında tekrar DPBS, pH:7,4 ile çözülmüştür. GFP içeren hücreler FITC (Fluorescein isothiocyanate) ile yakın dalga boyunda ışıma verdiği için örnekler, akış sitometrisinde FITC kanalında okutuldu.

2.2.14. GFP İfade Eden Kİ-MKH'ların Floresan Mikroskobunda İncelenmesi

iC9-GFP, EF1α-GFP ve CMV-GFP Kİ-MKH'ların GFP ifade seviyeleri floresan mikroskobunda incelenmiştir. 24 kuyulu plakaya ekili olan hücreler floresan mikroskobunda (ZEİSS Axio), 10X objektifte, 500.000 ışık yoğunluğunda EGFP filtresi ile görüntülenmiştir. EF1α-GFP ve CMV-GFP Kİ-MKH'lar arasındaki GFP ifade farkını değerlendirmek için 4 ayrı bölgeden alınan görüntülerdeki hücreler Image J programında sayılarak % GFP ışıması veren hücre oranı belirlenmiştir.

2.2.15. qPZR Yöntemi İle Lentivirüs İle Gen Aktarımı Yapılmış Kİ-MKH'ların Karakterizasyonu

Yabanil tip, EF1α-CD47, CMV-CD47, EF1α-GFP, CMV-GFP, CD47 k/o, k/o kontrol, iC9-GFP Kİ-MKH'lardan total RNA, Zymo Resaarch Direct-zol RNA miniprep Kit protokolüne göre izole edilmiştir ve cDNA, yüksek kapasiteli cDNA reverse transkripsiyon kiti (4368814, appliedbiosystems) kullanılarak sentezlenmiştir. Karakterizasyonda mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri olan CD90, CD44, CD54, CD106, farklılaşma belirteci olan Runx2, pluripotensi belirteçleri Sox2, Oct4, TERT (Telomeraz ters tranferaz) ve Vimentin genlerinin ifade seviyeleri analiz edilmiştir. Sonuçları normalize etmek için referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır. Reaksiyon Tablo 2.16'daki şekilde hazırlanmış ve Applied Biosystems qPZR cihazın da ilgili genlerin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun aşamaları tablo 2.17'deki gibi uygulanmıştır. Reaksiyonda kullanılan qPZR Master Mix Virostem Biyoteknoloji firmasından temin edilmiştir.

Tablo 2.16: Reasiyon Bileşenleri

Bileşenler	Miktar
qPZR Master Mix (5U/µl)	5 µl
Moleküler Grade dH_2O	2 µl
cDNA (50 ng/µl)	2 µl
İleri ve Geri Primer karışımı (2 µg/ml)	1 µl
Total	10 µl

Tablo 2.17: Reaksiyon aşamaları

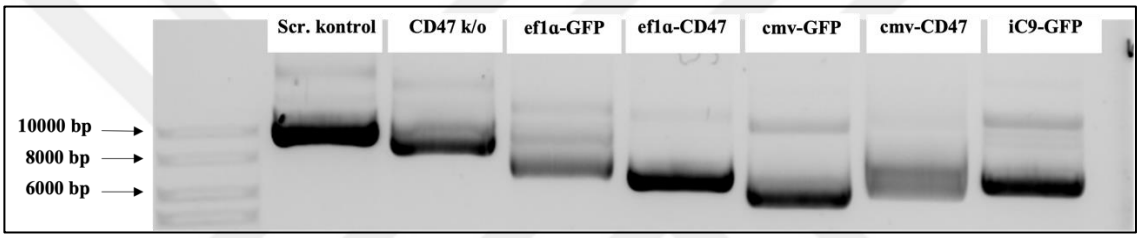
Döngü	Sıcaklık	Süre
1X	95 °C	2 dk
40 X	95 °C	10 sn
	60 °C	10 sn
	72 °C	15 sn
1X (melt curve)	95 °C	15 sn
	60 °C	1 dk
	95 °C	15 sn

3. BULGULAR

3.1. Plazmitlerin Oluşturulması ve Lentivirüs Üretimi

3.1.1. İzole Edilen Plazmit DNA'larının Agaroz Jel Elektroforezi İle Doğrulanması

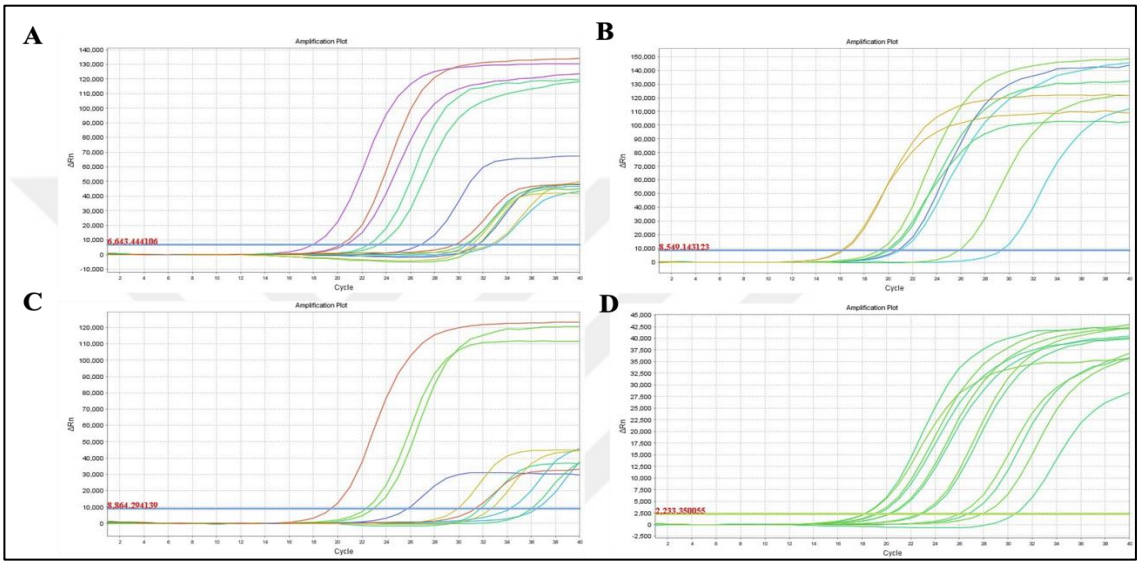
Bakteriden izole edilen CD47 k/o, scrambled nakavt kontrol (Scr k/o kontrol), EF1α-GFP, EF1α-CD47, CMV-GFP, CMV-CD47, iC9-GFP plazmitlerinin genomik içeriklerine göre boyutları agaroz jel elektroforezi ile doğrulaması yapılmıştır (Şekil 3.1). Plazmit boyutları Scr k/o kontrol ve CD47 k/o plazmitlerinde ~8000 baz çifti (bp), EF1α-GFP plazmitinde ~7000 bp ve EF1α-CD7, CMV-GFP, CMV-CD47, iC9-GFP plazmitlerinde ~6000 bp olarak ölçülmüştür. Agaroz jel elektroforez sonucuna göre genomik DNA kontaminasyonu görülmemiştir.



Şekil 3.1: Plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi

3.1.2. Lentivirüs Titrasyonun Kantitatif PZR (qPZR) Bulguları

Lentivirüs üretimi sonrasında virüs miktar analizi qPZR ile belirlenmiştir. EF1α-CD47, CMV-CD47, CMV-GFP, EF1α-GFP, CD47 k/o, scr k/o kontrol ve iC9-GFP için oluşturulan yedi farklı virüs için elde edilen çoğalma eğrisi analizleri şekil 3.2'de gösterilmiştir. Lentivirüs titrasyon kitinin hesaplama protokolüne göre elde edilen sonuçlar kit standartlarına göre hesaplanmıştır. Hesaplama sonuçları tablo 3.1'de gösterildiği gibi yüksek titrasyonda lentivirüs örnekleri elde edilmiştir.



Şekil 3.2: (A) iC9-GFP ve EF1α-CD47, (B) CD47 k/o ve scr k/o kontrol (C) CMV-CD47 ve EF1α-CD47, (D) EF1α-GFP ve CMV-GFP lentivirüslerinin qPZR amplifikasyon plotları

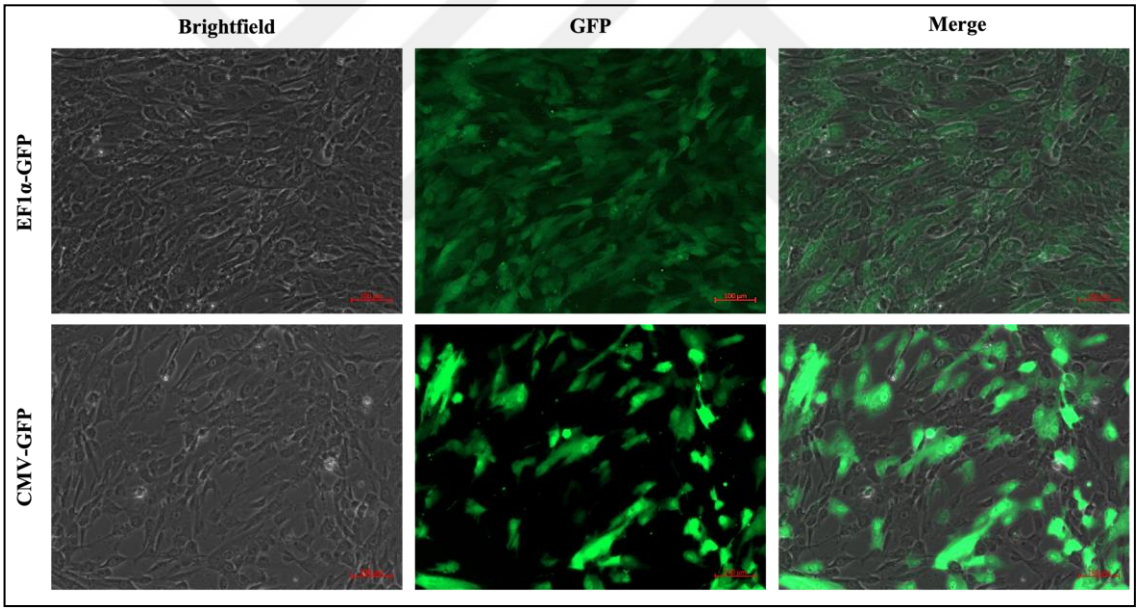
Tablo 3.1: Üretilen lentivirüslerin qPZR sonrası analiz edilen titrasyon sonuçları

Farkı Genler İçeren Lentivirüsler	Virüs Titrasyonu (virüs miktarı/ml)
CMV-GFP	$6{,}5\times10^{7}$
EF1α-GFP	$5{,}8\times10^{7}$
iC9-GFP	7×10^{7}
EF1α-CD47	$6{,}6\times10^{7}$
CMV-CD47	7×10^{7}
CD47 k/o	10^{7}
scr k/o kontrol	$2{,}6\times10^{6}$

3.2. Kİ-MKH'larda Gen İfade Etme Deneylerinin EF1α ve CMV Promotörleri Kullanılarak Optimize Edilmesi

3.2.1. EF1α-GFP ve CMV-GFP Kİ-MKH'ların Floresan Mikroskopi Görüntüleri

Fonksiyon kazanımı (gain-of-function) ve bir genin aşırı ifadesinin verimli bir şekilde sağlanması için promotör seçimi gereklidir. Sitomegalovirüs promotörü (CMV) ve ökaryotik uzama faktörü 1'in alfa alt birimini ifade eden insan EEF1A1 gen promotörü olan EF1α seçilerek klonlamalar gerçekleştirilmiştir. Model gen olarak GFP kullanılarak optimizasyonlar gerçekleştirilmiştir ve promotörler arasındaki fark analiz edilmiştir. Lentivirüs transdüksiyonu sonucunda oluşturulan CMV-GFP ve EF1α-GFP Kİ-MKH'ların GFP ifadesi seviyeleri floresan mikroskopta GFP kanalında görüntülenmiştir (Şekil 3.3). GFP gen ifadesi oranına bakıldığında EF1α-GFP Kİ-MKH'lar, CMV-GFP Kİ-MKH'lara göre ~%21 oranında daha fazla hücrede ışıma gösterdiği ancak ışıma yoğunluğunun CMV-GFP Kİ-MKH'lara oranla daha az olduğu tespit edilmiştir.

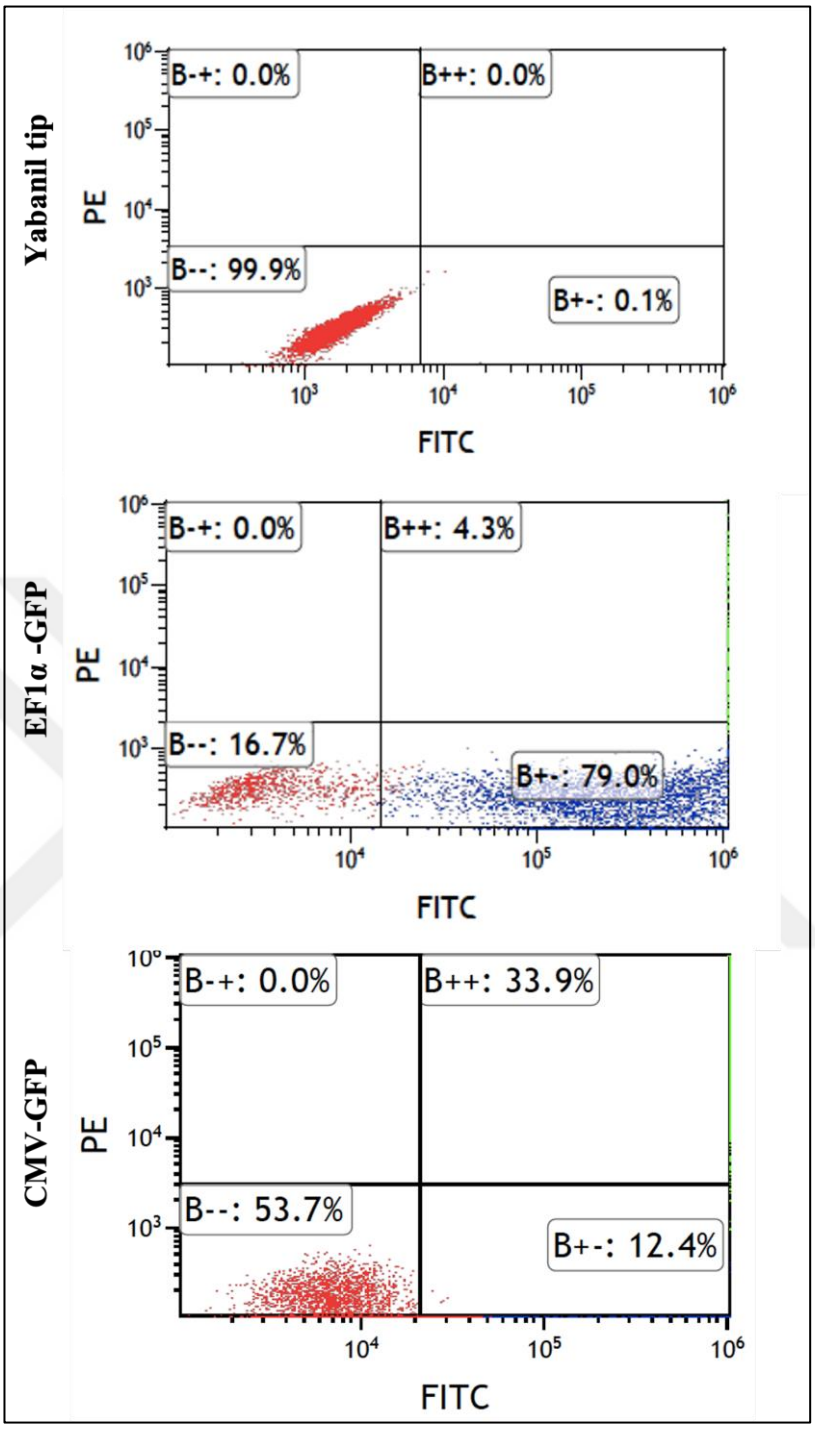


Şekil 3.3: EF1α-GFP Kİ-MKH ve CMV-GFP Kİ-MKH'larda GFP ifadesinin floresan mikroskopi sonuçları (ölçek çubuğu = 100µm; 10X objektif)

3.2.2. EF1α-GFP Kİ-MKH ve CMV-GFP Kİ-MKH'larda GFP ifadesinin Akış Sitometrisi Analiz Bulguları

Floresan mikroskobi ile yapılan deneyler akış sitometrisi kullanılarak doğrulanmıştır (Şekil 3.4). Farklı promotörler kullanılarak GFP geni ifade eden hücreler

FITC (495/519 nm) kanalında okutulmuş ve kontrol olarak Yabanil tip Kİ-MKH'lar (YT/Kİ-MKH) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar GFP içermeyen yabanil tip Kİ-MKH'lara göre, EF1α-GFP Kİ-MKH'ların ~%79 ve CMV-GFP Kİ-MKH'ların ~%45 oranında GFP geni ifade ettikleri belirlenmiştir. Akış sitometrisinde elde edilen sonuçlarda CMV-GFP Kİ-MKH'ların GFP ışıması yoğunluğundan kaynaklı olarak PE (564/574 nm) kanalında da sonuç verdiği tespit edilmiştir. Floresan mikroskopi sonuçlarında da elde ettiğimiz bulguları doğrulayan bu durum CMV-GFP Kİ-MKH'larda GFP'nin ışıma yoğunluğunun fazla olduğunu göstermektedir. Bu sebeple her iki kanalda (FITC ve PE) elde edilen veriler GFP ifadesi için değerlendirilmiştir.

