

**MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELERİN İMMÜN MODÜLATÖR
ETKİSİNİN HEMOFAGOSİTİK SENDROM KLİNİK
UYGULAMALARINA TEMEL OLUŞTURMAK ÜZERE *in*
vitro MODELDE İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF THE IMMUNE MODULATOR EFFECT
OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN *in vitro* MODEL AS
THE BASIS FOR HEMOPHAGOCYTIC SYNDROME
CLINICAL APPLICATIONS**

HANDAN SEVİM

**DOÇ. DR. ÖZER AYLİN GÜRPINAR
TEZ DANIŞMANI**

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2015

HAYATIMA IŞIK TUTAN AİLEME...

HANDAN SEVİM'in hazırladığı “**Mezenşimal Kök Hücrelerin İmmün Modölatör Etkisinin Hemofagositik Sendrom Klinik Uygulamalarına Temel Oluşturmak Üzere *in vitro* Modelde İncelenmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA

Başkan

.....

Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR

Danışman

.....

Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

Üye

.....

Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN

Üye

.....

Prof. Dr. Mehmet ERTEM

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

01/09/2015

İmza

HANDAN SEVİM

ÖZET

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN İMMÜN MODÜLATÖR ETKİSİNİN HEMOFAGOSİTİK SENDROM KLİNİK UYGULAMALARINA TEMEL OLUŞTURMAK ÜZERE *in vitro* MODELDE İNCELENMESİ

HANDAN SEVİM

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. ÖZER AYLİN GÜRPINAR

Eylül 2015, 112 sayfa

Hemofagositik sendrom (hemofagositik lenfohistiyositoz, HLH), sitotoksik T lenfositlerin ve makrofajların aşırı aktivasyonu sonucu gelişen ve aşırı uyarılmış bir immün sistemin olduğu, tedavi edilmezse ölümcül olan bir immün yetmezlik hastalığıdır. Primer (ailevi) HLH (FHL)'nin bir tipi olan FHL2, perforin gen hasarlı tiptir. Perforin, sitotoksik T lenfositler ve doğal öldürücü (NK) hücrelerinin immün cevabı sırasında, hedef hücre zarında porlar oluşturarak granzimin bu porlardan geçişine ve böylece enfekte hücrenin apoptozla ölümüne aracılık eder. FHL2 hastalarında perforin genindeki mutasyon nedeniyle bu hastaların immün cevabı oluşmamakta ve sürekli uyarılan immün sistem nedeniyle yüksek oranda sitokin salgılanmaktadır. Hastalarda oluşan bu kontrol edilemeyen immün sistem uyarımı nedeniyle, aşırı aktivite gösteren NK hücreleri ve sitotoksik T hücreleri çoklu organ hasarlarına yol açmakta ve sistemik inflamasyona sebep olmaktadır.

HLH tedavisinde öncelikli amaç; dekzametazon, siklosporin A ve etoposidden oluşan uluslararası HLH-2004 protokolü uygulanarak immün sistemin baskılanmasıdır. Ancak FHL'de kesin tedavi hematopoietik kök hücre transplantasyonu (HKHT) ile mümkün olmaktadır. HKHT yapılmayan hastalar için bu hastalık ölümcüldür. Klasik tedavilerde 8. haftanın sonunda tam veya çok iyi yanıt alınamayan hastalarda HKHT kadar geçen sürede çaresiz kalınmaktadır.

Mezenşimal kök hücreler, düşük MHC-II ekspresyonları ve sentezledikleri sitokinler ile immün modülatör etkiye sahiptir. GvHD gibi çeşitli otoimmün hastalıklarda MKH'ler immün modülatör etkileri nedeniyle klinikte uygulanmaktadır. FHL2'de MKH'lerin immün modülatör olarak kullanılması ile ilgili literatürde yalnızca 23 yaşındaki bir hastaya yapılan uygulama ile ilgili bilgiler bulunmaktadır. Ancak bu gibi çalışmaların devamı için gerekli temel bilgiyi sağlayacak sistemler bulunmamaktadır. Bu nedenle, tez çalışmamızda perforin gen ifadesi baskılanmış bir insan NK hücre hattı oluşturularak FHL2 için *in vitro* model geliştirilmesi ve MKH'lerin bu model hücreler üzerindeki immünmodülatör etkisini incelenmesi hedeflenmiştir.

Bu amaçla ticari olarak satılan NK hücre hattı olan NK92 hücre hattı seçilmiştir. Bu hücrelerde PRF1 gen ifadesinin baskılanması amacıyla DNA'daki PRF1 gen bölgesini hedefleyen CRISPR/Cas sistemi kullanılmıştır. Hazırlanan sistemle NK92 hücrelerinde perforin gen bölgesine puromisin direnç geni eklenmiştir. Transfeksiyon sonrası hücreler puromisin antibiyotiği ile seçilmiştir. Elde edilen klonlarda perforin geninin hedeflendiği qPCR, PCR ve ELISA yöntemleri ile analiz edilmiştir. Perforin geninin hedeflendiği PMA/İyonominin ile uyarılmış klonlarda perforin ifadesinin baskılandığı qPCR analizi ile perforin salgılamadığı ELISA yöntemi ile gösterilmiştir. Elde edilen klonlar MKH'lerle ko-kültür edilmiş ve ko-kültür sisteminden elde edilen süpernatantlara çoklu sitokin analizi yapılmıştır. Sitokin analizinde ortamdaki immünmodülatör sitokinlerin (IL-4 ve IL-10) miktarının arttığı, ancak sistemi uyarıcı sitokinlerin ise (IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, IFN γ , TNF α) miktarının azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlar MKH'lerin immün modülatör etkisini *in vitro* FHL2 modellenli hücre hattında gösterdiğini desteklemektedir.

Bu tez kapsamında, MKH'lerin immunmodülatör etkisi, insan kökenli MKH ve NK hücre hattı kullanılarak *in vitro* sistemde gösterilmiştir. Bu *in vitro* sistemden elde edilen sonuçların, *in vivo* ve klinik uygulamalar için çok önemli bir basamak olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda günümüzde devam eden klinik çalışmalarda GvHD gibi immün sistem hastalıklarının tedavisinde MKH'lerin kullanıldığı görülmektedir. Bu nedenle MKH'lerin klinikte klasik tedavilerde çaresiz kalınan FHL2 hastalarında kemik iliği transplantasyonuna kadar geçen sürede destekleyici ve yan etkisi çok düşük bir tedavi olarak kullanılması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ailevi hemofagositik lenfhistiyositoz, Doğal öldürücü hücreler, Perforin, CRISPR, Mezenkimal kök hücreler, Gen susturma, Immün modülasyon

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE IMMUNE MODULATOR EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN *in vitro* MODEL AS THE BASIS FOR HEMOPHAGOCYTIC SYNDROME CLINICAL APPLICATIONS

HANDAN SEVİM

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Assoc. Dr. ÖZER AYLİN GÜRPINAR

September 2015, 112 pages

If untreated, Hemophagocytic syndrome (Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, HLH), is a fatal immunodeficiency disease, which results from the over activation of cytotoxic T lymphocytes and macrophages caused over activated immune system. A type of primary hemophagocytic syndrome FHL2 is a perforin gene is mutated. Perforin is the key protein for immune response of cytotoxic T cells and natural killer (NK) cells. Cytotoxic T lymphocytes and NK cells secrete their perforin and granzyme containing granules when they contact virus-infected cells or tumor cells. Perforin creates pores at the target cell membrane, and mediates passing granzyme through these pores and inducing apoptotic death of the target cell. Because of the perforin gene mutation in FHL2, these patients do not regulate their immune systems and continually stimulated immune response in these patients causes high levels of cytokine secretion. Uncontrolled stimulation of the immune system of these patients leads to excessive activity of cytotoxic T cells and NK cells causing multi-organ failure and systemic inflammation.

Primary focus on HLH therapy is to suppress immune system following the international HLH2004 protocol by using Dexamethasone, Cyclosporin and Etoposide. Furthermore hematopoietic stem cell transplantation is need for full recovery. The disease is fatal if there will there is no stem cell donor. End of 8

week classical therapy, there is a need for alternative therapy to maintain patients when steroids do not work properly. So a therapy is need which has low side effects.

Mesenchymal stem cells (MSCs) have immune modulatory properties that are attributable to low expression of MHC class II antigens as well as cytokine secretory properties. *In vivo* studies have shown immune modulatory effects of MSCs on autoimmune diseases. However, there is only one sole publication where MSCs are utilized as immune modulatory therapy for an FHL patient who is 23 years old. However, it's clear that a cell based *in vitro* model is needed to further assess the beneficial effects of such an approach. Therefore the ultimate aim of this thesis is to generate a perforin gene knock out human NK cell line as an *in vitro* model for FHL2 and show the immune modulatory effect of MSCs on FHL2 to claim a novel therapeutic approach.

NK92 cell line is a commercial NK cell line that was chosen for experiments. CRISPR/Cas is a novel gene silencing tool that targets specific PRF1 sequences at DNA that will be used for silencing the PRF1 gene. Also this system has a puromycin resistance gene which will be added to NK92 cells after transfection. Transfected cells were selected with antibiotic resistance after transfection. After selection of the silenced cell clones, an initial mutation analysis will be done by qPCR, PCR screening. Also, perforin protein secretion levels will be further evaluated by ELISA. Selected clones were cocultured with MSCs and the supernatant were analyzed with multiplex cytokine assay. The results from qPCR showed that selected clones has suppressed expression of perforin. Following stimulation via a PMA/ionomycin selected clones were showed no perforin secretion analyzed with ELISA. Co-culture system were performed with selected clones and MSCs. Multiplex cytokine array analysis showed that levels of immune modulator cytokines (IL-4 and IL-10) were altered while the pro inflamator cytokine (IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, IFN γ , TNF α) levels were decreased. These data showed that MSCs have immune modulatory effect on *in vitro* FHL2 model cell line.

This thesis provided an important knowledge about using MSC as an immune modulator for the therapy of FHL2 patients. Meanwhile this *in vitro* system is a suitable and important human cell model for future *in vivo* investigations. Meanwhile there are clinical trials using MSCs's immune modulatory effects for therapy to GvHD. In conclusion this work achieved a remarkable contribution to the current literature and knowledge base on the use of MSCs as a supportive therapy for FHL2 patients who have no response to conventional therapy which has low side effects.

Keywords: Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis, NK cells, Perforin, CRISPR, Mesenchymal stem cells, Gene silencing, Immune modulation

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesinde yardımları ve desteği ile her ihtiyaç duyduğum her zaman yanımda olan danışman hocam Sayın **Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR'a** en içten saygı ve teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım süresindeki tez izleme komitelerindeki desteği ve katkılarından dolayı sayın hocam **Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR'a** teşekkürlerimi sunarım. Tezimin çeşitli aşamalarının gerçekleştirilmesi için laboratuvarını kullanmamı sağlayan ve tez izleme komitesinde değerli fikirlerini paylaşan sayın hocam **Prof. Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA**'ya teşekkür ederim. Tez jürimde yer alan **Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN ve Prof. Dr. Mehmet ERTEM'e** değerli katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince moleküler biyoloji konusundaki bilgileriyle katkıda bulunan ve laboratuvarlarını kullanmamı sağlayan çalışmalarım sırasında büyük desteğini aldığım hocam **Prof Dr. Yusuf Çetin KOCAEFE'ye** çok teşekkür ederim.

Tezimin deneysel aşamasındaki yardımlarından ve katkılarından dolayı **Emine KORKMAZ, Duygu AKÇAY ve Beril ERDEM'e** teşekkür ederim. Tezimin yazım aşamasında şekillerin yapılmasında desteğini aldığım ve her aşamada yanımda olan oda arkadaşım **Hanife Güler DÖNMEZ'e** içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın her aşamasında yardımını hiçbir zaman esirgemeyen **Gizem ERTÜK ve Seçil KARAHİSAR TURAN'a** teşekkür ederim. Çalışmam boyunca yanımda olduklarını hissettiren, beni dinleyen ve destek olan değerli arkadaşlarım **Esin AKBAY, Pınar BARKAN, Sevcan ALDEMİR** ve canım hocam **Uzm. Ş. Remma PAMİR GÜLSOY'** teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TÜBİTAK 114S57 nolu proje kapsamında ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi 013D12601001 numaralı ve FDK-2015- 7904 numaralı projeler tarafından desteklenmiştir.

Hayatımı güzelleştiren her anımda yanımda olan, beni destekleyen ve yolumu aydınlatan **CANIM AİLEME** teşekkür ederim...

1.6.1.Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> CRISPR/Cas).....	32
2. LABORATUVAR ÇALIŞMASI ve YÖNTEM.....	36
2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	36
2.1.1.Mezenşimal kök hücrelerin eldesi ve kültürü	36
2.1.2. NK92 hücrelerinin kültürü	37
2.1.3. NK92 hücrelerine antibiyotik dayanıklılık testinin yapılması	38
2.2. Vektör Sistemlerinin Hazırlanması	38
2.2.1. Perforin genini hedefleyen CRISPR/Cas9 vektör sisteminin hazırlanması	38
2.2.2. Perforin geni ekzon 2 ve puromisin direnci içeren vektör sisteminin hazırlanması	40
2.2.2.1. İnsan perforin geni ekzon 2'nin PCR ile çoğaltılması	41
2.2.2.2. İnsan perforin ekzon 2 gen bölgesini içeren homolog rekombinasyon donör vektörün hazırlanması	42
2.2.2.3. Puromisin direnci içeren vektörün hazırlanması	43
2.2.2.4. İnsan Perforin ekzon 2 ve Puromisin direncini içeren vektör tasarımı	44
2.3. Gen Transferi Çalışmaları	46
2.3.1. Elektroporasyon	46
2.3.2. Kimyasal transfeksiyon.....	47
2.3.3. Nükleofeksiyon	48
2.4. Hücrelerin Uyarılması ve Perforin İfadesinin Kontrolü	49
2.4.1. Hücrelerin uyarılması.....	49
2.4.2. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR)	50
2.4.3. PCR analizi.....	52
2.4.4. ELISA analizi	53
2.5. Hücrelerin Mezenşimal Kök Hücrelerle Ko-Kültürü.....	53
2.6. Çoklu Sitokin Analizi	54
2.7. İstatistiksel Analizler	56
3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	57
3.1. Hücre kültürü çalışmaları.....	57
3.1.1. Mezenşimal kök hücre kültürü çalışmaları.....	57

3.1.2. NK92 hücrelerinin kültürü	61
3.1.3. NK92 hücrelerine antibiyotik dayanıklılık testinin yapılması	62
3.2. Vektör Sistemlerinin Hazırlanması	64
3.2.1. Perforin genini hedefleyen CRIPR/Cas vektör sisteminin hazırlanması .	64
3.2.2. Perforin geni ekzon 2 ve puromisin direnci içeren vektör sisteminin hazırlanması	65
3.3. Gen Transferi Çalışmaları	70
3.3.1. Elektroporasyon	70
3.3.2. Kimyasal transfeksiyon.....	72
3.3.3. Nükleofeksiyon	72
3.4. Hücrelerin Uyarılması ve Gen İfadesinin Kontrolü.....	74
3.4.1. Hücrelerin uyarılması.....	74
3.4.2. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR)	75
3.4.3. PCR analizi.....	76
3.4.4. ELISA analizi	76
3.5. Hücrelerin Mezenşimal Kök Hücreleri ile Ko-Kültürü	77
3.6. Çoklu Sitokin Analizi	78
KAYNAKLAR.....	95
ÖZGEÇMİŞ	111

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. FHL sınıflandırmasında veziküler trafikte oluşan bozulmanın etkilerinin şematik olarak gösterilmesi.....	6
Şekil 1.2. Perforin genindeki FHL2 mutasyonlarının ekzonlara göre dağılımının şematik gösterimi. <i>MAC, EGF ve C2 perforin proteini alt birimlerini göstermektedir.</i>	7
Şekil 1.3. Normal durumdaki sitotoksik T lenfosit cevabı (a), FHL2 durumunda sitotoksik T lenfositlerin cevabı (b).....	8
Şekil 1.4. NK hücreleri yüzey reseptörleri.....	11
Şekil 1.5. Perforin proteini X-Ray kristal yapısı	16
Şekil 1.6. Perforin por yapısının kriyo-elektron mikroskopi görüntüleri	17
Şekil 1.7. Perforin granzim yolu etki mekanizması	18
Şekil 1.8. Mezenşimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli	21
Şekil 1.9. Mezenşimal kök hücrelerin immün sistem ile etkileşiminin şematik olarak gösterilmesi.....	25
Şekil 1.10. DNA çift zincir kırıkları onarım mekanizması	30
Şekil 1.11. Çinko parmak nükleazların şematik görünümü.....	31
Şekil 1.12. Transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazların şematik görünümü	32
Şekil 1.13. Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar sisteminin (CRISPR/Cas) şematik görünümü ve kullanma alanları	34
Şekil 2.1. Perforin genini hedefleyen ve puromisin direnci içeren vektör sisteminin tasarlanması.	41
Şekil 2.2. pCR2.1 TOPOUBI-PURO plazmidi şematik görüntüsü.....	43
Şekil 2.3. PRF1 ekzon 2 ve UBI-PURO DNA dizisi ve klonlama çalışmaları için kullanılan primerlerin DNA dizindeki yerleri.....	44
Şekil 2.4. pCR2.1 TOPO+PRF1 ekzon 2+UBI-PURO vektörünün şematik görünümü.....	46
Şekil 2.5. Mezenşimal kök hücre-NK92 hücresi ko-kültür sistemi şematik görünümü ve deneysel sistem görünümü.	54
Şekil 2.6.Çoklu sitokin analiz sistemi şematik görünümü	55
Şekil 3.1.Mezenşimal kök hücre karakterizasyonu flow sitometri paneli 1.....	58
Şekil 3.2. Mezenşimal kök hücre karakterizasyon flow sitometri paneli 2.....	59
Şekil 3.3. Mezenşimal kök hücre karakterizasyon flow sitometri paneli 3.....	60
Şekil 3.4. Mezenşimal kök hücre adiposit ve osteoblast yönünde farklılaşma potansiyelinin gösterilmesi. A. Mezenşimal kök hücre 21. gün ışık mikroskobu görüntüsü (200X), B. Adipojenik farklılaşma 21. gün Oil Red O boyama (200X), C. Osteojenik farklılaşma 21. gün Alizarin Red boyama (200X).....	61
Şekil 3.5. Sağlıklı NK92 hücreleri a. Yoğunluğu daha az hücreler ve küçük hücre agregatları, b. Yoğunluğu daha fazla hücreler ve büyük hücre agregatları. ...	61
Şekil 3.6. NK92 hücreleri antibiyotik direnç testi görüntüleri.....	63
Şekil 3.7. PRF1 ekzon 2'yi hedefleyen CRISPR/Cas sistemi vektörleri DNA dizi analizi sonuçları	64
Şekil 3.8. PRF1 Ekzon 2 PCR ürününün jelde yürütülmesi sonucu elde edilen görüntüsü.....	65
Şekil 3.9. PCR ile çoğaltılan PRF1 ekzon 2 dizi analizi sonuçları,.....	66

Şekil 3.10. pCR2.1 TOPO+PRF1 ekzon2 vektörü EcoRI ve SmaI enzim kesimleri sonucu elde edilen jel görüntüsü	67
Şekil 3.11. pCR2.1 TOPO+UBI-PURO plazmidi PmeI enzim kesim jel görüntüsü	68
Şekil 3.12. pCR2.1 TOPO+PRF1 Ekzon 2+UBI-PURO plazmidi EcoRI enzim kesimi jel görüntüsü	69
Şekil 3.13. pCR2.1 TOPO+PRF1 Ekzon 2+UBI-PURO vektör sistemi DNA dizi analizi sonuçları	69
Şekil 3.14. NK92 hücrelerinin GFP içeren vektörle elektroporasyonla transfeksiyonu sonucu elde edilen floresan mikroskop ve ışık mikroskobu görüntüleri.....	71
Şekil 3.15. NK92 hücrelerinin GFP içeren vektörle kimyasal ajanla transfeksiyonu sonucu elde edilen floresan mikroskop (a, c) ve ışık mikroskop (b, d) görüntüleri	72
Şekil 3.16. NK92 hücreleri GFP vektörle nükleofeksiyonndan 24 saat sonra elde edilen görüntüler; floresan mikroskop (a, c) ve ışık mikroskobu görüntüsü (b, d).	73
Şekil 3.17. Puromisin antibiyotik seçimi sonrası devam edilen kültürde çoğalmaya devam eden transfekte olmuş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri	74
Şekil 3.18. Klon1 ve Klon2 hücrelerinde PRF1 ifadesinin qPCR ile analizi	75
Şekil 3.19. Klon1 ve Klon2 hücrelerinde PRF1 ekzon 2 'de puromisin direnç geninin varlığının gösterilmesi	76
Şekil 3.20. Klon1 ve Klon2 hücrelerinde uyarım sonucu perforin salgılanmasının ELISA analizi ile ölçülmesi	77
Şekil 3.21. Ko-kültür öncesi hücrelerin görünümü; a; MKH, b; Klon1 hücreler, c; Klon2 hücreleri.....	78
Şekil 3.22. IL-4 sitokinin ko-kültür sistemindeki miktarının analizi	79
Şekil 3.23. IL-6 sitokinin ko-kültür sistemindeki miktarının analizi.	80
Şekil 3.24. IL-8 sitokinin ko-kültür sistemindeki miktarının analizi	81
Şekil 3.25. IL-10 sitokininin ko-kültür sistemindeki miktarının analizi.....	82
Şekil 3.26. GM-CSF sitokinin ko-kültür sistemindeki miktarının analizi	83
Şekil 3.27. G-CSF sitokinin ko-kültür sistemindeki miktarının analizi	84
Şekil 3.28. IFN γ sitokinin ko-kültür sistemindeki miktarının analizi	85
Şekil 3.29. TNF α sitokinin ko-kültür sistemindeki miktarının analizi	86
Şekil 3.30. MIP-1 β sitokinin ko-kültür sistemindeki miktarının analizi	86

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1. 1. Hemofagositik sendrom sınıflandırılması [2, 14, 15].....	3
Çizelge 1. 2. HLH tanı kriterleri [2].....	4
Çizelge 2. 1. ELISA ve qPCR analizi için hazırlanan örneklerin listesi	49
Çizelge 3.1. Ko-kültür sisteminde örneklerin dağılımı.....	78

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
°C	: Santigrat derece
CHS	: Chediak Higashi sendromu
DAMPs	: Hasar ilişkili moleküler örgüler
DC	: Dendritik hücreler
DMEM-LG	: Dulbecco's Modified Eagle's medium-Low Glucose
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü benzeri altbirim
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FBS	: Fetal bovine serum
FHL	: Ailevi hemofagositik sendrom
FHL2	: Perforin gen hasarlı ailevi hemofagositik sendrom
gr	: Gram
gRNA	: Guide RNA (kılavuz RNA)
GS 2	: Griscelli sendromu tip II
GvHD	: Graft-versus-host-disease
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
HKHT	: Hematopoietik kök hücre transplantasyonu
HLH	: Hemofagositik Sendrom
HPS II	: Hermansky-Pudlak sendromu II
HR	: Homolog rekombinasyon
HS	: Horse Serum
IDO	: Indolamine 2,3-dioksigenaz

IFN- γ	: İnterferon gama
IPS	: indüklenmiş pluripotent kök hücre (Induced pluripotent stem cell)
ISCT	: Uluslararası Hücresel Tedavi Topluluğu
LIF	: Lökemia inhibitörük faktör
LPS	: Lipopolisakkaritler
MACPF	: Membran atak kompleks perforin alt birimi
MKH	: Mezenşimal Kök Hücre
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MS	: Multiple sklerozis
NHEJ	: Homolog olmayan sona eklenme
NK hücre	: Doğal öldürücü hücreler
NLRs	: NOD-benzeri reseptörler
NO	: Nitrik oksit
PAM	: Protospacer adjacent motifs
PAMPs	: Patojen ilişkili moleküler örgüler
PBS	: Phosphate-Buffered saline
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pg/ml	: Pikogram/Mililitre
PGE-2	: prostaglandin E2
PRF1	: Perforin geni
Primer HLH	: Primer hemofagositik sendrom
RLR	: RIG-benzeri reseptörler
sHLA-G	: Çözünebilir insan lökosit antijeni G
SLE	: Sistemik lupus eritematazus

STL	: Sitotoksik T lenfositler
TALENs	: Transkripsyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar
TGF β	: transforme edici büyüme faktörü beta,
TLRs	: Toll-benzeri reseptörler
TLRs	: Toll-like reseptörler
TNF- α	: Tümör nekroz faktör- α
Tregs	: Düzenleyici T hücreleri
VEGF	: Vasküler endoteliyal büyüme faktörü
XLP 1	: X- Bağımlı Lenfoproliferatif Sendrom 1
XLP 2	: X- Bağımlı Lenfoproliferatif Sendrom 2
ZFNs	: Çinko parmak nükleazlar
α -MEM	: Minimum Essential Medium

1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Ailevi Hemofagositik Sendrom (Familial Hemofagositik Lenfohistiyositoz, FHL), fazla uyarılmış ama etkin olmayan bir immün sistem ile karakterize edilen, tedavi edilmezse ölümlü sonuçlanan otozomal resesif geçişli bir immün fonksiyon bozukluğu hastalığıdır. FHL'nin çeşitli gen defektlerinden kaynaklanan 5 tipi bulunmaktadır. Bu hastalıklar içinde en yaygın olan FHL2, perforin gen defekti olan tiptir. Perforin, immün sistemdeki sitotoksik T hücrelerin ve NK hücrelerinin görevlerini yerine getirmesinde kilit rol oynayan bir proteindir. Bu proteinde oluşan hasar nedeniyle hastalarda immün sistemin en ufak uyarımında bile hiperinflamasyon oluşmaktadır. Tedavi amacıyla yapılan uygulamalar inflamasyonun baskılanması ve devamında uyarıma neden olan etkenin ortadan kaldırılmasıdır. Kesin tedavi hematopoietik kök hücre transplantasyonudur. Ancak uygun donör bulunamadığı takdirde hasta çoklu organ yetmezliği sonucunda kaybedilir. FHL2'nin ülkemizdeki görülme sıklığı yapılan akraba evliliklerinin çokluğu nedeniyle diğer ülkelere oranla oldukça yüksektir. Yapılan deneysel çalışmalarda kullanılan hayvan modellerinin yaşatılmasındaki güçlükler ve hastalardan elde edilen hücre sayısının yetersizliği nedeniyle deneysel çalışmaların ve tekrarlarının gerçekleştirilmesi zorlaşmaktadır. Ayrıca inflamasyon cevabında hayvan modellerinden alınan verilerin insan inflamasyon cevabı ile tam olarak örtüşmemesi nedeniyle hayvan modellerinden elde edilen sonuçların kullanılabilirliği sınırlıdır.

Tedavideki zorluklar, bu hastalığın iyileştirilmesinde yeni yaklaşımları gündeme getirmekte ve hücrel tedaviler de bu noktada karşımıza çıkmaktadır. Mezenşimal kök hücreler, göç edebilme özellikleri, hedef dokuda mikroçevreye bağlı olarak farklılaşabilme yetenekleri, immün sistemini baskılayıcı ve nonimmünojenik diğer bir deyişle immün sistemi düzenleyici özellikte olmaları nedeniyle hücrel tedavilerde dikkat çekici bir kaynak olarak olarak görülmektedir. Bu tez çalışmasında mezenşimal kök hücrelerin immün modülatör etkisinin hemofagositik sendromun tedavisine yönelik kullanılması için bir *in vitro* model oluşturularak bu modelin mezenşimal kök hücrelerle etkileşimi incelenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların, *in vivo* modeller ve klinik uygulamalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

1.1. Hemofagositik Sendrom (Hemofagositik lenfhistiyoz, HLH)

Hemofagositik sendrom (hemofagositik lenfhistiyoz, HLH) fazla uyarılmış ama etkin olmayan immün sistemin neden olduğu potansiyel olarak öldürücü bir hastalıktır [1]. HLH'de aşırı aktive olmuş immün sistemin bir sonucu olarak oluşan hipersitokinemi, organ hasarları ve ölüme neden olmaktadır [1, 2]. HLH'nin ilk kez tanımlanması 1952 yılında Farquhar ve Claireaux tarafından "*familial hemophagocytic reticulosis*" adı ile organlarda histiyositlerin çoğaldığı ve kanda fagosistozun olduğu ender bir ailesel hastalık olarak tanımlanmıştır [3]. Hastalığın küçük yaşlarda öldürücü etkisi, hastalığın tanımının yapıldığı hastanın kardeşinde de aynı klinik tablonun görülmesi sonucunda gösterilmiştir [4]. Nelson ve arkadaşları 1961 yılında 3 hastada yaptıkları araştırmada, hastalığın ateş, anemi, lökopeni, trombositopeni ve hepatosplenomegalinin yanında menenjit ve ensefalit klinik bulgularına sebep olduğunu gösterilmiştir. Aynı çalışmada Nelson ve arkadaşları, hastalığın Lettrre-Siwe hastalığı ve Chédiak-Higashi Sendromu ile farklılıklarını göstermiştir [5]. 1963 yılında ilk kez ailesel eritrofagositik lenfhistiyozis ve 1979 yılında ise sekonder HLH; virüs ilişkili hemofagositik sendrom olarak tanımlanmıştır [6, 7].

1.1.1. HLH'nin Sınıflandırılması

Günümüzde HLH, *primer HLH* ve *sekonder HLH* olmak üzere iki gruba ayrılır [8]. Primer (genetik) HLH, otozomal resesif kalıtımla geçer ve bu hastalıkta etkin olan genlerin ilk olarak tanımlanması Paris'te bir araştırma grubu tarafından yapılmıştır [9]. İsveç'te yapılan geniş çaplı bir araştırmaya göre primer HLH insidansı, canlı doğan çocuklarda 0,12:100.000/yıl'dır [10, 11]. Ancak Türkiye'de yapılan akraba evlilikleri nedeniyle bu oran hastaneye yatırılan hastalarda 7,5:10.000 olarak kaydedilmiştir [12]. Sekonder HLH'nin nedenleri; otoimmün hastalıklar, enfeksiyonlar ve malignansilerdir. Ayrıca kalıtsal immünolojik hastalıklar ve metabolik bozukluklar gibi bazı hastalıklarda da HLH tablosu oluşabilir. Sekonder HLH, ilk olarak Risdall ve arkadaşları tarafından viral enfeksiyon geçiren organ nakli yapılmış hastalarda tanımlanmıştır [7, 13]. Çizelge 1.1'de "HLH sınıflandırılması" hakkında bilgi verilmiştir.

Çizelge 1. 1. Hemofagositik sendrom sınıflandırılması [2, 14, 15]

	Gen	Kromozom lokasyonu	Protein	Fonksiyon
Ailevi HLH (FHL)				
FHL1	Bilinmiyor	9q21.3-22	Bilinmiyor	
FHL2	PRF1	10q21-22	Perforin	Por oluşturucu protein
FHL3	UNC13D	17q25	Munc13-4	Sitolitik veziküllerin membrana füzyonu
FHL4	STX11	6q 24	Syntaxin-11	Sitolitik vezikül transferi ve membrana füzyonu
FHL5	STXBP2	19p13.2-3	Munc 18-2	Syntaxin-11 ile etkileşerek vezikül transferi ve membrana füzyonu
İmmün Yetmezlik Sendromları				
Chediak Higashi sendromu	LYST	1q42.1-q42.2	LYST	Vezikül olgunlaşması ve litik granüllerin fonksiyonu
Griscelli sendromu tip II	RAB27A	15q21	RAB27A	Granül hareketi ve vezikülün membranla kenetlenmesi
Hermansky-Pudlak sendromu tip II	AP3B1	5q14.1		Vezikül oluşumu ve protein sınıflanması
XLP 1 (X- Bağımlı Lenfoproliferatif Sendrom 1)	SH2D1A	Xp25	SAP	Lenfositlerde sinyal iletimi ve sitolitik granüllerin immunolojik sinapsa iletimi
XLP 2 (X- Bağımlı Lenfoproliferatif Sendrom 2)	BIRC4A	Xp25	XIAP	Apoptoz inhibisyonu
ITK Sendromu	ITK	5q33.3	ITK	T hücre kinaz
Sekonder HLH (HLH ile ilişkili diğer hastalıklar)				
Enfeksiyonlar				Herpes virüsleri (EBV, CMV), HIV, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Brucella spp.</i> , <i>Leishmania spp</i> , <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Histoplasma spp</i>
Makrofaj sendromu	aktivasyon			Still's sendromu, Sistemik Lupus Erythematosus, Kawasaki sendromu
Malignansiler				Periferik T hücre/ NK hücre lenfomaları, Hodgkin lenfoma, Akut lenfositik lösemi, Multiple miyolema, Akciğer kanseri, Prostat kanseri
İmmünsüpresyon				Organ transplantasyonları sonrası, Hematopoietik kök hücre transplantasyonu sonrası
Metabolik hastalıklar				Lizinürik protein intoleransı

(HLH, Hemofagositik sendrom; FHL, ailevi hemofagositik sendrom; ITK, Interlökin2 indlenbilir T hücre kinaz; EBV, Epstein-Bar virus; CMV, Sitomegalovirüs; HIV, insan immün yetmezliği virüsü; NK hücre, Doğal öldürücü hücre)

Hemofagositik sendrom epidemiyolojik olarak bütün yaşlarda görülebilmektedir [11, 16]. Primer HLH daha çok erken çocukluk döneminde görülürken, sekonder HLH tüm yaş gruplarında ortaya çıkabilir [10, 17, 18]. Kadın ve erkeklerde görülme oranları arasında bir fark yoktur.

1.1.2. HLH'nin Tanı ve Tedavi Yöntemleri

HLH tiplerinde ortak olarak; ateş, bisitopeni, splenomegali, hipertrigliseridemi ve/veya hipofibrinojenemi, hiperferritinemi, kemik iliği, lenf bezi ve dalakta hemofagositoz, kanda yüksek serbest (çözünebilir) interlökin-2 reseptör (sCD25) düzeyi, düşük doğal öldürücü (NK) hücre aktivitesi, aynı zamanda artmış interferon-gamma, proinflamatuvar sitokinler olan interlökin-8, 12, 6, 10 ve 18 seviyelerinde artış görülmektedir [9, 10, 12, 19]. Çizelge 1.2'de belirlenmiş 8 adet tanı kriterinden 5 tanesinin hastada görülmesi durumunda HLH tanısı verilebilmektedir [2].

Çizelge 1. 2. HLH tanı kriterleri [2]

HLH Tanı Kriterleri
1. Ateş
2. Splenomegali
3. Periferik kanda en az iki tip hücre hattını etkileyen sitopeni (Hemoglobin seviyesi <90g/L, Platelet sayısı <100x10 ⁹ /L, Nötrofil sayısı < 1x10 ⁹ /L)
4. Hipertrigliseridemi ve/veya hipofibrinojenemi (Açlık trigliseridi ≥ 3mmol/L, Fibrinojen ≤ 1.5 g/L)
5. Kemik iliği, dalak ya da lenf düğümlerinde hemofagositoz
6. Az ya da hiç olmayan doğal öldürücü hücre aktivitesi
7. Ferritin seviyesi ≥500µg/L
8. Serbest (soluble) interlökin-2 reseptör (sCD25) düzeyi ≥2400 U/L

HLH'de tedavi amacıyla yapılan uygulamalar incelendiğinde; acil olarak yapılması gereken ilk tedavi, hiperinflamasyonun baskılanması, ikinci olarak da hastalığı tetikleyen uyarının ortadan kaldırılmasıdır. Tedavi için oluşturulan ilk protokol 1991 yılında önerilmiş ve daha sonra 1994 ve 2004 yıllarında tekrar düzenlenmiştir [20, 21]. Günümüzde tedavide dekzametazon, siklosporin A ve etoposidden oluşan 2004 yılında yayınlanan uluslararası HLH tedavi protokolü uygulanarak immün sistem baskılanır. Ancak primer HLH'de tam tedavi hematopoietik kök hücre

transplantasyonu (HKHT) ile mümkün olmaktadır [21, 22]. İlk başarılı HKHT, HLA uyumlu ikizler arasında yapılmıştır [23]. Ancak HKHT için uygun donör bulunamayan hastalar, immünsupresif tedaviler ile geçici iyileşme gösterebilirler de tam iyileşme sağlanamaz ve hasta kaybedilir [9, 10, 16, 22]. Son yıllarda gen tedavisine yönelik çalışmalar da devam etmektedir. Carmo ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada perforin geni hasarlı model farelerden alınan hematopoietik öncül hücrelere lentiviral vektörler kullanılarak düzeltme yapılmıştır. Gen düzeltmesi yapılan hücreler, otolog olarak perforin geni hasarlı fareye verildiğinde *in vivo*da gen düzeltmenin %10-80 arasında etkili olduğu gösterilmiştir [24, 25]. Ancak konu ile ilgili olarak yapılan çalışmalar sınırlıdır ve klinik uygulamaların yapılabilmesi için çok daha fazla *in vitro* ve *in vivo* çalışmaya ihtiyaç vardır.

1.2. Primer Hemofagositik Sendrom (Primer HLH)

Primer hemofagositik sendrom (Primer HLH) iki alt gruba ayrılmaktadır:

- *Ailevi HLH (FHL)*
- İmmün yetmezlik sendromları

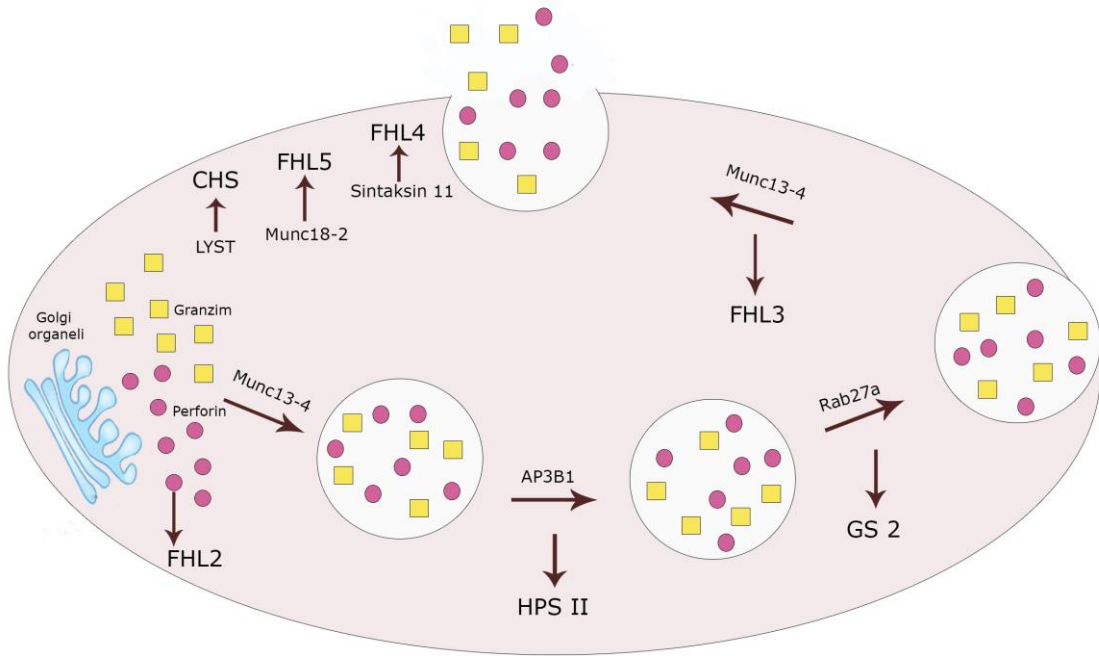
Çizelge 1.1'de bu sınıflandırma, sorumlu olan proteinler ve bunlara ait genler detaylı olarak gösterilmiştir.

FHL, otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalıktır. FHL'de sitotoksik T lenfositler ve NK92 hücreleri uyarıldıktan sonra perforin ve granzim içeren veziküller membrana doğru harekete geçer. Vezikülün membrana doğru hareketinde AP3B1, membrana kenetlenmesinde Rab27a görev alır. Membrana füzyonda Munc13-4 görev alırken, Munc18-2 ve Syntaxin11 sitotoksik vezikül trafiği ve ekzositozundan sorumludur. Bu tipte bu güne kadar 5 farklı genetik hasar tanımlanmıştır:

- i. FHL1: Kromozomdaki yeri belirlenmesine rağmen henüz ilgili olan gen ve protein bulunamamıştır.
- ii. FHL2: Perforin geni (PRF1) hasarlı FHL tipidir ve dünya çapındaki FHL hastalarının %20'sini oluşturur.

- iii. FHL3: UNC13D geni hasarlıdır, bu gen ürünü olan Munc13-4 sitotoksik granüllerin füzyonundan sorumludur.
- iv. FHL4: STX11 geni hasarlıdır, bu gen ürünü sintaksin11 proteininin granül ekzositozundan sorumludur.
- v. FHL5: STXBP2 geni hasarlıdır, bu gen ürünü sintaksin bağlayıcı protein 2 vezikül trafiğinden sorumludur [8, 26].