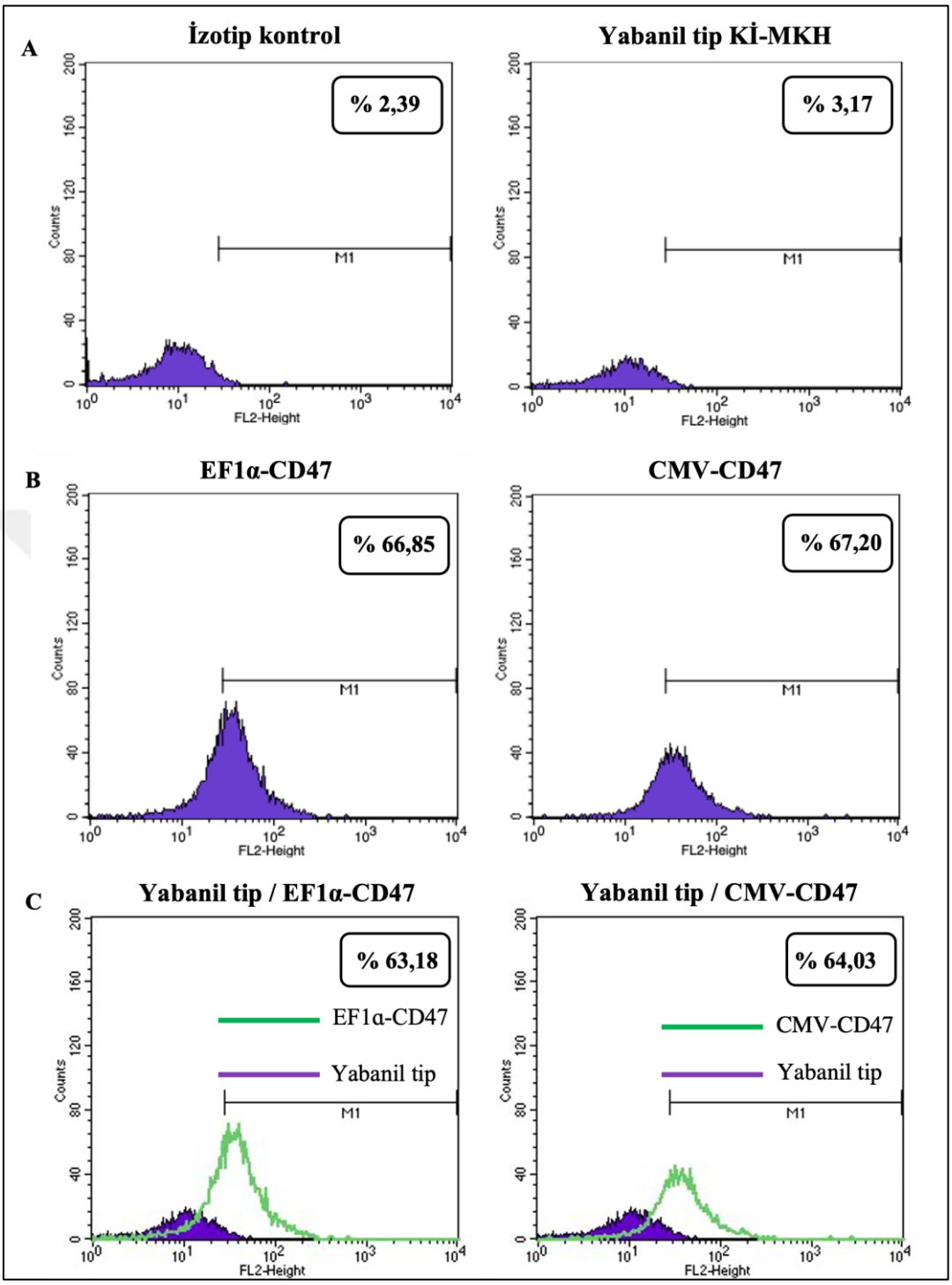


Şekil 3.4: Yabanil tip, EF1α-GFP ve CMV-GFP Kİ-MKH'larda akış sitometrisi ile değerlendirilen GFP ifadesinin histogram grafikleri

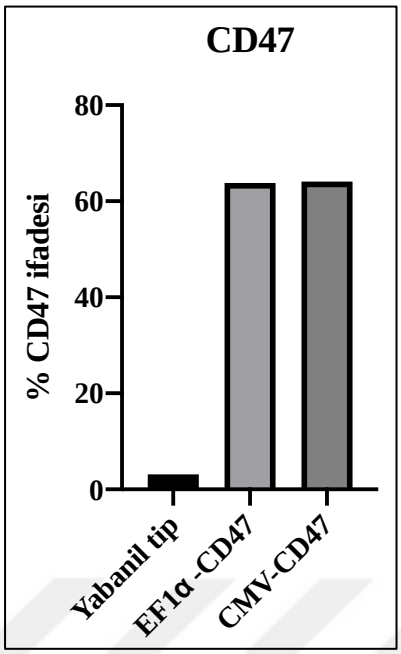
3.3. Lentiviral Transdüksiyon Yöntemi İle CD47 Proteinini Aşırı İfade Eden (CD47 o/e) ve CD47 Geni Nakavt Edilen Kİ-MKH Hatlarının Oluşturulması

3.3.1. EF1α ve CMV Promotörü Kullanılarak Oluşturulan CD47 o/e Kİ-MKH'ların CD47 Yüzey Proteini İfade Seviyelerinin Akış Sitometrisi İle Belirlenmesi

YT/Kİ-MKH CD47 geni içeren lentivirüs ile transdüksiyonu metot 2.2.6 belirtildiği gibi yapılmıştır. YT/Kİ-MKH'lar 40 enfeksiyon çokluğu (multiplicity of infection-MOI) oranı kullanılarak lentivirüsler ile muamele edilmiştir. Elde edilen EF1α-CD47 ve CMV-CD47 Kİ-MKH'ların hücre yüzeyindeki CD47 ifadesi akış sitometrisi ile belirlenmiştir (Şekil 3.5). Mezenkimal kök hücrelerde pasaj sayısı arttıkça CD47 ifade seviyesinin azaldığı gösterilmiştir (Kim ve ark., 2021). Bu sebeple yapılan analizlerde pasaj numaraları dikkate alınmıştır. YT/Kİ-MKH'larda pasaj numarası transdüksiyon yapılan hücreler ile aynı pasaj numarasında olması için pasaj 13 olacak şekilde seçilmiştir. CD47 ifade yüzdeleri izotip kontrol ile karşılaştırıldığında, EF1α-CD47 Kİ-MKH'larda %66,85, CMV-CD47 Kİ-MKH'larda %67,20 olarak belirlenmiştir. YT/Kİ-MKH ile karşılaştırıldığında EF1α-CD47 Kİ-MKH'lar %63,18, CMV-CD47 Kİ-MKH'larda ise %64,03 oranında CD47 yüzey proteini artışı gerçekleşmiştir. EF1α ve CMV promotörleri arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 3.5 ve 3.6).



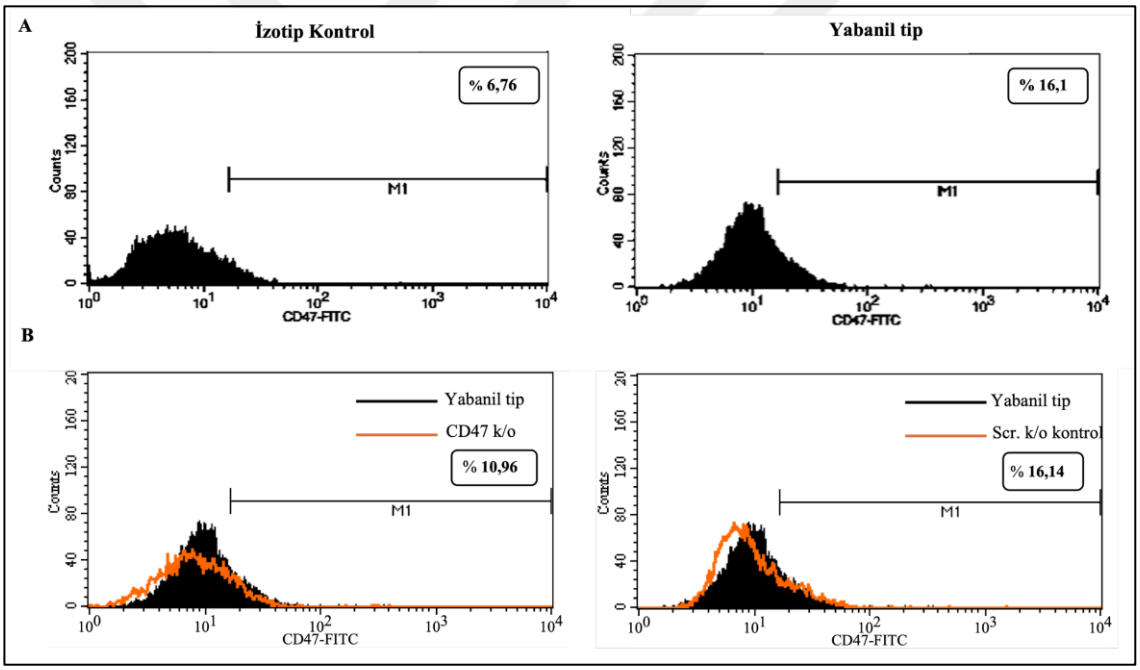
Şekil 3.5: (A) İzotip kontrol ve Yabanil tip Kİ-MKH, (B) EF1α-CD47 ve CMV-CD47 Kİ-MKH'ların CD47 yüzey protein ifade grafikleri, (C) Yabanil tip Kİ-MKH'lar ile EF1α-CD47 ve CMV-CD47 Kİ-MKH grafiklerinin birlikte gösterimi



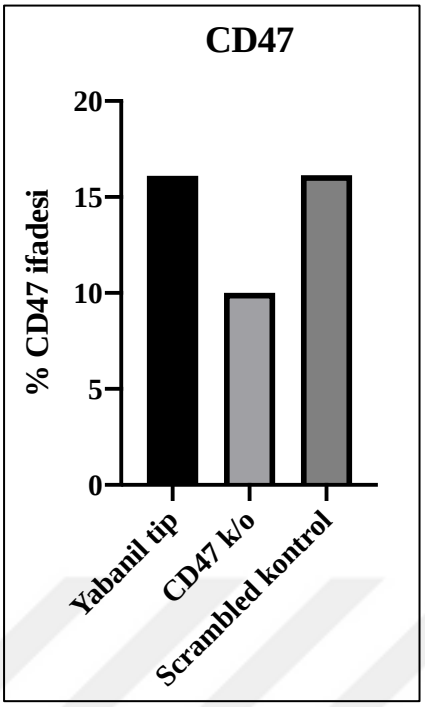
Şekil 3.6: Yabanil tip, EF1α-CD47 ve CMV-CD47 Kİ-MKH'larda akış sitometrisi ile analiz edilen CD47 ifadesinin grafik hâlinde gösterimi

3.3.2. CD47 Geni Nakavt Edilmiş Kİ-MKH'larda CD47 Yüzey Proteinin Akış Sitometrisi İle Belirlenmesi

YT/Kİ-MKH, CD47 nakavt Kİ-MKH (CD47 k/o) ve herhangi bir hedef gen taşımayan lentivirüs ile muamele edilmiş kontrol hücre (scrambled- Scr k/o kontrol) yüzeyindeki CD47 ifadesi akış sitometrisi ile analiz edilmiştir (Şekil 3.7). YT/Kİ-MKH'ların pasaj numarası CD47 k/o trasdüksiyonunun yapıldığı pasaj numarasına (p7) göre seçilmiştir. YT/Kİ-MKH'larda CD47 ifade seviyesi %16,1 CD47 k/o Kİ-MKH'larda %10,96 ve Scr kontrol Kİ-MKH'larda %16,14 olarak tespit edilmiştir. Yabanil tip hücrelere kıyasla CD47 k/o Kİ-MKH'larda ifade seviyesi ~%6 oranında azalmıştır. Scr k/o kontrol Kİ-MKH'larda ise beklendiği gibi CD47 ifadesi yabanil tip hücrelere göre bir değişiklik göstermemiş ve CD47 protein seviyesinin yapılan lentiviral transdüksiyon sebebine bağlı olarak değişmediği tespit edilmiştir (Şekil 3.7 ve 3.8).



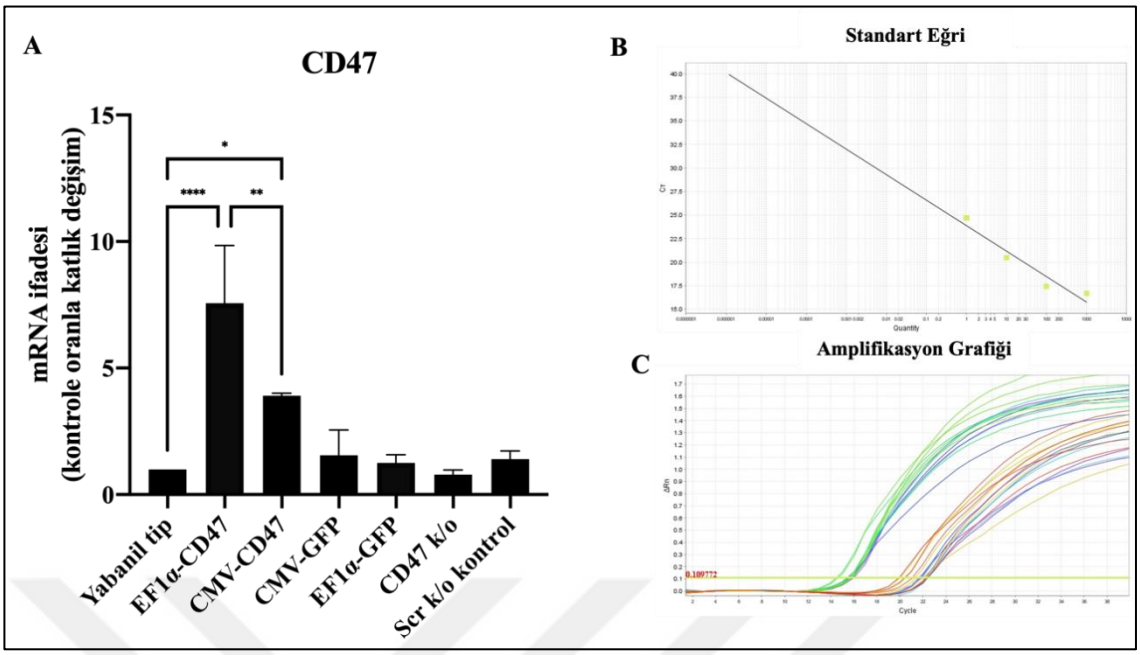
Şekil 3.7: Yabanil tip (YT/Kİ-MKH), CD47 k/o ve Scr k/o kontrol Kİ-MKH'larda CD47 yüzey proteinin akış sitometrisi ile gösterilmesi. (A) İzotip kontrol ve YT/Kİ-MKH'larda CD47 ifadesi (B) Yabanil tip Kİ-MKH'lar ile CD47 k/o ve Scr k/o kontrol Kİ-MKH grafiklerinin birlikte gösterimi



Şekil 3.8: Yabanil tip, CD47 k/o ve Scr k/o kontrol Kİ-MKH'larda akış sitometrisi ile analiz edilen CD47 ifadesinin grafik hâlinde gösterimi

3.3.3. Lentiviral Transdüksiyon Sonrası Genetiği Değiştirilen Kİ-MKH'larda CD47 mRNA Seviyesinin Belirlenmesi

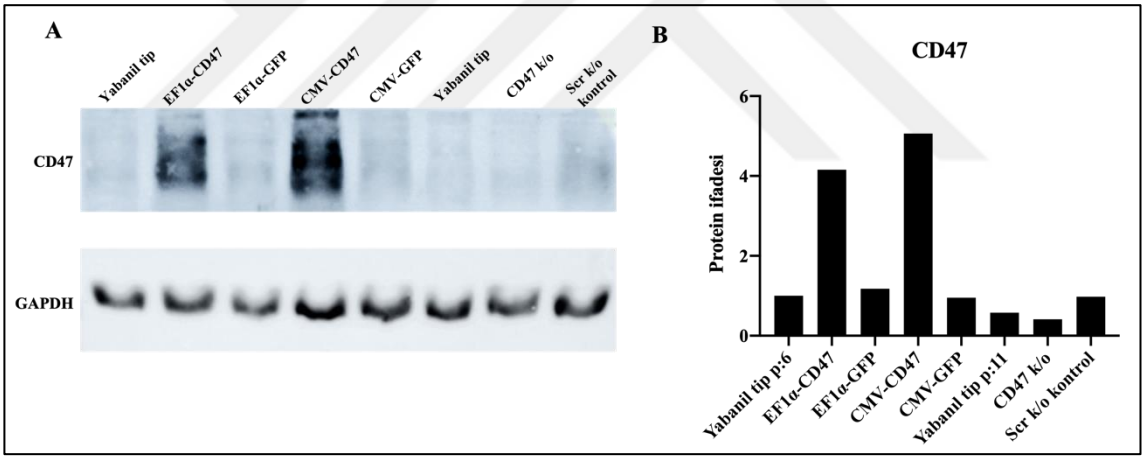
YT/Kİ-MKH, EF1α-CD47, CMV-CD47, CMV-GFP, EF1α-GFP, CD47 k/o ve Scr k/o kontrol Kİ-MKH'larda CD47 geninin mRNA ifadesi qPZR yöntemi ile gösterilmiştir (Şekil 3.9). "Housekeeping" gen olan GAPDH'e kıyasla EF1α-CD47 Kİ-MKH'larda ~8, CMV-CD47 Kİ-MKH'larda ~4 katlık bir CD47 mRNA ifade artışı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar da yapılan gen manipülasyonunun EF1α-CD47 ve CMV-CD47 Kİ-MKH'ların mRNA seviyesinde anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir. EF1α-CD47 Kİ-MKH'ların, CMV-CD47 Kİ-MKH'lara göre CD47 mRNA ifadesinde ~2 katlık bir fark olduğu tespit edilmiştir. Kontrol hücre hatları olan CMV-GFP Kİ-MKH ve EF1α -GFP Kİ-MKH'larda yabanil tip-Kİ-MKH'lara kıyasla ~0,50'lık bir artış vardır fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. CRISPR/Cas9 sistemi ile nakavt edilen hücrelerde Cas9 ile kesim sonrası mRNA okuma penceresinde çerçeve kayması oluştuğu için hedeflenen genin mRNA seviyesi değişmemektedir. Bu sebeple CD47 k/o Kİ-MKH'larda yabanil tip hücrelere kıyasla CD47 mRNA seviyesinde bir farklılık tespit edilmemiştir. Scr k/o kontrol Kİ-MKH'lar yabanil tip hücreler ile kıyaslandığında anlamlı bir fark elde edilmemiştir.



Şekil 3.9: CD47 mRNA seviyesinin qPZR ile değerlendirilmesi. (A) CD47 mRNA ifadesinin kontrole oranla katlık artış grafiği, (B) Standart örneklerin doğrusal eğri grafiği (C) qPZR amplifikasyon grafiği (*:p<0,0332, **:p<0,0021,****:p<0,0001)

3.3.4. CD47 Protein İfadesinin Western Emdirim İle Belirlenmesi

Hücrelerdeki total protein miktarı Western emdirim yöntemi ile belirlenmiştir. Hücrelerden yapılan protein izolasyonu metot 2.2.5.1'de bahsedilmiştir. Total protein izolasyonu yabanil tip, EF1α-CD47, CMV-CD47, CMV-GFP, EF1α-GFP, CD47 k/o ve Scr k/o kontrol Kİ-MKH'larda gerçekleştirilmiştir. Yabanil tip Kİ-MKH (p:6) kontrol olarak kullanılmış ve protein ifadesi 1 kabul edilmiştir. Sırasıyla değerler kontrole kıyasla EF1α-CD47 Kİ-MKH'larda ~4, EF1α-GFP Kİ-MKH'larda ~0,17, CMV-CD47 Kİ-MKH'larda ~5, CMV-GFP Kİ-MKH'larda ~0,95, yabanil tip (p11) Kİ-MKH'larda ~0,57, CD47 k/o Kİ-MKH'larda ~0,41 ve Scr k/o konrol Kİ-MKH'larda ~0,97 olarak hesaplanmıştır. Tüm örneklerde CD47 protein ifadesi GAPDH protein ifadesine göre normalize edilmiştir. Protein ifadesi grafik hâlinde şekil 3.10'da gösterilmiştir. Pasaj sayısı arttıkça CD47 protein seviyesinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Scr k/o kontrol Kİ-MKH'lardaki CD47 protein seviyesi yabanil tip hücrelere göre anlamlı bir değişiklik detekte edilmemiştir.