Bu tez çalışmasında da daha önce de ifade edildiği gibi Türkiye’de yüksek görülme oranına sahip olan “*ailevi primer hemofagositik sendrom, ailevi HLH (FHL)’nin bir tipi olan FHL2*” ayrıntılı olarak incelenmiştir.



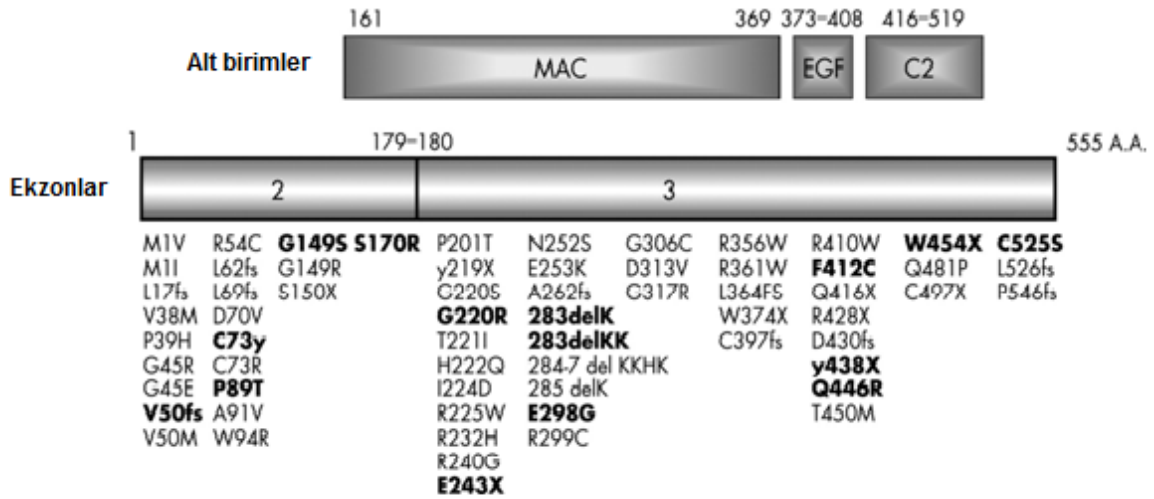
Şekil 1.1. FHL sınıflandırmasında veziküler trafikte oluşan bozulmanın etkilerinin şematik olarak gösterilmesi. ([26]’den yararlanılarak yeniden çizilmiştir). (CHS: Chediak Higashi sendromu, HPS II: Hermansky-Pudlak sendromu II, GS 2: Griscelli sendromu tip II)

1.2.1. Ailevi Hemofagositik Sendrom 2 (FHL2)

Ailevi hemofagositik sendromun perforin 1 (PRF1) gen hasarlı tipi olan FHL2’de perforin sentezleyemeyen sitotoksik T lenfositler ve doğal öldürücü (NK) hücreler,

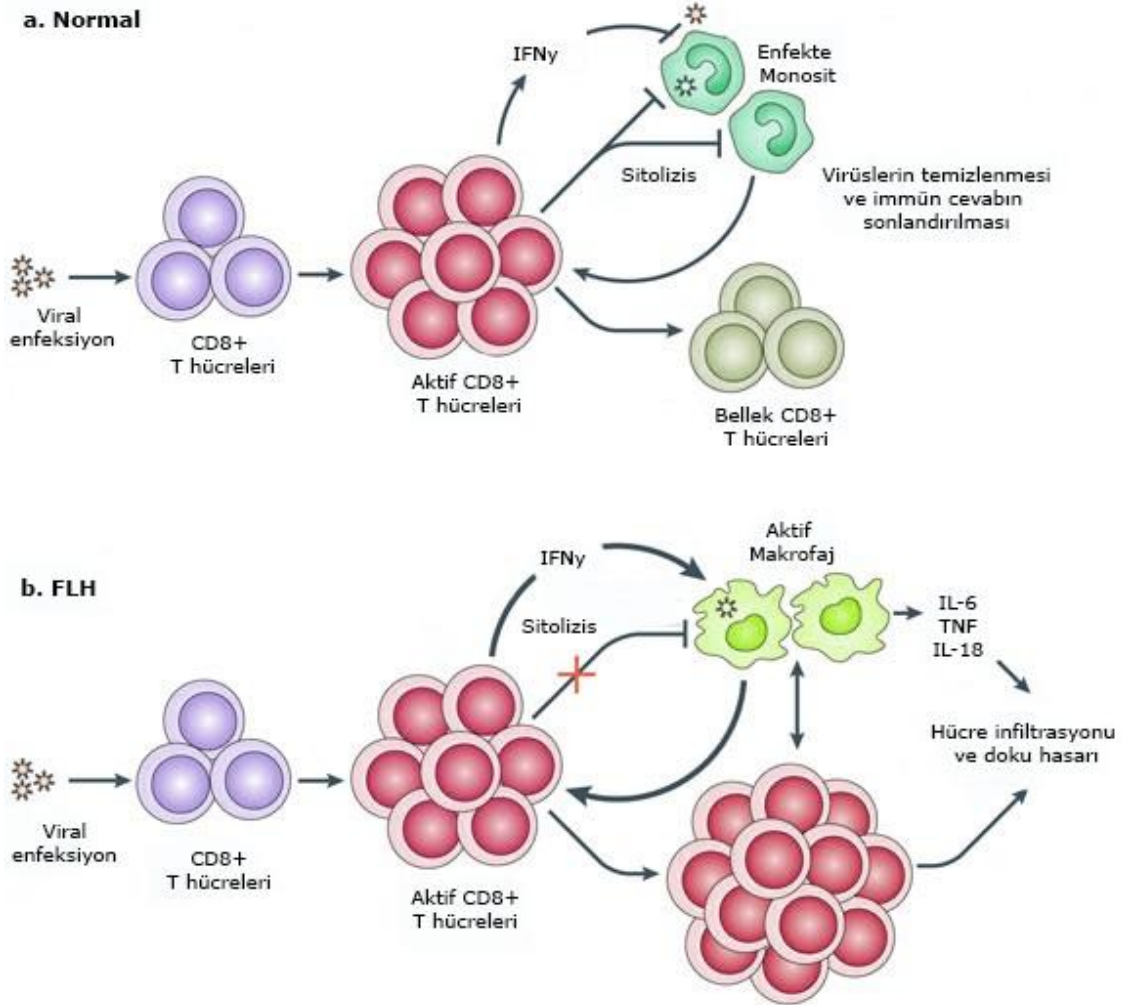
enfekte hücreyi yok edememekte ve immün sistemin kontrol edilemeyen aktivasyonu söz konusu olmaktadır [27, 28].

PRF1 genindeki hasar ilk olarak 1999 yılında bulunduğunda büyük bir etki yaratmış ve bütün FHL hastalarında bu gen hasarı taranmaya başlamıştır [29, 30]. Perforin gen hasarı etnik köken ve yaşanılan bölge dikkate alındığında dünya çapındaki FHL oranının yaklaşık olarak %13-58'ini oluşturmaktadır [30, 31]. Ayrıca bu oran ülkemizde %30, Japonya'da %40 ve Kuzey Amerika'da yaklaşık %50'dir [8, 32-34]. Genin her bölgesinde mutasyon olabilmektedir fakat bazı mutasyonlar bazı popülasyonlara özgüdür. Afrika kökenli Amerikalılarda 50delTA perforin mutasyonu görülürken, Japonlarda 207delC ve 1090-1091delCT mutasyonları görülmekte, Türklere Trp374X mutasyonu yüksek orandandır ve İtalyanlarda A91V sekans varyantı görülmektedir [8, 32-36]. Trizzino ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan ve 124 hastadan oluşan ve Dünya Histiyosit Topluluğuna üye ülkelerden elde edilen örneklerde PRF1 mutasyonu incelendiğinde 63 farklı mutasyon tespit edilmiştir (Şekil 1.2) [31].



Şekil 1.2. Perforin genindeki FHL2 mutasyonlarının ekzonlara göre dağılımının şematik gösterimi. *MAC, EGF ve C2 perforin proteini alt birimlerini göstermektedir. Perforin geninde ekzon 1 ifade olmaz. Ekzon 2 ve 3 ifade olduğundan mutasyonların yerleşimi ekzon 2 ve 3 üzerinde gerçekleşir [31].*

FHL2'de perforin yokluğu nedeniyle aktivite gösteremeyen CD8 (+) sitotoksik T lenfositler (STL) ve NK hücreler sürekli olarak aktif kalırlar. Bu durum immün sistemin vücudu enfeksiyonlara karşı en önemli koruma sistemlerinden biri olan perforin-granzim yolunun aktivite gösterememesi ile sonuçlanır (Şekil 1.3) [1, 10, 37, 38].



Şekil 1.3. Normal durumdaki sitotoksik T lenfosit cevabı (a), FHL2 durumunda sitotoksik T lenfositlerin cevabı (b). Normal durumda enfekte hücrenin tanınması sonucu CD8(+) sitotoksik T Lenfosit hücreleri çoğalır IFN γ salgılar. Perforin-granzim yolu ile enfekte hücre yok edilir ve bellek hücreleri oluşarak immün yanıt sağlanır, FHL2 durumunda CD8(+) sitotoksik T lenfositler aktive olmalarına ve çoğalmalarına rağmen enfekte hücre sitolize olmaz. Bu durumda sürekli artan aktif sitotoksik T lenfosit hücreleri

ve salgılanan sitokinler nedeniyle hücre infiltrasyonu ve doku hasarı oluşur ([39]'dan değiştirilerek çizilmiştir).

Aktivite gösteremeyen STL ve NK hücrelerinin devamlı çoğalması kontrol edilemeyen ölümcül oranda antijen spesifik sitotoksik hücre oluşmasına neden olmaktadır [40]. Bu koşulda çoğalmaya devam eden T hücreleri yüksek miktarda interferon gama (IFN- γ) üreterek, kontrol edilemez makrofaj aktivasyonunu uyarır [41]. Artan hücre aktivitesi ve IFN- γ , yüksek oranda interlekin-12 (IL-12) ve IL-1, IL-6, IL-10, IL-18, tümör nekroz faktör- α (TNF- α) salgılanmasına neden olur. Bu durum sitokin fırtınası olarak isimlendirilir [21, 41, 42]. IL-12 sitokininin fonksiyonu STL sayısını arttırmak ve native T hücrelerinin IFN- γ üreten hücelere farklılaştırmaktır. IL-18 ise IL-12 ile sinerjetik olarak etki gösteren bir sitokindir [43, 44]. TNF- α ve IL-1 ise nötrofil ve monositlerin enfeksiyon bölgesine gelmesini ve bu hücrelerin enfeksiyon etkenini yok etmek için aktive olmasını sağlar. Aynı zamanda bu iki sitokin IL-6 ile birlikte yüksek ateş oluşmasına sebep olur [21, 41, 45]. Böylece hastada HLH tanısında görülen klinik tablo oluşmaya başlar. Sitokin fırtınası sonucu oluşan hipersitokinemi ve salgılanan sitokinlerin ateş, sitopeni, splenomegali, hipertrigliseridemi, hipofibrinojenemi, hiperferritineminin yanında kemik iliği, lenf bezi ve dalakta hemofagositoz görülür [22]. Bütün bu nedenlerle FHL2, özellikle bir yaşın altındaki çocuklarda çok ağır semptomlara yol açar ve etkin tedavi yapılmazsa bu hastalar, kısa süre içinde kanama, sepsis, çoklu organ yetmezliği ve bir takım nörolojik bulgular nedeniyle kaybedilir [32, 46]. FHL2 hastalarında immün cevabın oluşmamasında kilit molekül *perforindir* [10]. İmmün sistem ve perforin gen hasarı ilişkisinin iyi araştırılması ve hasarlı hücrelerde tedavi için uygulanacak yöntemlerin geliştirilmesi, FHL2 ile ilgili çalışmalarda önem kazanmaktadır.

1.3. İmmün Sistem ve Perforin

1.3.1. İmmün Sistemin Genel Özellikleri

İmmün sistem, enfeksiyonlara karşı bağışıklığı ve korunmayı sağlayan hücre, doku ve moleküllerin tamamına verilen addır. Bu doku, organ ve moleküller ile vücudun kendisini koruma amacıyla gerçekleştirdiği reaksiyonların tümü ise, immün yanıt olarak tanımlanır. İmmün sistemin görevi tüm dokuları olası zararlı etkilere karşı

korumak olduğundan, immün sistemde oluşan herhangi bir hasar Hoshimoto hastalığı, romatid artrit gibi otoimmün hastalıklara, AIDS gibi inflamatuvar hastalıklara ve hatta kansere sebep olur [47, 48].

İmmün sistem klasik olarak, enfeksiyonlara karşı ilk yanıtı oluşturan *doğal immünite* ve enfeksiyonlara karşı özgül ve etkin savunma sağlayan *kazanılmış immünite* olarak sınıflandırılır [49].

1.3.2. Doğal immünite

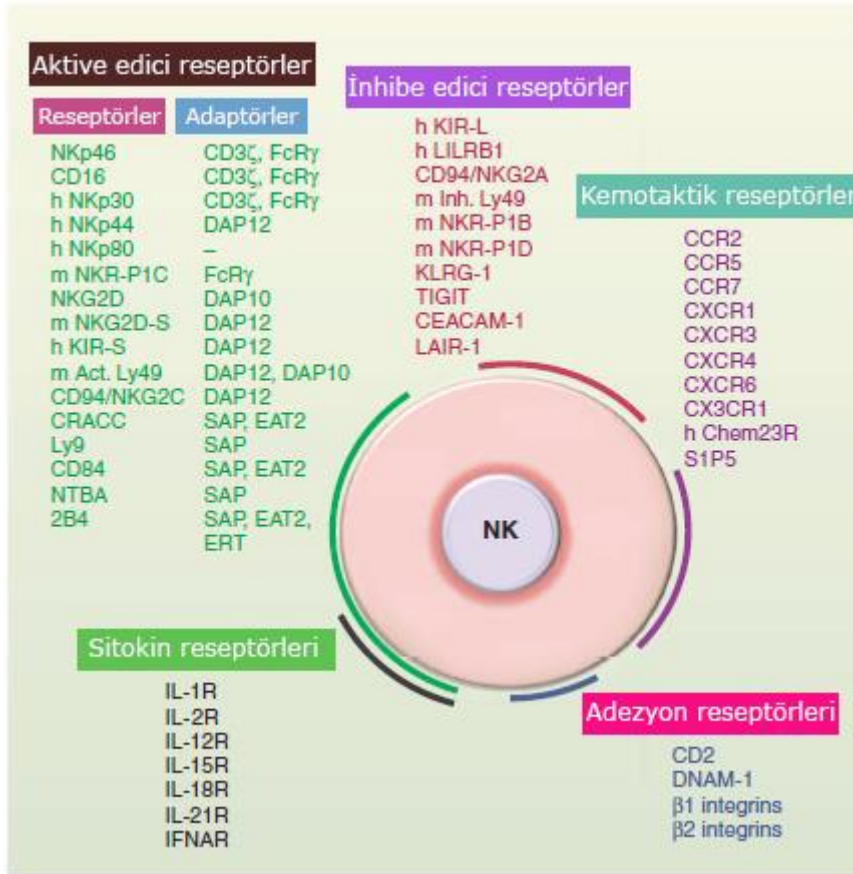
Doğal immünitenin görevi enfeksiyonlarla mücadelede güçlü bir biçimde mikroorganizmaları hedef almaktadır. Gram negatif bakteri membranında bulunan lipopolisakkarit gibi mikrobiyal kaynaklı moleküller doğal immün yanıtı hızla başlatırlar [49]. Vücudumuzdaki hücrelerde olmayan, ancak mikroorganizma ve virüslerde bulunan özelleşmiş yapılar, patojen ilişkili moleküler örgüler (PAMPs) adını alır ve doğal immün sistem hücrelerinin yabancı hücreleri tanımada önemli rol oynar. Doğal immünite, hasara uğramış ve nekrozlaşmış hücreleri de hasar ilişkili moleküler örgüler (DAMPs) yoluyla tanır ve yok eder [50]. PAMPs ve DAMPs'ın doğal immün sistem hücreleri tarafından tanınması bu hücrelerin yüzeyindeki çeşitli reseptörlerin varlığı ile gerçekleşir. Bu reseptörler, hücre membranında, sitoplazmada, bazen de sitoplazmada bulunan endozomlarda yer alır. Doğal immün sistem hücrelerinde bulunan ve immün yanıtın oluşmasını sağlayan başlıca reseptörler Toll-benzeri reseptörler (TLRs), NOD-benzeri reseptörler (NLRs), RIG-benzeri reseptörler (RLR) olarak sıralanabilir [51].

Doğal immün sistem elemanları, epitelyum tabakası (deri, sindirim, solunum sistemleri), fagositler (nötrofiller, monositler, makrofajlar), NK hücreleri, sitokinler (TNF, IL-1, IFN γ , IL-12, IL-10, IL-6, IL-15, IL-18 ve TGF β) ve kompleman sistem proteinleri (C3-C9 proteinleri) olarak sınıflandırılabilir [52, 53]. Çalışmamızla yakından ilgili olduğundan NK hücreleri ve doğal immünitede önemli olan sitokinlerden detaylı olarak bahsedilecektir.

1.3.2.1. NK hücreleri

NK hücreleri, doğal immün sistemin virüs enfekte hücreleri ve tümör hücrelerini tanıyan efektör lenfositleri olarak tanımlanmaktadır ve dolaşımdaki lenfositlerin

%10-15'ini oluştururlar [54]. NK hücreleri, özel bir immünizasyon gerekmeksizin direkt olarak virüs enfekte hücreleri ve tümör hücrelerini yok edebilirler. Bu aktiviteleri STL'lere benzer ve hücre içi veziküllerinde bulunan proteinler (perforin-granzim) aracılığı ile bu işlemi gerçekleştirirler [55]. NK hücrelerinin vücut hücrelerini tanımaması ve onlara zarar vermemesi major doku uyumluluk kompleksi I (MHC-I) tanınması ile olur. NK hücreleri bu tanımayı sahip oldukları özel inhibitör reseptörler (KIR, CD94 ve NKG2) yardımı ile yapar. Reseptörler vücut hücrelerine bağlandıkları zaman inhibitör etkilerini gösterir, NK hücresi de bu hücrelere etki etmez [56, 57]. Bu reseptörlerin dışında NK hücreleri hücre membranlarında aktivitelerini etkileyen farklı reseptör tiplerine sahiptir (Şekil1.4) [58].



Şekil 1.4. NK hücreleri yüzey reseptörleri [58]

NK hücreleri aynı zamanda IFN γ sentezleyen ana hücrelerdir ve salgıladıkları bu sitokin ile T hücre cevabının oluşmasını ve dolaylı olarak da dendritik hücreleri

etkiler [59]. Bunun yanında NK hücreleri birçok proinflamatuvar ve immünbaskılayıcı sitokin, büyüme faktörleri ve kemokinler sentezler [58, 60].

NK hücrelerinin bu yaygın etkileri nedeniyle çalışmamızda kullanılmak üzere bir insan NK hücre hattı olan NK92 (ATCC, CRL2407, USA) hücreleri seçilmiştir. Bu hücrelerle yapılan deneysel çalışmalar, sitotoksikite özelliği ile tümör hücrelerini *in vivo* ve *in vitro* yok edebildiğini göstermektedir [61]. Bu özellikleri ile adaptif immünoterapi amacıyla osteosarkoma, yumuşak doku sarkomaları gibi çeşitli kanser türlerinin faz I ve faz II çalışmalarında kullanılmıştır [62]. Tümör hücreleri ve virüsle enfekte hücrelerle karşılaştırıldıklarında perforin-granzim yolunu kullanarak hücrelerin apoptoza girerek ölümlerine yol açarlar. NK hücrelerinin sitotoksik özelliklerinin yanı sıra, TNF α , IFN γ ve granülosit/makrofaj-koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), IL-13 gibi sitokinleri salgıladıkları görülmektedir [60]. NK92 hücrelerinin bu sitokinleri ve hücre içi granüllerinde bulunan perforini salgılaması için uyarılmasında *in vitro* sistemlerde bir forbol ester türeviden olan Forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) ve bakteriler tarafından üretilen bir iyonofor olan iyonomisin benzeri maddeler kullanılmaktadır [63].

1.3.2.2. Doğal immün sistemin sitokinleri

Mikroorganizma ya da virüsle enfekte olan hücrelerce uyarılmış doğal immün sistemin hücresel elemanları tarafından salgılanırlar [64]. Salgılanan sitokinler genellikle otokrin ve parakrin etkiye sahiptir ancak enfeksiyon durumunda çok fazla salgılandıklarından daha uzaktaki hücreleri de etkileyebilirler. Doğal immünitede etkin olan sitokinler TNF α , IL-1, IL-18, IL-12, IFN γ , IFN α , IFN β , IL-10, IL-6, IL-15 ve TGF β 'dir [65].

TNF α , aktive makrofajlar ve NK hücrelerince fazla olarak üretilen proinflamatuvar bir sitokindir. Primer fonksiyonu birçok proinflamatuvar proteinin (sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri gibi) üretimini arttırmak ve kazanılmış immün sistem hücreleri olan B ve T lenfositlerin aktivasyonu ve çoğalmasını arttırmaktır. Termoregülasyon, lipid metabolizması, kan akımı ve koagülasyon gibi sistemik etkileri de vardır [66-69].

IL-1, doğal immün sistem hücreleri tarafından en çok salgılanan sitokindir. TNF α ile sinerjik etkiye sahip olup, proinflamatuvar proteinlerin (kemokinler ve adezyon

proteinleri) üretimini, B ve T lenfositlerin aktivasyonu ve çoğalmasını aynı zamanda endotel hücresi ve makofaj aktivasyonunu arttıırırlar [70].

IL18, NK hücreleri ve epitel hücreleri tarafından salgılanan bir IFN γ indükleme faktörüdür. NK hücreleri ve STL sitotoksitesini aktive eder [71, 72].

IL-12, aktive makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından salgılanmaktadır. IFN γ ve IL-8 sentezini arttırır ve NK hücreleri ve STL hücrelerinde sitolitik etkinliği arttırır [73].

İnterferonlar, IFN α dendritik hücreler, IFN β fibroblastalar, IFN γ ise NK ve T hücreleri tarafından sentezlenir. Etkileri dendritik hücrelerin ve makrofajların aktifleşmesi, immün sistem hücreleri üzerinde kemokinlerin etkisinin azaltılması ve tüm hücrelerde viral etkinin azaltılmasıdır. Aynı zamanda IFN α ve IFN β antiinflamatuvar etkiye sahiptir [74, 75].

IL-10, makrofajlar, dendritik hücreler ve T hücreleri tarafından sentezlenir. NK hücreleri ve makrofaj aktivasyonunun inhibisyonunu sağlar. Ayrıca IL-1, IL-6, IL-8 ve IFN γ sentezinin inibisyonuna neden olur. İmmün tolerasın oluşmasına katkıda bulunur [76].

IL-6, makrofajlar, endotel hücreler ve T hücreleri tarafından sentezlenir. Miyeloid hücre farklılaşması, B ve T hücrelerini etkileyerek kazanılmış immüniteye katkıda bulunur. Karaciğerde akut faz proteinlerinin sentezine etki ettiği için immün olmayan hücreler üzerinde de etkisi olan bir sitokindir [77, 78].

IL-15, makrofaj ve dendritik hücreler tarafından sentezlenir. Antijen sunucu hücrelerin aktivasyonunu sağlayarak NK hücreleri ve T hücrelerinin çoğalmasını sağlar [79].

TGF β , plateletler, makrofajlar, endotel hücreleri, epitelyum hücreleri, lenfositler ve eozinofiller tarafından sentezlenir. T ve B lenfositler ile NK hücrelerinin çoğalmasını baskılar. Bu nedenle immün baskılayıcı etkisi önemli bir sitokindir [80].

1.3.3. Kazanılmış immünite

Vücudu enfeksiyonlara karşı korumada doğal immün sistemin yeterli olamadığı durumlarda kazanılmış immün sistem göreve başlar. Kazanılmış immünitede

enfeksiyon ajanına özgü hücrelerin (B ve T lenfositler) ve hücresel ürünlerin (antikorlar) oluşması söz konusudur [81]. Kazanılmış immün sistem hücresel ve humoral immün sistem olarak iki sınıfa ayrılır ve her iki sınıfta farklı hücreler görev alır. Ayrıca bu immün yanıtta her antijene karşı özgüllük, yeniden karşılaşılan antijenlere karşı hafıza söz konusudur [82].

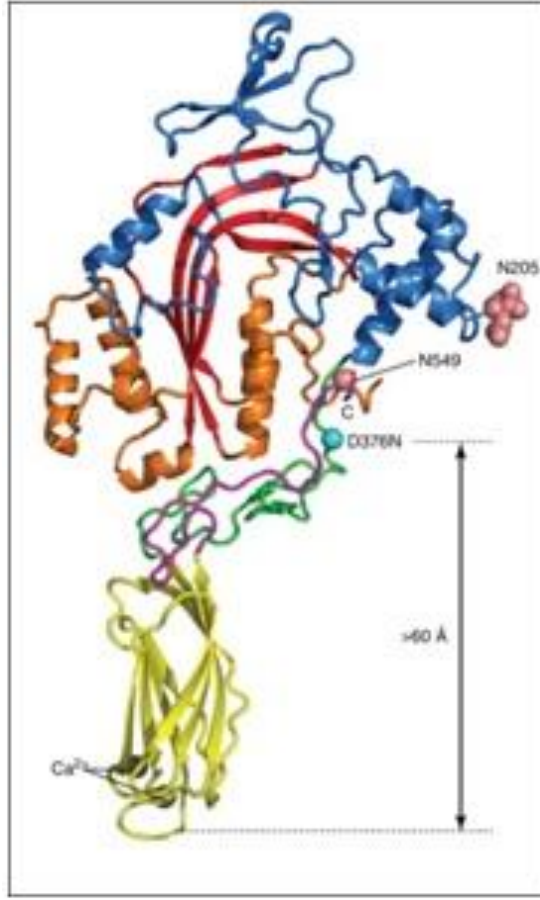
Hümmoral immünitede B lenfositler görev alır. Hümmoral kelimesi hücresel olmayan anlamına gelmektedir. Kan ve dokuların hücresel olmayan bileşenleri ile gerçekleştirilen vücut savunması anlamındadır. Antikor üretimi B hücreleri tarafından gerçekleştirilir [92]. B hücre gelişimi başlangıçta aktivasyon, çoğalma ve farklılaşma basamaklarını içerir. B hücre aktivasyonu antijenle bağlanma ve T hücreler aracılığıyla gerçekleşir. Aktive olan B lenfositler olgunlaşarak antikor üreten B lenfositlerini ve hafıza B lenfositlerini oluştururlar [93, 94]. Antikorlar hümmoral immünitenin kilit elemanlarıdır. Antikorlar dört polipeptid zincirinden oluşur; birbirine eş iki ağır zincir ve iki hafif zincir içerir aynı zamanda her bir zincir değişken ve sabit bölgeler içerir [95]. Hümmoral immünitede antikorlar hücre dışı enfeksiyon ajanlarına bağlanarak onları etkisiz hale getirir ya da kompleman sistemi veya fagositlere hedef göstererek vücut savunması sağlanır [96].

Hümmoral immünitede T lenfositler görev alır. T lenfositlerin antijeni tanınması antijen sunucu hücrenin MHC sınıfı yüzey reseptörlerine bağlanması ile olur [83]. Hümmoral immünitede görev alan T lenfositler; yardımcı T hücreleri; B lenfositlerin antikor üretmesine ve fagositlerin patojenleri yok etmesine yardım eder, STL; enfekte hücreleri yok eden hücreler, düzenleyici T hücreleri (Treg); immün yanıtı enleyen ve sınırlayan hücrelerdir [84, 85]. T lenfositin hümmoral immünitede hedef hücre ile karşılaştığında öncelikle enfekte hücrenin tanınmasıdır. Daha sonraki aşamalar ise enfekte hücreye özgü T lenfositlerin çoğalması ve özgül klonların bellek hücrelerine dönüşmesi şeklindedir [86, 87]. Hümmoral immünite elemanları tarafından salgılanan sitokinler ise IFN γ , TNF α , TGF β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL13, IL-17, IL-21ve IL-22 olarak sıralanmaktadır [88-91]. Sitotoksik T lenfositlerin, patojeni yok etmesi sırasında içinde *perforinlerin* de yer aldığı bir kimyasal süreç rol oynar.

1.3.3.1. Perforin

Perforin, ilk olarak 1985 yılında tanımlanmış, kalsiyum bağımlı por oluşturuçu sitolitik protein olarak karakterize edilmiştir [81, 82]. STL ve NK hücreler tarafından sentezlenen perforin, 534 aminoasitlik ve 67 kilodalton molekül ağırlığında por oluşturuçu bir proteindir ve PRF1 geni tarafından kodlanır. PRF1 geni genomda 10q22.1 lokalizasyonunda bulunur ve 3 ekzon içerir, birinci ekzon herhangi bir aminoasidi kodlamazken ikinci ve üçüncü ekzonlar protein sentezinden sorumludur [83].

Perforin proteini üç ana bölümden oluşmaktadır. Membran atak kompleks perforin alt birimi (MACPF), epidermal büyüme faktörü benzeri altbirim (EGF), Ca^{+2} bağımlı membran bağlanma alt birimi (C2) (Şekil1.4) [84, 85]. MACPF alt birimi por oluşturmaktan sorumlu ana alt birimdir. MACPF aynı zamanda komplement sistemi elemanları C6 ve C9 ile bakterilerde bulunan sitolizin yapısında da bulunan oldukça korunmuş bir alt birimdir [84]. C2 alt birimi ise Ca^{+2} varlığında perforin proteininin hedef membrana bağlanmasında önemli görev alır [86]. C2 alt birimi perforinin sadece pH>6.2 olduğunda hedef membrana bağlanmasını sağlar. Bu durum aynı zamanda hücrede vezikül içindeyken perforinin hücreye zarar vermesini engeller [87].



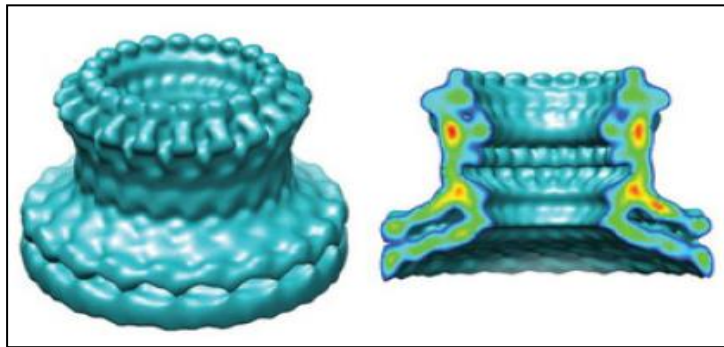
Şekil 1.5. Perforin proteini X-Ray kristal yapısı; MACPF alt birimi mavi/kırmızı/turuncu renkler, EGF alt birimi yeşil renk, C2 alt birimi sarı renkle temsil edilmektedir [85].

Perforin, STL ve NK hücrelerin, virüs enfekte hücreler ve kanser hücrelerine karşı immün yanıt oluşturmada kilit rol oynamaktadır [88]. STL ve NK hücrelerinin düz endoplazmik retikulumunda sentezlenir ve N-Glikolizasyonla modifiye edildikten sonra veziküller içinde depolanır. Bu veziküller içinde perforinle birlikte granzimler bulunur [89]. Granzimler serin esterazlar grubu proteinlerden olup hedef hücrede DNA fragmentasyonunu başlatarak apoptotik hücre ölümüne aracılık ederler [90, 91]. Aynı zamanda çalışmalar perforin yokluğunda granzim işlevinin tam olarak gerçekleşmediğini göstermiştir [91]. STL ve NK hücreleri enfekte hücrelerle karşılaştıklarında granüllerinde bulunan perforin yabancı hücre membranında por oluşturarak granüller içinde bulunan granzimlerin hedef hücreyi öldürmesine aracılık eder [9, 10, 85, 89, 92].

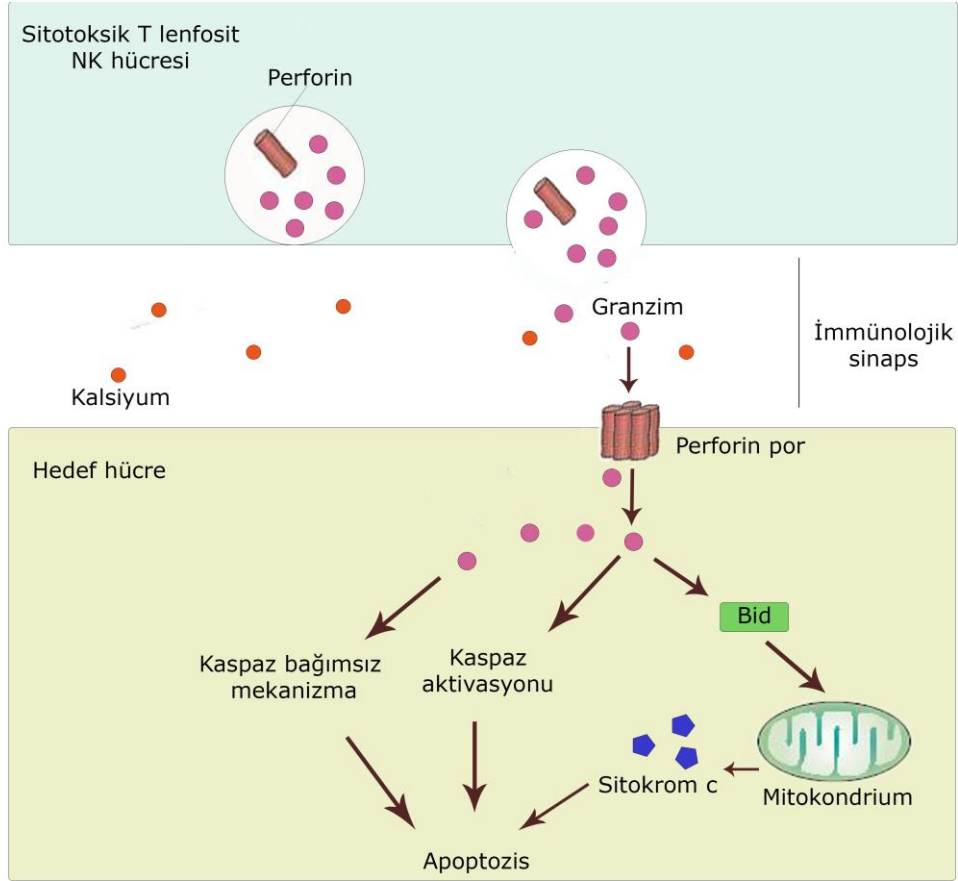
1.3.3.2. Perforin Granzim Yolu

STL ve NK hücreleri uyarıldıklarında ve hedef hücreyi tanımalarını sağlayan reseptörlere bağlandıklarında hedef hücre ile aralarında immünolojik bir sinaps oluşur. Oluşan bu sinaptik alana STL ve NK hücreleri içinde perforin ve granzim bulunan sitolitik veziküllerinin içeriğini aktarırlar [92, 93]. Sitotoksik hücre ile hedef hücre bağlantısı gerçekleştiğinde, sitotoksik hücredeki mikrotübül organizasyon merkezinden sitolitik veziküllerin dynein proteinleri yardımı ile presinaptik membrana doğru hareketi başlar [94]. Presinaptik membran ile birleşen vezikül içeriğini immünolojik sinapsa bırakır. Por oluşturma mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamış olsa da X-ışını kristal yapı analizlerinde immünolojik sinapsta Ca^{+2} varlığında perforin C2 alt birimi ile hedef membrana bağlanmaya başlar ve por oluşturur (Şekil 1.5) [84]. Oluşan porların büyüklükleri 7-16nm büyüklüğünde ve 19-24 alt ünitelerden oluşmaktadır. Bu büyüklükteki por çapı granzimin hedef hücre sitoplazmasına geçmesi için yeterlidir [93]. Özetle, Sitotoksik T lenfosit ve NK hücreleri hedef hücre ile karşılaştığında veziküllerindeki perforin ve granzim immünolojik boşluğa serbest bırakılır. Ortamda kalsiyum varlığında perforin hedef hücrede porlar oluşturur ve granzimin hücre içine girmesini sağlar. Hücre içine giren granzim apoptoz mekanizmalarını aktifleştirir.

Hücre içine perforin aracılığı ile giren granzim hedef hücrede apoptoz mekanizmalarını başlatarak enfekte hücrenin yok edilmesini ve immün cevabın oluşması sağlanır [93].



Şekil 1.6. Perforin por yapısının kriyo-elektron mikroskopisi görüntüleri. *Yüzeyden görüntü ve enine kesit. Enine kesitte yoğunluğa göre renklendirmede kırmızı görünen bölge en yoğun bölge. Çözünürlük 28.5 Å [84].*



Şekil 1.7. Perforin granzim yolu etki mekanizması. [90, 93]'den yararlanılarak yeniden çizilmiştir.

Perforin geni hasarlı fare modelleri ile genel olarak HLH çalışmaları ve özellikle FHL2 çalışmaları için deneysel bir model oluşturulmaya çalışılmıştır [95]. Bu hayvan modellerinde hayvanlar virüs ile enfekte edildiklerinde HLH klinik tablosunu oluşturmaktadır. Ancak bu hayvanların yaşatılmasındaki zorluklar ve araştırma süresince azalan örneklem sayısı, karşılaşılan en önemli sorundur [95-97]. Bütün bunların yanında bu modellerde görülen patojenlere karşı savunmasızlık, yüksek oranda B hücreli lenfoma oluşumu ve tümör metastazları uzun vadede bu çalışmaları olumsuz etkilemektedir [97, 98]. Bütün bunların yanında 2013 yılında yayınlanan geniş çaplı bir araştırmada, çeşitli inflamatuvar hastalıkların insanlarda ve bu hastalıkların fare modellerinde çalışıldığını, sonuçlar karşılaştırıldığında ise fare modellerinden alınan sonuçların insan inflamatuvar cevaplarıyla örtüşmediği gösterilmiştir [99].

1.4. Mezenşimal Kök Hücreler

Kök hücreler, henüz farklılaşmamış hücreler olup kendi kendilerini yenileme yeteneğine sahiptir. Köken aldıkları dokulara farklılaşabildikleri gibi, buldukları ortama ve aldıkları biyolojik uyarılara göre diğer dokulara da farklılaşabilirler [100, 101].

Bütün hücre tiplerine farklılaşarak tek başına tüm organizmayı oluşturabilme yeteneğine sahip hücreye totipotent hücre denir. Ör: zigot. Zigot totipotent özellikte bir hücre olup, tüm organizmayı ve plasenta gibi embriyo dışı destek dokularını da oluşturabilme özelliğine sahiptir. Bütün hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahip olmasına karşın tek başına tüm organizmayı oluşturamayan hücrelere pluripotent hücre denir. Ör: blastosistin iç hücre kitlesi. Blastosistin iç hücre kitlesi farklılaşarak plasenta gibi embriyo dışı destek dokuları dışında organizmadaki tüm diğer hücrelere farklılaşabilirler [102]. Organizmada doğal olarak bulunmayan ancak *in vitro* şartlarda uyarı sonucu meydana getirilen ve pluripotent özellik kazanan hücrelere indüklenmiş pluripotent kök hücre (Induced pluripotent stem cell) (IPS) denir [103]. Sadece birkaç tip hücreye farklılaşabilme yeteneğine sahip hücrelere multipotent hücre denir. Ör: yetişkin kök hücreler. Yetişkin kök hücreler tipik olarak yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretirler ve vücuttaki farklı dokuları tamir yeteneğine sahiptirler. Mezenşimal kök hücreler bu grup içinde yer alır [104].