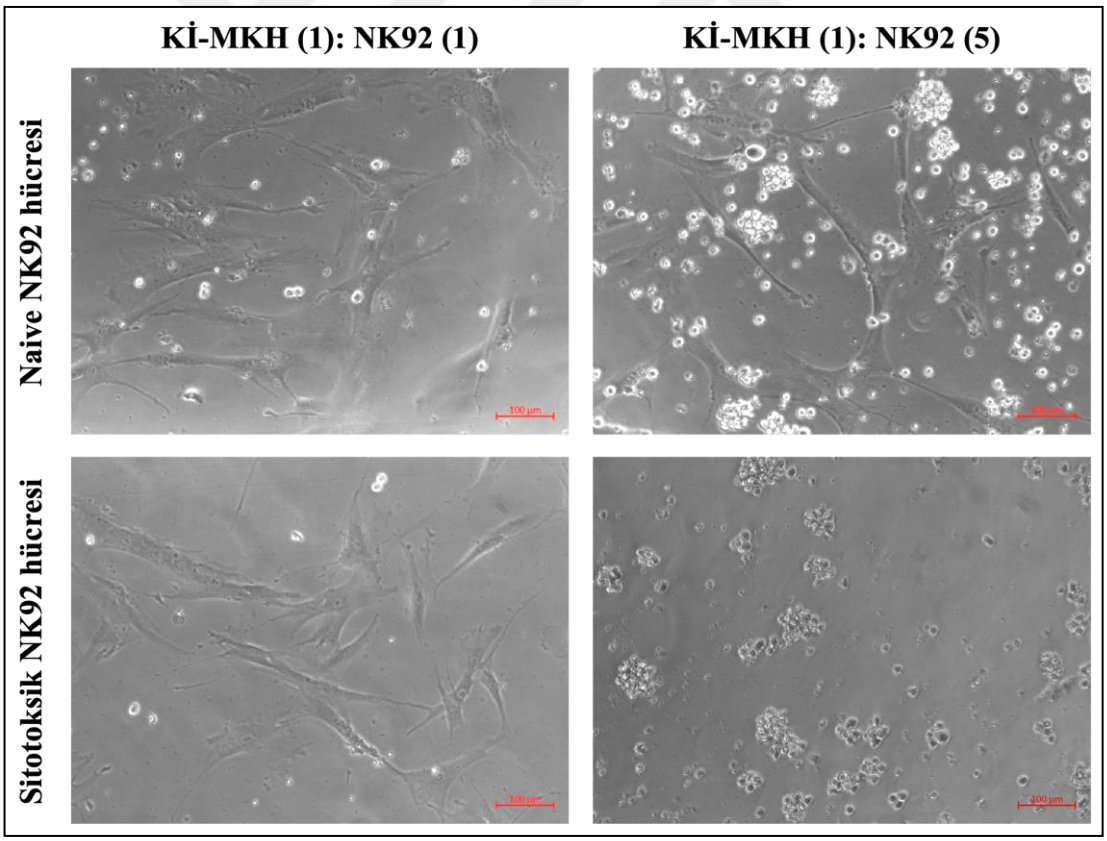


Şekil 3.10: Total protein izolasyonu sonrası CD47 proteinin western emdirim yöntemi ile gösterilmesi. (A) CD47 ve GAPDH antikorlarının protein ifadelerinin Western emdirim ile alınan sonuçları (B) CD47 protein ifadesinin grafik hâlinde gösterimi

3.4. CD47 Proteinine Bağlı Olarak Genetiği Değiştirilmiş Kİ-MKH'ların NK92 Hücreleri İle Etkileşimi

3.4.1. IL-2 İle İndüklenmiş NK92 Hücrelerinin Yabanil Kİ-MKH'lar Ko-Kültüre Edilmesi

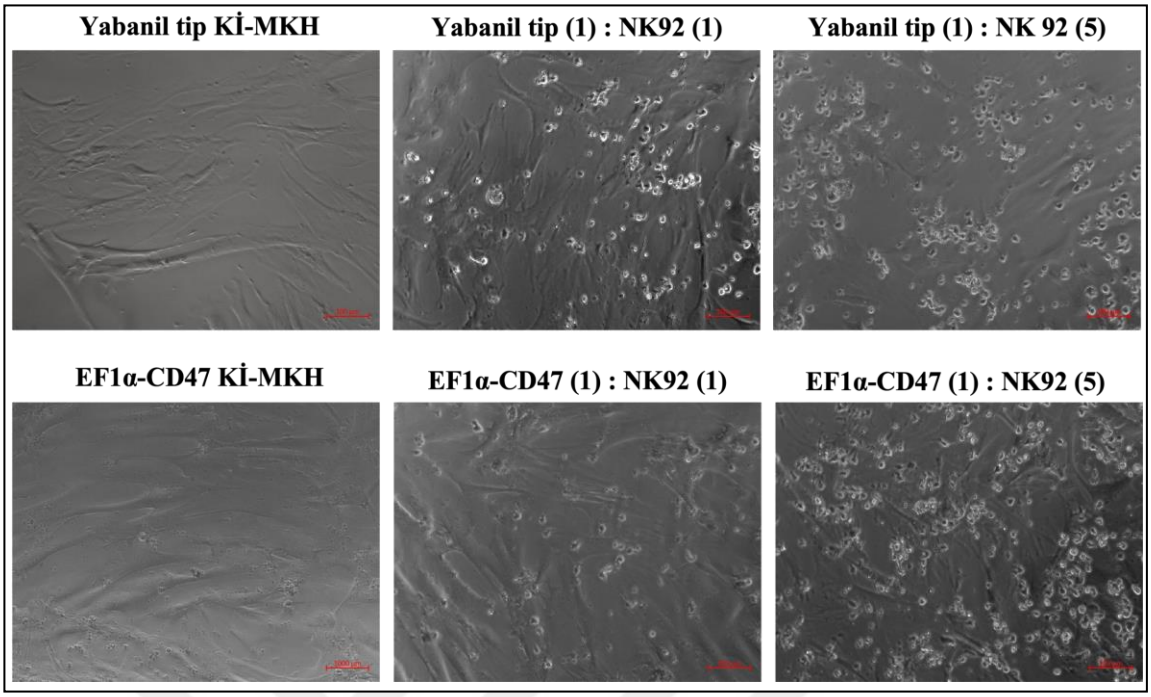
NK92 hücreleri literatürde belirtildiği gibi 24 saat 200 U/ml IL-2 ile indüklenerek sitotoksik hâle getirilmiştir (Abumaree ve ark., 2019; Sharma & Das, 2018; Spaggiari ve ark., 2006). Naif ve sitotoksik NK92 hücrelerinin Kİ-MKH'lar üzerindeki etkisini gözlemlemek için Kİ-MKH'lar 1:1 ve 1:5 (MKH:NK) oranlarında naif NK hücreleri ve IL-2 ile sitotoksik hâle getirilmiş NK hücreleriyle birlikte kültürlenmiştir (Şekil 3.11). Hücrelerin 24 saatlik ko-kültüründen sonra morfolojileri mikroskopta incelenmiştir. Naif NK92 hücreleri 1:1 ve 1:5 oranında Kİ-MKH'lar üzerinde morfolojik olarak sitolitik bir etki göstermemiştir. Sitotoksik NK92 hücreleri ile kültürlenen Kİ-MKH'lar ise 1:1 oranında morfolojilerini korurken, 1:5 oranında ko-kültüre edildiğinde Kİ-MKH'ların morfolojilerini kaybettiği tespit edilmiştir.



Şekil 3.11: Naif ve sitotoksik NK92 hücreleriyle yabanil tip Kİ-MKH'ların 1:1 ve 1:5 oranlarında (Kİ-MKH:NK) ko-kültüre edilmesinin mikroskopi görüntüleri (ölçek çubuğu = 100µm; 10X objektif)

3.4.2. Sitotoksik NK92 Hücrelerinin Yabanil Tip ve EF1α-CD47 Kİ-MKH'lar Üzerinindeki Etkisinin Morfolojik Olarak İncelenmesi

Sitotoksik NK92 hücrelerinin EF1α-CD47 Kİ-MKH'lar üzerindeki morfolojik etkisinin analizi için hücreler birlikte kültürlenmiştir. CD47 k/o edilen Kİ-MKH'ların k/o oranı yeterli verimlilikte olmadığı için deney akışına dahil edilmemiştir. EF1α-CD47 Kİ-MKH'lar ve CMV-CD47 Kİ-MKH'ların CD47 ifade seviyeleri akış sitometrisi ve western emdirim sonuçlarına göre değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık göstermemektedir. Ancak EF1α-GFP ve CMV-GFP Kİ-MKH'ların akış sitometrisi ve floresan mikroskop sonuçları değerlendirildiğinde EF1α-GFP'lerin verimliliğinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca CMV promotörü içeren hücrelerin ileriki pasajlarda metilasyondan kaynaklı CD47 gen ifadesinin azalma riski vardır (Škalamera ve ark., 2012). Bu sebeple sitotoksik NK92 hücreleri (200 U/ml IL-2 ortamında 24 saat kültürlenmiş) ile EF1α-CD47 Ki-MKH'lar ön deney olarak ko-kültürlenmiştir. 24 saat sonra hücrelerin morfolojik görüntüleri mikroskopta analiz edilmiştir. Yabanil tip Kİ-MKH'ların 1:1 oranında sitotoksik NK92 hücreleri ile ko-kültürü sonrasında Kİ-MKH'ların morfolojilerinde bir değişiklik gözlemlenmemiştir ancak 1:5 oranında kültürleme sonrasında Kİ-MKH'ların sayısında azalma gözlemlenmiştir. EF1α-CD47 Kİ-MKH'larda ise 1:1 ve 1:5 oranlarında ko-kültür sonrası hücrelerin sayısında veya morfolojisinde bir değişiklik görülmemiştir. Sonuç olarak, EF1α-CD47 Kİ-MKH'ların yabanil tip Kİ-MKH'lara göre sitotoksik NK92 hücrelerine karşı morfolojilerini koruduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.12).



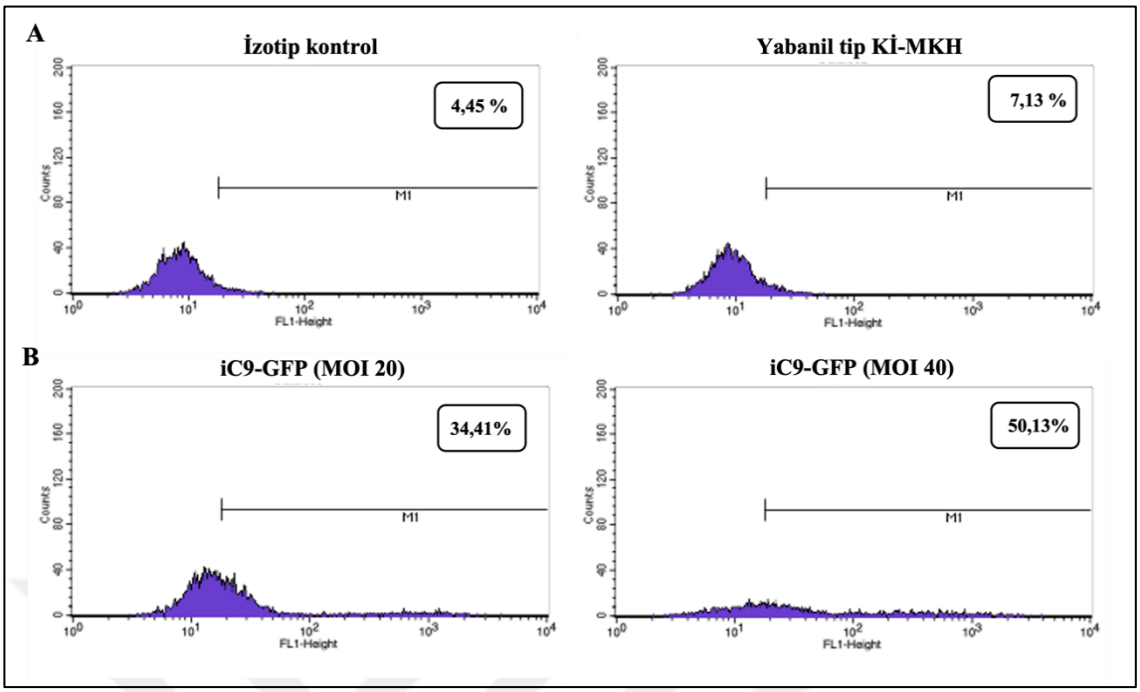
Şekil 3.12: Sitotoksik NK92 hücreleri ile yabanil tip ve EF1α-CD47 Kİ-MKH'ların farklı oranlarda ko-kültüre edilmesinin mikroskopi görüntüleri (ölçek çubuğu = 100µm; 10X objektif)

3.5. Kontrol Edilebilir Kİ-MKH Hatlarının Oluşturulmasının Optimizasyonu

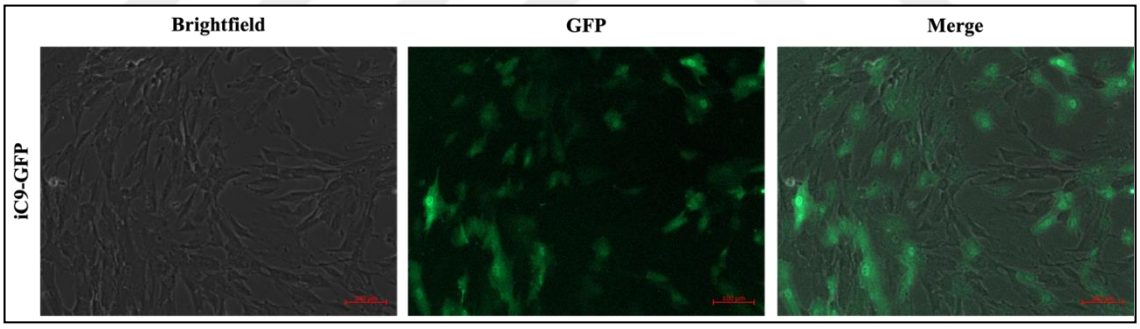
Tezin ikinci kısmında Kİ-MKH'lara lentivirüs aracılığı ile dimerizasyonun kimyasal indükleyicisi (CID) kullanılarak kaspaz-9'un dimerizasyonunu indükleyen intihar geni (iC9) aktarılacaktır. Küçük inhibitör aracılığı ile (FKBP) kaspaz-9 dimerizasyonu indüklenir ve kaspaz bağımlı apoptoz yolağı aktive olur. Bu yöntem lentiviral transdüksiyonun ve/veya CD47 geninin mezenkimal kök hücrelerde kanser hücresine dönüşme riskine karşı olarak güvenlik stratejisi olarak gen terapide kullanılmaya başlanmıştır (Straathof ve ark., 2005a; Tsujimura ve ark., 2019; C. Wu ve ark., 2014).

3.5.1. Kİ-MKH'larda iC9-GFP Gen İfadesinin Farklı Enfeksiyon Çeşitliliği (MOI) Kullanılarak Belirlenmesi

Deneylerde optimizasyonların yapılması için lentivirüs tarafından üretilmeye uygun olarak klonlanan ve iC9 geni içeren plazmit yapısına GFP geni de aktarılmıştır. CD47 proteinin aşırı ifadesi ve nakavt hücre hatları oluştururken yapılmış olan optimizasyon bilgilerine dayanarak İC9-GFP geni içeren lentivirüsler iki farklı enfeksiyon çeşitliliği (MOI) oranı kullanılarak YT/ Kİ-MKH'lara verilmiştir. Lentiviral transdüksiyon sonrası hücrelerdeki GFP ifadesi akış sitometrisinde tespit edilmiştir (Şekil 3.13). İzotip kontrolde ve yabanil tip Kİ-MKH'larda çıkan değerler non-spesifik olarak kabul edilmiştir. iC9-GFP Kİ-MKH'larda MOI 20 olarak yapılan transdüksiyon sonrası GFP ifadesi %34,41 olarak belirlenmiştir. MOI oranının 40'a çıkarılması sonrasında GFP ifadesi %50,13'a arttığı belirlenmiştir. MOI 20 ve MOI 40 ile transdüksiyon yapılan hücrelerde GFP ifadesi arasında ~1,5 katlık bir fark gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar MOI'nın arttırılması ile daha yüksek verimlilikte sonuç alındığını göstermektedir. Gelecek deneylerde kullanılmak üzere MOI değerinin 40 olması gerekliliği tespit edilmiştir. MOI 40 enfeksiyon çeşitliliği ile muamele edilen hücrelerdeki GFP miktarı floresan mikroskobu ile de gözlemlenmiştir. Hücrelerdeki GFP oranı floresan mikroskobu ile de gösterilmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.13: iC9-GFP Kİ-MKH'lara MOI 20 ve MOI 40 ile yapılan transdüksiyon sonrası GFP ifadesinin akış sitometri sonuçları. (A) İzotip kontrol ve Yabanil tip Kİ-MKH'ların, (B) iC9-GFP MOI 20 ve iC9-GFP MOI 40 Kİ-MKH'ların GFP ifadesinin histogram grafikler

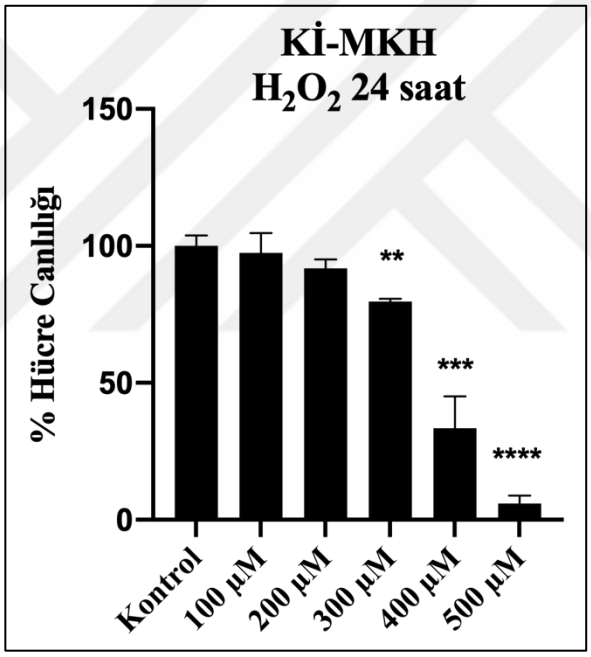


Şekil 3.14: MOI 40 ile yapılan transdüksiyon sonrası iC9-GFP Kİ-MKH'ların floresan mikroskobunda GFP ifade görüntüleri (ölçek çubuğu = 100µm; 10X objektif)

3.6. Kİ-MKH ve iC9-GFP Kİ-MKH'larda Hücre Ölümünün Gösterilmesi

3.6.1. H_2O_2 İle Muamele Edilen Kİ-MKH'larda WST-1 ile Hücre Canlılığı Ölçülmesi

Kİ-MKH'larda hücre canlılığını metabolik parametreler üzerinden göstermek için farklı dozlarda H_2O_2'nin 24 saatlik uygulamasının ardından WST-1 hücre canlılığı testi gerçekleştirilmiştir. H_2O_2 uygulanmamış olan kontrol hücrelerinde hücre canlılığı %100, 100 µM uygulamada %97,4, 200 µM uygulamada %91,7, 300 µM uygulamada %79,6, 400 µM uygulamada %33,3 ve 500 µM uygulamada %4,48 olarak tespit edilmiştir. Hücre canlılığı doz miktarı arttıkça azalmıştır. 300, 400 ve 500 µM dozlarında H_2O_2'nın istatistiksel olarak anlamlı hücre ölümünü sağladığı tespit edilmiştir (Şekil 3.15). Deneyler birbirinden bağımsız 3 farklı zaman diliminde gerçekleştirilmiştir.



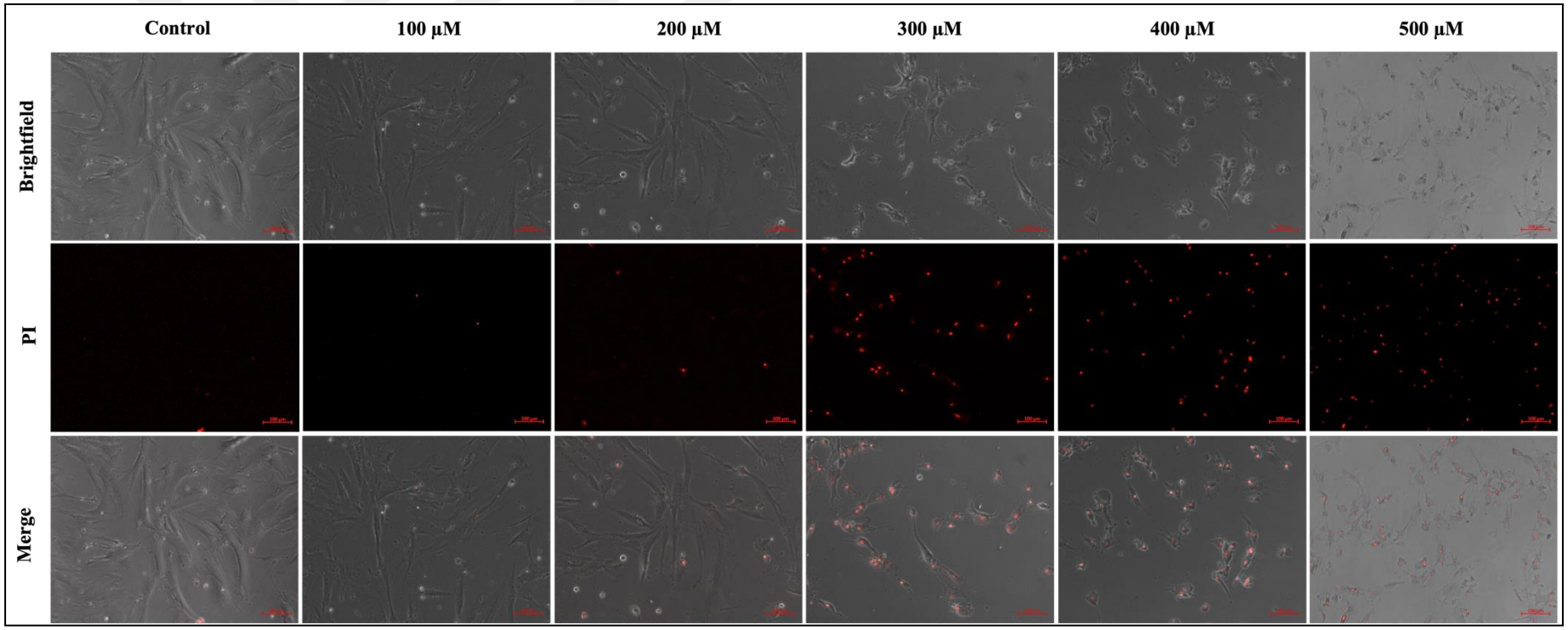
Şekil 3.15: H_2O_2'nın Kİ-MKH'lar üzerinde toksisitesini gösteren WST-1 hücre canlılığı testi analiz sonuçları (**:p<0,0021, ***:p<0,0002, ****:p<0,0001)

.

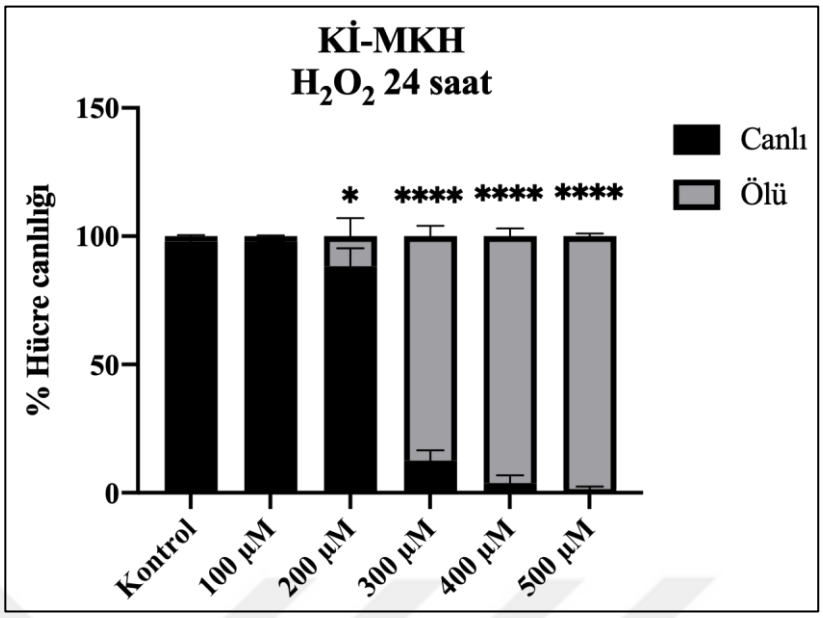
3.6.2. H_2O_2 ile Muamele Edilen Kİ-MKH'ların Hücre Ölümünün PI Boyaması ile Gösterilmesi

Hücre canlılık testlerindeki konsantrasyonlar kullanılarak 24 saat boyunca H_2O_2'ye maruz bırakılmış Kİ-MKH'lar PI ile boyanmıştır. Boyama sonrası hücreler floresan mikroskobunda şekil 3.16'da gösterildiği gibi 10X objektifte gösterilmiştir. Floresan mikroskobunda dört ayrı alandan alınan fotoğraflarda canlı ve ölü hücrelerin sayılması sonucunda elde edilen veriler grafik hâlinde şekil 3.17'de gösterilmiştir. Bu grafiğe göre 100 µM konsantrasyonda ~%2 oranında, 200 µM konsantrasyonda ~%11 oranında, 300 µM konsantrasyonda ~%80 oranında, 400 µM konsantrasyonda ~%96 oranında ve 500 µM konsantrasyonda ~%98 oranında PI ile boyanmış hücre tespit edilmiştir. Hücre canlılık testlerine paralel sonuçlar gösteren bu deney Kİ-MKH'larda hücre ölüm deneylerinin optimize edildiğini göstermiştir.

H_2O_2 uygulaması sonrası gerçekleştirilen WST-1 ve PI boyaması sonuçları 300 µM ve üzeri konsantrasyonların anlamlı bir şekilde hücre ölümünü indüklediğini göstermiştir (Şekil 3.15 ve 3.17).



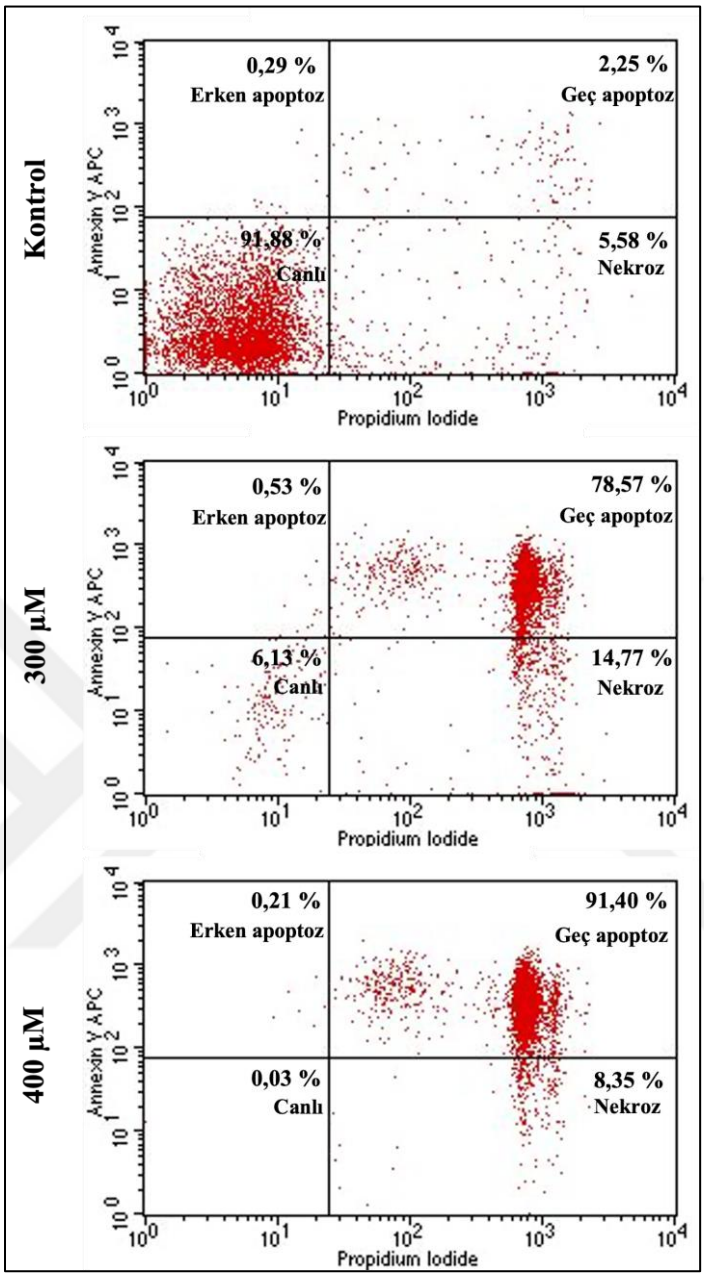
Şekil 3.16: H_2O_2'nın farklı dozlara maruz bırakılan Kİ-MKH'ların hücre ölümünün PI boyaması ile floresan mikroskobunda görüntülenmesi (ölçek çubuğu = 100µm; 10X objektif)



Şekil 3.17: H_2O_2'ye maruz bırakılan yabanil tip Kİ-MKH'larda oksidatif strese bağlı hücre ölümünün PI boyaması sonrası canlı ve ölü hücre sayılarının yüzde olarak grafik hâlinde gösterimi (*:p<0,0114, ****:p<0,0001)

3.6.3. H_2O_2 İle Muamele Edilen Kİ-MKH'ların Hücre Ölümünün Annexin-V/PI İle Değerlendirilmesi

Yapılan bağımsız deneyler sonucunda 24 saat boyunca 300 µM ve üzeri H_2O_2'in hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde etkilediği belirlenmiştir. H_2O_2'nın 500 µM dozunun şekil 3.16'daki morfoloji analizlerine de bakıldığında toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Sonraki analizlerde apoptotik hücre ölümü değerlendirileceği için 500 µM dozu seçilmemiştir. Kİ-MKH'larda sebep olduğu apoptotik/nekrotik hücre ölümü akım sitometrisinde Annexin-V/PI analizi ile gösterilmiştir (Şekil 3.18). Elde edilen histogram grafiklerinin sol üstü erken apoptozu, sağ üstü geç apoptozu, sol altı canlı hücreleri ve sağ alt nekrozu göstermektedir. Kİ-MKH'lara 300 µM H_2O_2 uygulamasında hücrelerin %78,57'sinin geç apoptotik evrede olduğu ve 400 µM uygulamasında ise hücrelerin %91,40'nın geç apoptotik evrede olduğu tespit edilmiştir.

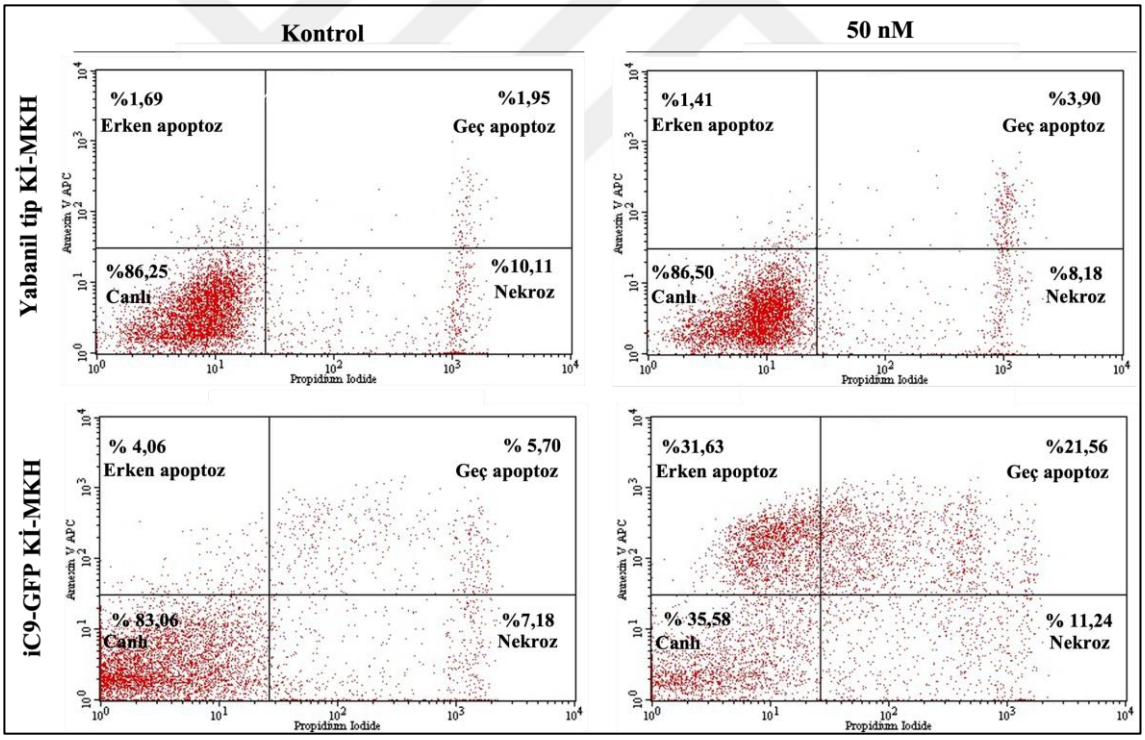


Şekil 3.18: H_2O_2'nın 300 µM ve 400 µM konsantrasyonlarında 24 saat inkübasyon sonrası Kİ-MKH'lar üzerindeki apoptotik etkisinin Annexin-V/PI ile değerlendirilmesi sonuçları

3.6.4. CID İle Muamele Edilen Yabanil Tip Ve iC9-GFP Kİ-MKH'ların Hücre Ölümünün Annexin-V/PI İle Değerlendirilmesi

CID molekülünün 24 saat içinde yabanil tip ve iC9-GFP Kİ-MKH'larda sebep olduğu apoptotik hücre ölümü akım sitometrisinde Annexin-V/PI analizi ile gösterilmiştir (Şekil 3.19). Elde edilen histogram grafiklerinin sol üstü erken apoptozu, sağ üstü geç apoptozu, sol altı canlı hücreleri ve sağ alt nekrozu göstermektedir. CID ile muamele

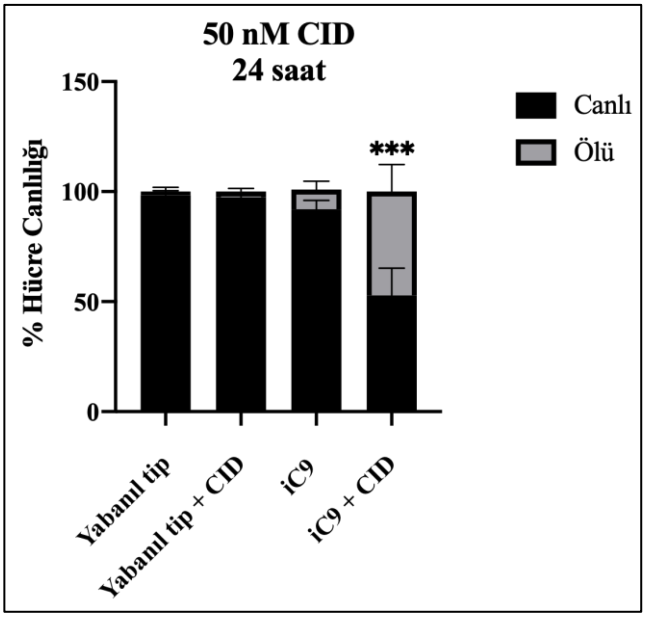
edilmeyen Yabanil tip Kİ-MKH'larda %86,25 canlı, %1,69 erken apoptoz, %1,95 geç apoptoz ve %10,11 nekroz görülmüştür. Yabanil tip Kİ-MKH'lar 50 nM CID ile muamele edildiğinde ise hücrelerin %86,50'sinin canlı, %1,41'inin erken apoptoz, %3,80'inin geç apoptoz ve %8,18'nin nekroz evresinde olduğu saptanmıştır. iC9-GFP Kİ-MKH'lar CID uygulanmadığında %83,06 canlı, %4,06 erken apoptoz, %5,70 geç apoptoz ve %7,18 nekroz evresinde hücre olduğu; 50 nM CID'e maruz bırakıldığında ise bu oranlar %35,58 canlı, %31,63 erken apoptoz, %21,56 geç apoptoz ve %11,24 nekroz olarak değişmiştir. Yabanil tip Kİ-MKH'larda CID uygulaması hücrelerdeki apoptoz ve nekroz yüzdelerini kontrole kıyasla anlamlı olarak arttırmamıştır. Öte yandan iC9-GFP Kİ-MKH'lar ise CID'e maruz kaldıktan sonra hücre ölümü ~%63 olarak dramatik oranda artmıştır. CID uygulanmamış grupta ise hücre canlılığının yabanil tip hücrelerle benzer şekilde olduğu gösterilmiştir. CID'e maruz bırakılan iC9-GFP hücrelerinde %35,58 oranında canlı hücre olması, seçilimin tam olarak gerçekleşmemesinden kaynaklanmaktadır.