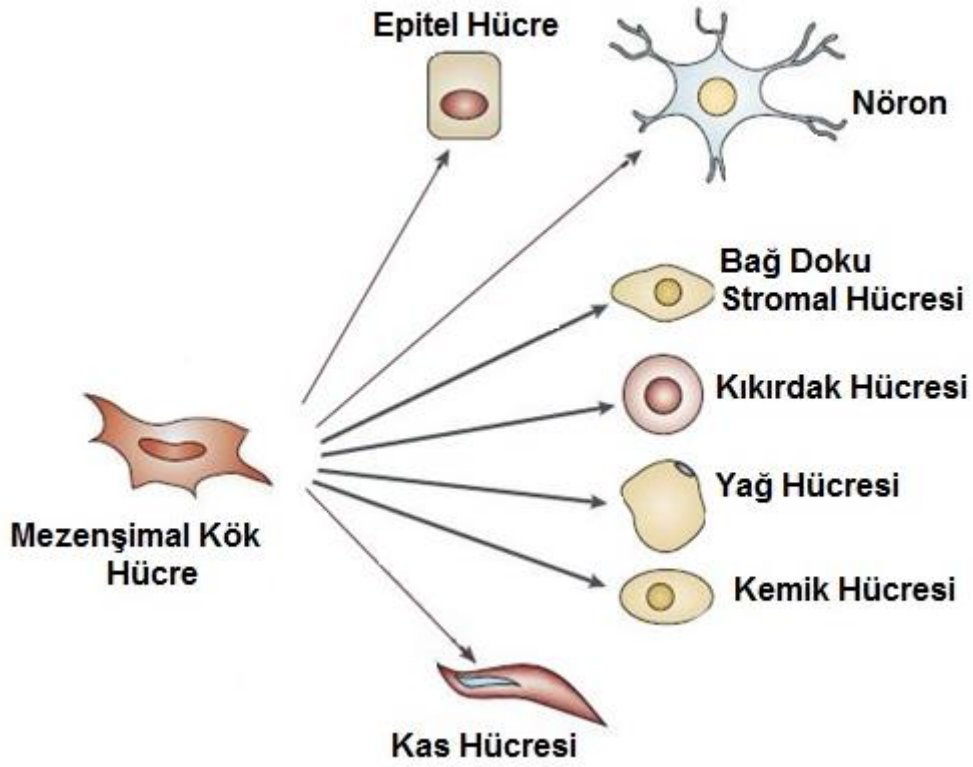
Mezenşimal kök hücreler (MKH) ilk olarak 1970 yılında Friendstein tarafından kemik iliğinden elde edilen, multipotent, klonal gelişim gösteren, spindle-shaped ve monolayer kültürde üreyen hücreler olarak tanımlanmıştır [105]. MKH'ler farklı birçok yetişkin dokudan elde edilebilen multipotent hücrelerdir. MKH izolasyonu için yetişkin dokulardan kemik iliği başta olmak üzere; yağ doku, plasenta, kord kanı, deri, dental pulpa, umbilikal kord wharton jeli, sinoviyal membran gibi birçok doku kullanılabilir [106-112].

Literatürde isimlendirme konusuna farklı yaklaşımlar olmasına rağmen Uluslararası Hücresel Tedavi Topluluğu (ISCT) "multipotent mezenşimal kök hücreler" ya da "mezenşimal kök hücreler" isimlendirmelerini kullanmayı önermiştir. Aynı zamanda ISCT, 2006 yılında farklı kaynaklardan elde edilen

MKH'in karakterizasyonu için minimum kriterler önermiştir. Bu kriterler kısaca 3 maddede özetlenebilir;

- i. Plastik yüzeye tutunabilme,
- ii. CD105, CD90 ve CD73 yüzey belirteçleri pozitifliği, CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79a, CD19 ve HLA-DR yüzey belirteçleri negatifliği,
- iii. Osteoblast, adiposit ve kondroblastlara farklılaşma olarak belirtilmiştir [113].

MKH'ler kemik iliğindeki çekirdekli hücrelerin %0.001–0.01'ini oluşturmaktadır [114]. Bu oran az gibi görünmesine rağmen *in vitro* ortamda çok hızlı çoğalabilmeleri onların hücresel tedaviler için uygun bir kaynak olmasını sağlamaktadır. MKH'ler, kemik, yağ ve kıkırdak gibi mezodermal kökenli dokulara farklılaşabilmektedir [113, 114]. Aynı zamanda düz kas, iskelet kası, kalp kası, endotelial doku, nöron ve hepatosit gibi endodermik ve nöroektodermik dokulara da farklılaşabilirler (Şekil 1.8) [115-120]. Bu geniş farklılaşma kapasitesi, MKH'lerin homojen bir hücre popülasyonu olmaması ve sahip oldukları çok geniş protein içeriğinin çok farklı gelişimsel yolları ve biyolojik aşamaları etkilemesinden kaynaklanır. Bu özellikleri mezenşimal kök hücreleri, hücresel tedavilerde iyi bir kaynak olarak öne çıkmaktadır.



Şekil 1.8. Mezenşimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli

1.4.1. Mezenşimal kök hücrelerin hücresel tedavilerde kullanılması

Sağlıklı bir immün yanıtın oluşabilmesi için immün sistemin uyarılması ve gerekli durumlarda da baskılanabilmesi gereklidir [121]. MKH'ler salgıladıkları faktörler, göç edebilme özellikleri, göç ettikleri dokudaki yerleşme yetenekleri, immün sistemi baskılayıcı ve düzenleyici rolleri sayesinde klinikte birçok hastalığın tedavi edilmesinde umut vaatmektedir. Ancak MKH'lerin klinik uygulamalarında kullanılabilmesi yeterli ve gerekli prelinik çalışmaların yapılmasına bağlıdır [122]. Bu anlamda MKH'ler ile yapılan prelinik çalışmalar iki ana başlık altında yoğunlaşmaktadır:

- *In vitro* çalışmalar
- *In vivo* çalışmalar

In vitro hücre kültürü çalışmaları ile MKH'in içinde buldukları mikroçevrenin taklit edilmesiyle özellikleri hakkında bilgi edinilmektedir. Bunlar da genellikle ko-kültür çalışmaları şeklinde olmaktadır. *In vivo* düzeyde ise farklı hayvan modelleri ile çalışmalar yapılmaktadır. Klinik uygulamalar ise vaka düzeyinde olmaktadır.

Bu uygulamalar, dünyanın farklı bölgelerindeki kliniklerde uygulanmış olup, <http://clinicaltrials.gov> adresinden paylaşılmaktadır. 2008 yılından günümüze kadar Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri, Çin, Kore, Orta Doğu, Kanada, Hindistan, Afrika, Japonya ve Avusturalya'da gerçekleştirilen vaka çalışmaları bildirilmiştir [122]. Uygulamalar giderek artmaktadır. MKH'lerin moleküler düzeyde mekanizmalarının anlaşılmasıyla tedavi için kullanımları da daha güvenli ve yaygın hale gelecektir.

MKH'in kullanım alanlarına baktığımız zaman temel olarak iki farklı kullanım şekli olduğunu söylememiz mümkündür:

1. Rejeneratif amaçlı uygulamalar,
2. *İmmün sistem hastalıklarında kullanılması.*

1.4.2. Mezenşimal kök hücrelerin immün sistem hastalıklarında kullanılması

Mezenşimal kök hücrelerin immün sistem üzerindeki etkileri, düzenleyici ve çoğu kez de baskılayıcı olarak karşımıza çıkmaktadır [123]. Bu da MKH'lerin immün sistem hastalıklarının tedavisinde kullanımını gündeme getirmiştir. Bu noktada iki uygulama şeklinden bahsedebiliriz: 1. Otoimmün hastalıklar ve 2. Aşırı uyarılmış immün cevabın baskılanması [124].

Graft-versus-host-disease (GvHD), kemik iliği ve hematopoietik kök hücre transplantasyonundan sonra karşılaşılan ciddi bir komplikasyondur. Transplantasyon sonrasında hastaların %40'ında ortaya çıkar ve ağır steroidler ile tedaviyi gerektirir. Son yıllarda GvHD fare modellerinde MKH'ler başarıyla uygulanmaktadır. Bu uygulamalarda, MKH infüzyonundan sonra çeşitli organlarda gelişen immün sistem hücrelerinin infiltrasyonunda belirgin bir şekilde düşüş gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, MKH'lerin IFN γ seviyesini düşürerek immün sistemi baskılayıcı rol oynadığını göstermiştir. Tedavi edici etkisi de burada yatmaktadır [125].

Sistemik lupus eritematazus (SLE)'un fare modeli fonksiyonel ras geninin etkisiz hale getirilmesiyle oluşturulmuştur. Fare modelinde SLE'nin tedavi edici etkisi kanıtlanmıştır. Yapılan MKH uygulamasının serumdaki otoantikör miktarını düşürdüğü ve renal fonksiyonda düzelmeye sebep olarak aktif SLE

semptomlarında azalmayı sağladığını göstermiştir [126]. Multiple sklerozis (MS) hayvan modelinde de MKH'lerin etkileri çalışılmıştır. MKH'lerin sistemik olarak uygulanması ile immün sistem hücrelerinin miyelin kılıf üzerine infiltrasyonunda azalma görülmüştür, CD4+ T hücrelerinin ve IL-17'nin plazma seviyelerinde düşme meydana gelmiştir. MKH uygulamasının özellikle hastalığın patogenezinin en yüksek olduğu evrede etkili olduğu, stabil evrede çok belirgin bir etkinin meydana gelmediği görülmüştür [127]. Bu da MKH'lerin etkilerini göstermesinde ortamda bulunan uyarıcıların önemini göstermektedir. GVHD'da kemik iliği transplantasyonundan sonra MKH'ler başarı ile uygulanmaktadır. Benzer şekilde SLE ve Chron's hastalığında otojenik ve allojenik MKH'ler inflamasyonu baskılayıcı, böbrek ve bağırsağı koruyucu etki yapar ve hasar oluşumunu azaltır. Hematopoitik kök hücre transplantasyonu sırasında, MKH uygulanması hematopoitik hücrelerin kemik iliğine adaptasyonuna imkan sağlar böylece transplantasyon süreci kolaylaşır ve hızlanır [124, 128].

Prelinik çalışmalar ve klinik uygulamalar, MKH'lerin immün sistemi düzenleyici rolleri bakımından ümit vericidir. Ancak bu hücrelerin güvenle kullanılabilmesi için MKH'lerin immün sistem üzerindeki düzenleyici rollerinin çok daha iyi anlaşılabilmesi gerekmektedir.

1.5. Mezenşimal Kök Hücrelerin İmmün Sistem Üzerindeki Etkileri

Mezenşimal kök hücreler, doku iyileşmesi ve inflamasyon sürecinde de yer alırlar. Bu süreçteki etkilerini, kazanılmış immünite ve doğal immünite üzerinden gerçekleştirmektedirler [129]. Kazanılmış immünitede, MKH'lerin aşırı aktive olmuş T hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı ve bu baskılamanın Go/G1 evresinde hücrelerin tutuklanmasını sağlayarak olduğu bilinmektedir. MKH'ler aynı zamanda proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını da baskılayarak immün sistemi baskılayıcı rol oynamaktadır. Bu proinflamatuvar sitokinler, IFN γ , TNF α , IL-6 and IL-17'dir. Bununla birlikte anti-inflamatuvar sitokinler olarak bilinen IL-4 ve IL-10 düzeylerinin arttırıcı rol oynamaktadır. MKH'in B hücreleri üzerindeki etkileri hala tam olarak anlaşılammış olsa da yapılan çalışmalar, B hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermektedir [130].

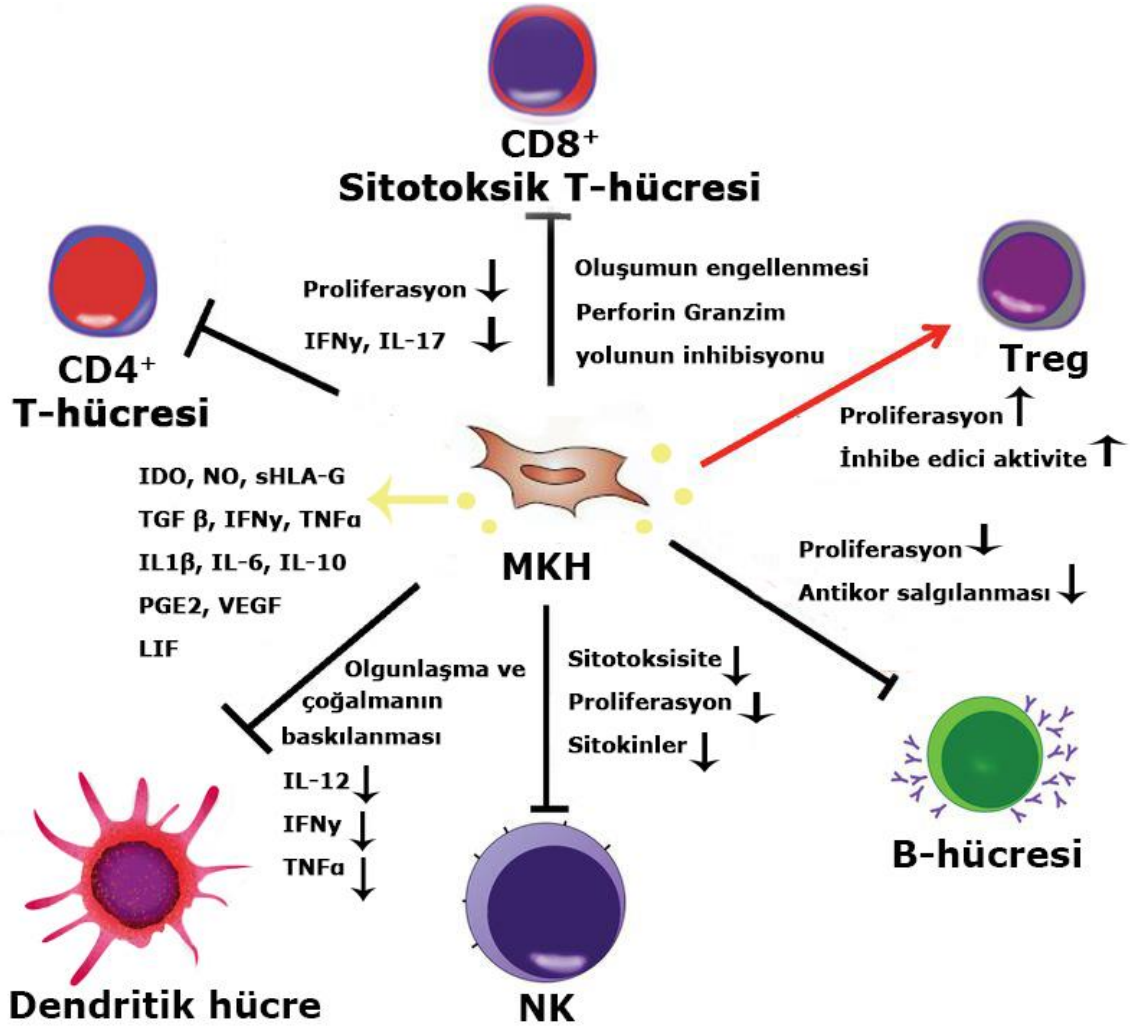
MKH'lerin ayrıca doğal immünite üzerinde de inhibe edici etkisi olduğu bilinmektedir. Bu etkisinin ise monositlerin olgunlaşmasını inhibe etmek ve hematopoietik kök hücrelerin dendritik hücrelere farklılaşmasını engellemek yoluyla olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda olgunlaşmış dendritik hücrelerin yüzeyindeki MHC-II, CD11c ve CD83 ifadesini baskıladıkları da bilinmektedir [131].

MKH'ler, immün sistem üzerindeki etkilerini;

- B hücreleri
- T hücreleri
- Düzenleyici T hücreleri (Treg)
- NK hücreleri
- Dendritik hücreler (DC) üzerinden gösterirler.

Bu hücrelerin;

- Olgunlaşmasını, farklılaşmasını ve aktivasyonunu
- Proliferasyonunu
- Sitokin ve kimokinleri salgılama fonksiyonunu
- Sitotoksitesini
- Kemotaksik özelliğini ve dokuya yerleşimini
- Hücre-hücre etkileşimini
- Bazı moleküllerin sentezini etkiler, şeklinde sıralayabiliriz (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Mezenşimal kök hücrelerin immün sistem ile etkileşiminin şematik olarak gösterilmesi. (*IDO*; Indolamine 2,3-dioksigenaz, *NO*; nitrik oksit, *sHLA-G*;çözünebilir insan lökosit antijeni G, *IFN γ* ; interferon gamma, *TGF β* ; transforme edici büyüme faktörü beta, *TNF α* ; transforme edici büyüme faktörü alfa, *PGE2*; prostaglandin E2, *VEGF*; vasküler endotelial büyüme faktörü, *LIF*; Lökemia inhibitörük faktör)

MKH'ler, MHC-I yüzey antijenini çok düşük düzeyde ifade ederek, iyi bir immüntolerans gösterirler. Bu durum antijen sunucu hücrelerin de uyarılmasını zayıflatır. Diğer yandan MHC-II yüzey antijeni taşımazlar. İmmün sistemin uyarılmasını bu yolla en aza indirmiş olurlar [132]. Bu özellikleri MKH'lerin rejeneratif kullanımlarında önemlidir. Bu şekilde allojenik MKH transplantasyonunun yapılabilmesine olanak tanımaktadır. Ancak elbette günümüzde hedeflenen, zorunlu haller dışında doku yenilenmesi için MKH'lerin otolog olarak kullanılabilmesidir.

Diğer yandan MKH'ler, immün sistemi baskılayıcı özellik gösterirler. Burada etkilerini, genellikle immün sistem hücreleri ile doğrudan etkileşime girerek ve salgıladıkları faktörler sayesinde bu hücrelerin aktivitelerini değiştirerek gerçekleştirirler. MKH'ler aynı zamanda Toll-like reseptörler (TLRs) 2, 3, 4, 7 ve 9 ifade ederler [133]. Bu reseptörlerin liganları ile uyarılmaları sonucunda hücrelerde oluşan değişiklikler, MKH'lerin immün sistem üzerindeki etkilerini düzenler.

1.5.1. Mezenşimal kök hücrelerin kazanılmış immünite üzerindeki etkileri

Kazanılmış immüniteden esas olarak sorumlu olan hücreler, B ve T lenfositleridir. B ve T lenfositleri yüzelerinde taşıdıkları bazı reseptörler aracılığıyla, antijen sunucu hücreler ile bağlantı kurar ve immün yanıtın oluşmasını sağlar. MKH'ler de bu sırada salgıladıkları faktörler sayesinde immün yanıtın düzenlenmesini sağlar [128].

B hücreleri: MKH'ler, B hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması ve olgunlaşmasını baskılayıcı etki gösterirler. MKH'in lipopolisakkaritler, oligodeoksinükleotidler, CD40L, IL-2, IL-4 ya da IL-10 tarafından uyarılmış B lenfositlerinin proliferasyonunu önlediği gösterilmiştir [121]. MKH'lerin kültür ortamından toplanan conditioned mediumun B lenfositlerinin proliferasyonunu ve antikör üretimini azalttığı gösterilmiştir. Ancak böyle bir ortamda immünespresif etkinin görülebilmesi için kullanılacak MKH/B lenfosit oranının doğru belirlenmesi önemlidir [134]. MKH'lerin B lenfositleri ile olan etkileşimi (Şekil 1.9)'de gösterilmiştir.

T hücreleri: MKH'ler T hücrelerinin proliferasyonunu durdurucu etki yaparlar. Bununla birlikte MKH'in IFN γ üretimini baskılar ve T hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahiptir. Burada inhibisyon özellikle IFN γ üretimi üzerinden gerçekleşmektedir. MKH, T hücrelerindeki IFN γ reseptörlerini ya da hücrelerden IFN γ üretimini inhibe ederler. MKH-T lenfosit etkileşimi (Şekil 1.9)'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. MKH'ler CD4+ ve CD8+ düzenleyici T hücreleri (Treg) ile doğrudan bağlantı kurdukları gibi aynı zamanda bu hücrelerin TGF β ve prostoglandin sentezini de etkiler ve HLA-G5 ifadesini arttırır [128, 135].

MKH'ler bu etkilerini salgıladıkları birtakım faktörler aracılığıyla gerçekleştirirler. Bu faktörler ve fonksiyonlarını şu şekilde özetleyebiliriz:

Indolamine 2,3-dioksigenaz (IDO): Triptofan miktarını düşürerek hücre proliferasyonunu inhibe eder.

Nitrik oksit (NO): Hücre aktivasyonunu inhibe eder.

Hepatosit büyüme faktörü (HGF): Hücre proliferasyonunu inhibe eder, sitotoksik etki gösterir.

sHLA-G ve TGFβ: Genel olarak sitotoksik etki gösterir ve hücre proliferasyonunu inhibe eder. Ancak düzenleyici T lenfositler üzerinde uyarıcı etkiye sahiptir.

Prostaglandin 2 (PGE-2): Sitotoksik etki yapar. Dendritik hücre ve Treg hücrelerinin uyarılmasını inhibe eder.

IFN γ , TNF α , IL-1 β : Kemokin üretimini ve NO ve IDO gibi immünsüpresif faktörlerin üretimini artırır.

IL-6: Hücre göçünü düzenler, mitozu ve anjiyogenezisi uyarır.

IL-10: Apoptozisi inhibe eder.

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF): Apoptozisi inhibe eder, anjiyogenezisi uyarır.

Lökemia inhibitörük faktör (LIF): Apoptozisi inhibe eder

CCLs ve CXCLs : Lökositlerin migrasyonunu uyarır.

1.5.2. Mezenşimal kök hücrelerin doğal immünite üzerindeki etkileri

Doğal bağışıklıktan temel olarak sorumlu hücreler, dendritik hücreler ve NK hücreleridir. MKH'lerin bu hücreler üzerindeki etkisi aktivitelerini düşürmek şeklinde olmaktadır [123, 124].

Dendritik hücreler (DC): Dendritik hücreler antijen sunucu hücreler olarak doğal bağışıklıkta görev yaparlar. Bu hücreler, CD34+ ve CD14+ hücrelerdir. Bu hücreler, GM-CSF, TNF- α ve/veya IL-4 varlığında uyarılarak olgunlaşır ve aktive olurlar. Olgunlaşmalarını tamamlamaları için aynı zamanda lipopolisakkaritler (LPS), TNF- α ve CD40 ligandı tarafından da uyarılmaları gerekmektedir. Bu

sinyallerin olmadığı durumlarda DC'ler inaktive formda kalır ve iDC olarak tanımlanırlar. MKH'ler, DC'lerin iDC halinden olgun DC'ye dönüşmesini inhibe ederler. Bu inhibe edici etkide özellikle IL-6 ve PGE-2 rol oynar (Şekil1.9) [136]. Bu şekilde etkin DC'lerin oluşması baskılanmış olur.

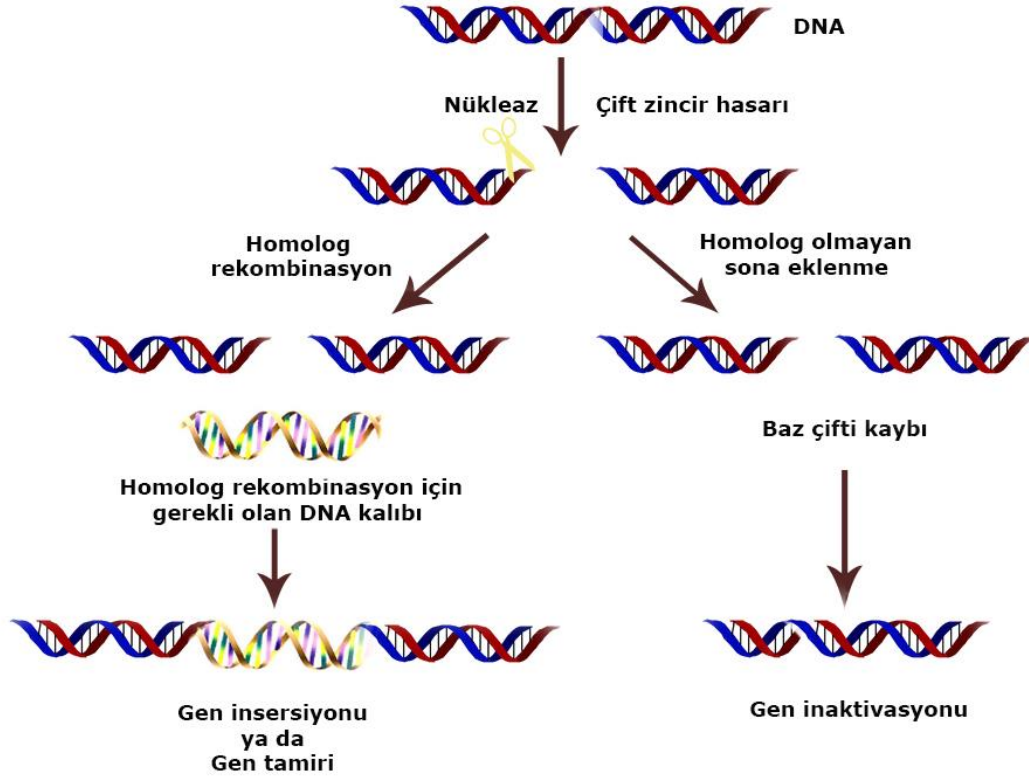
NK hücreleri: MKH'ler IL-2 ile aktive edilmiş NK hücrelerinin çoğalmasını baskılayıcı etkiye sahiptir. Bu işlemi hücre-hücre bağlantısı ile yapabildiği gibi salgıladığı TGF β , HLA-G gibi immün baskılayıcı faktörlerle gerçekleştirir [137]. NK hücreleri onları aktive eden moleküllerle ve MKH'lerle aynı anda ko-kültüre edildiğinde CD132, CD56, NKR2B4 gibi yüzey reseptörlerinin baskılandığı ve bu durumun NK hücresinin sitotoksik etkisini baskıladığı gösterilmiştir [137, 138]. Aynı zamanda MKH'ler tarafından sentezlenenIDO, TGF β , PGE2 ve HLA-G5 gibi faktörler immün baskılayıcı fonksiyonu desteklemektedir [131, 139]. Bu nedenlerle MKH'ler aktive olmuş ve olmamamış NK hücrelerinin çoğalmasını, sitokin üretimini ve sitotoksik aktivitesini baskılar (Şekil1.9) [140].

1.6. Gen Hedefleme Yöntemleri

2004 yılında insan genom projesinin tamamlanması, gen fonksiyonları ve genlerde olan mutasyonlar nedeniyle oluşan hastalıklarla ilgili araştırmaların yapılmasında önemli bir basamak oluşturmuştur [141]. Hasarlı gen bölgesinin bulunması ve bu bölgelerin gen tedavisi ile tamirinin yanında genetik hastalığın araştırılmasına olanak tanıyan hücre ve hayvan modellerinin oluşturulması önemli hedeflerdendir. Ulaşılabilir ve gerçekleştirebilir gen hedefleme yöntemlerinin gelişmesi gen hasarlı hatalıklara yönelik genel bilimsel çalışmaların yanında kişiye özel çalışmalar yapmayı mümkün kılmıştır [142]. Gen hedeflemede ilk olarak RNA interferans yöntemleri kullanılmış ve çift iplikli RNA ile genler susturulmaya çalışılmıştır [143]. RNA interferans ile gen hedefleme yöntemi araştırmacılara ucuz ve hızla yapılabilen bir yöntem olarak kolaylıklar sağlamaktadır. Bu nedenle RNA interferans birçok çalışmada gen hedefleme amacıyla kullanılmış ve çeşitli hücre tiplerinde (HeLA, 3T3, MEF, Cos1) başarıya ulaşmıştır. Ancak bu sistemin farklı çalışma gruplarında farklı sonuçlar elde edilmesine yol açması çalışmaları negatif etkilemektedir [143, 144]. Aynı zamanda hedeflenen bölge dışında etkilerin olması, hedeflemenin geçici olması, uygulamada kullanılacak uygun solüsyonun

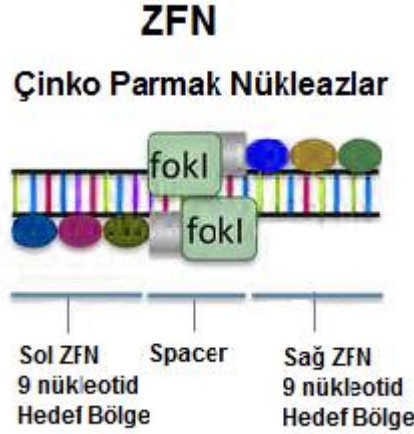
bulunmasındaki zorluklar ve toksisite, çalışmalarda yaşanan zorluklardandır [145, 146].

Günümüzde artık gen hedeflemede en çok kullanılan yöntemler DNA'da çift zincir hasarı oluşturarak geni hedeflemek yönündedir. Bu yöntemlerde DNA'da istenilen bölgeyi hedefleyen ve DNA iki zincirini de kesecek olan özel tasarlanmış nükleazlar kullanılmaktadır [147]. DNA'da oluşan çift zincir kırıklarının onarılması iki yolla gerçekleşmektedir. Birincisi olan homolog rekombinasyon (HR), DNA'da oluşan kırık homolog DNA zinciri kalıp alınarak tamir edilir, ikincisi olan homolog olmayan sona eklenme (NHEJ) de ise, kırık olan DNA uçları birbiri ile tekrar birleşir (şekil1.10). Çift zincir kırığının tamirinde bu iki mekanizmadan hangisinin tamir için kullanılacağı hücre döngüsünün evresine bağlıdır [148-150]. Bu doğal mekanizma DNA hedefleme çalışmalarında hedeflenen bölgede mutasyon oluşturma, mutasyonlu bölgede düzeltme yapma ve hedeflenen bölgeye bir gen yerleştirmeyi mümkün kılmaktadır [147, 151]. Gen hedeflemede çift zincir kırıklarını sağlayabilen ve istenilen bölgenin hedeflenmesini sağlayan üç sistem söz konusudur. Bu sistemler çinko parmak nükleazlar (ZFNs), transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALENs) ve *kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR/Cas)* olarak sınıflandırılabilir.



Şekil 1.10. DNA çift zincir kırıkları onarım mekanizması

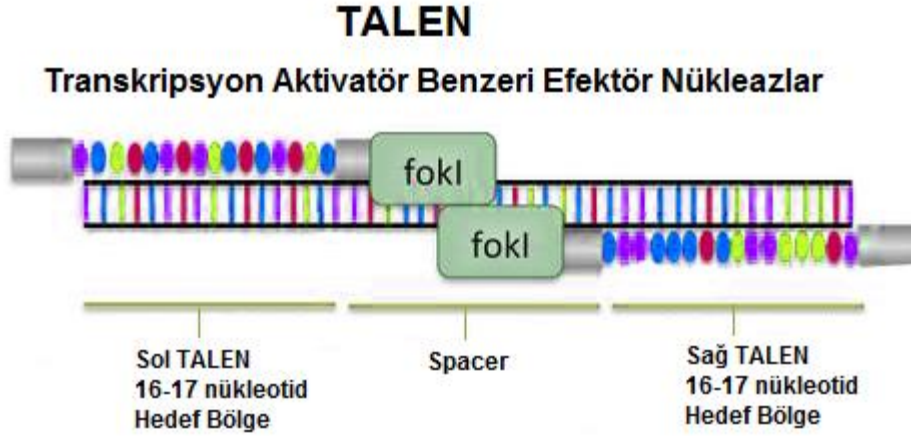
ZFNs, iki kısımdan oluşur DNA bağlanma bölgesi ve nükleaz aktivitesi olan DNA kesim bölgesini içerir (Şekil1.11). DNA kesim bölgesi (FokI) nükleaz aktivitesine sahip olan kısımdır ve herhangi bir özgüllüğü yoktur. Çinko parmak proteinleri, ökaryot genomunda DNA tanınması, RNA paketlenmesi, protein katlanması ve transkripsiyon aktivasyonu gibi görevleri olan proteinlerdir [152]. Protein 30 aminoasit içeren dokuz adet birbirine benzer üniteden oluşur ve her bir çinko ile iki sistein ve iki histidin içerir [153]. Her bir çinko parmak proteini DNA'nın büyük oluğunda üç adet bazı tanıyarak bağlanabilir ve bu şekilde altı adet çinko parmak proteini içeren bir ZFNs genomda 18 bazlık bir bölgeyi tanıyabilir [154].



Şekil 1.11. Çinko parmak nükleazların şematik görünümü

Günümüze kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde ZFNs'ların farklı organizmalarda birçok geni hedeflemede kullanılmıştır. Bu hedeflemeler NHEJ mekanizması ile genleri susturma ya da HR ile genlerin ifadesini sağlama şeklinde olmuştur [155]. Ayrıca HIV tedavisine yönelik faz I klinik araştırmalarda ZFNs'lerin kullanılması çalışmaları yapılmaktadır [156]. Başarılı olan ZFNs çalışmalarının yanında ZFNs'larla ilgili sınırlamalar söz konusudur; genomdaki bütün bölgeler ZFNs'larla hedeflenememektedir. Çünkü ZFNs motifleri bütün olası nükleotidler için tanımlanmamıştır. 18 bazlık bir nükleotid dizisi genomda hedeflenen bölgelere de bağlanabilir ve hedeflenen bölge dışı çift zincir kırığı hücrenin ölümüne sebep olabilir [157].

TALENs, transkripsiyon aktivatör benzeri (TAL) efektör proteinleri ve DNA'yı kesen nükleaz aktivitesi (FokI) olan kısımlardan oluşur (Şekil 1.12) [158]. TAL proteinleri 30-35 aminoasitlik tekrar bölümleri içeren ve bu bölgelerle DNA'yı tanıyarak bağlanan transkripsiyon faktörleridir. DNA'ya bağlanmayı sağlayan özel tekrar dizilerinin her bir nükleotid için özel dizileri bulunmaktadır. Bu da TALENs'ların gen hedefleme için kullanılabilir olmasını sağlamaktadır [159]. Her bir nükleotidi hedefleyen farklı TAL tekrarları bir araya getirilerek gen hedeflenmesi yapılacak bölgeye özgü TALENs'lar elde edilmektedir. Karşılıklı iki zincir için tasarlanan TALENs'ların arasında nükleaz enziminin kesim bölgesini oluşturmak için 12-20 bazlık "spacer" adı verilen dizilere yer verilmelidir [160].



Şekil 1.12. Transkripsyon aktivatör benzeri efektör nükleazların şematik görünümü
TALENs'lar kullanılarak böceklerden nematodlara kadar birçok başarılı gen hedefleme çalışması gerçekleştirilmiştir [161, 162]. TALENs kullanılarak yapılan gen hedefleme çalışmaları oldukça başarılıdır. NHEJ mekanizması ile gen susturma oranı %30-100, HR ile gen ekleme oranı %1-10'dur [163].

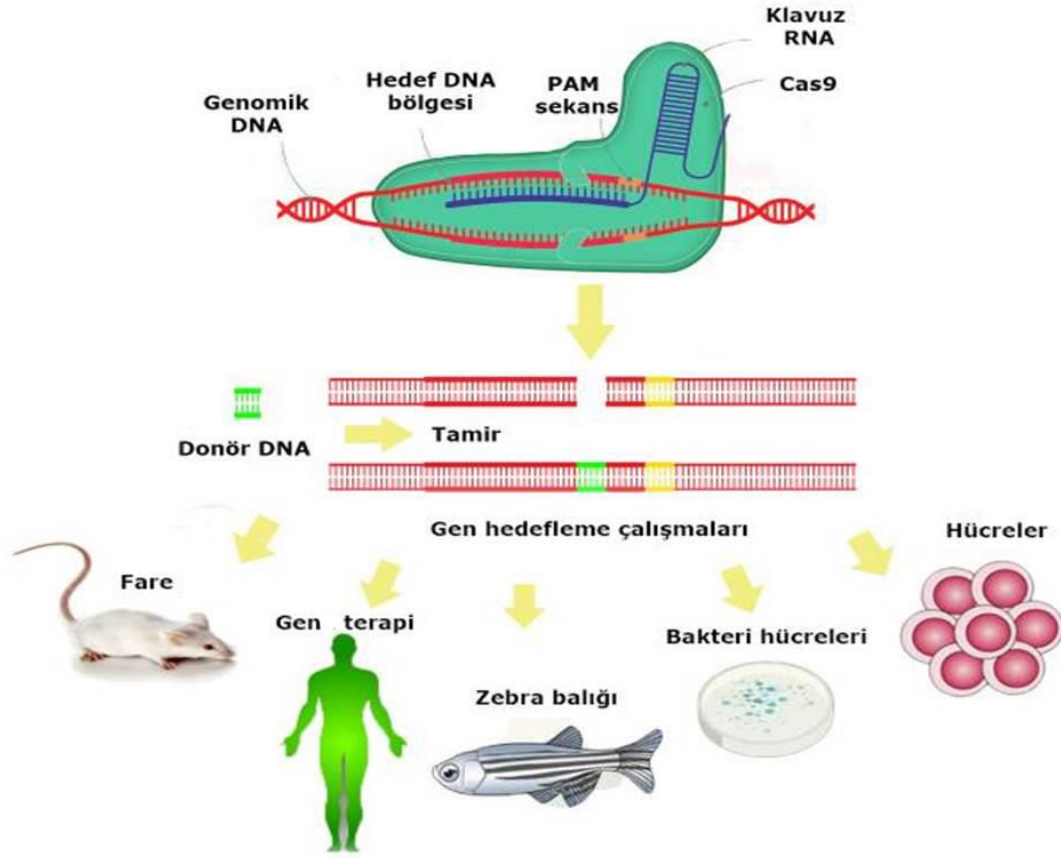
1.6.1. Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* CRISPR/Cas)

CRISPR/Cas sistemi prokaryotların immün sistemi olarak tanımlanan ve bakterilerin kendilerine yabancı DNA ve RNA'ları yok etmek için kullandığı bir sistemdir. İlk olarak 1987 yılında *E. coli*'de tanımlanmış ve Arkea bakterilerin %84'ünde, bakterilerin ise %45'inde bulunan bir sistemdir [164, 165]. CRISPR bakteri genomunda kısa tekrar eden diziler ile birbirinden ayrılmış "spacer" adını alan özel DNA dizilerinden oluşmaktadır. Bu diziler tekrar-spacer-tekrar şeklinde devam etmektedir. Her bir spacer bakteri genomuna bakteriyi enfekte etmiş virüs veya faj DNA'sından katılmış nükleotid dizileridir. Bu şekilde bakteri bir sonraki karşılaşmada spacer bölgesinde dizisini içerdiği virüs ya da faj ile enfekte olmaz [166]. Aynı zamanda CRISPR gen bölgesi tekrarlar ve spacerlar dışında CRISPR ilişkili genler (Cas) bölgesini içerir. Bu genler endonükleaz, helikaz, transkripsiyon düzenleyici proteinleri kodlar [167].

CRISPR/Cas sisteminin çalışma mekanizması öncelikle enfekte olan bakterinin konakçı genetik materyalinden spacer bölgeleri seçmesi ile gerçekleşir. Bu bölgeleri seçmede protospacer adjacent motifs (PAM) adı verilen ve korunmuş

özgöl diziler spacer seçiminde kılavuzluk eder. Seçilen spacerların CRISPR genom bölgesine entegrasyonunda çeşitli Cas proteinleri önemli görev alır. Spacer ve Cas genleri ifade edilerek CRISPR RNA (crRNA)'lar oluşturulmaya başlanır. crRNA'lar öncelikle uzun pre-crRNA olarak sentezlenir ve sonrasında küçültülerek crRNA'yı oluşturur. Hedef genetik materyal ile karşılaşan crRNA, PAM bölgesi ve spacer aracılığıyla hedef genetik materyale bağlanır ve Cas proteininin nükleaz aktivitesi ile hedef genetik materyali degrades eder [168-170].

CRISPR/Cas sisteminin memeli hücrelerinde gen hedefleme amacıyla kullanılabileceği ile ilgili ilk yayın, Cong ve arkadaşları tarafından Şubat 2013'te yayınlanan bir makale ile gösterilmiştir [171]. Oluşturdukları CRISPR/Cas gen hedefleme sistemi nükleaz aktivitesi olan insan kodon sistemine optimize edilmiş bir Cas9 proteini, hedeflenen bölgeyi içeren kılavuz RNA bölgesi ve PAM bölgesi içerir. Hedef bölgeye ait seçilen 20 bazlık dizi PAM bölgesi önüne yerleştirilir ve DNA kesim bölgesi hedef DNA dizisinin önünde bulunan PAM bölgesinden gerçekleşir (Şekil1.13) [171, 172]. CRISPR/Cas sisteminin ökaryotlarda gen hedeflemede kullanılabileceğinin gösterilmesinin ardından gen susturma, gen aktivitesi düzenleme ve genetik hastalıklarda hasarlı geni düzeltmeye yönelik CRISPR/Cas sistemi kullanılması ile ilgili çalışmalar artmıştır [173, 174].



Şekil 1.13. Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar sisteminin (CRISPR/Cas) şematik görünümü ve kullanma alanları

CRISPR/Cas sistemi kullanılarak gerçekleştirilen gen hedefleme çalışmaları tütün bitkilerinden, mayaya ve insan hücrelerine kadar geniş bir alanda devam etmektedir [173]. Hüresel modeller oluşturmak üzere CRISPR/Cas sistemi kalıcı transfeksiyonla hücelere uygulanabilmektedir. Ayrıca bu sistemlerin embriyonik kök hücelere uygulanması ile transgenik hayvan modelleri oluşturulabilmektedir. Aynı anda iki gen hedeflenerek gerçekleştirilen çalışmada her iki genin aynı anda hedeflenmesindeki başarı %80 oranındadır [175].