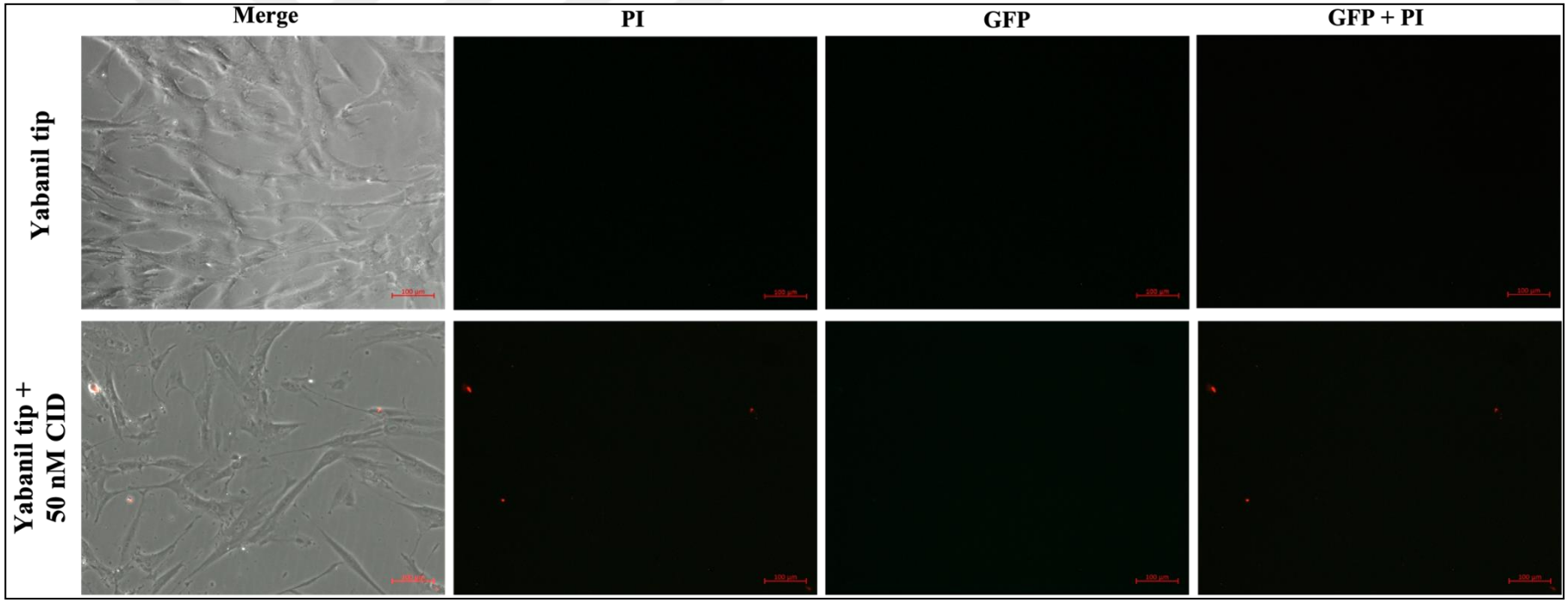
Şekil 3.19: CID molekülünün 50nM konsantrasyonda 24 saat uygulaması sonrası yabanil tip ve iC9-GFP Kİ-MKH'lara etkisinin Annexin-V/PI ile değerlendirilmesinin histogramı

3.6.5. CID İle Muamele Edilen iC9-GFP Ve Yabanil Tip Kİ-MKH'ların Hücre Ölümünün PI Boyaması İle Gösterilmesi

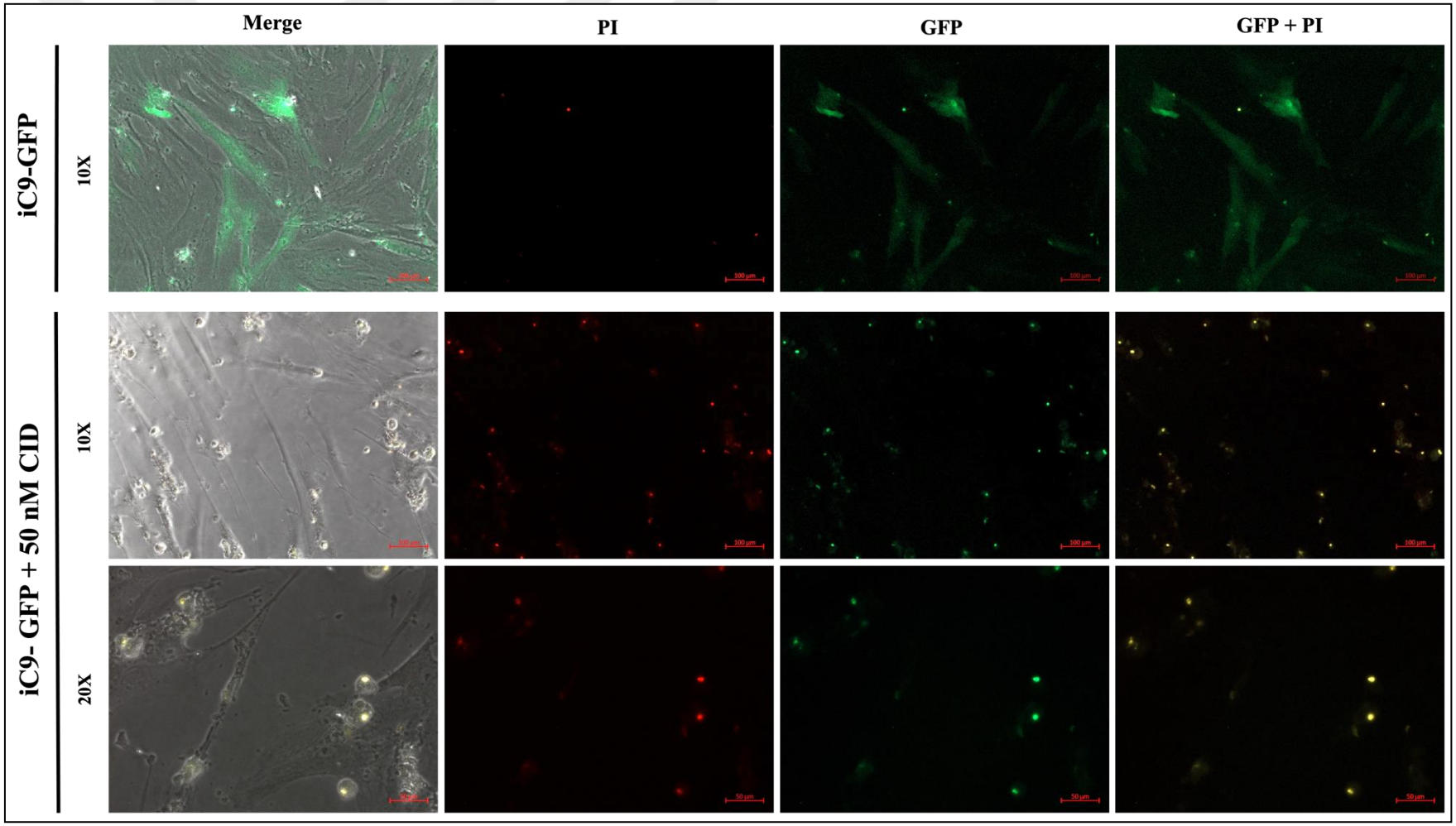
Yabanil tip ve iC9-GFP Kİ-MKH'lar 24 saat boyunca CID'e maruz bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücrelerin PI boyaması yapılmıştır. Boyama sonuçları şekil 3.21 ve 3.22'de gösterildiği gibi GFP ve PI filtresi ile floresan mikroskobunda gözlemlenmiştir. PI ile boyanan hücreler ölü hücreleri, GFP ışıması veren hücreler ise iC9-GFP Kİ-MKH göstermektedir. iC9-GFP Kİ-MKH seçilimi sonrasında tam olarak saf bir popülasyon elde edilememesinden dolayı ve deney kurgusu gereği verilen CID'in sadece bu hücrelerde ölümü tetiklemesi beklendiği için GFP pozitif hücrelerde PI pozitifliğine bakılmıştır. Şekilde görüldüğü üzere PI pozitivitesi sadece GFP pozitif hücrelerde görülmektedir. GFP ve PI boyamasının görüntüsü birlikte alındığında üstüste binen yeşil ve kırmızı boyalar sarı rengini vermektedir. Bu durum ölü hücrelerin hem GFP içerdiği hem de PI ile boyandığını göstermektedir. Bu sonuca göre 50 nM CID sadece iC9-GFP Kİ-MKH'larda hücre ölümünü tetiklerken yabanil tip hücrelerin canlılığı üzerine bir etkisi gözlemlenmemiştir. Floresan mikroskobunda dört ayrı alandan alınan fotoğraflarda canlı ve ölü hücrelerin sayılması sonucunda elde edilen veriler grafik halinde şekil 3.20'de gösterilmiştir. Yabanil tip grubunda 214 hücrenin 210'u, Yabanil tip + CID grubunda 238 hücrenin 232'si, iC9 grubunda 70 hücrenin 64'ü, iC9 + CID grubunda 225 hücrenin 120'si canlı olarak sayılmıştır.



Şekil 3.20: CID molekülüne maruz bırakılan yabanil tip ve iC9-GFP Kİ-MKH'larda hücre ölümünün PI boyaması sonrası canlı ve ölü hücre sayılarının yüzde olarak grafik hâlinde gösterimi (***:p<0,0004)



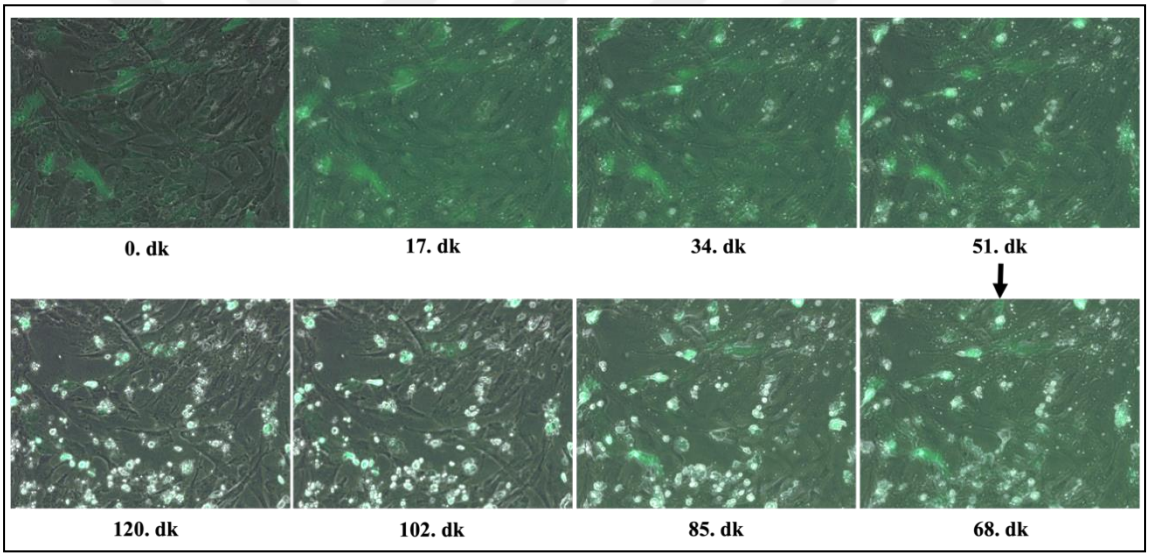
Şekil 3.21: 50 nM CID molekülü ile 24 saat muamele edilen/edilmeyen yabanil tip Kİ-MKH'larda hücre ölümünün PI boyaması ile floresan mikroskobunda görüntüleme sonuçları (ölçek çubuğu = 100µm; 10X objektif)



Şekil 3.22: 50 nM CID molekülü ile 24 saat muamele edilen/edimeyen iC9-GFP Kİ-MKH'larda hücre ölümünün PI boyaması ile floresan mikroskobunda görüntüleme sonuçları (ölçek çubuğu = 100µm; 10X objektif), (ölçek çubuğu = 50 µm; 20X objektif)

3.6.6. CID İle Muamele Edilen iC9-GFP Kİ-MKH'ların Floresan Mikroskopi Hızlandırılmış Görüntüleri

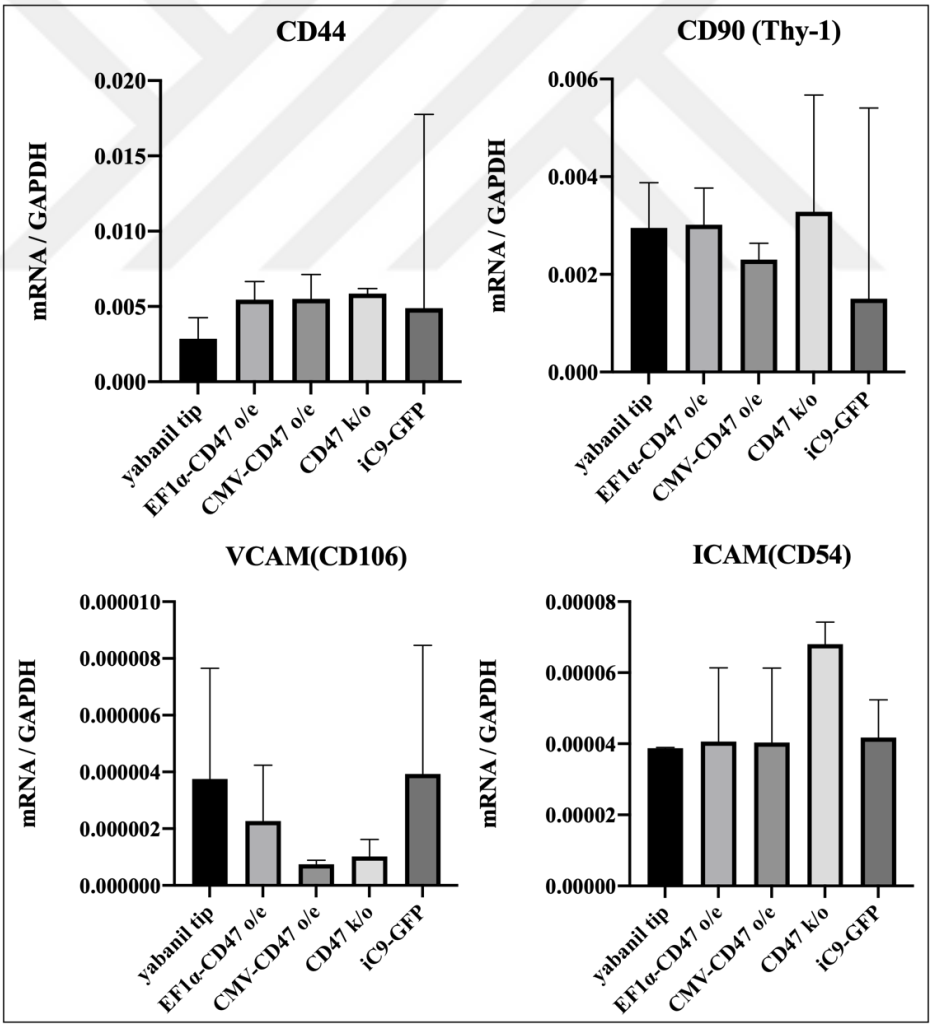
iC9-GFP Kİ-MKH'lar 24 kuyulu plakalara ekilmiştir. Bir gece sonra hücrelerin mediası içerisine 50 nM olacak şekilde CID eklenmiş ve floresan mikroskopta 2 saat boyunca hızlandırılmış çekime bırakılmıştır. Seri olarak çekilen fotoğraflar video hâline getirilmiştir. Video görüntüsü teze konulamadığı için videoyu oluşturan fotoğraflardan bazıları şekil 3.23'teki hâle getirilmiştir. Görüntülemede GFP içeren hücrelerin 2 saat içerisinde morfolojilerini kaybedip apoptoz benzeri ölüm gösterdikleri tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra GFP içermeyen yabanil tip hücrelerin morfolojilerini korudukları belirlenmiştir. Bu sonuçlar Annexin V/PI akış sitometrisi ve PI boyaması bulguları ile koreledir.



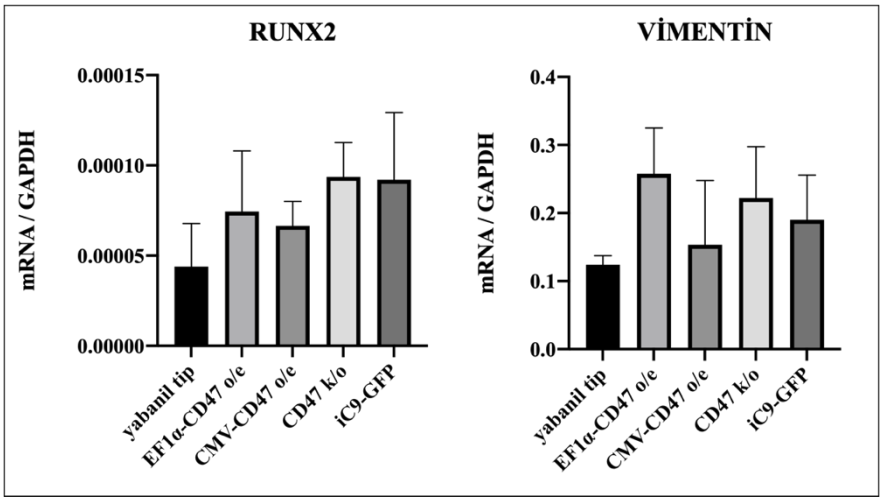
Şekil 3.23: iC9-GFP hücrelerinin 50 nM CID'a maruz bırakılmalarının ardından 2 saatlik floresan mikroskobu çekim sonuçları (ölçek çubuğu = 100µm; 10X objektif)

3.7. Gen Düzenleme Sonrası Elde Edilen Hücrelerin qPZR İle Karakterizasyonu

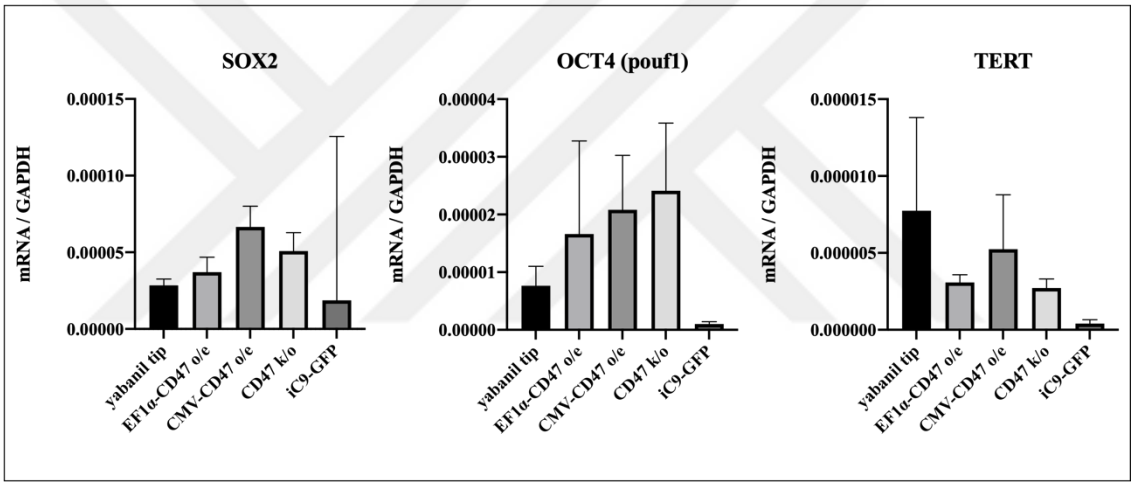
Yapılan gen düzenlemeler sonrası elde edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre karakterlerinde bir değişiklik yaratıp yaratmadığı qZPR ile analiz edilmiştir. Yabanil tip, EF1α-CD47, CMV-CD47, CD47 k/o ve iC9-GFP Kİ-MKH'larda karakterizasyon mezenkimal kök hücre yüzey belirteci olan CD90, CD44, Vcam, Icam; osteojenik farklılaşma belirteci olan RUNX2; hücre yapısının korunmasında rol oynayan Vimentin ve pluripotensi belirteçleri olan SOX2, OCT4 (poufl) ve TERT genlerinin mRNA ifadeleri ile değerlendirilmiştir. Tüm örneklerde genlerin ifadesi GAPDH geninin ifadesi göre normalize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar yabanil tip Kİ-MKH'lar ile kıyaslandığında ANOVA ile yapılan istatistiksel analizine göre anlamlı bir sonuç vermemiştir. Bu sonuçlar gen düzenleme sonrası hücrelerin MKH özelliklerini koruduğunu göstermektedir.



Şekil 3.24: MKH yüzey belirteçleri olan CD44, CD90, VCAM, ICAM genlerinin mRNA ifadeleri (ns:p>0,05)



Şekil 3.25: MKH osteojenik farklılaşma belirteci olan RUNX2 ve hücre yapısının korunmasında rol oynayan Vimentin geninin mRNA ifadesi (ns:p>0,05)



Şekil 3.26: MKH pluripotensi belirteçleri olan, SOX2, OCT4 ve TERT genlerinin mRNA ifadeleri (ns:p>0,05)

3.8. İleriye Yönelik Çalışmalar

Bu çalışmadan elde ettiğimiz veriler ileride yapılacak çalışmaları yönlendirmek için bilgi vermektedir. Projenin devamı olarak öncelikle CD47 aşırı ifade ettiğimiz Kİ-MKH'lar ile sitotoksik NK hücreleri etkileşim sonuçları farklı hücre canlılığı testleri ile desteklenecek, MKH'ların aktif NK hücreleri tarafından lize edilmesine sebep olan hücre-hücre etkileşimlerinin altında yatan moleküler mekanizma aydınlatılacaktır. Daha sonra bu sistem indüklenebilir kaspaz-9 sistemi ile birleştirilerek hem hipo-immunojenik hem de hücre ölümünü kontrol edebildiğimiz hücre hatları üretimi sağlanacaktır. Bu çalışmalar doğrultusunda gelecekte genetik manipülasyon ile tedavi edici özellikleri artırılmış MKH'ların güvenli bir şekilde klinik kullanımları mümkün kılınmaktadır.

4. TARTIŞMA

MKH'ların klinik uygulamalarda birçok hastalığın tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Ancak bazı limitasyonları vardır. Bu tez çalışmasının çıkış noktalarından biri literatürde gösterildiği üzere MKH'ların salgıladıkları sitokinlerle naif NK hücrelerinin proliferasyonunu ve sitotoksisitesini durdururken IL-2 ile önceden aktive olmuş NK'lar üzerinden bu etkiyi göstermemesidir. Ayrıca yapılan çalışmalar MKH-NK oranına bağlı olarak aktif NK'ların allojenik ve otolog MKH'ları lize edebildiğini göstermiştir (Abumaree ve ark., 2019; Aggarwal & Pittenger, 2005; Najar ve ark., 2018; P. De Miguel ve ark., 2012; Sotiropoulou ve ark., 2006; Spaggiari ve ark., 2006). Aktif NK'ların MKH'lar üzerinde gösterdiği bu etki klinikte kullanımda limitasyonlar yaratabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmalar üzerinden yola çıkarak ilk önce gen düzenleme yöntemi ile MKH'ların sitotoksik NK hücrelerinden kaçabilecek bir sistem oluşturulması planlanmıştır. Tez kapsamı dışında laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda Kİ-MKH'larda en uygun ve en verimli gen düzenleme yönteminin lentrivirüs olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca tez kapsamında yapılan gen düzenlemeler sonrası klinik uygulamalarda oluşabilecek bilinmeyen sorunlardan kurtulmak için kontrol edilebilir Kİ-MKH'lar tasarlanması üzerine çalışılmıştır.

Bu bağlamda ilk olarak gen düzenleme yöntemlerinde MKH'lar üzerinde verimliliği etkileyen kriterlenden biri olan promotörler üzerinde durulmuştur. En sık kullanılan CMV ve EF1α promotörünün verimlilikleri arasındaki fark değerlendirilmiştir.

İlk olarak analiz edilmesi kolay olduğu için GFP proteini üzerinden promotörler arasındaki fark incelenmiştir. EF1α-GFP ve CMV-GFP plazmitlerinin lentivirüs aracılı transdüksiyonu sonrası Kİ-MKH'lar floresan mikroskopta ve akış sitometrisinde görüntülenmiştir. Floresan mikroskop çekimlerinde görüldüğü üzere EF1α-GFP'de CMV-GFP'ye kıyasla ~%21 oranında daha fazla hücrede GFP ışıması olduğu saptanmış fakat ışımanın yoğunluğu CMV'ye göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde akış sitometrisinde de EF1α-GFP hücrelerin ~%80'ı GFP pozitifken CMV-GFP hücrelerinde ~%45'i GFP pozitif olarak belirlenmiştir. Qin ve ark. tarafından yapılan çalışmada GFP transdüksiyonu sonrası MKH'larda EF1α promotürünün CMV'ye göre daha verimli etki gösterdiği sunulmuştur (Qin ve ark., 2010). Elde edilen sonuçlar Kİ-MKH'larda EF1α promotörünün daha fazla hücrede; CMV promotörü daha yüksek verimlilikte protein ifadesi sağladığını göstermiştir. Bu nedenle EF1α promotörü,

progenitör hücrelerde hem yüksek düzeyde hem stabil bir transgen ifadesi sağlamak için tercih edilebilir.

MKH'ların kullanımına yönelik limitasyonlardan birinin NK hücreleri tarafından lizis edilmesi olduğu yukarıda bahsedilmiştir. MKH'ların aktif NK hücreleri tarafından tanınmamasını sağlamak amacıyla Kİ-MKH'larda lentivirüs aracılı genetik manipülasyon gerçekleştirilmiştir. CD47'nin aşırı ifadesi durumunda NK hücre yüzeyinde bulunan SIRPα ile etkileşime girerek "beni yeme sinyali" oluşturduğu bilindiğinden dolayı Kİ-MKH'larda CD47 geninin aşırı ifadesi sağlanmıştır. Ayrıca CD47 geninin hiç ifade edilmemesi durumunda NK hücreleri tarafından etkisini analiz etmek için CRISPR/Cas9 yöntemi ile Kİ-MKH'larda CD47 genini nakavt edilmiştir.

Kİ-MKH'larda lentivirüs aracılı trasdüksiyon sonrası EF1α-CD47 ve CMV-CD47 Kİ-MKH'larda hücre yüzeyinde bulunan CD47 miktarı akış sitometri ile incelenmiştir. Her iki promotör de yabanil tip Kİ-MKH'lara göre anlamlı bir ifade artışı oluşturmasına karşın birbirlerine kıyasla anlamlı bir değişim sağlamamıştır. Bunun yanı sıra total protein seviyesinde CD47 incelendiğinde de yine iki promotör yabanil tip Kİ-MKH'lara göre anlamlı miktarda artarken birbirlerine kıyasla anlamlı bir değişim göstermemiştir.

Buna karşın CD47 ifadesi seviyesi mRNA düzeyinde incelendiğinde EF1α-CD47 Kİ-MKH'larda hem yabanil tip hem CMV-CD47'a Kİ-MKH'lara kıyasla anlamlı bir artış sağladığı tespit edilmiştir. Ancak hücre yüzeyindeki CD47 proteini akış sitometrisi ve CD47 total proteini western emdirim ile analiz edildiğinde EF1α-CD47 ve CMV-CD47'nin CD47 ifadesilarında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür. Mcginley ve ark., tarafından MKH'larda pasaj sayısı ilerledikçe CMV promotörü içeren hücrelerin metillenerek kapandığı ve transkripsiyonun azaldığı gösterilmiştir (McGinley ve ark., 2011). Bu nedenle mRNA analizinde daha yüksek pasaj numaralı hücrelerin kullanımı CMV-CD47'nin EF1α-CD47 ye göre anlamlı bir şekilde az ifadesi göstermesinin CMV promotöründen kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Bu da daha erken pasajlarda yapılan akış sitometrisi ve western analizlerindeki sonuçlar ile mRNA sonuçları arasındaki farkı açıklamaktadır. Bu bilgiler birçok çalışmada gösterilen MKH'larda EF1α promotörünün epigenetik düzenlemeden etkilenmediği ve CMV promotörünün metilasyon kaynaklı ifadesida azalma sonuçları ile de uyumludur (McGinley ve ark., 2011; Qin ve ark., 2010; Škalamera ve ark., 2012; Wen ve ark., 2014).

MKH'larda CD47'nin hücre çoğalmasını kontrol etmede rol oynadığını ve CD47'nin baskılanmasının MKH'larda yaşlanma sürecini baskıladığı bilinmektedir (Deng ve ark., 2015; Kim ve ark., 2021). Kim ve ark., yapmış olduğu çalışmada MKH'larda pasaj sayısı arttıkça CD47 ifadesinin azaldığı gösterilmiştir ve CD47'nin MKH'larda yaşlanmayı tespit etmek veya hücrenin iyi çoğaldığını göstermek için CD47'nin kalite kontrol belirteci olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Kim ve ark., 2021). Tez kapsamında yapılan çalışmada düşük ve yüksek pasaj numaralarında Kİ-MKH'ların CD47 proteinin ifadesini western emdirim analizi ile değerlendirildiğinde Kim ve ark. çalışmasında olduğu gibi artan pasajlarda CD47 protein ifadesinin azaldığını gözlemlenmiştir (Şekil 3.10). Bu durum klinik kullanım açısından erken pasaj Kİ-MKH'ların kullanılması hücrelerin immün sistemden kaçmasında daha elverişli olduğunu göstermektedir. Yüksek pasaj numaralı MKH'ların immunmodülatör özelliklerinin azaldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Abolhasani ve ark., 2018; de Witte ve ark., 2017).

Kİ-MKH'lar ve NK'lar ile yaptığımız ön çalışma sonucunda naif NK hücrelerinin Kİ-MKH'lar üzerinde sitolitik bir etki göstermediği ancak IL-2 ile önceden aktive edilmiş NK'ların 1:5 (MKH:NK) oranında Kİ-MKH'ları etkili bir şekilde lize ettiği gösterilmiştir. Aynı şekilde, Najar ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada naif NK'lar MKH'lar üzerinde sitotoksik etki göstermezken aktif NK'ların 1:5 oranında MKH'ları lize ettiği gösterilmiştir. Ayrıca NK'lar IL-2, IL-12, IL-15 ve IL-21 ile kültürlenmiş ve lize edilme oranının en çok IL-2 ve IL-15 ile aktive edilmiş NK'ların sergilediği görülmüştür (Najar ve ark., 2018). Bir başka çalışmada ise IL-2 ile aktive olan NK hücrelerinin IFN-ɣ üretebildiğini, IL-15 ile aktive olan NK hücrelerinin ise sadece IL-12 ve/veya IL-18 ile birlikte kültürlendikten sonra sitokin ürettiği gösterilmiştir (Sotiropoulou ve ark., 2006). Ayrıca Thomas ve ark. yapmış olduğu çalışmada Kİ-MKH'ların hücre-hücre etkileşimi ve çözülebilir faktörler yoluyla, IL-12/IL-15 ile indüklenen NK92 hücrelerinde IFN-ɣ salınımını arttırdığı rapor edilmiştir (Thomas ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda Kİ-MKH'lar ile birlikte kültürlenen IL-2 ile aktive edilmiş NK'ların granzim salınımının Kİ-MKH'larda ROS üretimini tetiklediği ve bu nedenle hücre ölümünün gerçekleştiği gösterilmiştir (Najar ve ark., 2018). Elde edilen veriler klinik çalışmalarda aktif NK popülasyona sahip hastalara tedavi edici olarak uygulanan MKH'ların veya MKH uygulaması sırasında oluşabilecek enflamasyonun

vücutta IL-2'nin salgılanmasına neden olarak NK hücrelerini aktif hâle getirebileceğinden bu durumun, tedavinin verimliliği açısından değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir. Ayrıca bu veriler, kemik iliği transplantasyonunda engraftmanı iyileştirmek veya graft-versus-host hastalığını (GVHD) baskılamak için tasarlanmış yeni tedavi edici stratejilerde MKH'ların olası kullanımını değerlendirirken dikkate alınmalıdır. Ancak, ön çalışmalarda elde ettiğimiz veriler yeterli değildir. NK-MKH etkileşimlerinin farklı hücre canlılığı testleri ile desteklenmesi, hücre-hücre etkileşimleri altında yatan moleküler mekanizmanın açığa çıkarılması ve IFN-ɣ salınımının detaylı olarak çalışılması önerilmektedir.

Kİ-MKH'ların aktif NK'lar tarafından lize edilmemesi için yukarıda bahsedildiği gibi CD47 geni aşrı ifade edilmiştir. Yukarıda elde ettiğimiz sonuçlar literatürle de uyumlu olarak MKH'larda EF1α promotörünün stabil uzun süreli konstitüf ifadesi sağladığı ve CMV promotörünün aşırı ifadesi sağlamasına rağmen pasaj ilerledikçe metilasyon kaynaklı azalabileceğini göstermektedir (McGinley ve ark., 2011; Qin ve ark., 2010). Bu sebeple aşırı ifade sağlanmasında EF1α promotör temelli lentiviral ifade vektörü kullanarak ürettiğimiz EF1α-CD47 Kİ-MKH'ların aktif NK hücreleri üzerindeki etkisini inceledik. CD47 nakavt ettiğimiz Kİ-MKH'larda protein üretiminde yeterli susturma sağlanamadığı için deney akışına dahil edilmemiştir. Yabanil tip ve EF1α-CD47 Kİ-MKH'lar ile birlikte kültürlenen aktif NK hücrelerinin 1:5 oranında yabanil tip Kİ-MKH'ları lize ederek hücre miktarında azalmaya ve hücre morfolojisinde bozulmaya sebep olurken EF1α-CD47 Kİ-MKH'larda hücre sayısı ve morfolojisi korumaktadır. Deuse ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada iPKH'lerde MHC sınıf I ve sınıf II molekülerini inaktive edildiği, aynı zamanda CD47'nin aşırı ifade edildiği hücre hatları oluşturulmuştur. Bu hücre hatları aktive edilmiş NK hücrelerinin etkileşiminin incelenmesi sonucu iPKH'de aşırı ifade CD47 yüzey molekülünün NK hücrelerinin sitolitik aktivitesini engellediği belirtilmiştir (Deuse ve ark., 2019). Bizim de elde ettiğimiz ön bulgular CD47 aşırı ifadesinin MKH'ların aktif NK hücreleri tarafından lizisini önleyebileceğini göstermektedir. Ancak elde edilen bu bulgular yeterli değildir. Projenin ilerleyen kısımlarında aktif NK hücrelerinin CD47 aşırı ifade eden Kİ-MKH'lar üzerindeki etkisi farklı hücre canlılığı analizi metotları ile gösterilecektir. Elde ettiğimiz bu ön sonuçları destekleyecek şekilde yapılacak çalışmalar ile genetik manipülasyonların

MKH'ları hipoimmunojenik hâle getirebileceğine ve klinikte tedavilerin umut olabilecektir.

Genetik manipülasyon ile hücrelerde tedavi edici etkilerin arttırılmasıyla birlikte genetik manipülasyon kaynaklı ileriki çalışmalarda güvenlik sorunları oluşturup oluşturmayacağı bilinmemektedir. Bu sebeple hücre ölümünü kontrol edebilmek için inhihar geni olan indüklenebilir kaspaz-9 (iC9) içeren Kİ-MKH'ları tasarlanmıştır. iC9-GFP Kİ-MKH kimyasal dimerizasyon indükleyicisi (CID) ile aktive edilir ve doğrudan kaspaz yolunu aktive ederek iC9 genine sahip hücrelerde apoptozu indüklemektedir (Şekil 3.22) (Straathof ve ark., 2005a; Tsujimura ve ark., 2019; C. Wu ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda 1-100 nm AP20187 (CID) uygulanmasının MKH'larda apoptoz indüklediği gösterilmiştir (Rossignoli ve ark., 2018). Bu tez kapsamında benzer doz aralığı iC9-GFP Kİ-MKH'larda denenmiş ve 24 saat için en etkin dozun 50 nM olduğu tespit edilmiştir (data gösterilmemektedir). Floresan mikroskopta iC9-GFP genini alan Kİ-MKH'lar GFP filtresinde yeşil göründüğü için çekilen fotoğraflarda CID uygulaması sonrası ölen hücrelerin spesifik olarak gen aktarımı yapılmış olan hücreler olduğu açıkça görülmektedir. Bununla beraber yabanil tip Kİ-MKH'lara CID uygulaması sonrası hücrelerde apoptozun indüklenmediği akış sitometresinde görülmektedir. Çalışmamızda iC9-GFP Kİ-MKH'ların kontrol edilebilir şekilde lentivirüs aracılı gen düzenleme ile üretilebildiği gösterilmiştir. Ramos ve ark. tarafından yapılan *in vivo* çalışmada farelere verilen CID sonrası iC9-MKH'ların %99'unun öldüğü gösterilmiş ve kalanların da elemine edilmesi için ikinci doz CID verilebileceğini önerilmiştir (Ramos ve ark., 2010). Benzer şekilde Rossignoli ve arkadaşları iC9-TRAIL geni verdikleri adiposit türevli MKH'larda *in vitro*da 3 doz (24 saat boyunca 10 nm) CID uygulanmış fakat hâlâ bazı hücrelerin yaşadığını ve CID'a direnç geliştirdikleri bildirilmiştir (Rossignoli ve ark., 2018). Öte yandan klinik çalışmalar göstermiştir ki iC9 geni verilen T hücreleri hastalara verildikten sonra CID uygulamasına takiben hastalarda GVHD gelişmemiş ve güvenli bir biçimde bu sistem uygulanmıştır (Zhou ve ark., 2014, 2015).