CRISPR/Cas sistemi kullanılarak gerçekleştirilen gen susturma yöntemi ile von Willebrand hastalık modeli domuzlar üretilmiştir. Bu hastalıkta etkin olan gen vWF'yi hedefleyen CRISPR/Cas sistemi vektörleri embriyolara enjekte edilmiş ve embriyolar domuzlara transfer edilmiştir. Elde edilen yavrularda gen ifadesinin olmadığı gösterilmiştir. Bu çalışma CRISPR/Cas sistemi ile tek aşamada etkin bir

şekilde genomu modifiye edilmiş hayvan modeli oluşturulduğunu göstermektedir [176].

Bu genel bilgiler ışığında, ülkemizde dünyaya oranla sıklığı yüksek olan ve yaşam koşullarını olumsuz etkileyen FHL2 hastalığı ile ilgili literatür taraması yapıldığında; HLH temelli bir hücre modelinde MKH'lerin etkisinin incelendiği bir çalışma bulunamamıştır. Bu nedenle tez çalışmamızda amaç;

1. CRISPR/Cas sistemi ile DNA hedeflenerek FHL2 için tipik özellik olan perforin gen defektli bir *in vitro* model NK hücre hattı oluşturmak.
2. Elde edilen bu modelde MKH'lerin immün modülatör etkisi araştırmaktır.

Hayvan modellerinde oluşan inflamatuvar cevap ile insan inflamatuvar cevabı arasındaki farklılık göz önüne alındığında oluşturulacak *in vitro* modelde MKH'lerin etkilerinin incelenmesinin sağlayacağı bilimsel katkı çok büyüktür. Günümüzde devam eden klinik çalışmalarda MKH'lerin GvHD için immün modülatör olarak kullanılması söz konusudur. GvHD ile FHL2 tedavisinde kullanılan immün baskılayıcı tedavi süreçleri birbirine oldukça benzemektedir. Bu nedenle çalışmamızda MKH'lerin immün modülatör etkisinin FHL2 modeli bir hücre hattında çalışılması oluşturulacak klinik çalışmalar için gerekli verilerin eldesi açısından önemlidir. Bu *in vitro* çalışma yapılacak *in vivo* ve klinik çalışmalar için önemli bir basamak olacaktır. Bunun yanında MKH'lerin FHL2'de immün modülatör etkisinin araştırılması ile elde edilecek sonuçlar FHL2 tedavisinde kök hücre donörü bulunana kadarki süreçte hastaya uygulanabilecek tedaviler için önemli bilgiler sağlayarak, uygun donör bulunana kadar geçecek sürede hastanın hayatta kalmasını sağlamak için kullanılacak tedavilere önemli bir destek tedavi yöntemi olarak kullanılabilecektir.

2. LABORATUVAR ÇALIŞMASI ve YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

2.1.1.Mezenşimal kök hücrelerin eldesi ve kültürü

İnsan Kemik İliği Mezenşimal Kök Hücrelerinin (insan MKH) izolasyonu ve kültürü Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu LUT12/134-16 karar numaralı etik kurul izni çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. İzolasyon, ilk pasajlarda kültür ve karakterizasyon aşamaları Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

İnsan MKH'lerinin izolasyonu amacıyla 3 sağlıklı gönüllüden elde edilen kemik iliği örnekleri laboratuvara getirilmiştir. Plazma ayrılması için, heparinli enjektörde gelen kemik iliği örnekleri, 2300 RPM'de 10'dk santrifüj edilmiştir. Plazması uzaklaştırılan kemik iliği örneklerinden, başlangıç hacminin 2 katı miktarda phosphate-buffered saline (PBS, pH=7,5) ile dilue edilmiştir. Dilue edilen örnek Ficoll'le konsantrasyon gradienti oluşturularak ayrılmıştır. Elde edilen mononükleer hücreler 2 kez PBS ile santrifüj edilerek yıkanmıştır. İzole edilmiş olan hücrelerin sayısı ve canlılığına hemositometre lamında bakılmıştır. Sayım sonrası hücreler, 25cm² kültür kabına 3x10⁶ hücre olacak şekilde, %10 Fetal Bovine Serum (FBS, Biochrom, Germany) %1 Penisilin-Streptomisin (Biochrom, Germany) ve %1 L-Glutamin (Biochrom, Germany) içeren %60 Dulbecco's Modified Eagle's medium-Low Glucose (DMEM-LG) /40 MCDB201 (Biochrom, Germany /Sigma, USA) besi ortamı içerisinde, 37°C, %95 hava ve %5 CO₂ nemli inkübatörde standart koşullarda kültüre edilmiştir. Hücrelerin takibi aşamasında besi ortamı 3-4 günde bir değiştirilmiş ve hücreler kültür kabının yüzeyini %70-80 oranında kapladıklarında, 0,25% tripsin-10mM EDTA (Biochrom, Germany) kullanılarak pasajlanmıştır. İnsan MKH'lerinin karakterizasyonları Pasaj 3 olduklarında yapılmıştır.

İnsan MKH'lerinin karakterizasyonu Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde rutin olarak uygulanan mezenşimal kök hücre karakterizasyon paneli kullanılarak akım sitometrisi yöntemi ile yapılmıştır. Bu

panelde hücrelerdeki stromal işaretleyiciler; CD105, CD73, CD166, CD140b (PDGF-R bb), CD90, CD44, CD106, CD146, CD200, HLA-ABC, CD29 ve hematopoetik işaretleyiciler CD45, CD14, CD34, HLA-DR için antikolar kullanılmıştır. Aynı zamanda mezenşimal kök hücrelerin 2 farklı hücre tipine farklılaşma kapasitesinin ölçülmesi amacıyla osteoblast ve adiposit yönünde farklılaşması incelenmiştir. Karakterizasyon işlemi tamamlanan hücreler pasaj 2 (P2) ve pasaj 3 (P3)'te dondurularak immün modülasyon çalışmaları için sıvı azot içerisinde (-196⁰C) saklanmıştır.

2.1.2. NK92 hücrelerinin kültürü

NK92 hücreleri (ATCC, CRL2407, USA) ticari olarak satılan insan doğal öldürücü (NK-natural killer) hücre hattıdır. Bu hücreler süspanse hücreler olup, besi ortamında çoğaltılmak için interlökin-2 (IL-2) varlığına ihtiyaç duymaktadır. Hücreler kuru buz içinde laboratuvara transfer edilmiştir. Hücrelerin kültürü için, Alpha Minimum Essential Medium (α -MEM) (Biochrom, Germany), 100 Unite/ml IL2 (Merck Millipore, Germany), 0.2mM miyo-inositol (Applichem, Cat No: A1716, Denmark), 0,02mM folik asit (Sigma, F8758, USA), 0,1mM 2- β merkaptotanol (Sigma, Cat No: M6250, USA), FBS %12,5 (Biochrom, Germany), Horse Serum (HS) %12,5 (Biochrom, Germany) içeren besi ortamı kullanılmıştır. Hücreler 25cm² kültür kabına 3x10⁵ hücre/ml yoğunluğunda 37°C, %95 hava ve % 5 CO₂ nemli inkübatörde standart koşullarda kültüre edilmiştir. Hücrelerin kültür süresince takibi inverted mikroskop ile yapılmıştır. Pasajlama, hücre solüsyonunu ikiye bölündükten sonra taze besi ortamı eklenerek gerçekleştirilmiştir (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japan).

Çoğaltılan hücrelerin dondurulması amacıyla hücreler 15ml tüplere toplandıktan sonra 125g'de 5 dakika santifüj edilmiştir (Hettich Zentaifugen, Germany). Santrifüj sonrası süpernatant dökülerek hücreler 5:4:1 oranında FBS:besi ortamı:dimetilsülfoksit (DMSO) içeren dondurma besi ortamında homojenize edilip kademeli olarak dondurulmuştur. Hücreler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere sıvı azot içerisinde (-196⁰C) saklanmıştır.

2.1.3. NK92 hücrelerine antibiyotik dayanıklılık testinin yapılması

NK92 hücrelerinin transfeksiyon sonrası seçiliminde puromisin antibiyotiği kullanılacağı için bu hücrelerde antibiyotik dayanıklılık testi yapılmıştır. Hücrelerin ölmeye başladığı minimum antibiyotik konsantrasyonunu bulmak amacıyla sağlıklı hücrelere farklı konsantrasyonlarda puromisin besisi ortamına eklenerek hücrelere uygulanmış ve hücrelerin yaşaması için kritik konsantrasyon belirlenmiştir. Bu amaçla 6 kuyucuklu kültür kaplarına aynı sayıda hücre ekilmiş ve sonrasında 5 farklı konsantrasyonda (1µg/ml, 2µg/ml, 3µg/ml, 4µg/ml, 5µg/ml) puromisin antibiyotiği uygulanmıştır. Antibiyotik uygulanmayan grup kontrol grubu olarak takip edilmiştir. Hücreler 5 gün boyunca mikroskop altında incelenerek fotoğraflanmış ve hücrelerin ölü olduğu kritik konsantrasyon seçilmiştir (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japan). Transfeksiyon çalışmaları sonrası hücrelere bu kritik konsantrasyonda puromisin uygulanmasına karar verilmiştir.

2.2. Vektör Sistemlerinin Hazırlanması

Perforin genini hedefleyen iki farklı vektör sistemi hazırlanmıştır.

1. PRF1 geninde hedeflenen bölgeyi hedefleyen Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated gen ürünü 9 (CRISPR/Cas) sistemi.
2. Kesim sonucu hedeflenen bölgeye de homolog rekombinasyon ile genomu entegrasyonu hedeflenen puromisin direnci içeren vektör sistemi.

2.2.1. Perforin genini hedefleyen CRISPR/Cas9 vektör sisteminin hazırlanması

CRISPR/Cas vektörü sistemlerinin hazırlanması amacıyla ticari olarak satılan pX330 ve pX335 CRISPR/Cas vektörleri satın alınmış ve Cong ve arkadaşları tarafından önerilen deneysel aşamalar izlenerek sistem hazırlanmıştır [171]. pX330 ve pX335, hedeflenen bölgeye primer eklenecek bölgeyi ve DNA'yı kesen proteini içeren vektörlerdir. PRF1 geni hedeflenen bölge seçilirken ENSG00000180644.6 nolu Ensembl datası kullanılmıştır. PRF1 ekzon 1 ifade edilmediğinden ekzon 2'de 3 farklı bölgeyi hedefleyen ve CRISPR vektörlere uygun olarak tasarlanan primerler seçilmiştir. CRISPR/Cas vektörünün genomda

hedeflenen bölgeye özgüllüğünü gRNA (guide RNA) belirler. İstenilen hedef bölgeye yönlendirme işlemi için CRISPR/Cas9 vektörüne bu gRNA'ya karşılık gelen gDNA klonlanmıştır. Bu klonlama işlemi için oligonükleotid primerlerden yararlanılmıştır.

PRF1 geni Ekzon 2 Sekans datası:

PRF1 geni [Chromosome 10: 72,357,104-72,362,531](#) (reverse strand), ENSG00000180644.6 nolu Ensembl datası

```
CTCCATGGCAGCCCGTCTGCTCCTCCTGGGCATCCTTCTCCTGCTGCTGCCCTGCCCGTCCCTGCCCGTCCACACAGCCGCACGCTCA
GAGTGCAAGCGCAGCCACAAGTTCGTGCCTGGTGCA TGGCTGGCCGGGAGGGTGTGGACGTGACCAGCCTCCGCCGCTCGGGCTCCTTCC
CAGTGGACACACAAAGTTCTGCGGCCCGACGGCACCTGCACCCTGTGAAAATGCCCTACAGGAGGGCACCTCCAGCGCTGCCTCT
GGCGCTACCAACTGGCGGGCCAGGGCTCTGGCTGCCAGCGCCATGTAACCAGGGCCAAAGTCA GCTCCACTGAAGCTGTGGCCCGGGAT
GCGGCTCGTAGCATCCGCAAGACTGGAAGGTGCGGCTGGACGTGACTCCTAAGCCACCAGCAATGTGCATGTGTCTGTGGCCGGCTCAC
ACTCACAGGCAGCCAACTTTCAGCCCAGAAGACCCACCAGGACCAGTACAGCTTCAGCACTGACACGGTGGAGTGGCGCTTCTACAG
```

Seçilen primerler ve PRF1 ekzon 2'de hedefledikleri bölge:

```
PRF1- 2F: 5'-CACC GACAAGTTCGTGCCTGGTGCA- 3'
PRF1- 2R: 5'-AAACTGCACCAGGCACGAACTTGTC- 3'
PRF1-3F: 5'-CACC GCTCCACTGAAGCTGTGGCC- 3'
PRF1- 3R: 5'-AAACGGCCACAGCTTCAGTGGAGC- 3'
PRF1-4F: 5'-CACCGAATGTGCATGTGTCTGTGGC- 3'
PRF1- 4R: 5'-AAACGCCACAGACACATGCACATTC- 3'
```

CRISPR/Cas vektörler hazırlanırken gerçekleştirilen deneysel aşamalar aşağıdaki gibidir ve her işlem pX330 ve pX335 vektörleri için gerçekleştirilmiştir.

- i. 1 µg vektör DNA'sı BbsI enzimi ile 37°C'de 30 dakika 20µl total hacimde kesilmiştir.
- ii. Kesilen vektör DNA'sı %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve jelden DNA izolasyon kiti kullanılarak kesilmiş vektör DNA'sı izole edilmiştir (QIAquick Gel Extraction Kit, Cat.No: 28706)
- iii. PRF1 geni ekzon 2'yi hedefleyen primeler fosforile edilmiştir. Bu amaçla T4PNK enzimi (New England Biolabs, Cat. No: 28706) kullanılmış ve total hacim 10µl olacak şekilde reaksiyon hazırlanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) cihazında 95°C'den 25°C'ye 5°C/dakika olacak şekilde fosforilasyon gerçekleştirilmiştir.
- iv. Jelden izole edilen vektör DNA'sı ve fosforile edilen primerlerle ligasyon reaksiyonu oda ısısında 10 dakika yapılmıştır. Bu reaksiyonda ligasyon

enzimi olarak T4 DNA Ligase kullanılmıştır (New England Biolabs, Cat. No: M0202S).

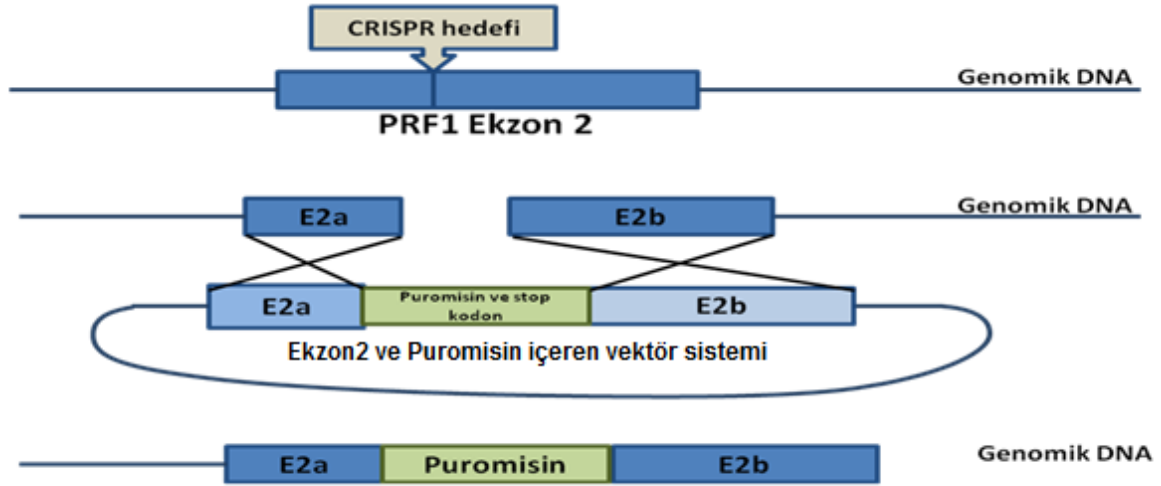
Ligasyon sonucu elde edilen DNA, kompetan bakterilere transforme edilmiştir. Bakterilere transforme edilen DNA'ların öncelikle küçük ölçekli kültürü yapılmış ve sonrasında büyük ölçekli bakteri kültürü yapılarak vektör DNA'sı çoğaltılmıştır. Bakteriye transformasyon aşamaları aşağıdaki gibidir;

- i. Bakteri örneği ve vektör DNA'sı buzda 30 dakika inkübe edildikten sonra 42⁰C su banyosunda 1 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında 5 dakika daha buzda bekletilmiş ve 1ml SOC besi ortamına alınarak çalkalamalı etüvde 37⁰C'de inkübe edilmiştir.
- ii. Çalkalamalı etüvden alınan örnekler amfisilin dirençli besi ortamı içeren petri kaplarına ekilerek gece boyu 37⁰C de inkübe edilmiştir.
- iii. Gece boyu inkübasyon sonrası seçilen farklı koloniler seçilip ve kısa süreli sıvı kültür hazırlanarak gün boyu (6-8 saat) çalkalamalı etüvde 37⁰C'de inkübe edilmiştir. Küçük ölçekli kültürden alınan örneklerle gece boyu süren büyük ölçekli kültür yapılmıştır.
- iv. Gece boyu inkübasyon sonrası bakteriden plazmid izole etme kiti (Quiagen, Midiprep, Cat No: 12945) kullanılarak plazmid DNA'ları elde edilmiş ve DNA konsantrasyonları ölçülmüştür (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, USA).

DNA konsantrasyonları ölçülen PRF1 genini hedefleyen CRISPR/Cas vektörleri doğruluklarının kontrolü amacıyla DNA dizi analizi yapılmıştır.

2.2.2. Perforin geni ekzon 2 ve puromisin direnci içeren vektör sisteminin hazırlanması

Bu aşamada hedef hem PRF1 ekzon 2 hem de puromisin direnci kısımlarını içeren bir vektör hazırlanmıştır. Bu şekilde edilen vektör transfeksiyon deneylerinde CRISPR/Cas sistemi ile kesilen bölgeye eklenecektir.



Şekil 2.1. Perforin genini hedefleyen ve puromisin direnci içeren vektör sisteminin tasarlanması.

2.2.2.1. İnsan perforin geni ekzon 2'nin PCR ile çoğaltılması

İnsan perforin geni 2. ekzonu (PRF1 ekzon 2), ENSG00000180644.6 no.lu Ensembl verisi kullanılarak forward ve reverse primerler hazırlanmıştır. Hazırlanan primerler F:CAGACCCCTCCCTAACCTG ve R: ATGATTGAAGCTCAGAGAGAA olarak elde edilmiştir. İnsan kanından elde edilen DNA'dan PCR ile ekzon 2 çoğaltılmıştır. PCR protokolü:

	Reaksiyon hacimleri	
5X Buffer (1X)	5ul	Reaction Buffer IV (10X)(Thermo)
dNTP	0.5 ul	Thermo
MgCl (25mM)	1.5ul	Thermo
F primer (10pmol)	1ul	
R primer (10pmol)	1ul	
Taq DNA polimeraz	0.25ul	5U/ µl ,500U- Thermo
DNA (10-50ng/ul)	2ul	
Su	9 ul	
Toplam	20ul	

PCR cihazında kullanılan program;

	95 °C	5 dakika		
Denatürasyon	95 °C	45 sn	}	34 döngü
Bağlanma	58 °C	35 sn		
Uzama	72 °C	45sn		
	72 °C	3 dakika		
	4 °C	∞		

Elde edilen örnekler %1'lik agaroz jelde 25 dakika 120 voltta yürütülmüş ve görüntülenmiştir. Jel görüntüsü kontrol edilmiş ve istenilen büyüklükte DNA içeren örnek sekanslanmıştır. Sekans protokolünde, jelde yürütülen örnekler öncelikle Exosap (Rapid Alkaline Phosphatase, ROCHE, 5000U-1U/ µl; Exonuclease I, 20000U-20U/ µl, Thermo) kullanılarak saflaştırılmıştır. Exosap reaksiyonu sonrası sekans için örnekler hazırlanmış ve 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) Sekans Cihazında DNA dizi analizi yapılmıştır.

2.2.2.2. İnsan perforin ekzon 2 gen bölgesini içeren homolog rekombinasyon donör vektörün hazırlanması

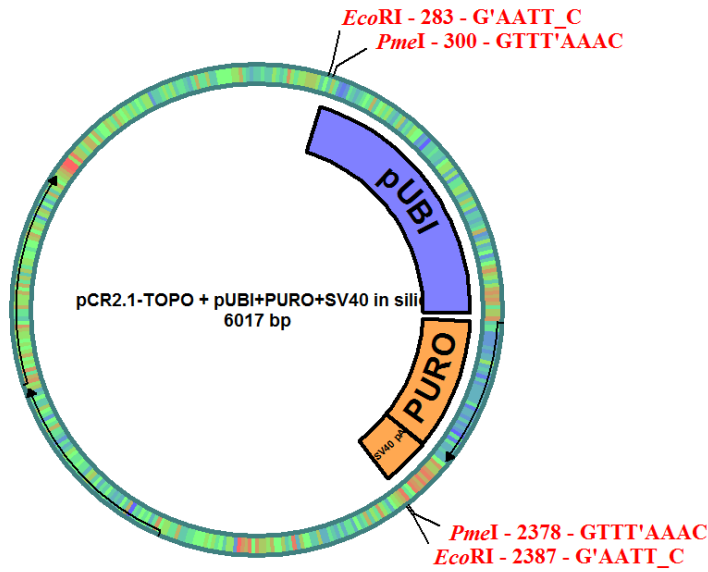
PCR ile çoğaltılan PRF1 ekzon 2 ticari olarak satılan pCR 2.1 TOPO plazmidi (Invitrogen) kullanılmıştır. Bu amaçla aşağıdaki deney aşamaları sırası ile izlenmiştir.

- i. pCR2.1 TOPO plazmidi ile PRF1 ekzon 2 PCR ürünü 1:3 molar konsantrasyonda olacak şekilde gece boyu ligasyon reaksiyonu hazırlanmıştır. PCR ürünü eklenmeyen tüp kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.
- ii. İnkübasyon sonrası örnekler kompetan bakterilere transforme edilmiştir.
- iii. Kısa süreli inkübasyon sonrası bakteriden plazmid izole etme kiti (Quiagen, Midiprep, Cat No: 12945) kullanılarak plazmid DNA'ları elde edilmiş ve DNA konsantrasyonları ölçülmüştür (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, USA).

- iv. Elde edile farklı plazmid DNA'ları PRF1 ekzon 2'nin ortasında bulunan SmaI ve EcoRI enzimleri ile kesilmiştir. Enzim kesimi sonucu elde edilen vektör DNA'ları %1'lik agaroz jelde 120 voltta 30 dakika yürütülmüştür.

2.2.2.3. Puromisin direnci içeren vektörün hazırlanması

Puromisin dirençli vektör tasarımı için öncelikle puromisin direnç genini içeren plazmidten puromisin gen bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan PCR ürünü ticari olarak satılan pCR2.1 TOPO plazmidi (Invitrogen, USA) kullanılmıştır. Vektör hazırlanırken bu plazmidte bulunan Puromisin direnci geninin iki ucuna PmeI (GTTTAAAC) enzim kesim bölgeleri eklenmiştir. Çünkü PRF1 ekzon 2 içeren yeni plazmid tasarımında Puromisin geni bu plazmidten çıkarılarak yeni plazmide PRF1 ekzon 2'nin ortasına yerleştirilmiştir. Hazırlanan puromisin dirençli plazmid şekildeki gibidir.



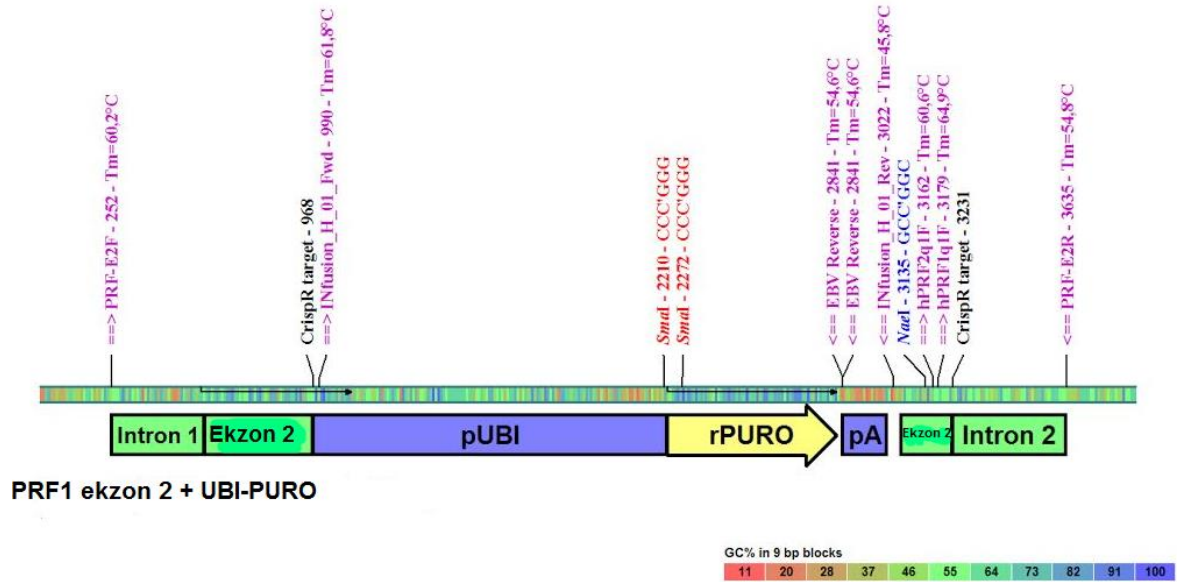
Şekil 2.2. pCR2.1 TOPOUBI-PURO plazmidini şematik görüntüsü. Hazırlanan vektör puromisin antibiyotik direncini içermekte ve puromisin direncinin her iki uç noktasında PmeI (GTTTAAAC) kesim noktası içermektedir.

Puromisin PCR ürünü Dr. Micheal Kyba (Minnesota Üniversitesi/ABD) tarafından hediye edilen plazmidten çoğaltılmıştır. Çoğaltılan PCR ürününün iki ucuna PmeI enzim kesim bölgesi eklenmiştir. pCR 2.1 TOPO plazmidine protokole uygun olarak puromisin direnci kısmı eklenmiş ve sonrasında bakteriyeye transforme edilmiştir. Kısa süreli bakteri kültürü sonrasında, plazmid DNA izolasyon kiti (EZNA

endo-Free DNA Mini Kit, OMEGA) kullanılarak bakteriden plazmid DNA'sı elde edilmiştir. Elde edilen plazmid DNA, PmeI enzimi ile kesilerek agaroz jelde (%1'lik) yürütülmüş ve doğruluğu kontrol edilmiştir.

2.2.2.4. İnsan Perforin ekzon 2 ve Puromisin direncini içeren vektör tasarımı

Transfeksiyonda kullanılacak olan bu vektörün hazırlanmasında bir önceki aşamalarda hazırlanan vektörler kullanılmıştır. Hedeflenen gen dizisi her iki ucunda PRF1 ekzon 2 parçalarını içeren ve ortada puromisin direnç genini içermektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. PRF1 ekzon 2 ve UBI-PURO DNA dizisi ve klonlama çalışmaları için kullanılan primerlerin DNA dizindeki yerleri

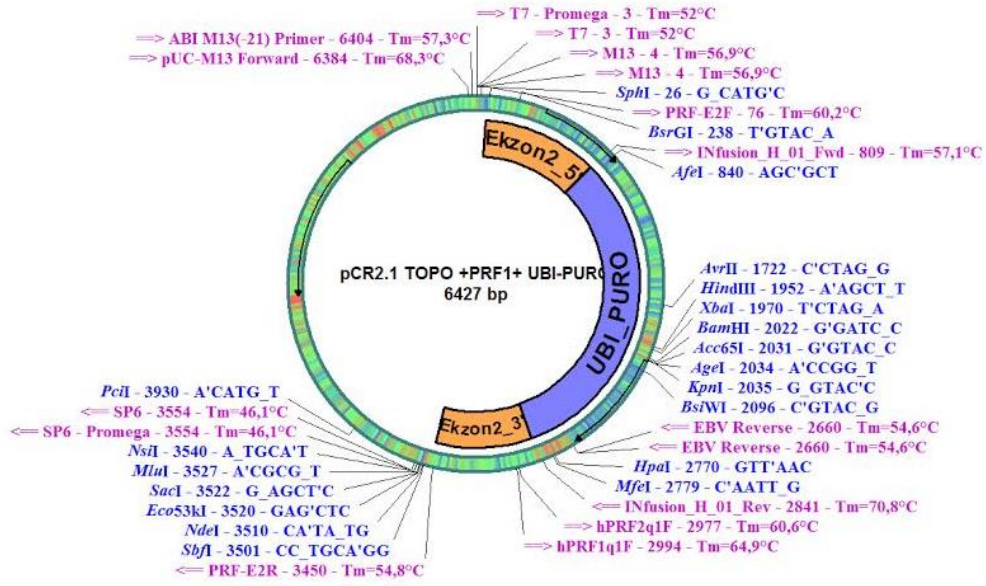
Yeni vektörün oluşturulmasında In-Fusion klonlama tekniği kullanılmıştır (Takahara, Clontech, Japan). Bu yöntemde klonlama yapılırken birleştirilmek istenen parçalar 15 bazlık uzunlukta birbiri ile örtüşecek şekilde hazırlanan primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılır, sonrasında kit içeriğindeki enzim kullanılarak birleştirilir. Bu amaçla izlenen aşamalar aşağıdaki gibidir.

- i. pCR2.1 TOPO+PRF1 ekzon 2 plazmidi SmaI enzimi ile 25⁰C'de gece boyu kesildikten sonra agaroz jelde (%1'lik) yürütülmüştür. Jeldeki bant kesilmiş

ve kit kullanılarak jelden izole edilmiştir (Promega PCR Clean up system, Cat No: A9282).

- ii. pCR2.1 TOPO+UBI-PURO plazmidinden in-fusion klonlama için hazırlanan özel primerlerle PCR yapılmış ve UBI-PURO kısmı çoğaltılmış ve agaroz jelde (%1'lik) yürütülmüştür. Jeldeki bant kesilmiş kit kullanılarak jelden izole edilmiştir (Promega PCR Clean up system, Cat No: A9282).
- iii. İn-fusion klonlama için eklenecek Smal ile kesilmiş vektör oranı ve UBI-PURO PCR ürünü oranı hesaplanmıştır. Vektör için 120ng ve UBI-PURO PCR ürünü için 145ng olarak hesaplanmıştır.
- iv. İn-fusion reaksiyonu 10µl total hacimde hazırlanmış ve 50⁰C'de 15 dakika PCR cihazında reansiyon gerçekleştirilmiştir.
- v. In-Fusion reaksiyonu sonucu elde edilen pCR2.1 TOPO+PRF1 ekzon 2+UBI-PURO plazmidi bakteriye trasforme edilmiştir. Transformasyon ürünü amfisilin dirençli katı besi ortamı içeren petri kaplarına ekilmiş ve gece boyu 37⁰C'de inkübe edilmiştir.
- vi. Gece boyu inkübasyon sonrası petri kabında bulunan en az 5 farklı koloni seçilmiş ve kısa süreli sıvı kültür hazırlanarak gün boyu (6-8 saat) çalkalamalı etüvde 37⁰C'de inkübe edilmiştir.
- vii. Kısa süreli inkübasyon sonrası bakteriden plazmid izolasyon kiti (Quiagen, Miniprep, Cat No: 12125) kullanılarak plazmid DNA'ları elde edilmiş ve DNA konsantrasyonları ölçülmüştür (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, USA).

Elde edilen farklı plazmid DNA'ları plazmidi EcoRI enzimi ile kesilerek DNA boyutlarının doğruluğu kontrol edilmiştir. Aynı zamanda vektör dizilerine DNA dizi analizi yapılmıştır. Elde edilen pCR2.1 TOPO+PRF1 ekzon 2+UBI-PURO vektörünün şematik görünümü Şekil 2.4' te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. pCR2.1 TOPO+PRF1 ekzon 2+UBI-PURO vektörünün şematik görünümü

2.3. Gen Transferi Çalışmaları

NK92 hücrelerinde PRF1 geni susturulması amacıyla gen transferi çalışmaları yapılmıştır. NK92 hücreleri transfeksiyonu oldukça zor olan süspansiyon hücreleridir bu sebeple transfeksiyon için 3 farklı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler;

- Elektroporasyon,
- Kimyasal transfeksiyon,
- Nükleofeksiyon yöntemleridir. Çalışma süresinde bu üç yöntem uygulanmış ve en verimli olan yöntemle deneysel çalışmalara devam edilmiştir.

2.3.1. Elektroporasyon

Elektroporasyon çalışmaları Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan vektörlere transfeksiyon öncesi GFP içeren vektörle farklı voltajlarda ve tekrarlarla transfeksiyon verimliliği çalışmaları yapılmıştır.

Transfeksiyon protokolü:

- i. 2×10^6 adet NK92 hücresi sayılmış ve antibiyotiksiz besi ortamı içinde santrifüj edildikten sonra 300 μ L PBS ile sulandırılmıştır.
- ii. Hücrelerin bulunduğu tüpe 5 mikrogram GFP (+) vektör DNA'sı eklenmiştir.
- iii. Hücre ve GFP içeren vektör DNA'sı elektroporasyon küvetine yüklendikten sonra farklı voltajlarda ve frekansta elektroporasyon gerçekleştirilmiştir. (Electro Square Porator ECM830, BTX Harward Apparatus).

Elektroporasyondan 24 saat sonra hücreler floresan ataçmanlı inverted mikroskopta görüntülenmiş (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japan). GFP (+) vektör taşıyan hücre oranından elde edilen transfeksiyon başarısına göre transfeksiyon verimliliği ölçülmüştür.

2.3.2. Kimyasal transfeksiyon

Kimyasal transfeksiyon için Turbofect transfeksiyon ajanı kullanılmıştır (Cat No: R0531, Thermo). NK92 hücreleri transfeksiyon öncesi pasajlanmış ve hücrelerin logaritmik çoğalma evresinde olmalarına dikkat edilmiştir.

Kimyasal transfeksiyon aşamaları:

- i. Hücreler 6 kuyucuklu kültür kabına $1 \cdot 10^5$ hücre/ml olacak şekilde ekilmiş ve logaritmik çoğalma evrelerine gelmeleri beklenmiştir.
- ii. 1 μ g GFP içeren vektör DNA'sı ve transfeksiyon ajanı 400 μ l besi ortamı ile birleştirilerek oda ısısında 20 dakika inkübe edilmiştir.
- iii. İnkübasyondan sonra transfeksiyon ajanı ve DNA'yı içeren karışım hücrelerin üzerine dağıtılmış ve 6 kuyucuklu kültür kapları standart kültür koşullarında inkübe edilmiştir.

Transfeksiyon işleminden 24 saat sonra hücreler floresan ataçmanlı inverted mikroskopta görüntülenmiş (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japan). GFP (+) vektör taşıyan hücre oranından elde edilen transfeksiyon başarısına göre transfeksiyon verimliliği ölçülmüştür.

2.3.3. Nükleofeksiyon

Nükleofeksiyon işlemi nükleofeksiyon cihazı ile yapılmıştır (4D-Nucleofector, Lonza, Switzerland). Nükleofeksiyon deneyleri Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir. Nükleofeksiyondan 1-2 gün önce hücreler 75cm²'lik kültür kaplarına pasajlanmış ve optimal büyüme aşamasına gelmeleri sağlanmıştır. Nükleofeksiyon için Cell Line Optimization 4D-Nucleofector™ X Kit kullanılmıştır (Lonza, Switzerland, Cat. No: V4XC-9064). Nükleofeksiyon deneylerinde kontrol olarak yeşil floresan protein (GFP) içeren vektör ile nükleofeksiyon yapılmıştır. Hücrelerin GFP proteinini alıp ifade etme durumu nükleofeksiyon başarısının ölçütü olarak kullanılmıştır. Nükleofeksiyon deney aşamaları aşağıdaki gibidir.

- i. Hücreler santrifüj edilip üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve 1×10^6 hücre sayılarak tüplere ayrılmıştır.
- ii. Hücreler tekrar santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 16,4µl SE solüsyonu, 3,6µl SE Supplement 1 ve 0,4µg vektör DNA'sı eklenmiştir.
- iii. Örnekler 16 kuyucuklu transfeksiyon kaplarına her kuyucuğa 20µl olacak şekilde yüklenip ve kapak kapatılarak nükleofeksiyon cihazına yüklenmiştir.
- iv. Nükleofeksiyon cihazında CA137 programı seçilmiş ve nükleofeksiyon işlemi yapılmıştır.
- v. Nükleofeksiyon işlemi bittikten sonra her kuyucuğa 80µl besi ortamı eklenmiş ve 10 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir.
- vi. İnkübasyon sonrası 96 kuyucuklu kültür kaplarına 50µl transfekte örnek 150µml besi ortamı eklenmiştir.
- vii. Nükleofeksiyon sonrası hücreler 37°C, %95 hava ve %5 CO₂ nemli inkübatörde kültüre edilmiştir.

Elde edilen GFP vektör transfeksiyon başarı sonuçlarına göre hücrelerin pCR2.1 TOPO+PRF1 ekzon 2+ UBI-PURO vektörü ile transfeksiyonu için nükleofeksiyon yöntemi kullanılmıştır. Nükleofeksiyondan 24 saat sonra antibiyotik seçilimi için hücrelere puromisin antibiyotiği uygulanmaya başlanmıştır.

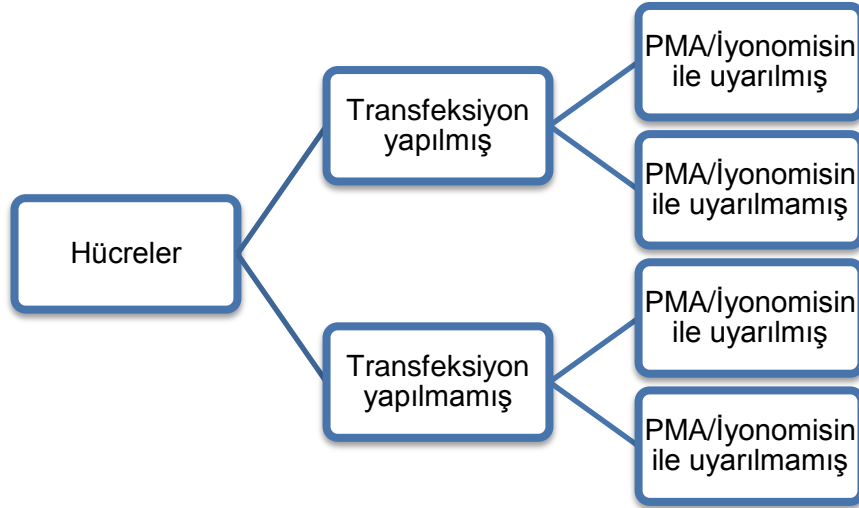
Nükleofeksiyon sonrası antibiyotik seçilim süresince ortamda bulunan ölü hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla besi ortamı puromisin içeren besi ortamı ile düzenli olarak değiştirilmiş ve inverted mikroskopta incelenmiştir (Olympus IX70 inverted mikroskop, Japan). Antibiyotik seçilimi sonucunda elde edilen klonlar devam eden deneyler için çoğaltılmış ve dondurularak saklanmıştır.

2.4. Hücrelerin Uyarılması ve Perforin İfadesinin Kontrolü

2.4.1. Hücrelerin uyarılması

Transfeksiyon sonrasındaki antibiyotik seçilimi sonucu elde edilen hücrelerde PRF1 gen aktivitesinin analizi amacıyla forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) ve İyonomisin karışımı ile uyarılmıştır. Uyarım amacıyla PMA 50ng/ml /İyonomisin1µg/ml konsantrasyonlarında besi ortanına eklenerek 4 saat inkübasyon yapılmıştır. Uyarım süresinin sonucunda örnekler santrifüj edilmiş süpernatant ELISA analizi için saklanmıştır. Hücreler ise gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) analizi için RNA izolasyonu yapılması RNA izolasyon materyali olan (İnvitrogen, USA) Trizol içine alınmıştır. Hazırlanan örneklerin listesi Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2. 1. ELISA ve qPCR analizi için hazırlanan örneklerin listesi



2.4.2. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR)

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu tansfekte olan NK92 hücrelerinde PRF1 geninin ifadesinin kontrolü amacıyla yapılmıştır. qPCR analizi 3 aşamada gerçekleştirilmiştir. Bu aşamalar;

- A. RNA izolasyonu ve kalite kontrolü
- B. Reverse transkriptaz reaksiyonu
- C. qPCR çalışması

A. RNA izolasyon aşamaları;

- i. Trizol içindeki hücrelere 1ml trizol için 0,2ml kloroform olacak şekilde kloroform eklendi, örnekler çalkalanarak 4⁰C'de 10.000RPM'de 15 dakika santrifüj edilmiştir
- ii. Fazların karışmamasına dikkat edilerek üst faz dikkatlice toplanmış ve yeni bir tüpe alınmıştır. 1ml trizollü örnek/0,5ml izopropil alkol oranında izopropil alkol eklenmiş. 10 dakika oda ısısında ve 10 dakika -80 de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 10 dakika 12.000RPM'de 4⁰C de satrifüj edilmiştir.
- iii. Süpernatant dikkatli bir şekilde toplanmış ve tüpe 0,5ml etanol eklenmiştir. Tüp çalkalandıktan sonra 7.800RPM'de 4⁰C de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- iv. Süpernatant dikkatli şekilde toplanmış ve dipteki RNA'nın kuruması için ısıtıcılı blokta 10 dakika bekletilmiştir. Steril distile su ile sulandırıldıktan sonra RNA konsantrasyonu ölçülmüştür (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, USA).