Yapılan genetik manipülasyonlar sonrası oluşturulan hücre hatlarının karakterizasyonunda bir değişiklik olup olmadığını tespit etmek için yüzey belirteci olan CD90, CD44, Vcam, Icam; osteojenik farklılaşma belirteci olan RUNX2; pluripotensi belirteçleri olan SOX-2, OCT-4 ve vimentin ile TERT genlerinin ifadesiları qPZR ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar yabanil tip Kİ-MKH'lar ile kıyaslandığında gen

seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu da Kİ-MKH'ların yapılan gen manipülasyonları sonrası mezenkimal kök hücre karakterlerini koruduklarını göstermektedir.

5. SONUÇ

Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler EF1α promotör temelli ifadesi vektörü lentivirüs aracılı gen aktarım yöntemi kullanılarak CD47 aşırı ifade Kİ-MKH'ların verimli bir şekilde üretilebildiği gösterilmiştir. Aktif NK hücrelerinin CD47 aşırı ifade eden Kİ-MKH'ları lize edemediğini gösterdiğimiz bu tez çalışmasında hipoimmunojenik Kİ-MKH'lar tasarlanabileceği gösterilmiştir. Ancak NK hücreleri ile yapılan ko-kültür deneylerinden elde edilen veriler yeterli değildir. Projenin ilerleyen kısımlarında NK-MKH etkileşimleri daha detaylı incelencek, çeşitli hücre canlılık testleri ile araştırılacak ve hücre-hücre etkileşimleri altında yatan moleküler mekanizma değerlendirilecektir.

Ayrıca tez çalışması kapsamında iC9 geni içeren, klinik kullanımlarda güvenli olan bir hücre ölümü indükleyicisi aracılığı ile kontrol edilebilir Kİ-MKH'lar oluşturulmuştur. Bu sistem gen düzenleme yöntemi ile tedavi edici özelliklerini arttırdığımız MKH'ların klinik kullanımlarını güvenli hâle getirmeyi hedeflemektedir. İleride CD47 aşırı ifade eden ve iC9 geni içeren, bu iki sistemin birleştirildiği, hem hipoimmunojenik hem de kontrol edibilir MKH'lar üretilmesi planmaktadır. Bu tez çalışmasından elde edilen veriler ise ileride yapılacak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla desteklenerek klinik uygulamalarda MKH'ların daha etkili kullanımına yön gösterecektir.

KAYNAKÇA

Abolhasani, M., Rezaee, M. A., Mohammadi, M., Ghadimi, T., Mohammadi, M., & Rahmani, M. R. (2018). Immunomodulatory properties of umbilical cord vein mesenchymal stromal cells influenced by gestational age and in vitro expansion. *Immunology Letters*, *194*, 62–68. https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2017.11.008

Abumaree, M. H., Alshehri, N. A., Almotery, A., Al Subayyil, A. M., Bahattab, E., Abomaray, F. M., Khatlani, T., Kalionis, B., Jawdat, D., El-Muzaini, M. F., Al Jumah, M. A., & Alaskar, A. S. (2019). Preconditioning human natural killer cells with chorionic villous mesenchymal stem cells stimulates their expression of inflammatory and anti-tumor molecules. *Stem Cell Research and Therapy*, *10*(1), 1–15. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1153-9

Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, *105*(4), 1815–1822. https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559

Anderson, P., Carrillo-Gálvez, A. B., García-Pérez, A., Cobo, M., & Martín, F. (2013). CD105 (Endoglin)-Negative Murine Mesenchymal Stromal Cells Define a New Multipotent Subpopulation with Distinct Differentiation and Immunomodulatory Capacities. *PLoS ONE*, *8*(10), 1–13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076979

Anft, M., Netter, P., Urlaub, D., Prager, I., Schaffner, S., & Watzl, C. (2020). NK cell detachment from target cells is regulated by successful cytotoxicity and influences cytokine production. *Cellular & Molecular Immunology*, *17*(4), 347–355. https://doi.org/10.1038/S41423-019-0277-2

Arora, L., & Narula, A. (2017). Gene editing and crop improvement using CRISPR-cas9 system. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1932. https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.01932/BIBTEX

Boissel, L., Tuncer, H. H., Betancur, M., Wolfberg, A., & Klingemann, H. (2008). Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Increase Expansion of Cord Blood Natural Killer Cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, *14*(9), 1031–1038. https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2008.06.016

Brandstadter, J. D., & Yang, Y. (2011). Natural killer cell responses to viral infection.

Journal of Innate Immunity, *3*(3), 274–279. https://doi.org/10.1159/000324176

Brown, N., Song, L., Kollu, N. R., & Hirsch, M. L. (2017). Adeno-Associated Virus Vectors and Stem Cells: Friends or Foes? *Human Gene Therapy*, *28*(6), 450–463. https://doi.org/10.1089/hum.2017.038

Cevher, E., Sezer, A. D., & Çağlar, E. S. (2012). Gene Delivery Systems: Recent Progress in Viral and Non-Viral Therapy. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*. https://doi.org/10.5772/53392

Chang, J., Tang, L., Lei, H., Zhang, X. G., Zuo, Z., Huang, W., & Fu, H. (2014). Effects of lentiviral infection of mesenchymal stem cells on the expression of octamer transcription factor 4. *Molecular Medicine Reports*, *10*(5), 2249–2254. https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2505

Chen, X., Song, M., Zhang, B., & Zhang, Y. (2016). Reactive Oxygen Species Regulate T Cell Immune Response in the Tumor Microenvironment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*. https://doi.org/10.1155/2016/1580967

Chng, K., Larsen, S. R., Zhou, S., Wright, J. F., Martiniello-Wilks, R., & Rasko, J. E. J. (2007). Specific adeno-associated virus serotypes facilitate efficient gene transfer into human and non-human primate mesenchymal stromal cells. *Journal of Gene Medicine*, *9*, 22–32. https://doi.org/10.1002/jgm

Choi, Y. H., Lim, E. J., Kim, S. W., Moon, Y. W., Park, K. S., & An, H. J. (2019). IL-27 enhances IL-15/IL-18-mediated activation of human natural killer cells. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *7*(1), 1–12. https://doi.org/10.1186/S40425-019-0652-7/FIGURES/4

Cofano, F., Boido, M., Monticelli, M., Zenga, F., Ducati, A., Vercelli, A., & Garbossa, D. (2019). Mesenchymal Stem Cells for Spinal Cord Injury: Current Options, Limitations, and Future of Cell Therapy. *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 2698*, *20*(11), 2698. https://doi.org/10.3390/IJMS20112698

Connoly, J. B. (2002). Lentiviruses in gene therapy clinical research. *Gene Therapy*, *9*(24), 1730–1734. https://doi.org/10.1038/SJ.GT.3301893

Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso,

M., Gualandi, F., Mancardi, G. L., Pistoia, V., & Uccelli, A. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, *107*(1), 367–372. https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2657

de Witte, S. F. H., Lambert, E. E., Merino, A., Strini, T., Douben, H. J. C. W., O'Flynn, L., Elliman, S. J., de Klein, A. J. E. M. M., Newsome, P. N., Baan, C. C., & Hoogduijn, M. J. (2017). Aging of bone marrow- and umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells during expansion. *Cytotherapy*, *19*(7), 798–807. https://doi.org/10.1016/J.JCYT.2017.03.071

Deng, W., Chen, Q. W., Li, X. S., Yuan, Z. M., Li, G. Q., Ke, D. Z., Wang, L., Wu, Z. Q., & Luo, S. L. (2015). Bone marrow mesenchymal stromal cells with CD47 high expression via the signal transducer and activators of transcription signaling pathway preventing myocardial fibrosis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *8*(9), 10555–10564. /pmc/articles/PMC4637580/?report=abstract

Deuse, T., Hu, X., Agbor-Enoh, S., Jang, M. K., Alawi, M., Saygi, C., Gravina, A., Tediashvili, G., Nguyen, V. Q., Liu, Y., Valantine, H., Lanier, L. L., & Schrepfer, S. (2021). The SIRPα-CD47 immune checkpoint in NK cells. *Journal of Experimental Medicine*, *218*(3). https://doi.org/10.1084/JEM.20200839/211668

Deuse, T., Hu, X., Gravina, A., Wang, D., Tediashvili, G., De, C., Thayer, W. O., Wahl, A., Garcia, J. V., Reichenspurner, H., Davis, M. M., Lanier, L. L., & Schrepfer, S. (2019). Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients. *Nature Biotechnology*, *37*(March). https://doi.org/10.1038/s41587-019-0016-3

Dizman, N., & Buchbinder, E. I. (2021). Cancer Therapy Targeting CD47/SIRPα. *Cancers*, *13*(24), 6229. https://doi.org/10.3390/CANCERS13246229

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317. https://doi.org/10.1080/14653240600855905

Doudna, J. A. (2020). The promise and challenge of therapeutic genome editing.

Nature, *578*(7794), 229–236. https://doi.org/10.1038/s41586-020-1978-5

Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V, Kurolesova, A. I., & Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. In *Transplantation* (Vol. 6, Issue 2, pp. 230–247). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5654088

Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., & Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, *16*(3), 381–390.

Gianchecchi, E., Delfino, D. V., & Fierabracci, A. (2018). NK cells in autoimmune diseases: Linking innate and adaptive immune responses. *Autoimmunity Reviews*, *17*(2), 142–154. https://doi.org/10.1016/J.AUTREV.2017.11.018

Glenn, J. D. (2014). Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World Journal of Stem Cells*, *6*(5), 526. https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.526

Gnecchi, M., & Melo, L. G. (2009). Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Isolation, Expansion, Characterization, Viral Transduction, and Production of Conditioned Medium. *Stem Cells in Regenerative Medicine*, *482*. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-060-7

Grimm, D., & Kay, M. (2003). From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Current Gene Therapy*, *3*(4), 281–304. https://doi.org/10.2174/1566523034578285

Ha, H. (2019). Validate CRISPR-edited Cells using Imaging and Western Emdirim Detection on a Microplate Reader | Molecular Devices. *Molecular Devices*, *1*(1).

Hauser, P. V., De Fazio, R., Bruno, S., Sdei, S., Grange, C., Bussolati, B., Benedetto, C., & Camussi, G. (2010). Stem cells derived from human amniotic fluid contribute to acute kidney injury recovery. *American Journal of Pathology*, *177*(4), 2011–2021. https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091245

Hida, N., Nishiyama, N., Miyoshi, S., Kira, S., Segawa, K., Uyama, T., Mori, T., Miyado, K., Ikegami, Y., Cui, C., Kiyono, T., Kyo, S., Shimizu, T., Okano, T.,

Sakamoto, M., Ogawa, S., & Umezawa, A. (2008). Novel Cardiac Precursor-Like Cells from Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Cells. *Stem Cells*, *26*(7), 1695–1704. https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0826

Hille, F., & Charpentier, E. (2016). CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *371*(1707). https://doi.org/10.1098/RSTB.2015.0496

Huang, L., You, J., Yao, Y., & Xie, M. (2020). Interleukin-13 Gene Modification Enhances Grafted Mesenchymal Stem Cells Survival After Subretinal Transplantation. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *40*(5), 725–735. https://doi.org/10.1007/S10571-019-00768-3/FIGURES/6

Iuliucci, J. D., Oliver, S. D., Morley, S., Ward, C., Ward, J., Dalgarno, D., Clackson, T., & Berger, H. J. (2001). Intravenous Safety and Pharmacokinetics of a Novel Dimerizer Drug, AP1903, in Healthy Volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology*, *41*(8), 870–879. https://doi.org/10.1177/00912700122010771

Ivics, Z. (2015). Self-Destruct Genetic Switch to Safeguard iPS Cells. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *23*(9), 1417–1420. https://doi.org/10.1038/MT.2015.139

Javan, M. R., Khosrojerdi, A., & Moazzeni, S. M. (2019). New insights into implementation of mesenchymal stem cells in cancer therapy: Prospects for anti-angiogenesis treatment. *Frontiers in Oncology*, *9*(AUG), 1–17. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00840

Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, *46*, 505–529. https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOPHYS-062215-010822

Jiang, W., & Xu, J. (2020). Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*, *53*(1), 1–16. https://doi.org/10.1111/cpr.12712

Ju, X. D., Lou, S. Q., Wang, W. G., Peng, J. Q., & Tian, H. (2004). Effect of hydroxyurea and etoposide on transduction of human bone marrow mesenchymal stem and progenitor cell by adeno-associated virus vectors. *Acta Pharmacologica Sinica*, *25*(2), 196–202.

Kane, N. M., McRae, S., Denning, C., & Baker, A. H. (2008). Viral and non-viral gene delivery and its role in pluripotent stem cell engineering. *Drug Discovery Today: Technologies*, *5*(4), e107–e115. https://doi.org/10.1016/J.DDTEC.2008.10.002

Karaöz, E., Demircan, P. Ç., Erman, G., Güngörürler, E., & Sarıboyacı, A. E. (2017a). Comparative Analyses of Immunosuppressive Characteristics of Bone-Marrow, Wharton's Jelly, and Adipose Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells. *Turkish Journal of Hematology*, *34*(3), 213–225. https://doi.org/10.4274/TJH.2016.0171

Karaöz, E., Demircan, P. Ç., Erman, G., Güngörürler, E., & Sarıboyacı, A. E. (2017b). Kemik İliği, Wharton Jölesi ve İnsan Yağ Doku-Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünsüpresif Özelliklerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. *Turkish Journal of Hematology*, *34*(3), 213–225. https://doi.org/10.4274/tjh.2016.0171

Karaöz, E., Doğan, B. N., Aksoy, A., Gacar, G., Akyüz, S., Ayhan, S., Genç, Z. S., Yürüker, S., Duruksu, G., Demircan, P. Ç., & SarIboyacI, A. E. (2010). Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochemistry and Cell Biology*, *133*(1), 95–112. https://doi.org/10.1007/s00418-009-0646-5

Kaygisiz, K., & Synatschke, C. V. (2020). Materials promoting viral gene delivery. *Biomaterials Science*, *8*(22), 6113–6156. https://doi.org/10.1039/D0BM01367F

Kim, G. H., Bae, Y. K., Kwon, J. H., Kim, M., Choi, S. J., Oh, W., Um, S., & Jin, H. J. (2021). Positively Correlated CD47 Activation and Autophagy in Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells during Senescence. *Stem Cells International*, *2021*. https://doi.org/10.1155/2021/5582792

Lee, B. C., & Kang, K. S. (2020). Functional enhancement strategies for immunomodulation of mesenchymal stem cells and their therapeutic application. *Stem Cell Research and Therapy*, *11*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/S13287-020-01920-3/TABLES/2

Levine, B. L., Miskin, J., Wonnacott, K., & Keir, C. (2017). Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, *4*(March), 92–101. https://doi.org/10.1016/j.omtm.2016.12.006

Li, C., Zhao, H., Cheng, L., & Wang, B. (2021). Allogeneic vs. autologous mesenchymal stem/stromal cells in their medication practice. *Cell & Bioscience 2021 11:1*, *11*(1), 1–21. https://doi.org/10.1186/S13578-021-00698-Y

Li, M., Jayandharan, G. R., Li, B., Ling, C., Ma, W., Srivastava, A., & Zhong, L. (2010). High-efficiency transduction of fibroblasts and mesenchymal stem cells by tyrosine-mutant AAV2 vectors for their potential use in cellular therapy. *Human Gene Therapy*, *21*(11), 1527–1543. https://doi.org/10.1089/HUM.2010.005

Li, Y., Lu, S., Xu, Y., Qiu, C., Jin, C., Wang, Y., Liu, Z., & Kong, B. (2017). Overexpression of CD47 predicts poor prognosis and promotes cancer cell invasion in high-grade serous ovarian carcinoma. *American Journal of Translational Research*, *9*(6), 2901–2910. /pmc/articles/PMC5489890/?report=abstract

Lian, S., Xie, X., Lu, Y., & Jia, L. (2019a). Checkpoint CD47 function on tumor metastasis and immune therapy. In *OncoTargets and Therapy* (Vol. 12, pp. 9105–9114). Dove Medical Press Ltd. https://doi.org/10.2147/OTT.S220196

Lian, S., Xie, X., Lu, Y., & Jia, L. (2019b). Checkpoint CD47 function on tumor metastasis and immune therapy. In *OncoTargets and Therapy* (Vol. 12, pp. 9105–9114). Dove Medical Press Ltd. https://doi.org/10.2147/OTT.S220196

Lin, A. W., Gonzalez, S. A., Cunningham-Rundles, S., Dorante, G., Marshall, S., Tignor, A., Ha, C., Jacobson, I. M., & Talal, A. H. (2004). CD56+dim and CD56+bright cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection. *Clinical & Experimental Immunology*, *137*(2), 408–416. https://doi.org/10.1111/J.1365-2249.2004.02523.X

Lin, P., Lin, Y., Lennon, D. P., Correa, D., Schluchter, M., & Caplan, A. I. (2012). Efficient Lentiviral Transduction of Human Mesenchymal Stem Cells That Preserves Proliferation and Differentiation Capabilities. *Stem Cells Translational Medicine*, *1*(12), 886–897. https://doi.org/10.5966/SCTM.2012-0086

Mamcarz, E., Therapy, C., Zhou, S., Lockey, T., Production, T., Abdelsamed, H., Cross, S. J., Kang, G., Condori, J., Dowdy, J., Triplett, B., Therapy, C., Li, C., Maron, G., & Becerra, J. C. A. (2019). Lentiviral Gene Therapy Combined with Low-Dose Busulfan in Infants with SCID-X1. *New England Journal of Medicine*, *380*(16),

1525–1534. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1815408.Lentiviral

McCracken, M. N., Cha, A. C., & Weissman, I. L. (2015). Molecular pathways: Activating T cells after cancer cell phagocytosis from blockade of CD47 “Don’t eat Me” signals. *Clinical Cancer Research*, *21*(16), 3597–3601. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2520

McGinley, L., McMahon, J., Strappe, P., Barry, F., Murphy, M., O’Toole, D., & O’Brien, T. (2011). Lentiviral vector mediated modification of mesenchymal stem cells & enhanced survival in an in vitro model of ischaemia. *Stem Cell Research and Therapy*, *2*(2), 1–18. https://doi.org/10.1186/SCRT53/FIGURES/8

Meyerrose, T. E., Roberts, M., Ohlemiller, K. K., Vogler, C. A., Wirthlin, L., Nolta, J. A., & Sands, M. S. (2008). Lentiviral-Transduced Human Mesenchymal Stem Cells Persistently Express Therapeutic Levels of Enzyme in a Xenotransplantation Model of Human Disease. *Stem Cells*, *26*(7), 1713–1722. https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0008.Lentiviral-Transduced

Miyazaki, M., Obata, Y., Abe, K., Furusu, A., Koji, T., Tabata, Y., & Kohno, S. (2006). Gene transfer using nonviral delivery systems. *Peritoneal Dialysis International*, *26*(6), 633–640. https://doi.org/10.1177/089686080602600603

Najar, M., Fayyad-Kazan, M., Meuleman, N., Bron, D., Fayyad-Kazan, H., & Lagneaux, L. (2018). Mesenchymal stromal cells of the bone marrow and natural killer cells: cell interactions and cross modulation. *Journal of Cell Communication and Signaling*, *12*(4), 673–688. https://doi.org/10.1007/s12079-018-0448-4

Nicola, M. Di, Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanesi, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S., & Gianni, A. M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, *99*(10), 3838–3843. https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3838

Nolta, J. A., Galipeau, J., & Phinney, D. G. (2020). Improving mesenchymal stem/stromal cell potency and survival: Proceedings from the International Society of Cell Therapy (ISCT) MSC preconference held in May 2018, Palais des Congrès de Montréal, Organized by the ISCT MSC Scientific Committee. *Cytotherapy*, *22*(3), 123–126. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.01.004

Oggu, G. S., Sasikumar, S., Reddy, N., Ella, K. K. R., Rao, C. M., & Bokara, K. K. (2017). Gene Delivery Approaches for Mesenchymal Stem Cell Therapy: Strategies to Increase Efficiency and Specificity. *Stem Cell Reviews and Reports*, *13*(6), 725–740. https://doi.org/10.1007/s12015-017-9760-2

P. De Miguel, M., Fuentes-Julian, S., Blazquez-Martinez, A., Y. Pascual, C., A. Aller, M., Arias, J., & Arnalich-Montiel, F. (2012). Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells: Advances and Applications. *Current Molecular Medicine*, *12*(5), 574–591. https://doi.org/10.2174/156652412800619950

Pham, L. H., Vu, N. B., & Van Pham, P. (2019). The subpopulation of CD105 negative mesenchymal stem cells show strong immunomodulation capacity compared to CD105 positive mesenchymal stem cells. *Biomedical Research and Therapy*, *6*(4), 3131–3140. https://doi.org/10.15419/bmrat.v6i4.538

Picanco-Castro, V., Moco, P. D., Mizukami, A., Vaz, L. D., Pereira, M. de S. F., Silvestre, R. N., Azevedo, J. T. C. de, Bomfim, A. de S., Neto, M. S. de A., Mal, K. C. R., & Covas, D. T. (2019). Establishment of a simple and efficient platform for car-t cell generation and expansion : from lentiviral production to in vivo studies. *Hematology, Transfusion and Cell Therapyv*, *x x*, 1–9.

Pisano, F., Mura, M., Ciuffreda, M. C., Calabrò, F., Lanzo, N., & Gnecchi, M. (2018). Optimized lentiviral transduction of human amniotic mesenchymal stromal cells. *Pharmacological Research*, *127*, 49–57. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.11.014

Prager, I., & Watzl, C. (2019). Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *Journal of Leukocyte Biology*, *105*(6), 1319–1329. https://doi.org/10.1002/JLB.MR0718-269R

Qin, J. Y., Zhang, L., Clift, K. L., Hulur, I., Xiang, A. P., Ren, B. Z., & Lahn, B. T. (2010). Systematic Comparison of Constitutive Promoters and the Doxycycline-Inducible Promoter. *PLOS ONE*, *5*(5), e10611. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010611

Ramamoorth, M., & Narvekar, A. (2015). Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, *9*(1), GE01. https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/10443.5394

Ramos, C. A., Asgari, Z., Liu, E., Yvon, E., Heslop, H. E., Rooney, C. M., Brenner, M. K., & Dotti, G. (2010). An Inducible Caspase 9 Suicide Gene to Improve the Safety of Mesenchymal Stromal Cell Therapies. *STEM CELLS*, *28*(6), 1107–1115. https://doi.org/10.1002/STEM.433

Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols 2013 8:11*, *8*(11), 2281–2308. https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143

Rossignoli, F., Grisendi, G., Spano, C., Golinelli, G., Recchia, A., Rovesti, G., Orsi, G., Veronesi, E., Horwitz, E. M., & Dominici, M. (2018). Inducible Caspase9-mediated suicide gene for MSC-based cancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy 2018 26:1*, *26*(1), 11–16. https://doi.org/10.1038/s41417-018-0034-1

Ryan, J. M., Barry, F. P., Murphy, J. M., & Mahon, B. P. (2005). Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of Inflammation*, *2*, 1–11. https://doi.org/10.1186/1476-9255-2-8

Ryø, L. B., Thomsen, E. A., & Mikkelsen, J. G. (2019). Production and Validation of Lentiviral Vectors for CRISPR/Cas9 Delivery. *Methods in Molecular Biology*, *1961*, 93–109. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9170-9_7

S.Nayak, Roland, M. S., & Herzog, W. (2010). Progress and prospects: immune responses to viral vectors. *Gene Therapy*, *17*(3), 295–304. https://doi.org/10.1038/gt.2009.148.Progress

Savić, N., & Schwank, G. (2016). Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Translational Research*, *168*, 15–21. https://doi.org/10.1016/J.TRSL.2015.09.008

Secco, M., Zucconi, E., Vieira, N. M., Fogaça, L. L. Q., Cerqueira, A., Carvalho, M. D. F., Jazedje, T., Okamoto, O. K., Muotri, A. R., & Zatz, M. (2008). Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord Is Richer than Blood! *Stem Cells*, *26*(1), 146–150. https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0381

Shahror, R. A., Wu, C. C., Chiang, Y. H., & Chen, K. Y. (2020). Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells: The Next Generation of Stem Cell-Based Therapy for TBI. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(11), 1–17.

https://doi.org/10.3390/IJMS21114051

Shankar, K., Capitini, C. M., Capitini, C. M., Saha, K., Saha, K., & Saha, K. (2020). Genome engineering of induced pluripotent stem cells to manufacture natural killer cell therapies. *Stem Cell Research & Therapy 2020 11:1*, *11*(1), 1–14. https://doi.org/10.1186/S13287-020-01741-4

Sharma, R., & Das, A. (2018). IL-2 mediates NK cell proliferation but not hyperactivity. *Immunologic Research*, *66*(1), 151–157. https://doi.org/10.1007/S12026-017-8982-3/FIGURES/5

Škalamera, D., Dahmer, M., Purdon, A. S., Wilson, B. M., Ranall, M. V., Blumenthal, A., Gabrielli, B., & Gonda, T. J. (2012). Generation of a Genome Scale Lentiviral Vector Library for EF1α Promoter-Driven Expression of Human ORFs and Identification of Human Genes Affecting Viral Titer. *PLOS ONE*, *7*(12), e51733. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0051733

Song, M., Kim, Y. H., Kim, J. S., & Kim, H. (2014). Genome engineering in human cells. In *Methods in Enzymology* (Vol. 546, Issue C, pp. 93–118). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00005-2

Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N., & Papamichail, M. (2006). Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells. *Stem Cells*, *24*(1), 74–85. https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0359

Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*, *111*(3), 1327–1333. https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-074997

Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2006). Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: Evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, *107*(4), 1484–1490. https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2775

Straathof, K. C., Pulè, M. A., Yotnda, P., Dotti, G., Vanin, E. F., Brenner, M. K.,

Heslop, H. E., Spencer, D. M., & Rooney, C. M. (2005a). An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*, *105*(11), 4247–4254. https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-11-4564

Straathof, K. C., Pulè, M. A., Yotnda, P., Dotti, G., Vanin, E. F., Brenner, M. K., Heslop, H. E., Spencer, D. M., & Rooney, C. M. (2005b). An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*, *105*(11), 4247–4254. https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-11-4564

Thakore, P. I., & Gersbach, C. A. (2015). Genome Engineering for Therapeutic Applications. In *Translating Gene Therapy to the Clinic: Techniques and Approaches* (pp. 27–43). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800563-7.00003-8

Thomas, H., Jäger, M., Mauel, K., Brandau, S., Lask, S., & Flohé, S. B. (2014). Interaction with mesenchymal stem cells provokes natural killer cells for enhanced IL-12/IL-18-induced interferon-gamma secretion. *Mediators of Inflammation*, *2014*. https://doi.org/10.1155/2014/143463

Tsai, S. Q., Zheng, Z., Nguyen, N. T., Liebers, M., Topkar, V. V., Thapar, V., Wyvekens, N., Khayter, C., Iafrate, A. J., Le, L. P., Aryee, M. J., & Joung, J. K. (2014). GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nature Biotechnology 2014 33:2*, *33*(2), 187–197. https://doi.org/10.1038/nbt.3117

Tsujimura, M., Kusamori, K., & Nishikawa, M. (2019). Rapid Regulation of Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation Using Inducible Caspase-9 Suicide Gene for Safe Cell-Based Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(22). https://doi.org/10.3390/IJMS20225759

Ugurlu, B., & Karaoz, E. (2020). Comparison of similar cells: Mesenchymal stromal cells and fibroblasts. *Acta Histochemica*, *122*(8), 151634. https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2020.151634

Wang, D., Tai, P. W. L., & Gao, G. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 18, Issue 5, pp. 358–378). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9

Wang, M., Yuan, Q., & Xie, L. (2018). Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem Cells International*, *2018*. https://doi.org/10.1155/2018/3057624

Wen, S., Zhang, H., Li, Y., Wang, N., Zhang, W., Yang, K., Wu, N., Chen, X., Deng, F., Liao, Z., Zhang, J., Zhang, Q., Yan, Z., Liu, W., Zhang, Z., Ye, J., Deng, Y., Zhou, G., Luu, H. H., … Wei, G. (2014). Characterization of Constitutive Promoters for piggyBac Transposon-Mediated Stable Transgene Expression in Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *PLOS ONE*, *9*(4), e94397. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0094397

Wu, C., Hong, S. G., Winkler, T., Spencer, D. M., Jares, A., Ichwan, B., Nicolae, A., Guo, V., Larochelle, A., & Dunbar, C. E. (2014). Development of an inducible caspase-9 safety switch for pluripotent stem cell–based therapies. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, *1*, 14053. https://doi.org/10.1038/MTM.2014.53/ATTACHMENT/805BA8C6-DDAF-4E88-85EF-5C69A901FD27/MMC1.PDF

Wu, Z., Yang, H., & Colosi, P. (2010). Effect of genome size on AAV vector packaging. *Molecular Therapy*, *18*(1), 80–86. https://doi.org/10.1038/mt.2009.255

Xie, X., Zhao, X., Liu, Y., Zhang, J., Matusik, R. J., Slawin, K. M., & Spencer, D. M. (2001). Adenovirus-mediated Tissue-targeted Expression of a Caspase-9-based Artificial Death Switch for the Treatment of Prostate Cancer 1. *CANCER RESEARCH*, *61*, 6795–6804.

Yoon, D. S., Lee, K. M., Cho, S., Ko, E. A., Kim, J., Jung, S., Shim, J. H., Gao, G., Park, K. H., & Lee, J. W. (2021). Cellular and tissue selectivity of aav serotypes for gene delivery to chondrocytes and cartilage. *International Journal of Medical Sciences*, *18*(15), 3353–3360. https://doi.org/10.7150/IJMS.56760

Zannettino, A. C. W., Paton, S., Arthur, A., Khor, F., Itescu, S., Gimble;, J. M., & Gronthos, S. (2008). Multipotential Human Adipose-Derived Stromal Stem Cells Exhibit a Perivascular Phenotype In Vitro and In Vivo. *Journal Cellular Physiology*, *214*(2), 413–421. https://doi.org/10.1002/JCP

Zhang, H., Tang, X., Wang, C., & Sun, L. (2018). AB0063 High-efficiency transduction of mesenchymal stem cells by aav2/dj vector for their potential use in autoimmune

diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *77*(Suppl 2), 1230–1230. https://doi.org/10.1136/ANNRHEUMDIS-2018-EULAR.5014

Zhang, J., Huang, X., Wang, H., Liu, X., Zhang, T., Wang, Y., & Hu, D. (2015). The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. *Stem Cell Research and Therapy*, *6*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/s13287-015-0240-9

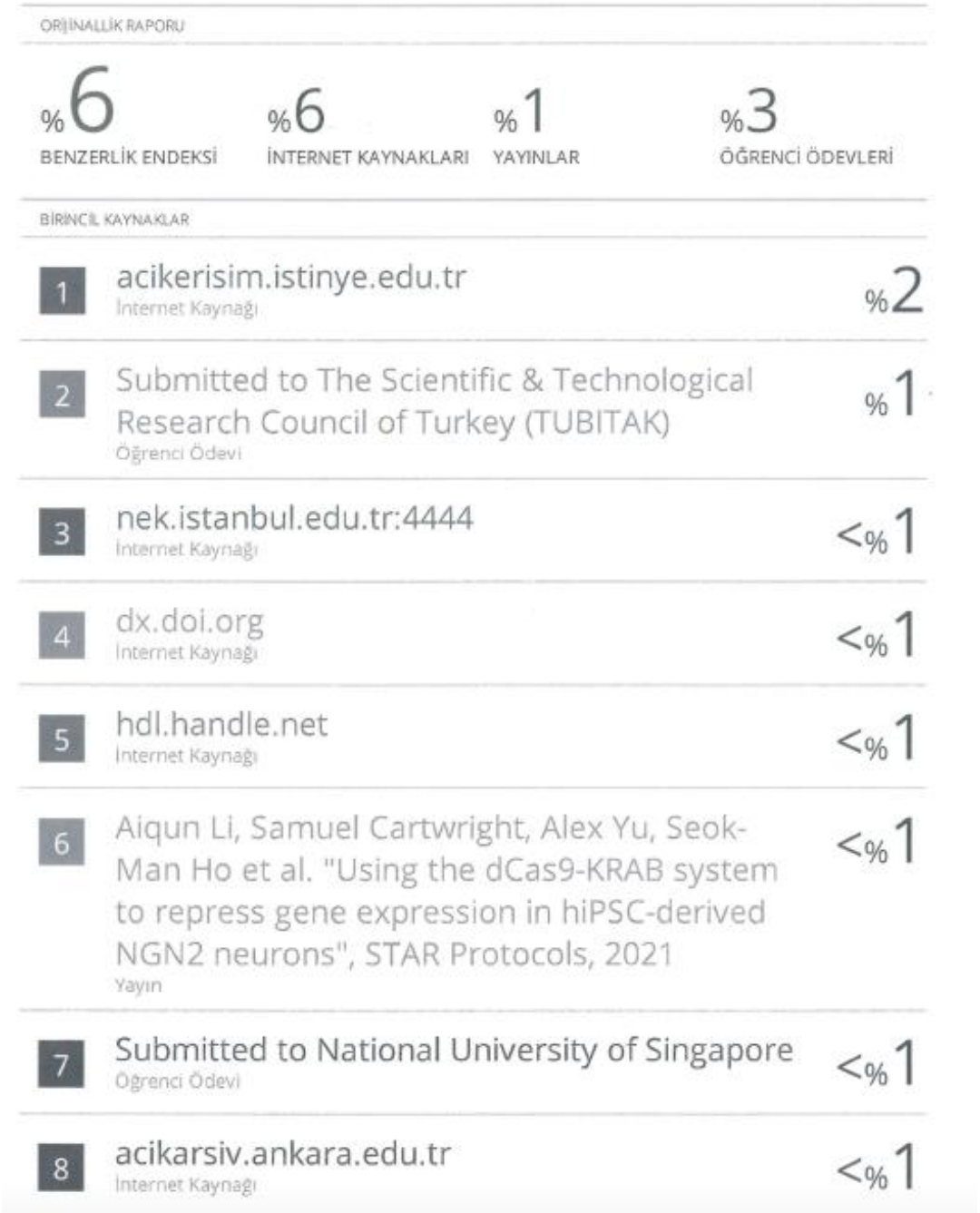
Zhou, X., Di Stasi, A., Tey, S. K., Krance, R. A., Martinez, C., Leung, K. S., Durett, A. G., Wu, M. F., Liu, H., Leen, A. M., Savoldo, B., Lin, Y. F., Grilley, B. J., Gee, A. P., Spencer, D. M., Rooney, C. M., Heslop, H. E., Brenner, M. K., & Dotti, G. (2014). Long-term outcome after haploidentical stem cell transplant and infusion of T cells expressing the inducible caspase 9 safety transgene. *Blood*, *123*(25), 3895. https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-01-551671

Zhou, X., Dotti, G., Krance, R. A., Martinez, C. A., Naik, S., Kamble, R. T., Durett, A. G., Dakhova, O., Savoldo, B., Stasi, A. Di, Spencer, D. M., Lin, Y. F., Liu, H., Grilley, B. J., Gee, A. P., Rooney, C. M., Heslop, H. E., & Brenner, M. K. (2015). Inducible caspase-9 suicide gene controls adverse effects from alloreplete T cells after haploidentical stem cell transplantation. *Blood*, *125*(26), 4103–4113. https://doi.org/10.1182/BLOOD-2015-02-628354

Zou, M. Z., Liu, W. L., Gao, F., Bai, X. F., Chen, H. S., Zeng, X., & Zhang, X. Z. (2019). Artificial Natural Killer Cells for Specific Tumor Inhibition and Renegade Macrophage Re-Education. *Advanced Materials*, *31*(43). https://doi.org/10.1002/ADMA.201904495

Zu, H., & Gao, D. (2021). Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *AAPS Journal*, *23*(4), 1–12. https://doi.org/10.1208/S12248-021-00608-7/TABLES/1

İNTİHAL RAPORU



ORİJİNALLİK RAPORU

%6	%6	%1	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.istinye.edu.tr İnternet Kaynağı	%2
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1
4	dx.doi.org İnternet Kaynağı	<%1
5	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<%1
6	Aiqun Li, Samuel Cartwright, Alex Yu, Seok-Man Ho et al. "Using the dCas9-KRAB system to repress gene expression in hiPSC-derived NGN2 neurons", STAR Protocols, 2021 Yayın	<%1
7	Submitted to National University of Singapore Öğrenci Ödevi	<%1
8	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1