B. Reverse transkriptaz reaksiyonu

RNA izolasyon işlemi tamamlandıktan sonra cDNA sentezi amacıyla Reverse transkriptaz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Thermo, Revert AID RT reaxion kit, USA). Her bir örnekten 0,5µg RNA olacak şekilde reaksiyon hazırlanmıştır.

Mix A: mRNA : 0,5 µl
oligodT : 0,5 µl
dH₂O : 13 µl

Mix B: 5X Reaction Buffer : 4 µl

10mM dNTP	: 2 µl
RT	: 1µl

Reverse transkriptaz reaksiyonu aşamaları:

- i. Örneklerin RNA konsantrasyonlarına göre hesap yapıldıktan sonra tüplere Mix A'yı oluşturan elemanlar eklenmiş ve 65⁰C de 5 dakika PCR cihazında bekletilmiştir.
- ii. PCR cihazı sonrası örnekler hızla buz üzerine alınmış ve 5 dakika buzda bekletilmiştir.
- iii. Mix B örneklerin üzerine eklenmiş ve 42⁰C'de 60 dakika, 70⁰C'de 10 dakika PCR cihazında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler buz üzerine alınarak qPCR analizine başlanmıştır.

C. qPCR çalışması

qPCR analizinde öncelikle kontrol gen olan TBP(TATA binding protein) ile deneyler yapılmış ve örneklerin kalitesi ölçülmüştür. Aynı zamanda PRF1 genini hedefleyen iki farklı çift primer tasarlanmış ve bu primer çiftlerinin de en iyi çalışanı kontrol edilmiştir. Her örnek 3 kez tekrar edilerek çalışılmıştır. Örnek seçilimi Çizelge 2.1'de listelendiği gibi yapılmıştır.

qPCR analizi için Sybr Green JumpStart Taq Ready Mix kiti kullanılmıştır (Sigma, S3443, USA).

2x Mix	: 5 µl
10mM Primer F	: 0,4 µl
10mM Primer R	: 0,4 µl
25mM MgCl ₂	: 1,2 µl
cDNA	: 1,5 µl
Distile Su	: 1,5 µl

Örnekler Corbett qPCR analiz cihazı rotorlarına yüklenerek analiz başlatılmıştır (Corbett Rotorgene 6000 qPCR cihazı, USA).

2.4.3. PCR analizi

Transfeksiyon sonucu puromisin direncine sahip mutant hücrelerde PRF1 gen susturma işleminin kontrolü amacıyla PRF1 geni ekzon 2’de hedefli insersiyon bölgesinde ekzon 2 ve puromisinin varlığını göstermek için PCR yapılmış ve bu amaçla F:CAGACCCCTCCCTAAACCTG ve R: ATGATTGAAGCTCAGAGAGAA primerleri kullanılmıştır.

PCR protokolü:

	Reaksiyon hacimleri	
5X Buffer (1X)	5ul	Reaction Buffer IV (10X)(Thermo)
dNTP	0.5 ul	Thermo
MgCl (25mM)	1.5ul	Thermo
F primer (10pmol)	1ul	
R primer (10pmol)	1ul	
Taq DNA polimeraz	0.25ul	5U/ µl ,500U- Thermo
DNA (10-50ng/ul)	2ul	
Su	9 ul	
Toplam	20ul	

PCR cihazında kullanılan program;	94 ⁰ C	5 dakika	
Denatürasyon	94 ⁰ C	45 sn	} 34 döngü
Bağlanma	57 ⁰ C	35 sn	
Uzama	72 ⁰ C	45sn	
	72 ⁰ C	3 dakika	
	4 ⁰ C	∞	

Elde edilen örnekler %1’lik agaroz jelde 25 dakika 120 voltta yürütülmüş ve görüntülenmiştir. Jel görüntüsü fotoğraflanmış ve uygun büyüklükte bandın varlığı kontrol edilmiştir.

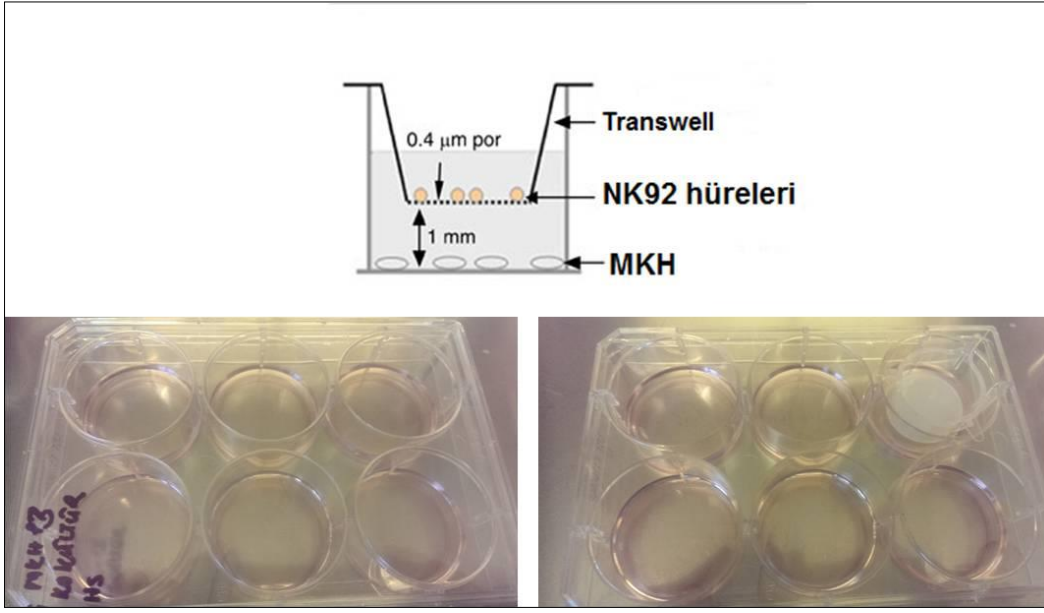
2.4.4. ELISA analizi

Perforin ELISA analizi için çalışma öncesi süpernatantlar oda ısısına çıkarılmış ve kullanılan ELISA kit uygulama yönergesine göre aşağıdaki aşamalar gerçekleştirilmiştir (Abcam, UK, Cat No:ab46068). Her örnek 3 tekrar olarak çalışılmıştır.

- i. Bilinen miktarlarda perforin içeren standartlar hazırlanmıştır.
- ii. Her standarttan ve örnekten 100µl kuyucuklara eklenmiştir.
- iii. Kuyucukların üzeri kapatılarak oda ısısında (18-25⁰C) 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 300µl yıkama tamponu ile kuyular 2 kez yıkanmıştır.
- iv. 50µl Biotinli anti-perforin eklendi ve 1 saat oda ısısında inkübe edilmiş ve yıkama işlemi tekrarlanmıştır.
- v. 100µl Streptavidin HRP solüsyonu eklendi ve 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiş ve yıkama işlemi tekrarlanmıştır.
- vi. 100µl Chromogen TMB substratı eklenerek 10-20 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir.
- vii. 100µl durdurma solüsyonu eklenerek 450nm'de absorbans spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (EZ Read 400 Microplate reader, Biochrom).

2.5. Hücrelerin Mezenşimal Kök Hücrelerle Ko-Kültürü

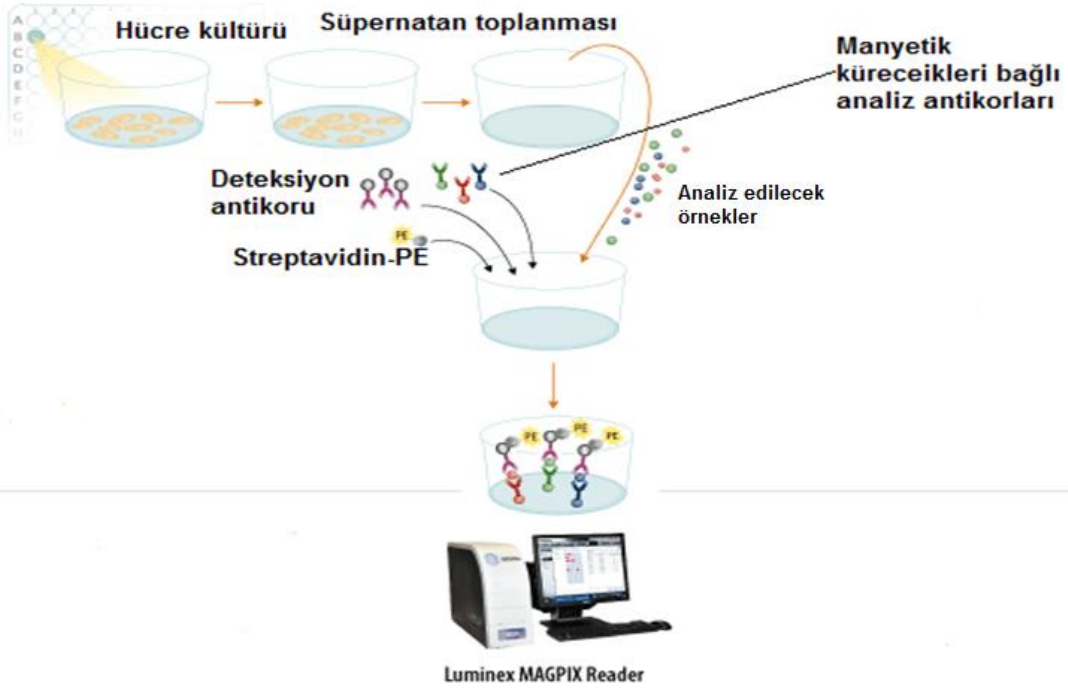
Transfeksiyon sonucu seçilen ve PRF1 ifadesinin baskılandığı gösterilen FHL2 hastalık modelli hücrelerin insan MKH'leri ile etkileşimini göstermek için ko-kültür sistemi kullanılmıştır. Ko-kültür sistemi 6 kuyulu kültür kaplarında 0,4µm porlu transwell sistemleri kullanılmıştır (Şekil 2.5). Ko-kültürden 24 saat önce insan MKH'leri 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. 24 saat sonrasında seçilen klonlar transwell ko-kültür sistemine 1:1 ve 1:10 MKH:klonlar oranında eklenmiştir. Besi ortamı olarak insan MKH besi ortamı kullanılmış ve sitokin analizini etkilememesi için IL-2 içermeyen besi ortamı seçilmiştir. Ko-kültürün 24 ve 72. saatlerinde süpernatantlar toplanarak -80⁰C'de çoklu sitokin analizi için saklanmıştır.



Şekil 2.5. Mezenşimal kök hücre-NK92 hücresi ko-kültür sistemi şematik görünümü ve deneysel sistem görünümü.

2.6. Çoklu Sitokin Analizi

Ko-kültür sisteminde MKH'lerinin immun modölatör etkisinin gösterilmesi amacıyla çoklu sitokin analizi yapılmıştır. Çoklu sitokin analizinde IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MCP-1 (MCAF), MIP-1 β ve TNF- α sitokinlerinin ölçümü yapılmıştır (Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader). Bu analiz için Bio-Plex pro human sitokin paneli kullanılmıştır (Bio-Rad, USA, Cat. No: #M5000031Y). Çoklu sitokin analizi şematik görünümü Şekil 2.6'da özetlenmiştir.



Şekil 2.6.Çoklu sitokin analiz sistemi şematik görünümü

Kit uygulama aşamaları aşağıdaki gibidir.

- i. Standartlar ve örnekler çalışma öncesi oda sıcaklığına getirilerek hazırlanmıştır.
- ii. 96 kuyucuklu kap önce tampon solüsyonu ile ıslatıldıktan sonra sitokin kürecikleri yüklenmiş ve 2 kez yıkama yapılmıştır.
- iii. Standartlar ve örnekler kuyucuklara yüklendikten sonra 30 dakika oda sıcaklığında karıştırıcının üzerinde inkübe edilmiştir.
- iv. Antikorlar eklenerek 30 dakika daha inkübe edilmiş ve Streptavidin PE eklenerek 10 dakika daha inkübasyona devam edilmiştir.
- v. İnkübasyon sonrası 3 kez yıkama yapıldıktan sonra kürecikler tampon solüsyonu ile dilue edilmiş ve Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader okuma yapılmıştır.

Elde edilen veriler Bio-Plex MAGPIX Multiplex analiz programında analiz edilerek grafiklenmiştir.

2.7. İstatistiksel Analizler

Deneysel çalışmaların sonuçlarından elde edilen verilere istatistiksel olarak hangi testin kullanılacağına karar vermek amacıyla tanımlayıcı istatistiksel yöntemler uygulanmıştır. Normal dağılan verilerde gruplar arasındaki farklılıkların analizinde Student T test kullanılmıştır. Dağılımları normal olmayan gruplarda analize Tukey HSD analizi ile devam edilmiş ve gruplar arasındaki farklılığın anlamlı olup olmadığı incelenmiştir. P değeri 0,05'ten küçükse farklılık anlamlı kabul edilmiştir.

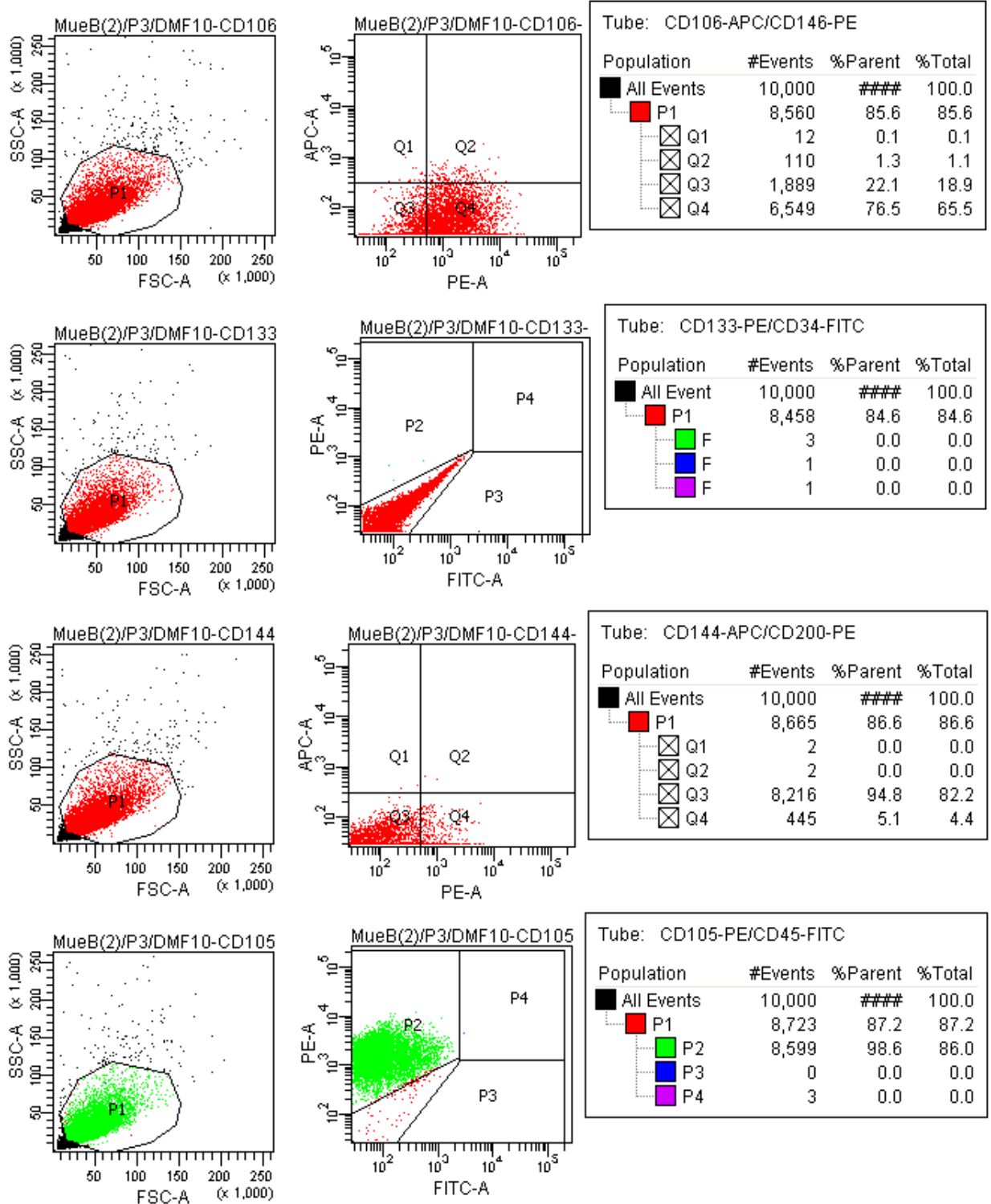
3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

3.1. Hücre kültürü çalışmaları

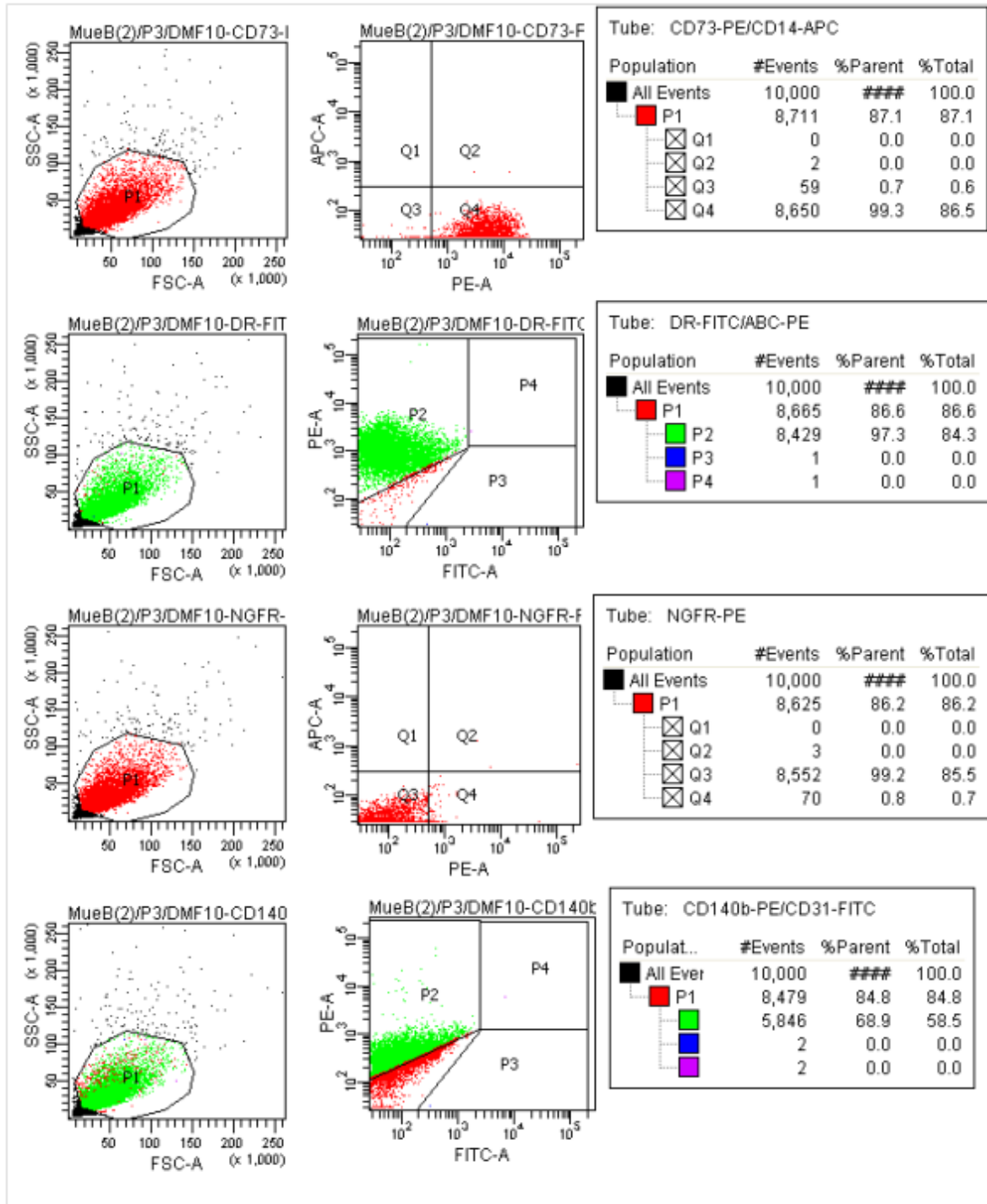
3.1.1. Mezenşimal kök hücre kültürü çalışmaları

Çalışmanın bu aşaması, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu LUT12/134-16 karar numaralı etik kurul izni çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin izolasyon, karakterizasyon, farklılaştırma aşamaları Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Erken pasajlarda (pasaj 2 ve 3) dondurulan hücreler devam eden çalışmalar için laboratuvarımıza getirilmiştir.

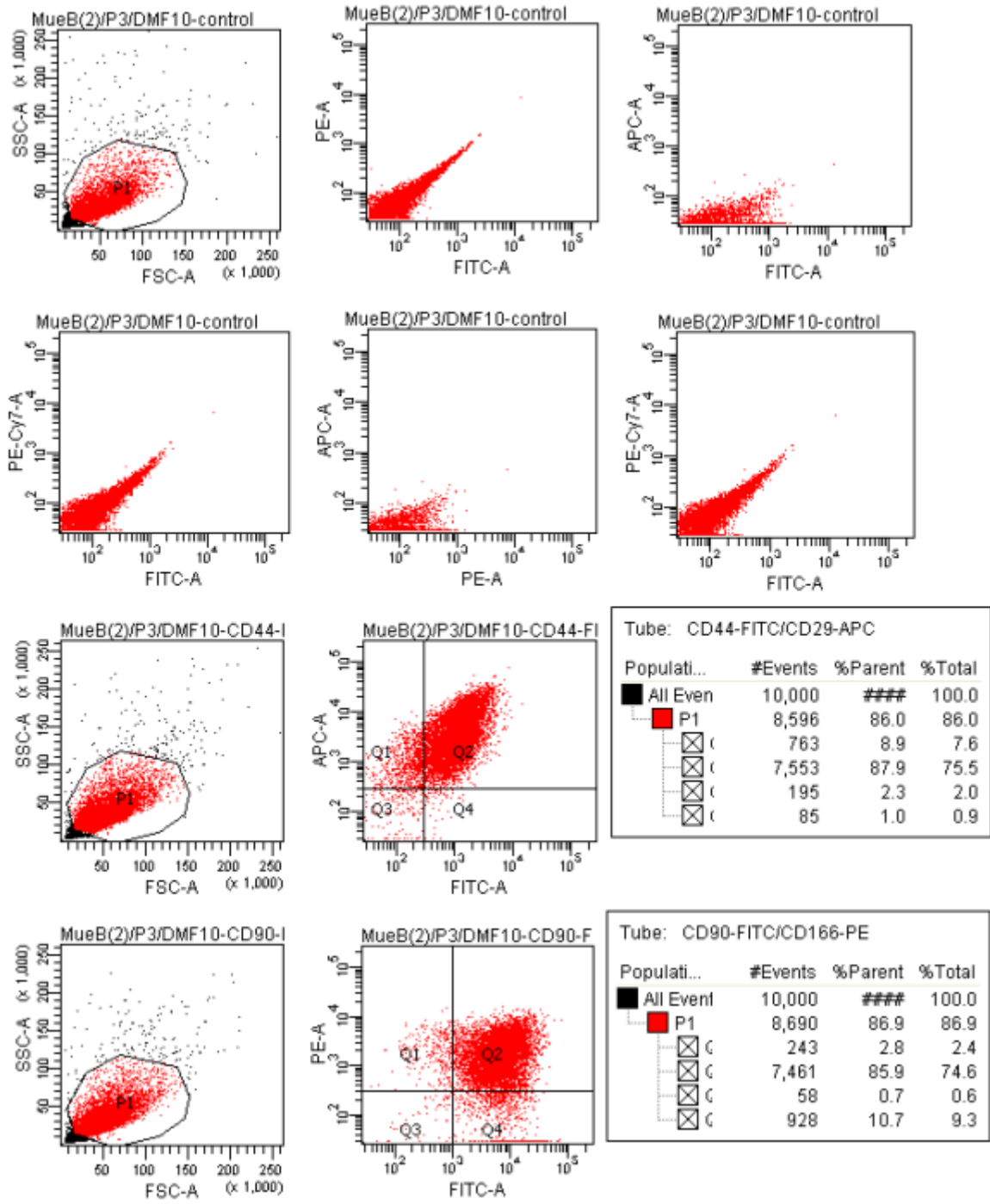
MKH'lerin karakterizasyonu için Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde rutin olarak uygulanan mezenşimal kök hücre karakterizasyon paneli akım sitometrisi ve farklılaşma deneyleri ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda izole edilen mezenşimal kök hücrelerde CD44,CD29, CD90, CD200, CD144,CD73,CD146, 166, CD106 ve NGFR yüzey belirteçlerinin pozitif, HLA-ABC belirtecinin düşük pozitif, olduğu görülmüştür. Ancak CD34, CD45, CD133, CD14 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin ise negatif olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3.). Aynı zamanda mezenşimal kök hücreleri 2 farklı hücre tipine farklılaşma kapasitesinin ölçülmesi amacıyla osteoblast ve adiposit yönünde farklılaşması incelenmiştir. Adiposit ve osteoblast yönünde farklılaşmaları Oil Red O ve Alizarin Red boyaları ile gösterilmiştir (Şekil 3.4). ISCT tarafından belirlenen mezenşimal kök hücre olma kriterleri kapsamında incelendiğinde izole edilen kök hücrelerin karakterizasyonlarının mezenşimal kök hücre karakterizasyonu için yeterli olduğu görülmüştür [106, 113].



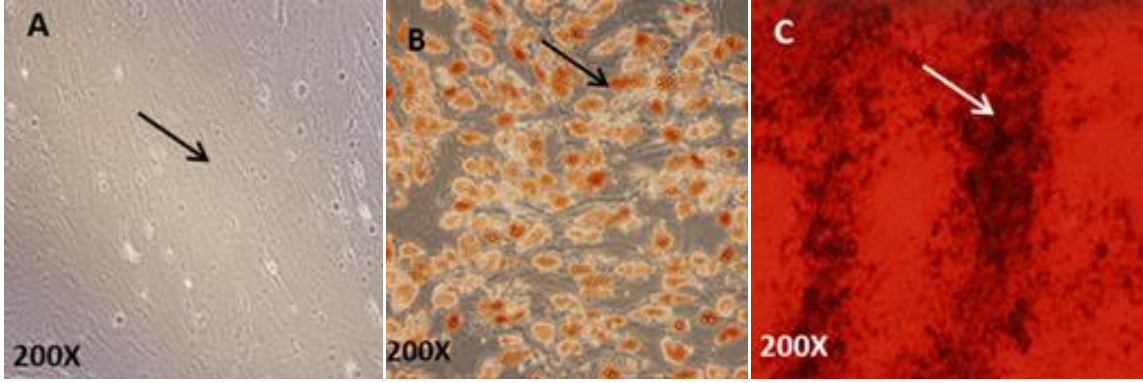
Şekil 3.1. Mezenşimal kök hücre karakterizasyonu flow sitometri paneli 1; CD106, CD146, CD133, CD144, CD34, CD20, CD105, CD45 yüzey belirteçlerinin analizleridir. CD106, CD146, CD205, CD200 pozitif iken CD133, CD45, CD144 ve CD34 negatiftir.



Şekil 3.2. Mezenşimal kök hücre karakterizasyon flow sitometri paneli 2; CD73,CD14, HLA-DR, HLA-ABC, NGFR,CD140b, CD31; CD73, HLA-ABC (düşük pozitif), CD140b ve NGFR pozitif iken CD14, CD31ve HLA-DR negatiftir.



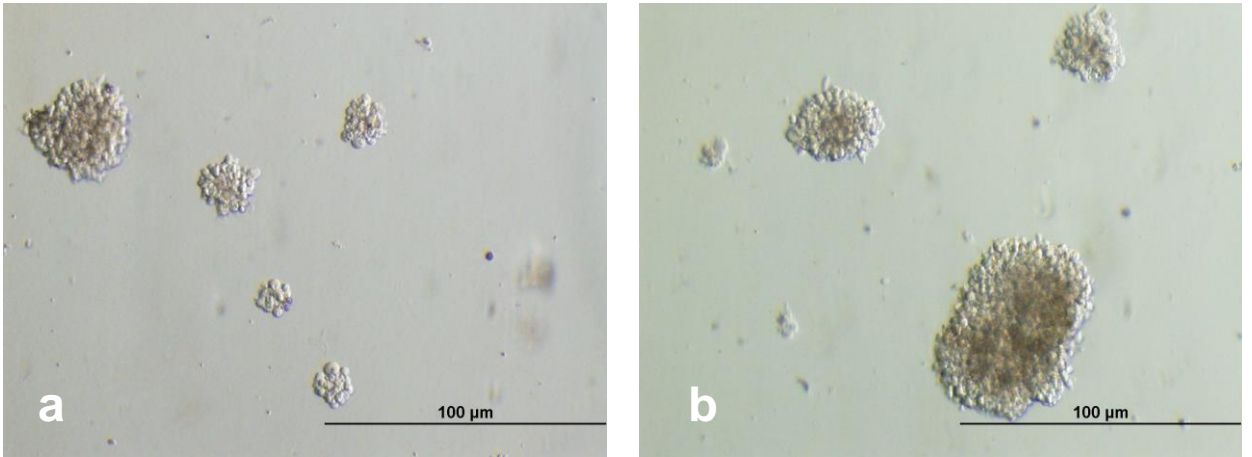
Şekil 3.3. Mezenşimal kök hücre karakterizasyon flow sitometri paneli 3; *CD44*, *CD29*, *CD90* ve *CD166*; bütün yüzey belirteçleri pozitifdir.



Şekil 3.4. Mezenşimal kök hücre adiposit ve osteoblast yönünde farklılaşma potansiyelinin gösterilmesi. A. Mezenşimal kök hücre 21. gün ışık mikroskobu görüntüsü (200X), B. Adipojenik farklılaşma 21. gün Oil Red O boyama (200X), C. Osteojenik farklılaşma 21. gün Alizarin Red boyama (200X).

3.1.2. NK92 hücrelerinin kültürü

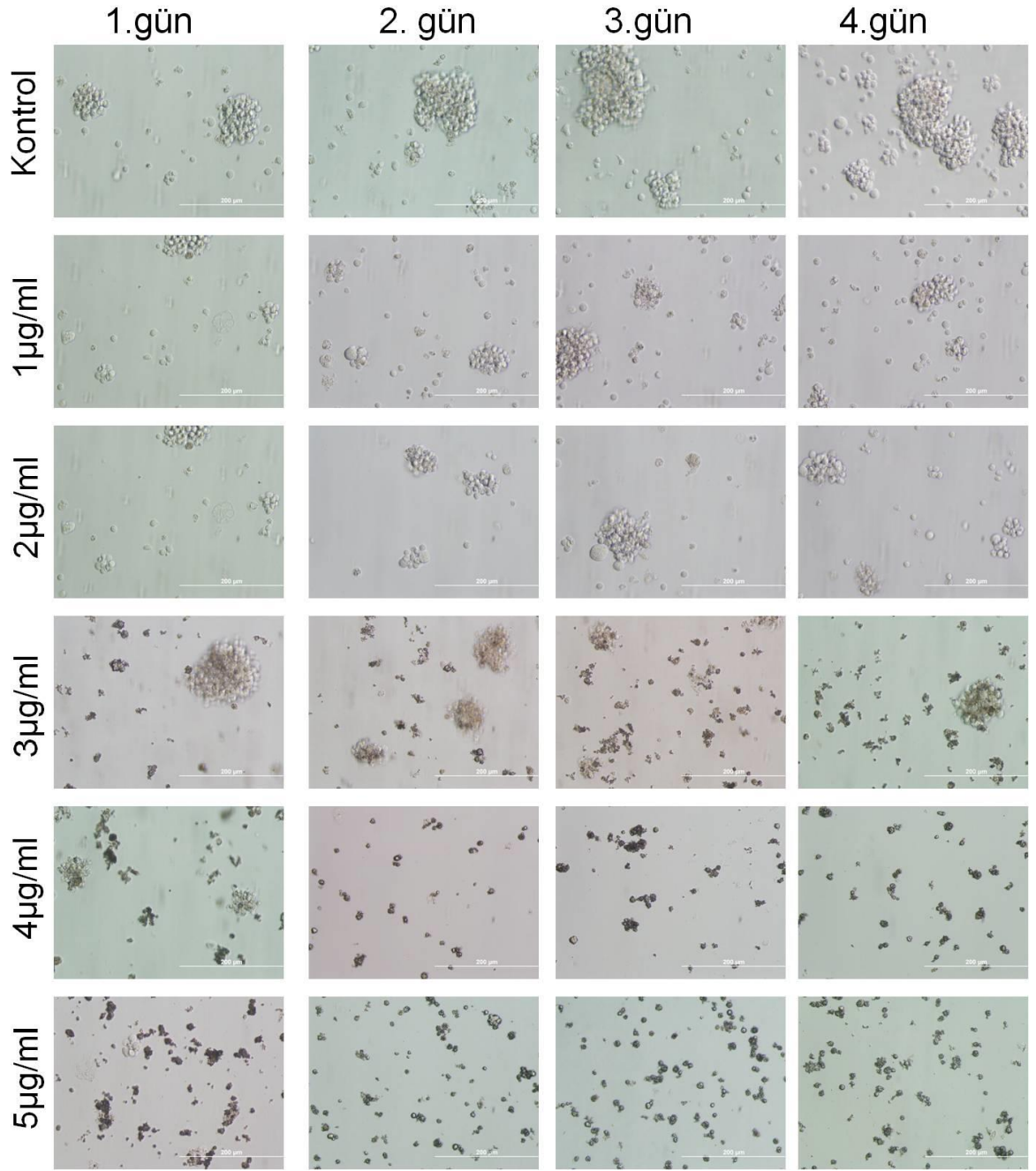
NK92 hücreleri IL-2 bağımlı süspanse kültür hücreleridir ve 3×10^5 hücre/ml yoğunluğunda kültüre edilmektedir. Hücrelerin kültürü boyunca kültür ortamındaki IL-2 seviyesi sabit tutulmuştur. Pasajlanan hücreler transfeksiyon deneyleri için hazırlanmış ve daha sonra gerçekleştirilecek deneyler için dondurulmuştur. NK92 hücreleri hücre agregatları oluşturarak çoğalan hücrelerdir. Ortamda yeterli IL-2 olduğunda çoğalarak daha büyük hücre agregatları oluşturmaktadırlar (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Sağlıklı NK92 hücreleri a. Yoğunluğu daha az hücreler ve küçük hücre agregatları, b. Yoğunluğu daha fazla hücreler ve büyük hücre agregatları.

3.1.3. NK92 hücrelerine antibiyotik dayanıklılık testinin yapılması

Hücrelerin puromisin antibiyotiğine dayanıklılığının ölçülmesi amacıyla antibiyotik dayanıklılık testi yapılmıştır ve puromisine dayanıklılık kritik konsantrasyonu olarak 3 µg/ml seçilmiştir. Antibiyotik dayanıklılık testinde hücreler 1, 2, 3, 4 ve 5. günlerde görüntülenmiştir, 5. gün görüntüleri 4. gün görüntüleri ile çok benzer olduğundan verilmemiştir (Şekil 3.6). Hücreler inkübasyon süresi boyunca takip edilmiş canlı ve ölü hücre oranı mikroskobik olarak görüntülenmiştir. Kontrol grubunda ilerleyen günlerde hücrelerin sayısında artış olduğu görüntülenmiş ve zamanla hücrelerin bir araya gelerek hücre kümeleri oluşturduğu tespit edilmiştir. 1 µg/ml ve 2 µg/ml puromisin içeren grupta hücre sayısının azaldığı ancak 5 günlük takipte sağlıklı hücre morfolojisinin düzenli olduğu görülmüştür. 3 µg/ml puromisin içeren grupta hücrelerde 48 saatten sonra ölümün arttığı ortamda sağlıklı hücre sayısının oldukça az olduğu gözlenmiştir. 4 µg/ml grubu ve 5 µg/ml grubu hücrelerde 24 saatlik uygulama sonucunda bütün hücrelerin öldüğü görülmüştür. Puromisin hücre kültüründe dirençli kolonileri seçmek için kullanılan çok yaygın bir antibiyotik çeşididir. Direnç genini içeren hücreler yaşarken direnç geni olmayan hücrelerde protein sentezini engelleyerek hücrelerin ölümüne neden olur [177]. Hücreler üzerinde puromisin etkisi protein sentezi aşamalarında ribozoma peptid transferinin engellenmesi ile olur. Bu şekilde prematür peptid zinciri tamamlanamaz ve hücrelerin bölünmesi için gerekli proteinler sağlanamaz. Ayrıca puromisin hücre kültüründe etkisini %99 gibi bir oranla 24 saat içinde göstermektedir [178]. Bu nedenle kritik konsantrasyon olarak seçilen 3 µg/ml konsantrasyonun, 24 saat sonrasında devam ettiği ve sağlıklı hücre sayısının kontrole göre az olmasından seçim için uygun olduğu görülmüştür.

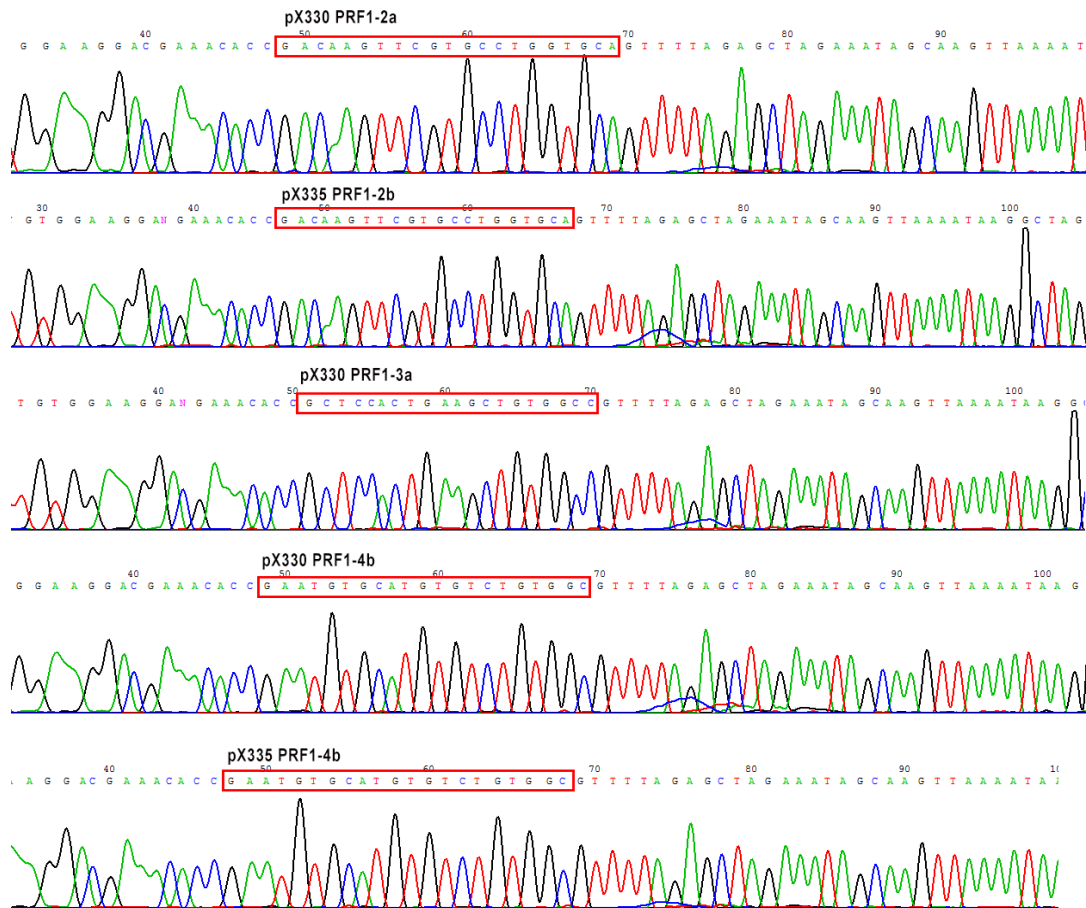


Şekil 3.6. NK92 hücreleri antibiyotik direnç testi görüntüleri, *inkübasyon süresi ve konsantrasyon değişikliklerine göre incelendiğinde 3µg/ml kritik konsantrasyon olarak seçilmiştir.*

3.2. Vektör Sistemlerinin Hazırlanması

3.2.1. Perforin genini hedefleyen CRISPR/Cas vektör sisteminin hazırlanması

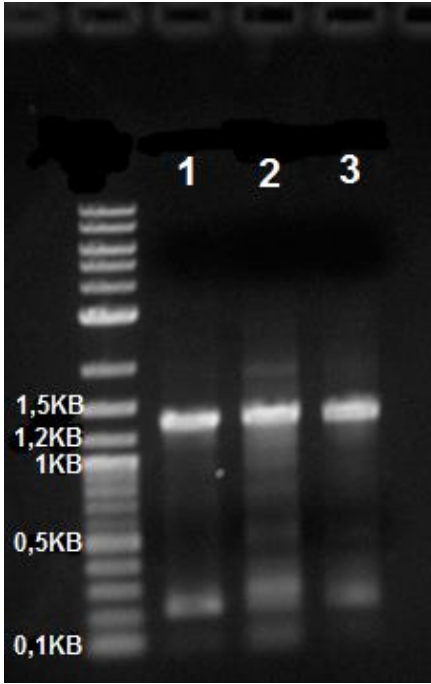
Perforin genini hedefleyen CRISPR/Cas vektör sisteminin hazırlanmasında hedeflenen bölgeye özel olarak tasarlanan primerler kullanılmıştır. Bu primerlerin CRISPR/Cas vektörlerine ligasyonunda Cong ve arkadaşları tarafından önerilen yöntemler izlenmiştir [171]. Elde edilen vektörlerin perforin geni ekzon 2'yi hedeflediğini göstermek için DNA dizi analizi yapılmıştır. Elde edilen 5 farklı vektörde dizi analizi sonucu CRISPR/Cas sistemine eklenen F: CAGACCCCTCCCTAACCTG primer dizi analizi verilerinde işaretlenmiştir. Elde edilen CRISPR/Cas sistemi vektörleri PRF1 ekzon2'yi hedeflemek için uygundur (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. PRF1 ekzon 2'yi hedefleyen CRISPR/Cas sistemi vektörleri DNA dizi analizi sonuçları; elde edilen 5 farklı vektörde perforin genini hedeflemede kullanılan primer işaretlenmiştir.

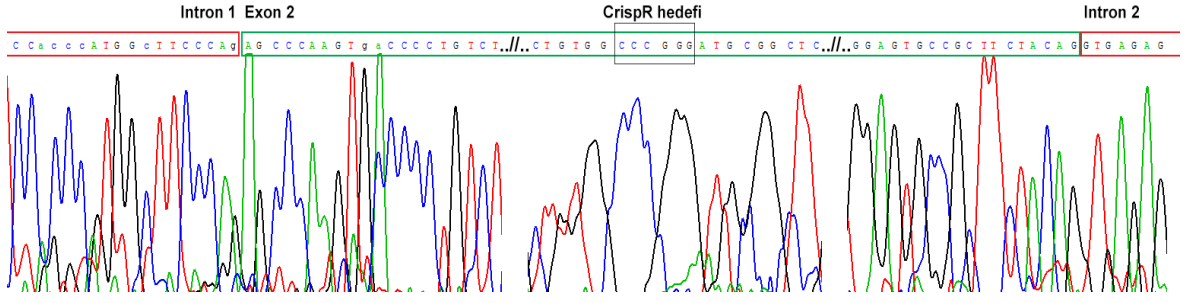
3.2.2. Perforin geni ekzon 2 ve puromisin direnci içeren vektör sisteminin hazırlanması

PRF1 ekzon 2 ve puromisin direnci içeren vektör tasarımı öncelikle vektör sistemine eklenecek olan PRF1 geni insan DNA'sından PCR ile çoğaltılmıştır. PRF1 geni çoğaltmak için kullanılan primerlerin, çoğalttığı bölgenin baz uzunluğu 1396 bazdır. PCR sonrası elde edilen ürün agaroz jelde yürütülüp görüntülediğinde edilen bant büyüklüğü 1396 baz ile uyumludur (Şekil 3.8).



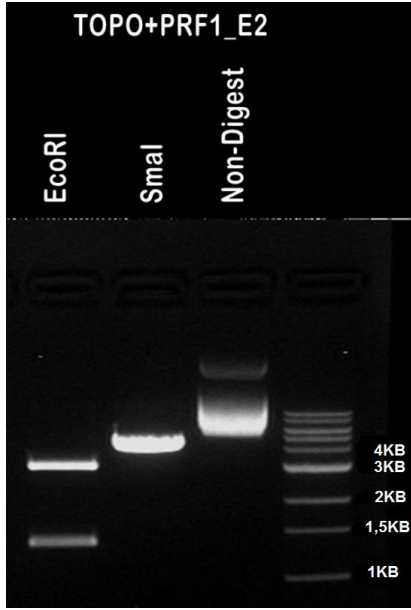
Şekil 3.8. PRF1 Ekzon 2 PCR ürününün jelde yürütülmesi sonucu elde edilen görüntüsü. *PRF1 ekzon 2 PCR fragmenti uzunluğu 1396 baz, 3 adet PCR ürünü yüklenmiştir. (1KB ladder kullanılmıştır).*

Agaroz jelde görüntülenen ve büyüklüğü kontrol edilen PRF1 ekzon 2 PCR ürününün DNA dizi analizi yapılmıştır. Elde edilen analiz sonucu karşılaştırılmış ve PRF1 geni ekzon 2 ile örtüştüğü gösterilmiştir (Şekil 3.9).



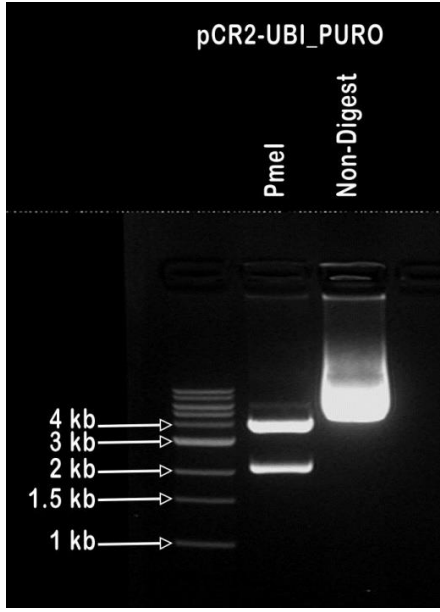
Şekil 3.9. PCR ile çoğaltılan PRF1 ekzon 2 dizi analizi sonuçları, *ekzon 2'nin her iki tarafındaki intronlar ve CRISP/Cas sistemi ile hedeflenen ekzon 2 bölgesi işaretlenmiştir.*

PRF1 ekzon 2 PCR fragmentini içeren homolog rekombinasyon donör vektörün hazırlanması aşamasında pCR2.1 TOPO plazmidi kullanılmıştır. Bu plazmide PRF1 ekzon 2 eklenmiş ve EcoRI ve SmaI restriksiyon endonükleaz enzim kesimleri sonucunda elde edilen bant büyüklüklerinin beklendiği gibi olduğu görülmüştür (Şekil 3.10). PRF1 ekzon 2 yi içeren pCR2.1 TOPO+PRF1 ekzon 2 vektörü EcoRI enzimi ile kesildiğinde 2 adet fragment oluşmakta bu fragmentlerden küçük olan, eklenen PRF1 ekzon2 bölgesi olup 1396 bazdır, SmaI enzimi ile oluşturulan vektörü sadece bir noktadan keserek linearize etmektedir. Elde edilen görüntü linearize edilmiş bir DNA'nın jelde oluşturduğu görüntü ile uyuşmaktadır. Jelde paralel olarak yürütülen enzim kesimi yapılmamış vektör DNA'sının görüntüsü ise dairesel bir DNA'nın jelde oluşturduğu görüntü ile uyuşmaktadır.



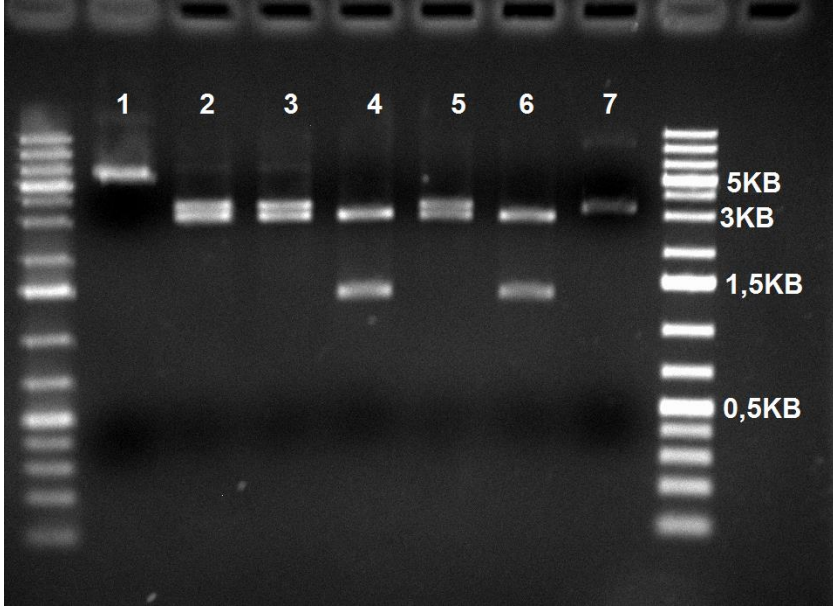
Şekil 3.10. pCR2.1 TOPO+PRF1 ekzon2 vektörü EcoRI ve SmaI enzim kesimleri sonucu elde edilen jel görüntüsü, *EcoRI* enzimi ile elde edilen 2 bant ve *SmaI* enzimi ile elde edilen linearize olmuş DNA jel görüntüsü (1KB ladder kullanılmıştır).

Puromisin direnci içeren vektörün hazırlanması amacıyla pCR2.1 TOPO plazmidi kullanılmıştır. Bu plazmide puromisin direnç geni eklenirken genin her iki ucuna PmeI kesim bölgeleri eklenmiştir. Enzim eklenmesindeki amaç daha sonra hazırlanacak vektör için puromisin direnç genini kör uç şeklinde keserek pCR2.1 TOPO+PRF1 ekzon 2 vektöründe ekzon 2 kısmının ortasına yerleştirebilmektir. Hazırlanan pCR2.1 TOPO +Ubi-Puro vektörü PmeI enzimi ile kesildikten sonra jelde yürütülmüş ve jelde görülen 2 banttın büyük olan plazmidi (4359 baz) küçük olan ise puromisin direnç genini (2068baz) göstermektedir (Şekil 3.11).

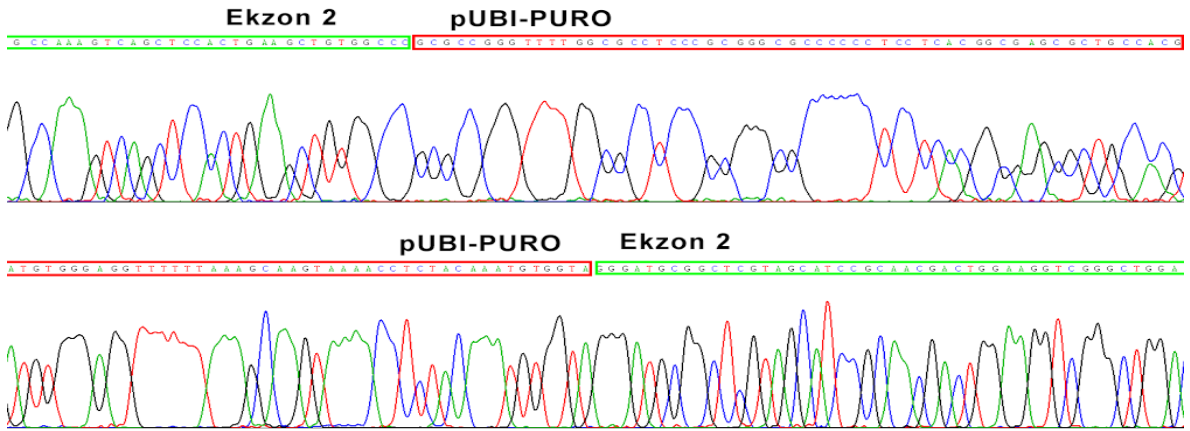


Şekil 3.11. pCR2.1 TOPO+UBI-PURO plazmidi PmeI enzim kesim jel görüntüsü, oluşan fragmentler pCR2.1 TOPO plazmidi (4359 baz) ve puromisin direnç geni (2068baz) olarak görülmektedir (1KB ladder kullanılmıştır).

PRF1 ekzon 2 ve puromisin direncini içeren vektör sisteminin hazırlanmasında öncelikle; pCR2.1 TOPO+UBI-PURO vektöründen UBI-PURO geni In-Fusion klonlama için özel olarak tasarlanmış primerlerle PCR ile çoğaltılmış ve jelde yürütülerek jelden izole edilmiştir. pCR2.1 TOPO+PRF1 ekzon 2 vektörü ile SmaI enzimi ile linearize edilmiş ve jelde yürütülerek jelden izole edilmiştir. In-fusion klonlama için bu iki fragment birleştirilmiştir. Elde edilen 7 farklı örnek EcoRI enzimi ile kesilmiş ve jelde yürütülmüştür. Jel görüntü analiz edildiğinde bu örneklerden sadece 3 tanesinde istenilen büyüklükteki 2 bandın (3400baz ve 3000 baz) olduğu görülmüştür (Şekil 3.12). Beklenen bantların olduğu örnekler seçilerek DNA dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi sonucunda ekzon 2 ve puromisin direncini içeren 2 vektör seçilmiştir ve bu yeni vektör pCR2.1 TOPO+PRF1 ekzon 2+UBI-PURO olarak isimlendirilmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.12. pCR2.1 TOPO+PRF1 Ekzon 2+UBI-PURO plazmidi EcoRI enzim kesimi jel görüntüsü, *EcoRI* enzim kesimi sonucu elde edilmesi beklenen 3400baz ve 3000 bazlık iki band 2, 3 ve 5 nuralı örnekte görülmektedir.



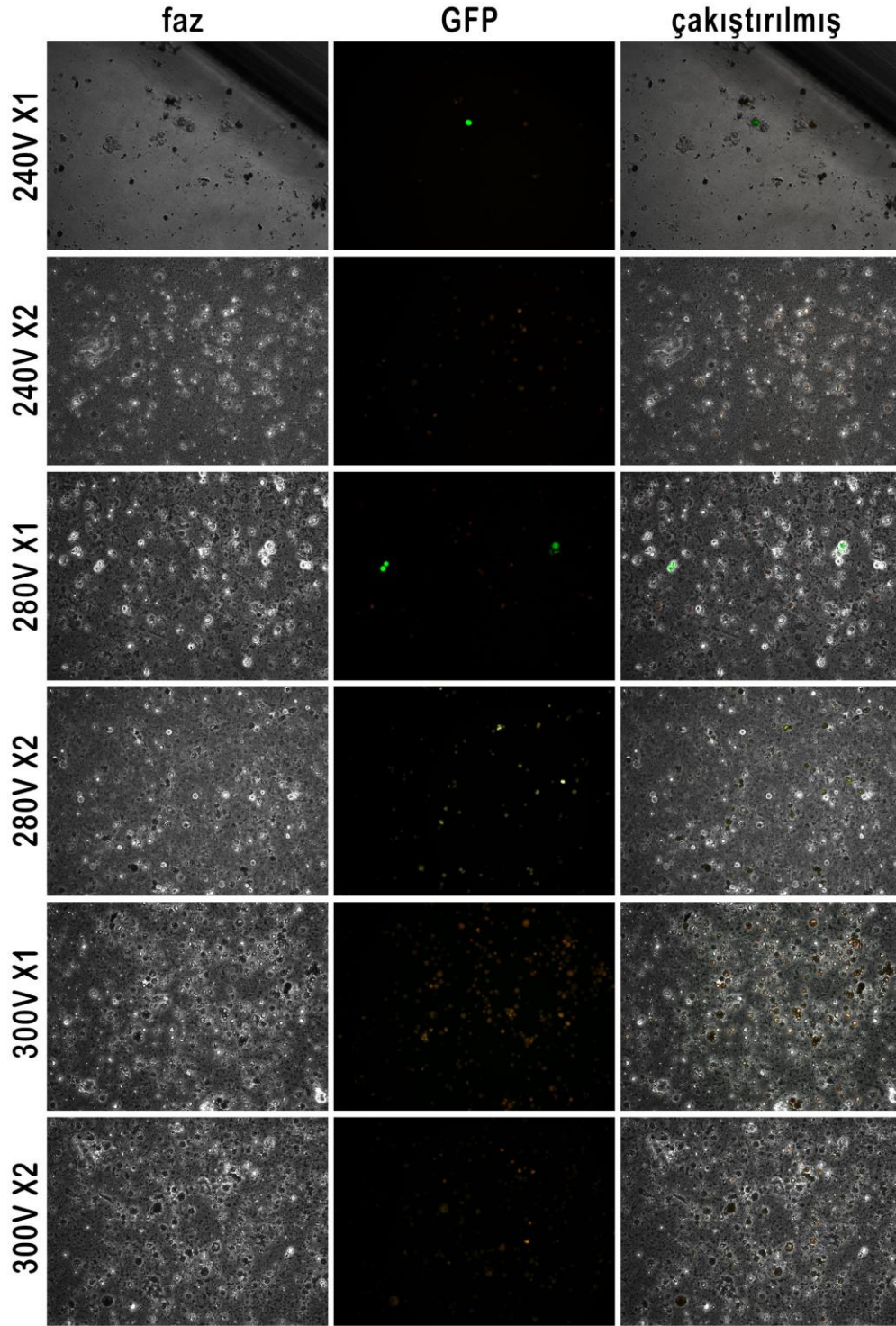
Şekil 3.13. pCR2.1 TOPO+PRF1 Ekzon 2+UBI-PURO vektör sistemi DNA dizi analizi sonuçları, *şekilde 2* farklı dizi analizi sonucu elde edilen sonuçlar görülmektedir. Dizi analizi sonucunda PRF1 ekzon 2'nin puromisin direnç geni ile birleştiği bölgeler gösterilmiştir.

3.3. Gen Transferi Çalışmaları

NK92 hücrelerine 3 farklı yöntemle gen transfeksiyonu yapılmıştır. Sonuçta transfeksiyon verimliliği en yüksek yöntem seçilerek tez kapsamında kullanılmıştır.

3.3.1. Elektroporasyon

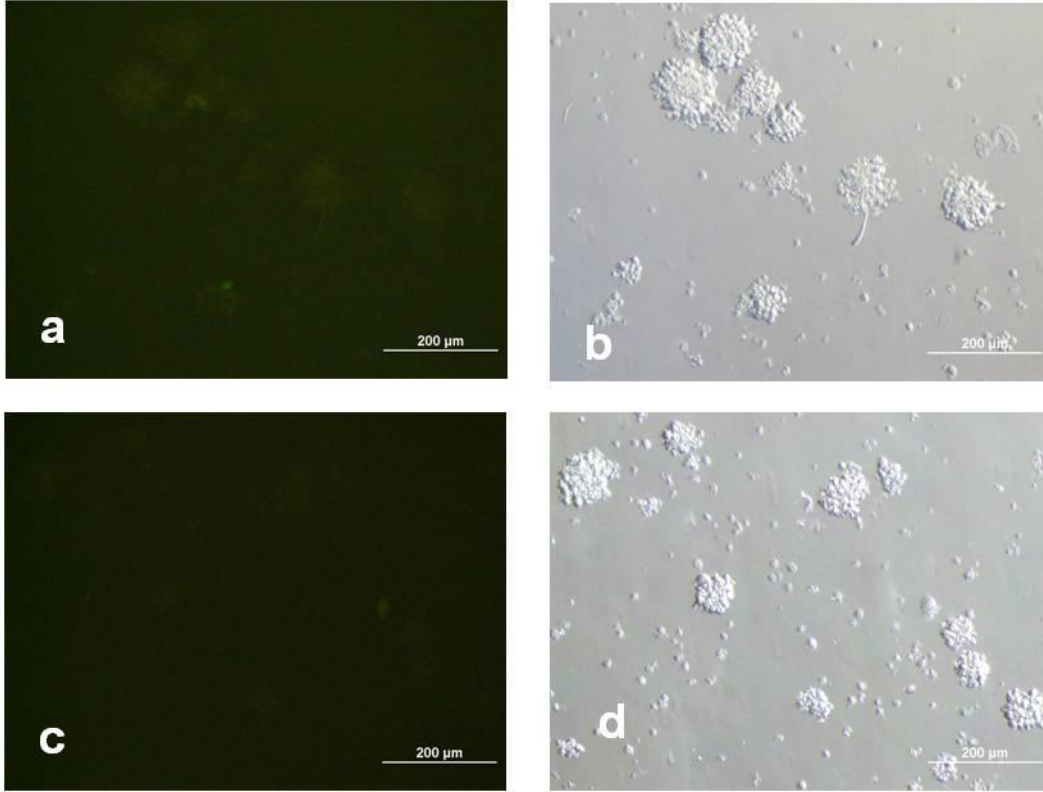
Elektroporasyon çalışmalarında farklı voltajlar (240V, 280V, 300V) ve farklı tekrarlar (1 ve 2 tekrar) kullanılarak GFP içeren vektör transfekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda 280V ve tek seferlik elektroporasyon denemesinde diğer gruplara oranla daha fazla GFP pozitif hücre görülmüştür. Ancak transfekte olan hücre sayısının düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. NK92 hücrelerinin GFP içeren vektörle elektroporasyonla transfeksiyonu sonucu elde edilen floresan mikroskop ve ışık mikroskobu görüntüleri (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japan); 280V elektriksel güçte tek seferlik uygulama yapılan grupta diğer gruplara göre daha fazla GFP pozitif hücre bulunmaktadır.

3.3.2. Kimyasal transfeksiyon

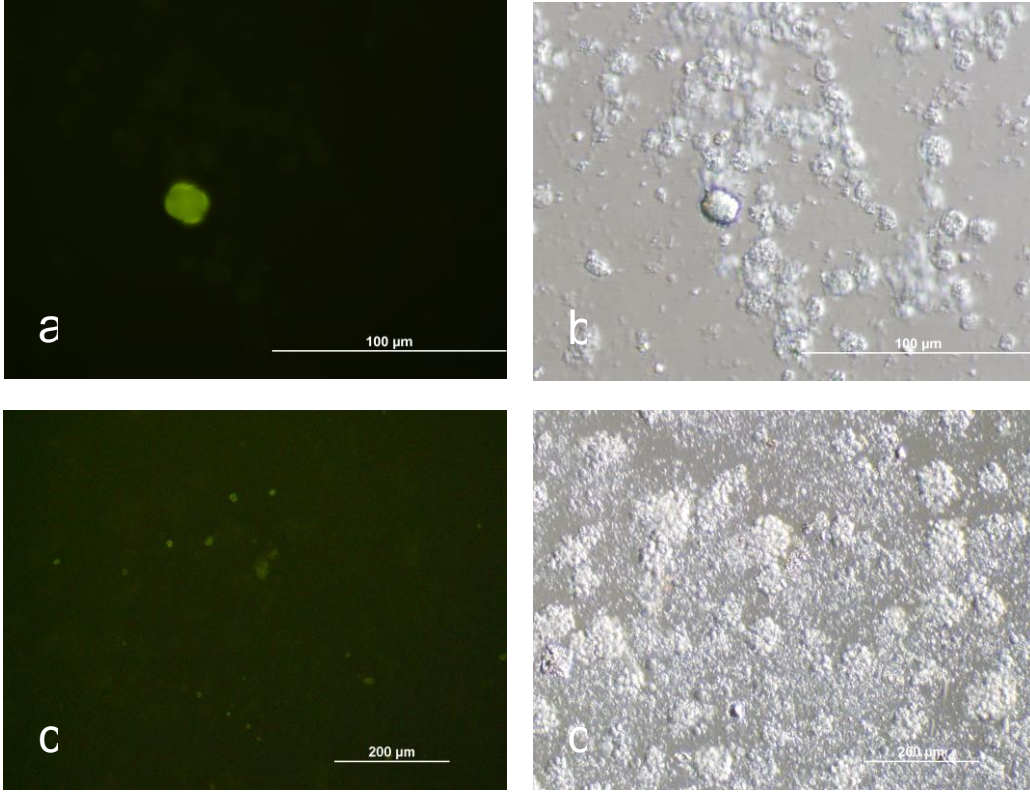
Kimyasal transfeksiyon amacıyla yapılan denemelerde kimyasal transfeksiyon ajanı (Turbofect, Thermo) ile GFP içeren vektör DNA'sı uygulanmıştır. 24 saat sonra elde edilen görüntülerde GFP pozitif olan hücre sayısının az olduğu görülmüştür (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. NK92 hücrelerinin GFP içeren vektörle kimyasal ajanla transfeksiyonu sonucu elde edilen floresan mikroskop (a, c) ve ışık mikroskop (b, d) görüntüleri (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japan), *GFP pozitif hücre sayısının çok düşük olduğu görülmektedir.*

3.3.3. Nükleofeksiyon

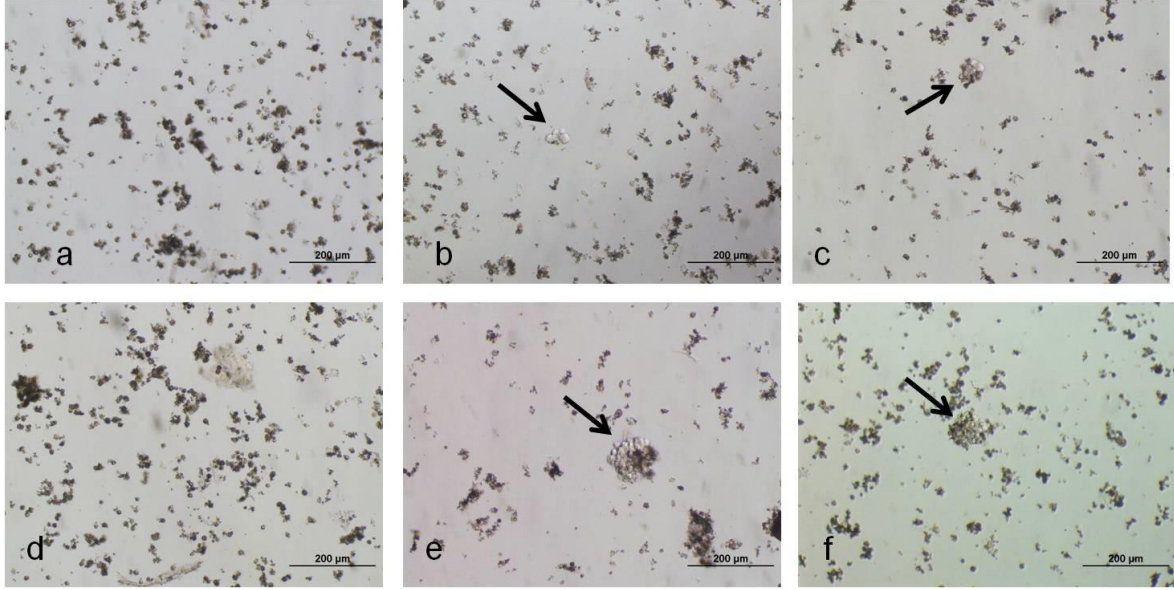
Nükleofeksiyon çalışmalarında GFP içeren vektörle transfeksiyon yapılmış ve transfeksiyon verimliliği ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre NK92 hücrelerinin transfeksiyon verimliliğinin diğer iki yonteme göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 3.16). Bu nedenle hücrelerin transfeksiyonu ile ilgili devam eden deneysel çalışmalar nükleofeksiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.16. NK92 hücreleri GFP vektörle nükleofeksiyondan 24 saat sonra elde edilen görüntüler; floresan mikroskop (a, c) ve ışık mikroskobu görüntüsü (b, d) (Olympus IX70 Inverted Mikroskop, Japan); *GFP pozitif hücre sayısının diğer gruplara göre daha fazla olduğu gösterilmiştir.*

NK92 hücrelerinin pCR2.1 TOPO+PRF1 Ekzon2+UBI-PURO vektörü ve CRISPR sistemi için transfeksiyonunda nükleofeksiyon yöntemi kullanılmıştır. Nükleofeksiyon işlemi sonucu laboratuvara getirilen hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda antibiyotik seçilimi işlemi için besi ortamına 3µg/ml puromisin eklenmiş ve devam eden kültür süresince hücreler puromisin içeren besi ortamında kullanılmıştır. Aynı zamanda antibiyotik seçilimine kontrol olarak sağlıklı hücrelere de paralel olarak puromisin uygulanmıştır. Antibiyotik uygulamasından 24 saat sonra kültür ortamında yoğun miktarda ölü hücre görülmüştür. Bu durum transfekte olmayan hücrelerde puromisin direncinin olmamasından kaynaklanmaktadır. Antibiyotik seçilimine 2-4 hafta devam edilmiştir. Bu süreçte kontrol grubunda yaşayan hücre kalmazken, transfekte olan ve puromisin direnci taşıması nedeniyle puromisinin etkisinden korunan hücreler çoğalmaya başlamıştır (Şekil 3.17). Denemeler sonucunda transfekte olan ve puromisinli ortamda

çoğalmaya devam eden 2 farklı klon seçilmiştir (Klon1 ve Klon2). Klon1 ve Klon2 hücreleri arasındaki fark transfeksiyonda kullanılan CRISPR/Cas vektör sisteminin PRF1 ekzon 2 de hedeflediği bölgedeki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Başlangıçta çok düşük olan hücre sayısı kültür devam ettiği sürece artmıştır. Devam eden deneysel çalışmalar çoğaltılan Klon1 ve Klon2 hücreleri ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.17. Puromisin antibiyotik seçimi sonrası devam edilen kültürde çoğalmaya devam eden transfekte olmuş hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri; a-c; puromisin antibiyotikli besi ortamında 1. hafta hücre görünüşleri, d-f; puromisin antibiyotikli besi ortamında 2. hafta hücre görünüşleri. a ve d; kontrol NK92 hücreleri, b ve e; transfekte NK92 hücreleri (Klon1); c ve f; transfekte NK92 hücreleri (Klon2). Ok işareti puromisin dirençli sağlıklı hücreleri göstermektedir.

3.4. Hücrelerin Uyarılması ve Gen İfadesinin Kontrolü

Transfekte edilen ve antibiyotik seçilimi sonucu çoğalmaya devam eden Klon1 ve Klon2 hücrelerinde perforin geninin ifadesinin kontrolü için öncelikle hücreler uyarılmış, sonrasında ise qPCR, PCR ve ELISA analizleri gerçekleştirilmiştir.

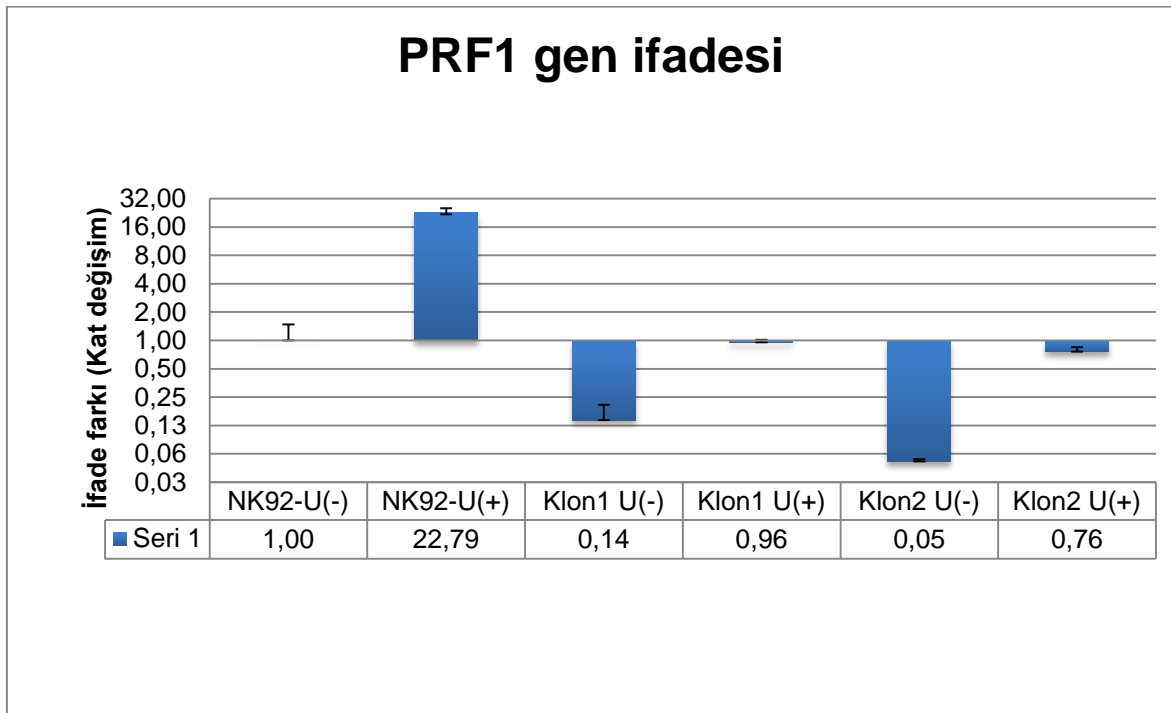
3.4.1. Hücrelerin uyarılması

Transfeksiyon deneyleri sonrası antibiyotikli besi ortamında canlılığını devam ettiren Klon1 ve Klon2 hücrelerinde perforin ifadesinin kontrolü amacıyla, hücreler

PMA/İyonominin ile uyarılmıştır. NK hücreleri PMA/İyonominin ile 4 saat uyarılmıştır. PMA/İyonominin *in vitro* çalışmalarda NK hücrelerini uarmak ve perforin salınımını görüntülemek için kullanılan en önemli ajanlardandır. Bu nedenle uyarı sonucu perforin ifadesini ve protein miktarını gösterebilmek için bu çalışmada kullanılmıştır [63].

3.4.2. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR)

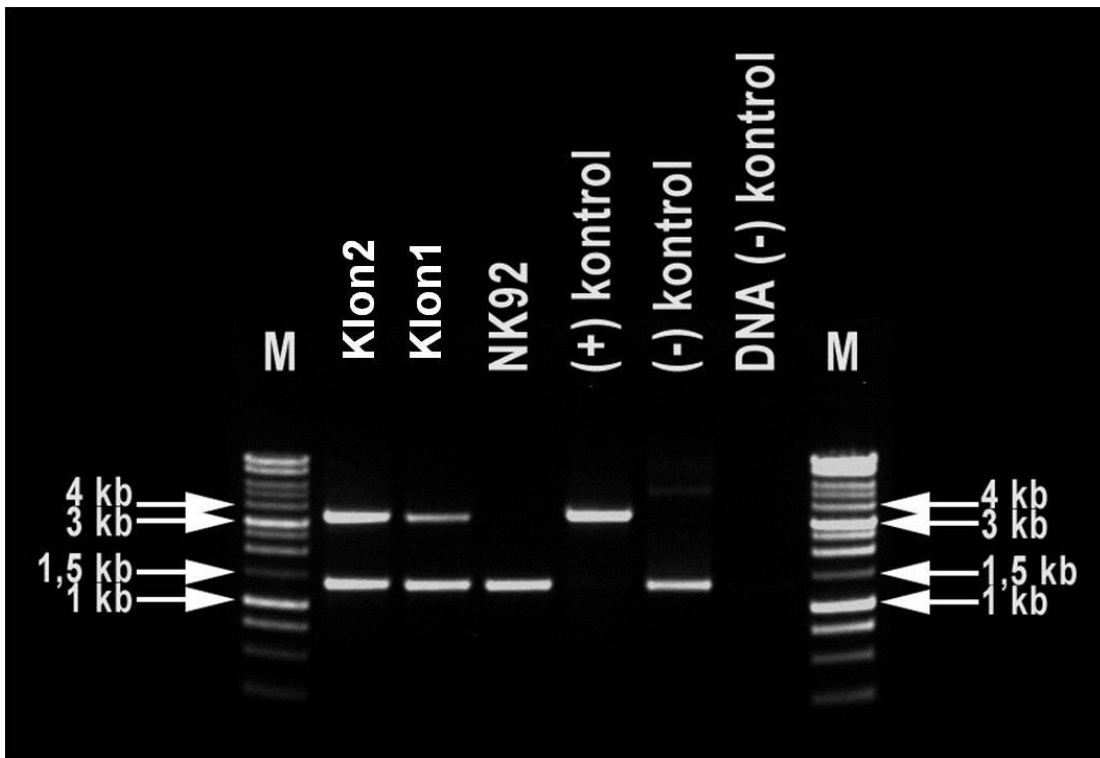
qPCR deneylerinde kontrol gen olarak TATA binding protein (TBP) ifadesi analiz edilmiştir. Kontrol TBP ifadesine göre perforin gen ifadesi değişimi relatif olarak hesaplanmıştır. Transfekte olmamış ve olmuş hücrelerde PMA/iyonominin ile uyarılmış (U+) ve uyarılmamış (U(-)) hücreler analiz edilmiştir. Transfekte olmamış NK92 hücrelerinde uyarılmış hücrelerde perforin ifadesi, uyarılmamış hücelere göre yaklaşık 22 kat artmıştır. Bu durum uyarım sonucu hücrelerden PRF1'in ifade olduğunu göstermektedir. Klon1 ve Klon2 de ise perforin ifadesinin 0,05-0,096 kat olacak kadar baskılandığı gösterilmiştir (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. Klon1 ve Klon2 hücrelerinde PRF1 ifadesinin qPCR ile analizi

3.4.3. PCR analizi

Klon1 ve Klon2 hücrelerinde PRF1 geni ekzon 2'de hedefli insersiyon bölgesinde ekzon 2 ve puromisin varlığını göstermek için PCR yapılan analizleri ekzon 2 ve puromisin insersiyon bölgesinde olduğunu göstermiştir. PRF1 ekzon 2 bölgesini çoğaltan primerlerden elde edilen ürün 1396 baz uzunluğundadır. Ekzon 2'ye puromisin eklenmesi sonucu oluşan PCR fragmentinin uzunluğu ise 3474 baz uzunluğundadır. PCR analizleri sonucu elde edilen jel görüntülerindeki bant büyüklüğü 3474 baz ile uyumludur (Şekil 3.19).

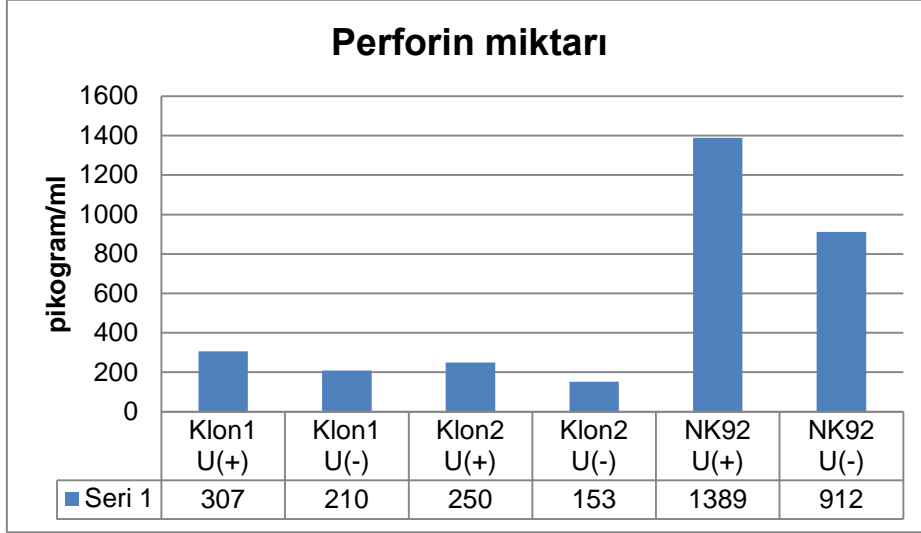


Şekil 3.19. Klon1 ve Klon2 hücrelerinde PRF1 ekzon 2 'de puromisin direnç geninin varlığının gösterilmesi, *Klon2* ve *Klon1* kuyucuklarında 3400 baz ile uyumlu bant bulunmaktadır.

3.4.4. ELISA analizi

Klon1 ve Klon2 hücrelerinde uyarım sonucu perforin salgılanmasının görüntülenmesi amacıyla yapılan ELISA analizi sonucunda perforin salgılanmasının baskılandığı görülmüştür. Perforin salınımı uyarılmış hücrelerde uyarılmamış hücrelere göre daha yüksek ölçülmüştür. Klon1 uyarılmış hücrelerle,

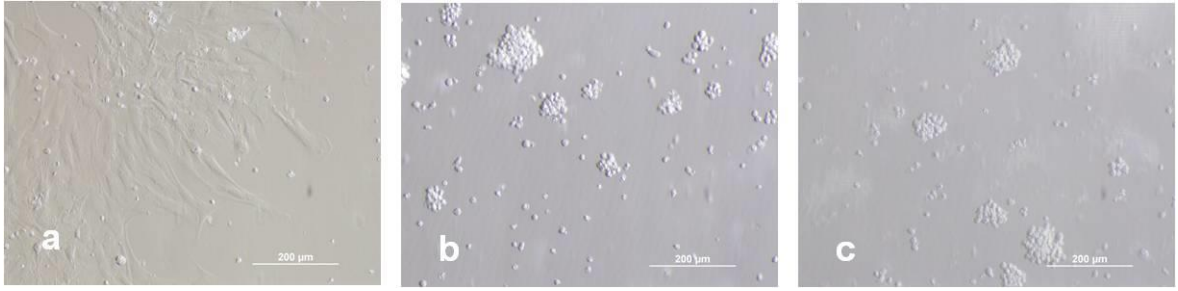
NK92 uyarılmış hücreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p=0,000019$). Aynı zamanda Klon2 ile sağlıklı NK92 uyarılmış hücreler arasında da anlamlı farklılık söz konusudur ($p=0,0000138$). Bu sonuçlar yapmış olduğumuz transfeksiyonun başarılı olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.20. Klon1 ve Klon2 hücrelerinde uyarım sonucu perforin salgılanmasının ELISA analizi ile ölçülmesi, *NK92 hücrelerinden salınan perforin miktarı Klon1 ve Klon2'ye oranla anlamlı olarak daha yüksektir.*

3.5. Hücrelerin Mezenşimal Kök Hücreleri ile Ko-Kültürü

Klon1 ve Klon2 hücrelerinin MKH'lerle ko-kültürü yapılarak süpernatantlar çoklu sitokin analizi için saklanmıştır. MKH'ler 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiş ve 24 saatlik inkübasyon sonrası transwell sisteminde Klon1 ve Klon 2 hücreleri transwellin üst kısmına eklenerek ko-kültüre edilmiştir. Kontrol olarak NK92 hücreleri ile ko-kültür yapılmıştır. Ko-kültür sistemi kurulmadan önce hücreler görüntülenmiştir. Devam eden zamanda görüntülenme transwell sistemindeki porlu yapılar nedeniyle gerçekleştirilememiştir.



Şekil 3.21. Ko-kültür öncesi hücrelerin görünümü; a; MKH, b; Klon1 hücreler, c; Klon2 hücreleri.

Klon1, Klon2 ve NK92 hücreleri MKH'lerle farklı oranla kültüre edilmiştir. Her hücre grubu için MKH/NK hücre oranı 1:1 ve 1:10 olacak şekilde ko-kültür sistemi kurulmuştur. Örneklem seçilimi Çizelge 3.1'de özetlenmiştir. 24 ve 72. saatlerde örnekler toplanarak çoklu sitokin analizi için -80°C 'de saklanmıştır. Aynı zamanda kontrol örneği olarak aynı sayıda MKH'lerin süpernatantları alınarak analiz edilmiştir.

Çizelge 3.1. Ko-kültür sisteminde örneklerin dağılımı

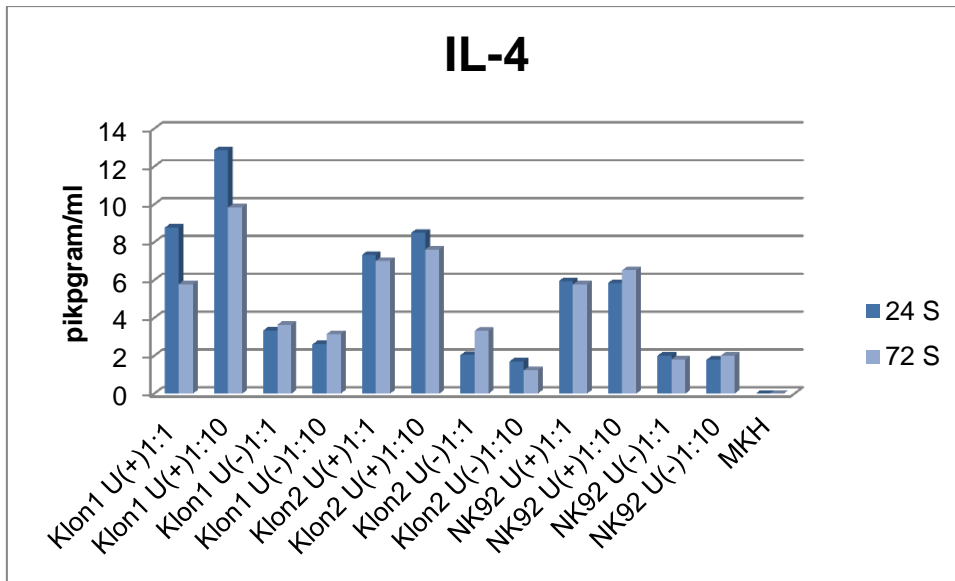
Hücreler	Uyarılmış (U(+))		Uyarılmamış (U(-))	
	Klon1	MKH/Klon1 1:1	MKH/Klon1 1:10	MKH/Klon1 1:1
Klon2	MKH/Klon2 1:1	MKH/Klon2 1:10	MKH/Klon2 1:1	MKH/Klon2 1:10
NK92	MKH/NK92 1:1	MKH/NK92 1:10	MKH/NK92 1:1	MKH/NK92 1:10

3.6. Çoklu Sitokin Analizi

Çoklu sitokin analizinde ko-kültür sisteminden toplanan süpernatantlarda IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , MCP-1 (MCAF), MIP-1 β ve TNF α sitokinlerinin analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda IL-1 β , IL-5, IL-7, IL-12, IL-13, IL-17 ve MCP-1 (MCAF) sitokinlerinin oluşturulan ko-kültür sisteminde ölçülebilecek seviyeden daha düşük olduğu görülmüştür. Bu nedenle bu sitokinlerle ilgili analiz yapılmamıştır. Diğer yandan IL-

2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , MIP-1 β ve TNF α sitokinleri ile ilgili veriler elde edilmiş ve analiz yapılmıştır. Elde edilen veriler ortamda sadece MKH, NK92, Klon1 ve Klon2 hücrelerinin bulunduğu ko-kültür sistemine aittir. Ayrıca verilerin çoğu pikogram/ml olarak hesaplanan sonuçlardır. Sadece IL-6 ve IL-8 sitokin analizlerinde bu sitokinler MKH'lerin süpernatantlarında ölçüldüğü için sonuçlar MKH'lerden elde edilen sonuçlara normalize edilerek kat değişim olarak verilmiştir.

IL-4 genel olarak bağışıklık sisteminin baskılanmasından sorumlu bir sitokindir ve ko-kültür sistemimizde MKH'ler tarafından salgılanmaktadır [179]. Bu nedenle, ko-kültür sisteminde IL-4'ün varlığı ko-kültür sisteminin çalıştığı anlamına gelmektedir. Gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında Klon1 ve Klon2 arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 3.22).

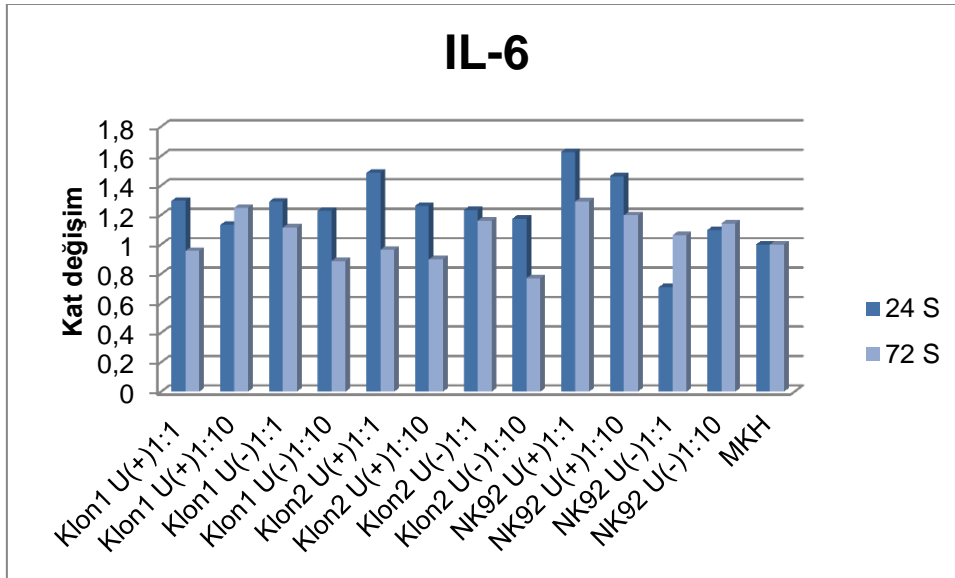


Şekil 3.22. IL-4 sitokininin ko-kültür sistemindeki miktarının analizi

Klonlar kendi aralarında değerlendirildiğinde 1:1 (MKH:Klon1) ve 1:10 (MKH:Klon1) oranında 24. saatte IL-4 oranının daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu da ortamda daha fazla sayıda defektli/hasarlı hücre olması durumunda IL-4 miktarının daha fazla olarak inflamasyonu baskıladığını gösterir. Klon1 ve Klon2'nin 24. saatlerinde bu etki görülmektedir. Ayrıca Klon1'de 72. saatte IL-4 miktarının azaldığı görülmektedir. Bu durum 24. saatte akut olarak immün sistemin

baskılanmasından sonra, 72. saatte IL-4 etkisine gerek kalmadığı ve IL-4 miktarının düştüğü anlamına gelmektedir. Klon2'de bu açıdan bir farklılık görülmemiştir. Klonlar ve NK92 hücreleri birbirleri ile karşılaştırıldığında ise sağlıklı NK92 hücrelerinin bulunduğu ko-kültürlerde IL-4 seviyesinin daha düşük olduğu görülmüştür. Bu durum her klonun ayrı ayrı NK92 hücresi ile karşılaştırılmasında da aynıdır. Bu da ko-kültür sistemindeki MKH'lerin ihtiyaca göre cevap verdiğini ve defektli hücrelerin bulunduğu grupta daha fazla IL-4 salgıladığını göstermektedir. Aynı zamanda sadece MKH süpernatnından elde edilen verilerde IL-4 tespit edilmemesi, MKH'lerin IL-4'ü NK92 hücreleri ile etkileşimi sonucu salgılamasından kaynaklandığı düşünülebilir.

IL-6 proinflamatuvar bir sitokindir ve inflamasyonu başlatır. T lenfositler, endotel hücreleri makrofajlar ve MKH'ler tarafından salgılanır [133, 180, 181]. Ko-kültür sistemimizde IL-6 kaynağı MKH'lerdir. MKH'lerin IL-6 salgılaması aynı zamanda immün sistemi uyarıcı etkisinden kaynaklanmaktadır. IL-6 sitokin analizinde tüm gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında belirgin bir farklılık görülmemiştir (Şekil3.23).

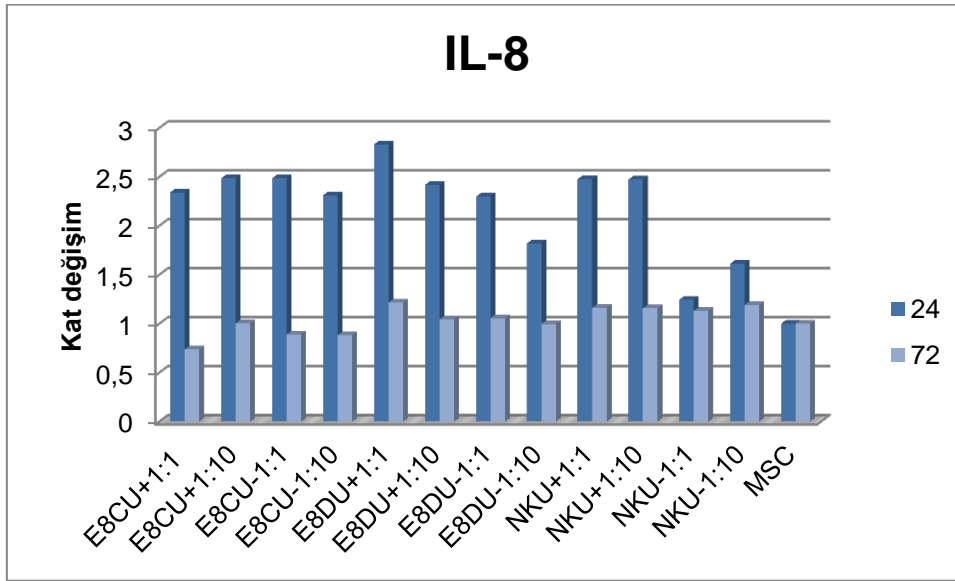


Şekil 3.23. IL-6 sitokininin ko-kültür sistemindeki miktarının analizi. MKH'lerden elde edilen süpernatanda da IL-6 ölçümü yapıldığından sonuçlar normalize edilerek verilmiştir.

Klonlar kendi içinde karşılaştırıldığında 1:1 ve 1:10 MKH/Klon grupları arasında, 24. ve 72. saatler arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Klonlar ve NK hücreleri

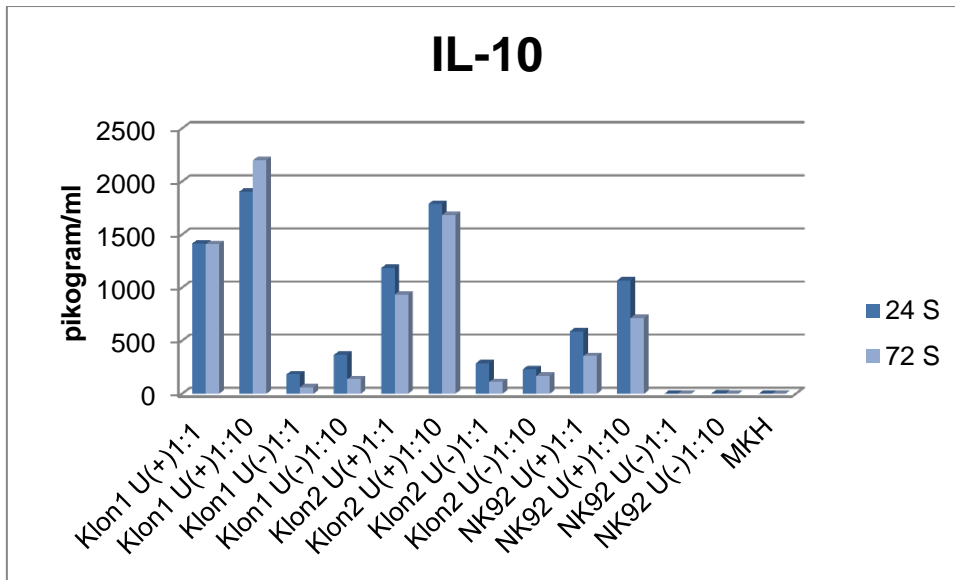
karşılaştırıldığında ise yine belirgin bir farklılık tespit edilememiştir. Ayrıca MKH süpernatantında da IL-6 varlığı tespit edildiğinden bu durum MKH hücrelerinin herhangi bir etkileşime girmeden de bu sitokini salgıladığını göstermektedir. Bu nedenle gruplardaki IL-6 miktarı MKH'lerden elde edilen sonuçlara göre normalize edilmiştir.

IL-8, MKH'ler tarafından salgılanan bir kemokindir [181]. İmmün sistemi uyarıcı etki yapar nötrofillerin inflamasyon bölgesine gelmesini sağlar [70]. IL-8 sitokin analizinde tüm gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında 24 saatte belirgin bir artış göstermiş, ancak 72. saatte düşüş olmuştur (Şekil3.24). Bunun nedeni, IL-8'in erken ifade edilen kemoatraktif bir molekül olmasıdır. İlk 24 saatte maksimum uyarı gösterir ve seviyesi 48. saatte bazal seviyeye düşer. Aynı zamanda IL-8 MKH'lerden elde edilen süpernatantlarda da görülmüştür. Bu nedenle diğer gruplardan elde edilen sonuçlar MKH'lerden elde edilen sonuçlara göre normalize edilmiştir.



Şekil 3.24. IL-8 sitokininin ko-kültür sistemindeki miktarının analizi, MKH'lerden elde edilen süpernatanda da IL-8 ölçümü yapıldığından sonuçlar normalize edilerek verilmiştir.

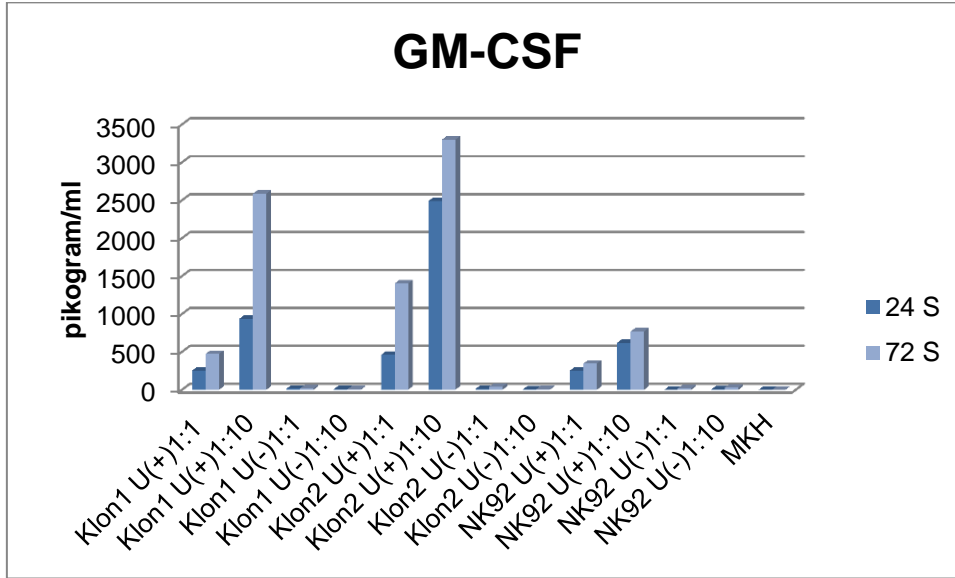
IL-10, NK hücreleri ve MKH'ler tarafından salgılanan sitokindir [70, 121]. İmmün sistemi baskılayıcı aynı zamanda düzenleyici rol oynamaktadır. Gruplar birbiri ile karşılaştırıldığında Klon1 ve Klon arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Ancak her iki klonun da hücre sayısının yüksek olduğu grupta IL-10 seviyesinin yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 3.25) . MKH süpernatantından yapılan ölçümde IL-10 görülmemesi bu hücrelerin ancak NK hücreleri ile etkileşime girdiklerinde bu sitokinleri salgıladıklarını göstermektedir. IL-4 gibi immün sistemi baskılayıcı bir sitokin olan IL-10'un ml'deki pikogram miktarının yüksek olmasının nedeni bu sitokinin hem MKH'ler hem de NK hücreleri tarafından salgılanmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca IL-10 üretimi IL-4 varlığı ile artmaktadır.



Şekil 3.25. IL-10 sitokininin ko-kültür sistemindeki miktarının analizi.

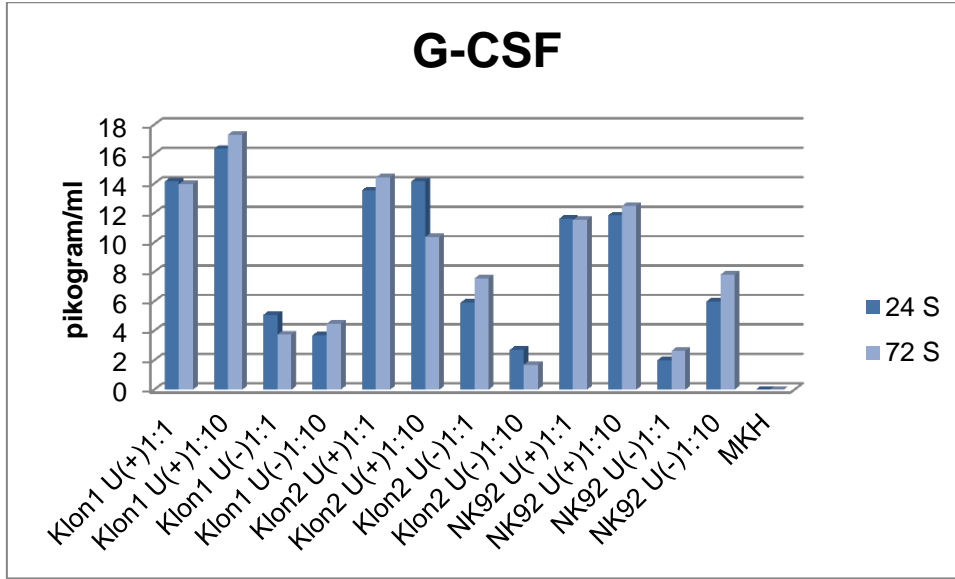
GM-CSF, genel olarak immün sistemi uyarıcı rol oynar. Bu etki granülosit ve makrofajlardan proinflatuvar salınımını arttırması ile olur. GM-CSF hem MKH'ler hem de NK hücreleri tarafından salgılanır [70, 180]. MKH'ler kemik iliğinde hematopoietik kök hücreleri destekleyici görev yapar; granülosit ve makrofaj farklılaşmasında rol oynar. Ko-kültür sistemimizde de Klon1 ve Klon2 karşılaştırıldığında uyarılmış hücre gruplarında belirgin bir artış görülmektedir. Aynı zamanda 24. saatte daha düşük olan GM-CSF miktarı, 72. saatte artış göstermektedir (Şekil 3.26). Bu artış, hücre farklılaşması için gerekli proteinlerin sentezi için geçen sürenin uzun olması ile açıklanabilir. MKH süpernatantından

elde edilen sonuçta GM-CSF görülmemesi bu hücrelerin NK hücreleri ile etkileşime girdiklerinde bu sitokinleri salgıladıklarını göstermektedir.



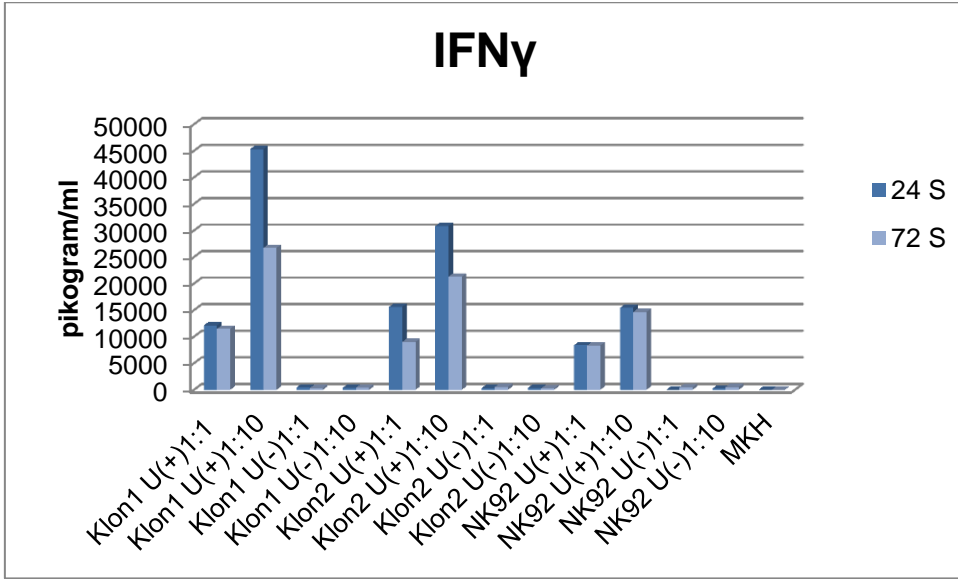
Şekil 3.26. GM-CSF sitokinin ko-kültür sistemindeki miktarının analizi

G-CSF de GM-CSF gibi MKH'ler tarafından salgılanan immün sistemi uyarıcı etkisi olan bir sitokindir [121]. Uyarım durumunda hematopoietik grupta yer alan öncül hücrelerden granülositlerin salgılanmasını uyarır. Ko-kültür sisteminde de Klon1 ve Klon2 karşılaştırıldığında uyarılmış hücre gruplarında daha yüksek miktarlarda üretilmektedir. Aynı zamanda etkisini uzun süre devam ettirmekte ve 72. saatte de miktarında düşme olmadığı görülmektedir. MKH süpernatantından elde edilen sonuçta G-CSF görülmemesi bu hücrelerin NK hücreleri ile etkileşime girdiklerinde bu sitokinleri salgıladıklarını göstermektedir (Şekil 3.27).



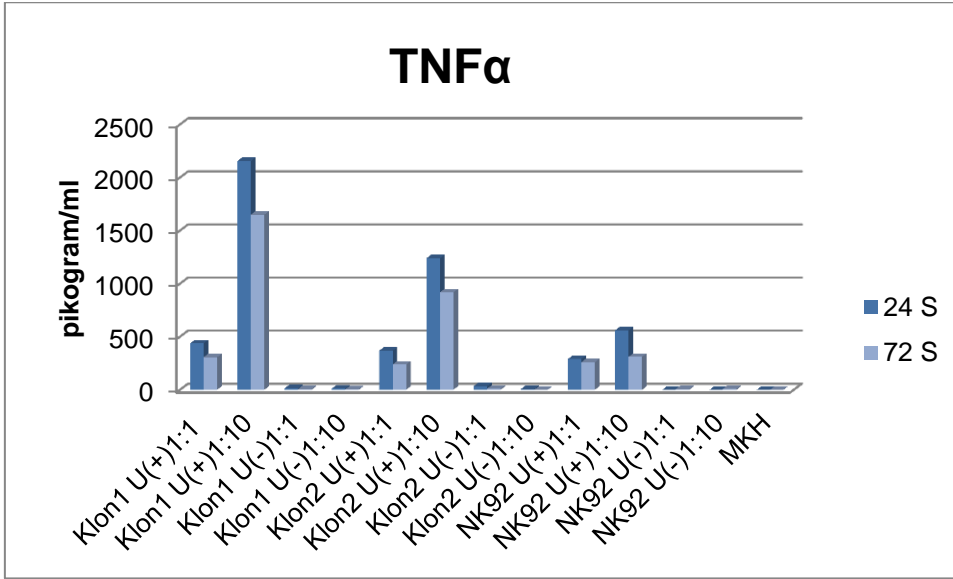
Şekil 3.27. G-CSF sitokininin ko-kültür sistemindeki miktarının analizi

IFN γ , hem NK hücreleri hem de MKH'leri tarafından salgılanan bir sitokindir [54, 182]. İmmün sistemi uyarıcı etki yapmaktadır. Ko-kültür sistemimizde de Klon1 ve Klon2 hücrelerinin uyarılmış gruplarında miktarlarında belirgin bir artış görülmektedir (Şekil 3.28). Aynı zamanda her iki klonda da MKH/Klon oranı 1:10 olan hücrelerde IFN γ miktarı daha yüksektir. Bu durum gen defektli ve sağlıklı NK hücrelerinde benzerlik göstermektedir. Bu da ko-kültür sistemindeki IFN γ 'nın daha çok NK hücrelerinden kaynaklandığını göstermektedir. Aynı zamanda klonlarda salgılanan IFN γ miktarının çok yüksek olması FHL2 modeli ile de örtüşmektedir. MKH süpernatantından elde edilen sonuçta IFN γ görülmemesi bu hücrelerin NK hücreleri ile etkileşime girdiklerinde bu sitokinleri salgıladıklarını göstermektedir.



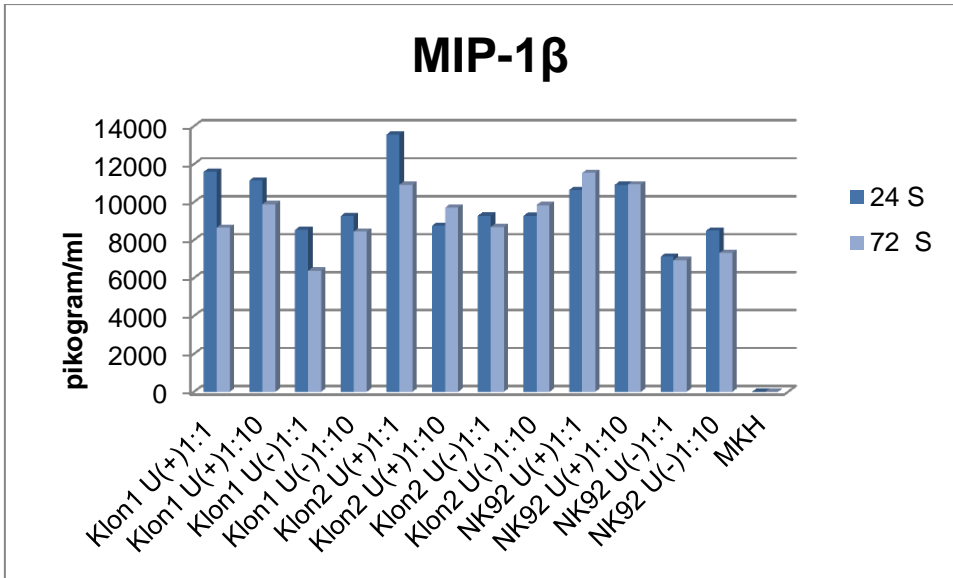
Şekil 3.28. IFN γ sitokininin ko-kültür sistemindeki miktarının analizi

TNF α , hem NK hücrelerin hem de MKH'ler tarafından salgılanan bir sitokindir [54, 70, 182]. İmmün sistemi uyarıcı etki yapmaktadır. Ko-kültür sistemimizde de Klon1 ve Klon2 hücrelerinin uyarılmış gruplarında miktarlarında belirgin bir artış görülmektedir. Aynı zamanda her iki klonda da MKH/Klon oranı 1:10 olan hücrelerde TNF α miktarı daha yüksektir. Bu durum gen defektli ve sağlıklı NK hücrelerinde benzerlik göstermektedir (Şekil 3.29). Bu sonuçlar, ko-kültür sistemindeki TNF α 'nın daha çok NK hücrelerinden kaynaklandığını göstermektedir. Aynı zamanda klonlarda salgılanan TNF α miktarının çok yüksek olması FHL2 modeli ile de örtüşmektedir. MKH süpernatantından elde edilen sonuçta TNF α görülmemesi bu hücrelerin NK hücreleri ile etkileşime girdiklerinde bu sitokinleri salgıladıklarını göstermektedir.



Şekil 3.29. TNFα sitokininin ko-kültür sistemindeki miktarının analizi

MIP-1β, MKH'ler, T lenfositler ve makrofajlar tarafından salgılanan bir kemokindir [70, 183]. Ko-kültür sistemimizde gruplar arasında belirgin bir farklılık görülmemektedir (Şekil 3.30). MKH süpernatantından yapılan ölçümde TNFα görülmemesi bu hücrelerin NK hücreleri ile etkileşime girdiklerinde bu sitokinleri salgıladıklarını göstermektedir.



Şekil 3.30. MIP-1β sitokininin ko-kültür sistemindeki miktarının analizi

Ailevi hemofagositik sendrom (Familial hemofagositik lenfositosis, FHL), fazla uyarılmış ama etkin olmayan bir immün sistem ile karakterize edilen, tedavi edilmezse ölümlü sonlanan otozomal resesif geçişli bir immün fonksiyon bozukluğu hastalığıdır [8]. FHL hastalarında semptomların en yüksek seviyede görülmeye başladığı zaman 1-6 aylık dönemdir. Ancak diğer çocukluk yaşlarında, gençlikte ve hatta yetişkinlikte de ortaya çıkabilir [12, 184]. FHL'nin sitolitik proteinlerin sekresyonu yolundaki mutasyonlar nedeniyle oluşan 5 tipi bulunmaktadır. Bu hastalıklar içinde en yaygın olan FHL2, perforin gen defekti olan tiptir [10]. Perforin mutasyonunun FHL tipleri arasında görülme sıklığı %30'dur [30]. FHL2, ülkemizde en yaygın görülen FHL tipi olarak dikkat çekmektedir. Dünya üzerinde FHL sıklığı incelendiğinde Japonya'da 0.342/100.000/yıl ve İsveç'te 0.12/100.000/yıl iken Türkiye'de hastaneye yatan hastalar arasında 7.5/10000 gibi yüksek bir orandadır [11, 12, 185]. FHL2'deki perforin gen hasarı nedeniyle perforin sentezleyemeyen sitotoksik T lenfositler ve NK hücreleri enfekte hücreyi yok edememekte, immün sistemin en ufak uyarımında bile hiperinflamasyon gelişmekte ve kontrol edilemeyen bir immün sistem aktivasyonu oluşmaktadır. Bu durumda hastaneye başvuran hastalara tanı ve tedavi amacıyla HLH 2004 protokolü uygulanmaktadır [21]. Tedavi amacıyla yapılan uygulamalar inflamasyonun baskılanması ve devamında uyarıma neden olan etkenin ortadan kaldırılmasıdır. Kesin tedavi ancak uygun donör bulunması durumunda hematopoietik kök hücre transplantasyonu ile söz konusudur ancak uygun donör bulunmadığı takdirde hasta çoklu organ yetmezliği sonucu kaybedilir [2]. Hastalıkla ilgili yapılan araştırmalar daha çok hastalıktaki mutasyonların tanımlanması ve hastalık sürecinde oluşan klinik tablonun düzeltilmesine yöneliktir. Hastalıkta oluşan immün sistem değişikliklerini incelemeye yönelik perforin gen hasarlı hayvan modelleri geliştirilmiştir. Ancak bu hayvan modelleri her türlü patojene karşı çok hassas olduğundan deney süreleri boyunca bu hayvanların yaşatılmasında zorluk çekilmektedir [96, 186]. Bu nedenlerle, yapılan tez çalışmasında amaç öncelikle FHL2 modeli bir *in vitro* sistem oluşturmak ve oluşturulan model hücre hattı üzerinde MKH'lerin immün modülatör etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Perforin, STL ve NK hücrelerinin virüs enfekte hücreler ve kanser hücrelerine karşı immün cevap oluşturmada kilit rol oynamaktadır. STL ve NK hücreleri enfekte hücrelerle karşılaştıklarında sitoplazmik granüllerinde bulunan perforin proteinlerini salgılar. Perforin proteinleri, yabancı hücre membranında por oluşturarak granüller içinde bulunan granzimlerin hedef hücreyi öldürmesine aracılık eder [88]. Bu bilgilerin ışığında bu tez çalışmasında perforin defektli FHL2 modeli oluşturulması için NK hücreleri seçilmiştir ve bir insan NK hücre hattı olan NK92 kullanılmıştır.

NK92 hücrelerinde PRF1 geni hedeflenerek mutasyon oluşturulmaya çalışılmıştır. Mutasyon oluşturmak için öncelikle PRF1 genini hedefleyen vektör sistemleri oluşturulmuştur. Bu amaçla, PRF1 ekzon 2'yi ve bir antibiyotik direncini puromisin direnci) içeren donör vektör sistemi hazırlanmıştır. Puromisin antibiyotiği, klonlama çalışmalarında transfekte klonların seçiminde yaygın olarak kullanılan seçici bir antibiyotik çeşididir [187]. Puromisin antibiyotiğinin, ökaryot ve prokaryotlardaki etki mekanizması protein sentezini ribozomdaki peptidil transferaza bağlanarak gösterir [177]. Böylece protein sentezini engeller. Yüksek konsantrasyonlarda puromisin, bulunduğu ortamdaki bütün protein sentezini engelleme özelliğine sahiptir. Bu nedenle transfekte olan hücrelerin seçiminde kullanılmak üzere puromisin antibiyotiği seçilmiştir.

PRF1 ekzon 2 ve puromisin direncini içeren vektörler hazırlandıktan sonra restriksiyon endonükleazlarla kesilmiştir. Klonlama sistemlerinde restriksiyon endonükleazlar istenilen vektörde istenilen bölgeleri kesmek ve o bölgelere gen parçaları eklemek için kullanılan en önemli araçlardır. Çalışmamızda hazırlanan vektör sistemlerinde PRF1 ekzon 2 ve puromisin direnç geni varlığı enzim kesimleri ve dizi analizleri ile kontrol edilmiştir.

NK hücrelerinde gen hedefleme çalışmaları RNA kökenli sistemler ve lentiviral kökenli sistemlerle yapılmaktadır [188, 189]. Çalışmamızda NK92 hücrelerinde PRF1 geni ekzon 2'yi hedeflemek için seçtiğimiz CRISPR/Cas sistemi kullanılmıştır. CRISPR/Cas sistemi ilk defa 2013 yılında ökaryot genomunda modifikasyonlar oluşturmak üzere kullanılmaya başlamış ve günümüzde gen hedefleme için öne çıkan en yeni yöntemlerden biridir [171, 173]. CRISPR/Cas sistemi, bakterilerin kendilerini fajlara karşı koruduğu bir savunma mekanizması

olup, bir kez karşılaştıkları patojen DNA'sını kendi DNA'larına ekleyerek bir sonraki karşılaşmada o patojen DNA'sını tanımaya ve yok etmeye yönelik bir sistemdir [166]. Çalışmamızda genomda PRF1 ekzon 2'de çift zincir kırığı oluşturacak CRISPR/Cas vektör sistemi hazırlanmış ve PRF1 ekzon 2 hedef primerlerinin varlığı DNA dizi analizi ile gösterilmiştir.

NK hücrelerinde transfeksiyon çalışmaları elektroporasyon, kimyasal transfeksiyon ve nükleofeksiyon yöntemleri ile yapılmaktadır [190-192]. Çalışmamızda her üç yöntem de denenmiş olup, transfeksiyon verimliliği en yüksek olan nükleofeksiyon yöntemi ile çalışmaya devam edilmiştir. Elektroporasyon sisteminde uygulanan düşük voltajların bile hücreler için yüksek bir elektriksel alan yarattığı düşünülmektedir. Kimyasal transfeksiyonda uygulanan ajanın yüksek oranda toksik olması verimliliği düşürmüştür. Ancak nükleofeksiyon transfeksiyon çalışmaları için günümüz koşullarında uygulanan en güvenilir ve verimliliği yüksek bir sistem olarak dikkat çekmektedir. Bu nedenle nükleofeksiyon grubunda uygulanan yöntemin NK92'ye özgül olması ve uygulanan voltaj değerlerinin, transfeksiyon solüsyonlarının hücre tipine göre özel olarak seçilmesi nükleofeksiyonda daha yüksek başarı elde edilmesini sağlamıştır. Aynı zaman süspansiyon olan NK92 hücreleri kolay transfekte olan hücreler değildir ve bu hücreler evrimsel olarak gelişim aşamalarının sonuna kadar farklılaşmış, özelleşmiş hücrelerdir. Bu nedenle bu hücrelerde oluşturulmak istenen genetik modifikasyonlara adaptasyon diğer hücre tiplerine göre düşüktür. Ayrıca süspansiyon hücre kültür sisteminde her zaman belli bir yoğunlukta bulunmaları gereken NK92 hücrelerinde transfeksiyon sonrası klon seçimleri de oldukça zor olmaktadır.

Çalışmamızda FHL2 modelli hücre hattı oluşturmak için seçilen NK92 hücreleri, hazırlanan CRISPR/cas sistemi ve PRF1 ekzon 2-puromisin direnci içeren vektör sistemi kullanılarak nükleofeksiyon yöntemi ile transfekte edilmiştir. Transfeksiyondan 24 saat sonra besiy ortamına kritik miktarda (3µg/ml) puromisin antibiyotigi eklenmiş ve transfekte olmayan hücrelerin seçilimi sağlanmıştır.

Antibiyotik seçilimi sonucu çoğalan hücrelerde PRF1 geninde ekzon 2 bölgesinde hedeflenen bölgeye puromisin direnç geni eklenerek PRF1 geninde mutasyon oluşturulup oluşturulmadığı üç farklı yöntemle test edilmiştir. Bu yöntemler;

klonlardaki PRF1 geni ifadesi qPCR yöntemi ile ölçülmüş, klonların genomik DNA'sından PRF1 ekzon 2 PCR ile çoğaltılarak büyüklüğü kontrol edilmiş ve klonlardan perforin protein salınımı ELISA yöntemi ile ölçülmüştür.

qPCR analizleri sonucu çalışılan her Klon1 ve Klon2'de PRF1 gen ifadesinin baskılandığı görülmüştür. Ayrıca klonlarda görülen düşük miktardaki ifadenin süspanse olan NK92 hücrelerini tek klon olarak seçilmesindeki zorluklardan kaynaklanmaktadır. Aynı zamanda bu veriler donör vektör sisteminin genomda farklı yere bağlaması sonucu puromisin direnci sahibi olan ancak PRF1'in hedeflenemediği hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca NK92 hücreleri bir kanser hücre hattı olduğundan düşük miktarda da olsa 3µg/ml puromisine dirençli hücreler ortamda kalmış olabilir. Bu tür sistemlerde ortaya çıkan bu klonlara pseudo klonlar denilmektedir. Ancak uyarılan NK92 hücreleri ve klonlar arasındaki ifade farkındaki büyüklük ve istatistiksel olarak anlamlılık PRF1 gen ifadesindeki baskılanmanın gerçekleştiğini göstermektedir.

PCR analizi sonucunda ise çoğaltılan PRF1 ekzon 2 bölgesinin puromisin direncini içerdiği elde edilen PCR ürününün uzunluğundan görülmektedir. Klon1 ve Klon2 hücrelerinden elde edilen PCR ürünlerinden elde edilen bantların büyüklüğü PRF1 ekzon 2'ye puromisin eklenmesi sonucu beklenen büyüklükle örtüşmektedir. Ancak qPCR verilerinde olduğu gibi PCR görüntüsünde görülen ve PRF1 ekzon 2'nin büyüklüğü ile örtüşen bandın pseudo klonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

ELISA analizi ile uyarılmış ve uyarılmamış klonlar ve NK92 hücrelerinden salınan perforin protein miktarı ölçüldüğünde klonlardan salınan perforin miktarının transfekte olmayan NK92 hücrelerine göre çok düşük olduğu gösterilmiştir. qPCR ve PCR deneylerinde olduğu gibi ölçülen düşük miktardaki perforin miktarının pseudo klonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Elde edilen sonuçlardan CRISPR/Cas sistemi ile hedeflenen PRF1 ekzon 2 genomik bölgesinde bir mutasyon oluşturulduğu ve buraya puromisin direnç geni eklendiği gösterilmiştir. Oluşturulan Klon1 ve Klon2 hücreleri FHL2 modelli hücre hattı olarak çoğaltılmış ve MKH'lerle ko-kültür deneyleri için dondurularak saklanmıştır.

CRISPR/Cas sistemi günümüzde gen susuturma ve gen aktive etme çalışmalarında en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Bu sistem kullanılarak gen susturma işlemi yapılan embriyonik kök hücrelerden hayvan modelleri oluşturulmaktadır [176, 193].

MKH'ler, günümüzde birçok klinik çalışmada birbirinden farklı dokuların tedavisi için kullanılmaktadır. Bu geniş kullanım alanı MKH'lerin birçok dokuya farklılaşma kapasitesi, immün sistem hücreleri tarafında tanınmamaları, doku reddine sebep olmamaları ve nontoksik özellik göstermeleri gibi nedenlerden kaynaklanmaktadır [104]. Rejeneratif tedavi dışında MKH'lerin bir diğer kullanım alanı ise immün sistem üzerindeki düzenleyici ve baskılayıcı etkilerinin kullanılmasına yöneliktir [123, 194, 195]. İmmün sistem hücreleri ile MKH'ler arasındaki etkileşim yapılan ko-kültür sistemleri ile analiz edilmeye çalışılmıştır. Bu ko-kültür sistemleri T lenfositler-MKH, B lenfositler-MKH, NK hücresi-MKH, periferal kan mononükleer hücreler-MKH şeklinde oluşturulmaktadır [134, 136, 137, 196]. Bu çalışmalarda immün sistem hücreleri ve MKH'ler farklı oranlarda ve sürelerde ko-kültüre edilerek gerek düzenleyici gerekse baskılayıcı etkiler gösterilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar MKH'lerin inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılmasına yönelik ön verileri sağlamış ve bugün MKH'lerin GvHD, SLE ve Chron's hastalığı gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisine yönelik kullanılmasına öncülük etmiştir [123, 125, 126, 197]. FHL2 immün sistemin yoğun aktivitesinin gözlemlendiği otoimmün bir hastalıktır ve çalışmamızda oluşturduğumuz hücresel FHL2 modelinin MKH'lerle etkileşimi FHL2'de MKH'lerin kullanılması için önemli bir ön veri olacaktır.

MKH'lerle FHL2 modelli hücrelerin ko-kültürü iki farklı oranda NK92 hücresi kullanılarak ve hücreler uyarılarak gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde uyarılmış ve uyarılmamış hücrelerin etkileşimleri arasındaki fark analiz edilmiş, aynı zamanda MKH/NK92 hücre oranının etkisi incelenebilmiştir. Ko-kültür sisteminden toplanan örneklerle çoklu sitokin analizi yapılmıştır. Çoklu sitokin analizinde IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , MCP-1 (MCAF), MIP-1 β ve TNF α sitokinleri analiz edilmiştir. IL-1 β , IL-5, IL-7, IL-12, IL-13, IL-17 ve MCP-1 (MCAF) sitokinlerinin ko-kültür sisteminde çok düşük seviyede

olması nedeniyle herhangi bir analiz gerçekleştirilememiştir. Bunun nedeni bu sitokinleri salgılayan hücrelerin ko-kültür sistemimizde bulunmamasıdır.

IL-1 β , IL-5, IL-12 ve IL-17 T hücrelerden, dendritik hücrelerden, fibroblastlardan, epiteliyal ve endoteliyal hücrelerden salgılanmaktadır. Bu nedenle ko-kültür sistemimizde ölçülmemiştir [198, 199]. IL-7 ise fibroblastlar, stromal hücreler tarafından üretilen bir T hücre büyüme faktörüdür. Hazırladığımız ko-kültür sisteminde T hücreleri bulunmadığından ölçüm yapılamamıştır [200]. IL-13 yardımcı T hücreleri tarafından salgılanan ve monosit makrofaj fonksiyonunu etkileyen bir sitokin olmasından dolayı analiz edilememiştir [201]. MCP-1 ise monosit kemotaktik proteindir, monositlerin göçü ve inflamasyon bölgesine yönelmesini düzenler ko-kültür sisteminde monositler yer almamaktadır ve bu nedenle bu molekülün tayini yapılamamıştır [202].

Bu sitokinler dışında analizi yapılan IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , MIP-1 β VE TNF α sitokinleridir. Bu sitokinlerin bir bölümü immün sistemi uyarıcı etki yaparken bir kısmı da baskılayıcı etkiye sahiptir. Analiz edilen sitokinler immün sistemin farklı hücre tiplerinden salgılanmakla birlikte ko-kültür sistemimizde bu sitokinlerden NK hücreleri ve MKH'ler tarafından salgılananlar yer almaktadır. *In vivo* sistemde, tüm immün sistem hücrelerinin bulunduğu bir ortamda bu sitokinler diğer hücreler tarafından salgılanan sitokinlerden de etkilenmektedir. Bu tez çalışmamızdaki amaçlardan biri MKH'lerin salgıladıkları sitokinler ile FHL2 modelli hücre hattı üzerinde immün modülatör/ baskılayıcı etkisini göstermektir.

Çoklu sitokin analizi sonuçlarına göre çalışmamızdaki ko-kültür sisteminde IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, IFN γ , TNF α , ve MIP-1 β immün sistemi uyarıcı, IL-4 ve IL-10 ise immün sistemi baskılayıcı özellikleri ile karşımıza çıkmaktadır.

İmmün sistem uyarıcısı olarak ko-kültürde salgılanan ve analiz edilen G-CSF ve GM-CSF sitokinlerini ko-kültür sisteminde diğer sitokinlerden ayrı tutmak gerekmektedir. Bu faktörler kemik iliğinde MKH'lerden uyarılmaları sonucu salgılanmakta ve hematopoietik grupta yer alan granülosit ve makrofaj öncülü hücreleri uyarak bu hücrelerin farklılaşmasında rol oynamaktadırlar [203]. Ko-

kültür sisteminde klonların olduğu grupta daha fazla salgılanmasının nedeni bu hücrelerin MKH'leri daha fazla uyararak daha fazla sitokin salınmasına neden olmalarından kaynaklanmaktadır.

İmmün sistemi uyarıcı rol oynayan IFN γ ve TNF α doğal bağışıklıkta salgılanan en temel sitokinlerden olup NK hücreleri tarafından salgılanmaktadır [54]. Ko-kültür sistemimizde bu sitokinlerin klonlar tarafından daha fazla salgılandığı görülmüştür. Literatürde MKH'ler tarafından da bu sitokinlerinin salgılandığı belirtilmiştir [204]. Ancak ko-kültür sistemi incelendiğinde uyarılmış klonlardaki yüksek salgılanma kapasitesi bu sitokinlerin daha çok klonlar tarafından salgılandığını, devam eden inkübasyon süresinde görülen düşüşün ise ko-kültür sisteminde sağlanan immün modulasyondan tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir.

Çoklu sitokin analizinde MKH'lerden elde edilen süpernatantlarda da ölçümü alınan IL-6 ve IL-8 proinflatuar sitokinlerdendir [64, 204, 205]. Ko-kültür sisteminde klonlardan elde edilen bu sitokin sonuçları MKH'lerden elde edilen sonuçlara normalize edilmiştir. Çünkü salgılanan miktarların besi ortamında bulunan sitokin miktarı arasındaki farkın görülmesi istenmiştir. Ko-kültür sisteminde klonlardan salgılanan bu sitokin seviyelerinin de 24. saatte yüksek iken 72. saatte düşmesi yine ko-kültür sistemimizde gerçekleşen immün modülasyonu desteklemektedir. Aynı zamanda MKH'ler tarafından salgılanan PGE-2'nin IL-6 salgılanmasını baskıladığı daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir [131].

IL-4 ve IL-10 sitokinleri immün sistemi baskılayıcı/düzenleyici sitokinlerdir [179]. Ko-kültür sisteminde IL-4 MKH'ler tarafından salgılanırken, IL-10 her iki hücre grubundan da salgılanmaktadır. Literatürde IL-4 varlığında makrofajların IL-10 salgılayan alt tipe farklılaştığı gösterilmiştir [131]. Ko-kültür sistemimizde IL-4 ve IL-10'un immün sistemi baskılayıcı etkisi diğer sitokinlerin aynı andaki analizini sağlayan çoklu sitokin analizi ile gösterilmiştir.

Yapılan ve devam etmekte olan klinik çalışmalarda MKH'lerin immün sistemi baskılayıcı özelliği GVHD, SLE ve kronik allograft nefropati gibi hastalıklarda gösterilmeye çalışılmıştır [122, 133]. FHL2 hastalığında MKH'lerin kullanılmasına yönelik yapılan tek çalışma ise bir vaka sunumu olup, 23 yaşındaki bir FHL2

hastasına sağlıklı MKH'lerin uygulanması şeklindedir [206]. Bu çalışmada hastada baskılayıcı immün hücre sayısında artış olduğu gösterilmiştir. Ancak tek hastadan elde edilen bu verilerin kesinlik kazanabilmesi ve etkilerin net olarak görülebilmesi için yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir. FHL2 modelli yapılan çalışmaların çoğu hayvan modelli çalışmalardır ve insan inflamatuvar cevap ile hayvan infalamatuvar cevap arasındaki farklar giderek dikkat çekmeye başlamıştır [40]. Bu kapsamda çalışmamızda insan NK hücreleri ile oluşturulan FHL2 modelli hücre hattının insan MKH'lerle ko-kültüre edilmesi FHL2 araştırmaları için büyük önem taşımaktadır.

Günümüzde gerçekleştirilen klinik çalışmalarda özellikle GvHD hastalarında MKH'lerin immün sistemi düzenleyici etkisi çok yaygın olarak kullanılmaktadır [207]. Ayrıca Introna ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yapılan ve 40 yetişkin/çocuk GvHD hastasını içeren çalışmada MKH'lerin güvenli olarak tedavide kullanılabileceği belirtilmiştir [208]. Aynı zamanda GvHD ve FHL2 gibi hastalıklarda kullanılan immün sistem baskılayıcı ajanların bir kısmı ağır yan etkilere sahiptir. Ancak çalışmalardan elde edilen verilerden MKH'ler uygulanan hastalarda bu kadar yoğun ve toksik bir yan etkiden söz edilmemektedir. Bunun nedeni ise MKH'lerin sahip olduğu düşük MHC-II yüzey belirteçlerinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle hali hazırda GvHD çalışmalarında tedavi amaçlı kullanılan MKH'lerin FHL2 tedavisi için de kullanılabilmesi için çalışmamız gerekli ön verileri sağlaması açısından önemlidir.

Aynı zamanda immün sistemi taklit etmeyi hedefleyen çalışmamızda elde edilen öncül sonuçlar, diğer immün sistem hücrelerinin modele eklenmesi ile zenginleşecek ve böylece tam bir immün sistem modeli oluşacaktır. Çalışmamızdan elde edilen veriler ülkemizde dünyaya oranla sıklığı yüksek olan bu hastalıkla ilgili yapılacak çalışmalar ve araştırmalar için model bir sistem olarak kullanılabilecektir. Ayrıca uygun koşullar sağlandığında MKH'lerin FHL2 tedavisinde kullanılan HLH 2004 protokolüne ek olarak kullanılmasının hastalar için HKHT'na kadarki süreçte bir tedavi alternatifi olabileceği ve yanıt alınamayan hastalarda tedaviyi önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Janka, G., Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: When the Immune System Runs Amok, *Klinische Padiatrie*, vol. 221, no. 5, pp. 278-285, **2009**.
- [2] Rosado, F. G., and Kim, A. S., Hemophagocytic Lymphohistiocytosis an Update on Diagnosis and Pathogenesis, *American journal of clinical pathology*, vol. 139, no. 6, pp. 713-727, **2013**.
- [3] Farquhar, J. W., and Claireaux, A. E., Familial Haemophagocytic Reticulosis, *Archives of disease in childhood*, vol. 27, no. 136, pp. 519, **1952**.
- [4] Farquhar, J. W., Macgregor, A. R., and Richmond, J., Familial Haemophagocytic Reticulosis, *British medical journal*, vol. 2, no. 5112, pp. 1561, **1958**.
- [5] Nelson, P., Santamaria, A., Olson, R. L., and Nayak, N. C., Generalized Lymphohistiocytic Infiltration a Familial Disease Not Previously Described and Different from Letterer-Siwe Disease and Chédiak-Higashi Syndrome, *Pediatrics*, vol. 27, no. 6, pp. 931-950, **1961**.
- [6] MacMahon, H. E., Bedizel, M., and Ellis, C. A., Familial Erythrophagocytic Lymphohistiocytosis, *Pediatrics*, vol. 32, no. 5, pp. 868-879, **1963**.
- [7] Risdall, R. J., McKenna, R. W., Nesbit, M. E., Krivit, W., Balfour, H. H., Simmons, R. L., and Brunning, R. D., Virus-Associated Hemophagocytic Syndrome a Benign Histiocytic Proliferation Distinct from Malignant Histiocytosis, *Cancer*, vol. 44, no. 3, pp. 993-1002, **1979**.
- [8] Gholam, C., Grigoriadou, S., Gilmour, K., and Gaspar, H., Familial Haemophagocytic Lymphohistiocytosis: Advances in the Genetic Basis, Diagnosis and Management, *Clinical & Experimental Immunology*, vol. 163, no. 3, pp. 271-283, **2011**.
- [9] Cetica, V., Pende, D., Griffiths, G. M., and Aricò, M., Molecular Basis of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, *Haematologica*, vol. 95, no. 4, pp. 538-541, **2010**.
- [10] Janka, G., Familial and Acquired Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, *Annual review of medicine*, vol. 63, pp. 233-246, **2012**.
- [11] Henter, J. I., Elinder, G., Söder, O., and Öst, Å., Incidence in Sweden and Clinical Features of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, *Acta Paediatrica*, vol. 80, no. 4, pp. 428-435, **1991**.
- [12] Gürgey, A., Göğüş, S., Özyürek, E., Aslan, D., Gümrük, F., Cetin, M., Yüce, A., Ceyhan, M., Seçmeer, G., and Yetgin, S., Primary Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Turkish Children, *Pediatric hematology and oncology*, vol. 20, no. 5, pp. 367-371, **2003**.
- [13] Larroche, C., Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Adults: Diagnosis and Treatment, *Joint Bone Spine*, vol. 79, no. 4, pp. 356-361, Jul, **2012**.
- [14] Bode, S. F., Lehmborg, K., Maul-Pavicic, A., Vraetz, T., Janka, G., zur Stadt, U., and Ehl, S., Recent Advances in the Diagnosis and Treatment of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, *infection*, vol. 22, pp. 26, **2012**.
- [15] Janka, G. E., and Lehmborg, K., Hemophagocytic Syndromes — an Update, *Blood Reviews*, vol. 28, no. 4, pp. 135-142, 7//, **2014**.
- [16] Imashuku, S., Hibi, S., and Todo, S., Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Infancy and Childhood, *The Journal of pediatrics*, vol. 130, no. 3, pp. 352-357, **1997**.

- [17] Janka, G., Imashuku, S., Elinder, G., Schneider, M., and Henter, J.-I., Infection-and Malignancy-Associated Hemophagocytic Syndromes: Secondary Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, *Hematology/oncology clinics of North America*, vol. 12, no. 2, pp. 435-444, **1998**.
- [18] Edner, J., Rudd, E., Zheng, C., Dahlander, A., Eksborg, S., Schneider, E. M., Edner, A., and Henter, J. I., Severe Bacteria-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in an Extremely Premature Infant, *Acta Paediatrica*, vol. 96, no. 11, pp. 1703-1706, **2007**.
- [19] Usmani, G. N., Woda, B. A., and Newburger, P. E., Advances in Understanding the Pathogenesis of Hlh, *British journal of haematology*, vol. 161, no. 5, pp. 609-622, **2013**.
- [20] Henter, J., Elinder, G., and Ost, A., "Diagnostic Guidelines for Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. The Fhl Study Group of the Histiocyte Society." pp. 29-33.
- [21] Henter, J., Horne, A., and Arico, M., Hlh 2004. Treatment Protocol of the Second International Hlh Study 2004, *Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Study Group*, **2004**.
- [22] Henter, J. I., Horne, A., Aricó, M., Egeler, R. M., Filipovich, A. H., Imashuku, S., Ladisch, S., McClain, K., Webb, D., and Winiarski, J., Hlh-2004: Diagnostic and Therapeutic Guidelines for Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, *Pediatric blood & cancer*, vol. 48, no. 2, pp. 124-131, **2007**.
- [23] Fischer, A., Cerf-Bensussan, N., Blanche, S., Le Deist, F., Bremard-Oury, C., Leverger, G., Schaison, G., Durandy, A., and Griscelli, C., Allogeneic Bone Marrow Transplantation for Erythrophagocytic Lymphohistiocytosis, *The Journal of pediatrics*, vol. 108, no. 2, pp. 267-270, **1986**.
- [24] Carmo, M., Risma, K. A., Arumugam, P., Tiwari, S., Hontz, A. E., Montiel-Equihua, C. A., Alonso-Ferrero, M. E., Blundell, M. P., Schambach, A., and Baum, C., Perforin Gene Transfer into Hematopoietic Stem Cells Improves Immune Dysregulation in Murine Models of Perforin Deficiency, *Molecular Therapy*, **2014**.
- [25] Carmo, M., Gaspar, H. B., and Booth, C., Gene Therapy as a Future Management Option for Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, *The Journal of OncoPathology*, vol. 2, no. 4, pp. 95-105, **2014**.
- [26] Tang, Y.-M., and Xu, X.-J., Advances in Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: Pathogenesis, Early Diagnosis/Differential Diagnosis, and Treatment, *The Scientific World Journal*, vol. 11, pp. 697-708, **2011**.
- [27] Hansmann, M., Rontogianni, D., Janka-Schaub, C., Wacker, H., Hinkeldey, K., and Radzun, H., Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Macrophages Showing Immunohistochemical Properties of Activated Macrophages and T-Accessory Cells, *Pediatric hematology and oncology*, vol. 6, no. 3, pp. 237-246, **1989**.
- [28] Bujan, W., Schandene, L., Ferster, A., De Valck, C., Goldman, M., and Sariban, E., Abnormal T-Cell Phenotype in Familial Erythrophagocytic Lymphohistiocytosis, *The Lancet*, vol. 342, no. 8882, pp. 1296, **1993**.
- [29] Stepp, S. E., Dufourcq-Lagelouse, R., Le Deist, F., Bhawan, S., Certain, S., Mathew, P. A., Henter, J.-I., Bennett, M., Fischer, A., and de Saint Basile,

- G., Perforin Gene Defects in Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, *Science*, vol. 286, no. 5446, pp. 1957-1959, **1999**.
- [30] Ericson, K. G., Fadeel, B., Nilsson-Ardnor, S., Söderhäll, C., Samuelsson, A., Janka, G., Schneider, M., Gurgey, A., Yalman, N., and Révész, T., Spectrum of Perforin Gene Mutations in Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, *The American Journal of Human Genetics*, vol. 68, no. 3, pp. 590-597, **2001**.
- [31] Trizzino, A., Zur Stadt, U., Ueda, I., Risma, K., Janka, G., Ishii, E., Beutel, K., Sumegi, J., Cannella, S., and Pende, D., Genotype–Phenotype Study of Familial Haemophagocytic Lymphohistiocytosis Due to Perforin Mutations, *Journal of medical genetics*, vol. 45, no. 1, pp. 15-21, **2008**.
- [32] Okur, H., Balta, G., Akarsu, N., Oner, A., Patiroglu, T., Bay, A., Sayli, T., Unal, S., and Gurgey, A., Clinical and Molecular Aspects of Turkish Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Patients with Perforin Mutations, *Leukemia research*, vol. 32, no. 6, pp. 972-975, **2008**.
- [33] Lee, S. M., Villanueva, J., Sumegi, J., Zhang, K., Kogawa, K., Davis, J., and Filipovich, A., Characterisation of Diverse Prf1 Mutations Leading to Decreased Natural Killer Cell Activity in North American Families with Haemophagocytic Lymphohistiocytosis, *Journal of medical genetics*, vol. 41, no. 2, pp. 137-144, **2004**.
- [34] Ueda, I., Morimoto, A., Inaba, T., Yagi, T., Hibi, S., Sugimoto, T., Sako, M., Yanai, F., Fukushima, T., and Nakayama, M., Characteristic Perforin Gene Mutations of Haemophagocytic Lymphohistiocytosis Patients in Japan, *British journal of haematology*, vol. 121, no. 3, pp. 503-510, **2003**.
- [35] Balta, G., Okur, H., Unal, S., Yarali, N., Gunes, A. M., Unal, S., Turker, M., Guler, E., Ertem, M., and Albayrak, M., Assessment of Clinical and Laboratory Presentations of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Patients with Homozygous W374x Mutation, *Leukemia research*, vol. 34, no. 8, pp. 1012-1017, **2010**.
- [36] Zur Stadt, U., Beutel, K., Kolberg, S., Schneppenheim, R., Kabisch, H., Janka, G., and Hennies, H. C., Mutation Spectrum in Children with Primary Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: Molecular and Functional Analyses of Prf1, Unc13d, Stx11, and Rab27a, *Hum Mutat*, vol. 27, no. 1, pp. 62-68, Jan, **2006**.
- [37] Aricò, M., Danesino, C., Pende, D., and Moretta, L., Pathogenesis of Haemophagocytic Lymphohistiocytosis, *British journal of haematology*, vol. 114, no. 4, pp. 761-769, **2001**.
- [38] de Saint Basile, G., and Fischer, A., The Discovery of the Familial Hemophagocytosis Syndromes, *Primary Immunodeficiency Disorders: A Historic and Scientific Perspective*, pp. 139, **2014**.
- [39] de Saint Basile, G., Ménasché, G., and Fischer, A., Molecular Mechanisms of Biogenesis and Exocytosis of Cytotoxic Granules, *Nature Reviews Immunology*, vol. 10, no. 8, pp. 568-579, **2010**.
- [40] Jordan, M. B., Hildeman, D., Kappler, J., and Marrack, P., An Animal Model of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (Hlh): Cd8+ T Cells and Interferon Gamma Are Essential for the Disorder, *Blood*, vol. 104, no. 3, pp. 735-743, Aug 1, **2004**.

- [41] Henter, J., Elinder, G., Soder, O., Hansson, M., Andersson, B., and Andersson, U., Hypercytokinemia in Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, *Blood*, vol. 78, no. 11, pp. 2918-2922, **1991**.
- [42] Osugi, Y., Hara, J., Tagawa, S., Takai, K., Hosoi, G., Matsuda, Y., Ohta, H., Fujisaki, H., Kobayashi, M., and Sakata, N., Cytokine Production Regulating Th1 and Th2 Cytokines in Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, *Blood*, vol. 89, no. 11, pp. 4100-4103, **1997**.
- [43] Trinchieri, G., Interleukin-12 and the Regulation of Innate Resistance and Adaptive Immunity, *Nature Reviews Immunology*, vol. 3, no. 2, pp. 133-146, **2003**.
- [44] Takada, H., Ohga, S., Mizuno, Y., Suminoe, A., Matsuzaki, A., Ihara, K., Kinukawa, N., Ohshima, K., Kohno, K., and Kurimoto, M., Oversecretion of IL-18 in Haemophagocytic Lymphohistiocytosis: A Novel Marker of Disease Activity, *British journal of haematology*, vol. 106, no. 1, pp. 182-189, **1999**.
- [45] Larroche, C., and Mouthon, L., Pathogenesis of Hemophagocytic Syndrome (Hps), *Autoimmunity reviews*, vol. 3, no. 2, pp. 69-75, **2004**.
- [46] Puliyl, M. M., Rose, W., Kumar, S., Moses, P. D., and Gibikote, S., Prolonged Neurologic Course of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, *Pediatr Neurol*, vol. 41, no. 3, pp. 207-210, Sep, **2009**.
- [47] O'Byrne, K. J., and Dalglish, A. G., Chronic Immune Activation and Inflammation as the Cause of Malignancy, *British journal of cancer*, vol. 85, no. 4, pp. 473, **2001**.
- [48] de Visser, K. E., Eichten, A., and Coussens, L. M., Paradoxical Roles of the Immune System During Cancer Development, *Nature reviews cancer*, vol. 6, no. 1, pp. 24-37, **2006**.
- [49] Hoebe, K., Janssen, E., and Beutler, B., The Interface between Innate and Adaptive Immunity, *Nature immunology*, vol. 5, no. 10, pp. 971-974, **2004**.
- [50] Medzhitov, R., and Janeway, C., Innate Immune Recognition: Mechanisms and Pathways, *Immunological reviews*, vol. 173, no. 1, pp. 89-97, **2000**.
- [51] Newton, K., and Dixit, V. M., Signaling in Innate Immunity and Inflammation, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 4, no. 3, pp. a006049, **2012**.
- [52] Beutler, B., Innate Immunity: An Overview, *Molecular immunology*, vol. 40, no. 12, pp. 845-859, **2004**.
- [53] Medzhitov, R., Recognition of Microorganisms and Activation of the Immune Response, *Nature*, vol. 449, no. 7164, pp. 819-826, **2007**.
- [54] Hamerman, J. A., Ogasawara, K., and Lanier, L. L., Nk Cells in Innate Immunity, *Current opinion in immunology*, vol. 17, no. 1, pp. 29-35, **2005**.
- [55] Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S., Functions of Natural Killer Cells, *Nature immunology*, vol. 9, no. 5, pp. 503-510, **2008**.
- [56] Rajalingam, R., "Overview of the Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor System," *Immunogenetics*, pp. 391-414: Springer, 2012.
- [57] Lanier, L. L., Nk Cell Recognition, *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 23, pp. 225-274, **2005**.
- [58] Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M., and Ugolini, S., Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells, *Science*, vol. 331, no. 6013, pp. 44-49, **2011**.

- [59] Martín-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F., Induced Recruitment of Nk Cells to Lymph Nodes Provides Ifn- γ for Th1 Priming, *Nature immunology*, vol. 5, no. 12, pp. 1260-1265, **2004**.
- [60] Cooper, M. A., Fehniger, T. A., and Caligiuri, M. A., The Biology of Human Natural Killer-Cell Subsets, *Trends in immunology*, vol. 22, no. 11, pp. 633-640, **2001**.
- [61] Gong, J.-H., Maki, G., and Klingemann, H., Characterization of a Human Cell Line (Nk-92) with Phenotypical and Functional Characteristics of Activated Natural Killer Cells, *Leukemia*, vol. 8, no. 4, pp. 652-658, **1994**.
- [62] Tonn, T., Becker, S., Esser, R., Schwabe, D., and Seifried, E., Cellular Immunotherapy of Malignancies Using the Clonal Natural Killer Cell Line Nk-92, *Journal of hematotherapy & stem cell research*, vol. 10, no. 4, pp. 535-544, **2001**.
- [63] Pores-Fernando, A. T., Gaur, S., Doyon, M. Y., and Zweifach, A., Calcineurin-Dependent Lytic Granule Exocytosis in Nk-92 Natural Killer Cells, *Cell Immunol*, vol. 254, no. 2, pp. 105-109, **2009**.
- [64] Alfano, M., and Poli, G., Role of Cytokines and Chemokines in the Regulation of Innate Immunity and Hiv Infection, *Molecular immunology*, vol. 42, no. 2, pp. 161-182, **2005**.
- [65] Borregaard, N., Sørensen, O. E., and Theilgaard-Mönch, K., Neutrophil Granules: A Library of Innate Immunity Proteins, *Trends in immunology*, vol. 28, no. 8, pp. 340-345, **2007**.
- [66] Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., and Kim, J. H., Historical Perspectives on Tumor Necrosis Factor and Its Superfamily: 25 Years Later, a Golden Journey, *Blood*, vol. 119, no. 3, pp. 651-665, **2012**.
- [67] Leon, L. R., White, A. A., and Kluger, M. J., Role of Il-6 and Tnf in Thermoregulation and Survival During Sepsis in Mice, *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 275, no. 1, pp. R269-R277, **1998**.
- [68] Plomgaard, P., Fischer, C. P., Ibfelt, T., Pedersen, B. K., and van Hall, G., Tumor Necrosis Factor- α Modulates Human in Vivo Lipolysis, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 93, no. 2, pp. 543-549, **2008**.
- [69] Patel, J., Jager, A., Schalkwijk, C., Corder, R., Douthwaite, J., Yudkin, J., Coppack, S., and Stehouwer, C., Effects of Tumour Necrosis Factor- α in the Human Forearm: Blood Flow and Endothelin-1 Release, *Clinical science*, vol. 103, no. 4, pp. 409-416, **2002**.
- [70] Striz, I., Brabcova, E., Kolesar, L., and Sekerkova, A., Cytokine Networking of Innate Immunity Cells: A Potential Target of Therapy, *Clinical science*, vol. 126, no. 9, pp. 593-612, **2014**.
- [71] Piper, S. n. C., Ferguson, J., Kay, L., Parker, L. C., Sabroe, I., Sleeman, M. A., Briend, E., and Finch, D. K., The Role of Interleukin-1 and Interleukin-18 in Pro-Inflammatory and Anti-Viral Responses to Rhinovirus in Primary Bronchial Epithelial Cells, *PloS one*, vol. 8, no. 5, pp. e63365, **2013**.
- [72] Leung, B. P., Culshaw, S., Gracie, J. A., Hunter, D., Canetti, C. A., Campbell, C., Cunha, F., Liew, F. Y., and McInnes, I. B., A Role for Il-18 in Neutrophil Activation, *The Journal of Immunology*, vol. 167, no. 5, pp. 2879-2886, **2001**.

- [73] Perussia, B., Chan, S., D'andrea, A., Tsuji, K., Santoli, D., Pospisil, M., Young, D., Wolf, S., and Trinchieri, G., Natural Killer (Nk) Cell Stimulatory Factor or Il-12 Has Differential Effects on the Proliferation of Tcr-Alpha Beta+, Tcr-Gamma Delta+ T Lymphocytes, and Nk Cells, *The Journal of Immunology*, vol. 149, no. 11, pp. 3495-3502, **1992**.
- [74] González-Navajas, J. M., Lee, J., David, M., and Raz, E., Immunomodulatory Functions of Type I Interferons, *Nature Reviews Immunology*, vol. 12, no. 2, pp. 125-135, **2012**.
- [75] Trinchieri, G., and Perussia, B., Immune Interferon: A Pleiotropic Lymphokine with Multiple Effects, *Immunology Today*, vol. 6, no. 4, pp. 131-136, **1985**.
- [76] D'andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N. M., Ma, X., Kubin, M., and Trinchieri, G., Interleukin 10 (Il-10) Inhibits Human Lymphocyte Interferon Gamma-Production by Suppressing Natural Killer Cell Stimulatory Factor/Il-12 Synthesis in Accessory Cells, *The Journal of experimental medicine*, vol. 178, no. 3, pp. 1041-1048, **1993**.
- [77] Jones, S. A., Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for Il-6, *The Journal of Immunology*, vol. 175, no. 6, pp. 3463-3468, **2005**.
- [78] Marinkovic, S., Jahreis, G. P., Wong, G. G., and Baumann, H., Il-6 Modulates the Synthesis of a Specific Set of Acute Phase Plasma Proteins in Vivo, *The Journal of Immunology*, vol. 142, no. 3, pp. 808-812, **1989**.
- [79] Ohteki, T., Suzue, K., Maki, C., Ota, T., and Koyasu, S., Critical Role of Il-15–Il-15r for Antigen-Presenting Cell Functions in the Innate Immune Response, *Nature immunology*, vol. 2, no. 12, pp. 1138-1143, **2001**.
- [80] Werner, F., Jain, M. K., Feinberg, M. W., Sibinga, N. E., Pellacani, A., Wiesel, P., Chin, M. T., Topper, J. N., Perrella, M. A., and Lee, M.-E., Transforming Growth Factor-B1 Inhibition of Macrophage Activation Is Mediated Via Smad3, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 47, pp. 36653-36658, **2000**.
- [81] Podack, E. R., Young, J., and Cohn, Z. A., Isolation and Biochemical and Functional Characterization of Perforin 1 from Cytolytic T-Cell Granules, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 82, no. 24, pp. 8629-8633, **1985**.
- [82] Masson, D., and Tschopp, J., Isolation of a Lytic, Pore-Forming Protein (Perforin) from Cytolytic T-Lymphocytes, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 260, no. 16, pp. 9069-9072, **1985**.
- [83] Shinkai, Y., Yoshida, M. C., Maeda, K., Kobata, T., Maruyama, K., Yodoi, J., Yagita, H., and Okumura, K., Molecular Cloning and Chromosomal Assignment of a Human Perforin (Pfp) Gene, *Immunogenetics*, vol. 30, no. 6, pp. 452-457, **1989**.
- [84] Law, R. H., Lukyanova, N., Voskoboinik, I., Caradoc-Davies, T. T., Baran, K., Dunstone, M. A., D'Angelo, M. E., Orlova, E. V., Coulibaly, F., Verschoor, S., Browne, K. A., Ciccone, A., Kuiper, M. J., Bird, P. I., Trapani, J. A., Saibil, H. R., and Whisstock, J. C., The Structural Basis for Membrane Binding and Pore Formation by Lymphocyte Perforin, *Nature*, vol. 468, no. 7322, pp. 447-451, Nov 18, **2010**.

- [85] Lopez, J. A., Brennan, A. J., Whisstock, J. C., Voskoboinik, I., and Trapani, J. A., Protecting a Serial Killer: Pathways for Perforin Trafficking and Self-Defence Ensure Sequential Target Cell Death, *Trends in immunology*, vol. 33, no. 8, pp. 406-412, **2012**.
- [86] Voskoboinik, I., Thia, M.-C., Fletcher, J., Ciccone, A., Browne, K., Smyth, M. J., and Trapani, J. A., Calcium-Dependent Plasma Membrane Binding and Cell Lysis by Perforin Are Mediated through Its C2 Domain a Critical Role for Aspartate Residues 429, 435, 483, and 485 but Not 491, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 9, pp. 8426-8434, **2005**.
- [87] Voskoboinik, I., and Trapani, J. A., Addressing the Mysteries of Perforin Function, *Immunology and cell biology*, vol. 84, no. 1, pp. 66-71, **2006**.
- [88] Trapani, J. A., and Smyth, M. J., Functional Significance of the Perforin/Granzyme Cell Death Pathway, *Nat Rev Immunol*, vol. 2, no. 10, pp. 735-747, Oct, **2002**.
- [89] Groscurth, P., and Filgueira, L., Killing Mechanisms of Cytotoxic T Lymphocytes, *Physiology*, vol. 13, no. 1, pp. 17-21, **1998**.
- [90] Hiebert, P. R., and Granville, D. J., Granzyme B in Injury, Inflammation, and Repair, *Trends in molecular medicine*, vol. 18, no. 12, pp. 732-741, **2012**.
- [91] Hoves, S., Trapani, J. A., and Voskoboinik, I., The Battlefield of Perforin/Granzyme Cell Death Pathways, *Journal of leukocyte biology*, vol. 87, no. 2, pp. 237-243, **2010**.
- [92] Stepp, S. E., Mathew, P. A., Bennett, M., de Saint Basile, G., and Kumar, V., Perforin: More Than Just an Effector Molecule, *Immunology today*, vol. 21, no. 6, pp. 254-256, **2000**.
- [93] Voskoboinik, I., Smyth, M. J., and Trapani, J. A., Perforin-Mediated Target-Cell Death and Immune Homeostasis, *Nat Rev Immunol*, vol. 6, no. 12, pp. 940-952, 12//print, **2006**.
- [94] Voskoboinik, I., Whisstock, J. C., and Trapani, J. A., Perforin and Granzymes: Function, Dysfunction and Human Pathology, *Nature Reviews Immunology*, **2015**.
- [95] Jordan, M. B., Hildeman, D., Kappler, J., and Marrack, P., An Animal Model of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (Hlh): Cd8+ T Cells and Interferon Gamma Are Essential for the Disorder, *Blood*, vol. 104, no. 3, pp. 735-743, **2004**.
- [96] Pachlopnik Schmid, J., Ho, C. H., Diana, J., Pivert, G., Lehuen, A., Geissmann, F., Fischer, A., and de Saint Basile, G., A Griscelli Syndrome Type 2 Murine Model of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (Hlh), *Eur J Immunol*, vol. 38, no. 11, pp. 3219-3225, Nov, **2008**.
- [97] van den Broek, M. E., Kägi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W. K., Melief, C., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H., Decreased Tumor Surveillance in Perforin-Deficient Mice, *The Journal of experimental medicine*, vol. 184, no. 5, pp. 1781-1790, **1996**.
- [98] Walsh, C. M., Matloubian, M., Liu, C.-C., Ueda, R., Kurahara, C. G., Christensen, J. L., Huang, M., Young, J., Ahmed, R., and Clark, W., Immune Function in Mice Lacking the Perforin Gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 91, no. 23, pp. 10854-10858, **1994**.
- [99] Seok, J., Warren, H., Cuenca, A., Mindrinis, M., Baker, H., Xu, W., Richards, D., McDonald-Smith, G., Gao, H., and Hennessy, L.,

- Inflammation and Host Response to Injury, Large Scale Collaborative Research Program. Genomic Responses in Mouse Models Poorly Mimic Human Inflammatory Diseases, *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 110, no. 9, pp. 3507-3512, **2013**.
- [100] Quesenberry, P. J., and Becker, P. S., Stem Cell Homing: Rolling, Crawling, and Nesting, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, no. 26, pp. 15155-15157, **1998**.
- [101] Müller-Sieburg, C. E., Cho, R. H., Thoman, M., Adkins, B., and Sieburg, H. B., Deterministic Regulation of Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation, *Blood*, vol. 100, no. 4, pp. 1302-1309, **2002**.
- [102] Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M., Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts, *science*, vol. 282, no. 5391, pp. 1145-1147, **1998**.
- [103] Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S., Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors, *cell*, vol. 131, no. 5, pp. 861-872, **2007**.
- [104] Caplan, A. I., Adult Mesenchymal Stem Cells for Tissue Engineering Versus Regenerative Medicine, *Journal of cellular physiology*, vol. 213, no. 2, pp. 341-347, **2007**.
- [105] Friedenstein, A., Chailakhjan, R., and Lalykina, K., The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow and Spleen Cells, *Cell Proliferation*, vol. 3, no. 4, pp. 393-403, **1970**.
- [106] Caplan, A. I., Mesenchymal Stem Cells, *Journal of orthopaedic research*, vol. 9, no. 5, pp. 641-650, **1991**.
- [107] Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., and Hedrick, M. H., Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells, *Molecular biology of the cell*, vol. 13, no. 12, pp. 4279-4295, **2002**.
- [108] Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G. M., Claas, F. H., Fibbe, W. E., and Kanhai, H. H., Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta, *Stem cells*, vol. 22, no. 7, pp. 1338-1345, **2004**.
- [109] Shih, D. T. b., Lee, D. C., Chen, S. C., Tsai, R. Y., Huang, C. T., Tsai, C. C., Shen, E. Y., and Chiu, W. T., Isolation and Characterization of Neurogenic Mesenchymal Stem Cells in Human Scalp Tissue, *Stem cells*, vol. 23, no. 7, pp. 1012-1020, **2005**.
- [110] Erices, A., Conget, P., and Minguell, J. J., Mesenchymal Progenitor Cells in Human Umbilical Cord Blood, *British journal of haematology*, vol. 109, no. 1, pp. 235-242, **2000**.
- [111] De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., and Luyten, F. P., Multipotent Mesenchymal Stem Cells from Adult Human Synovial Membrane, *Arthritis & Rheumatism*, vol. 44, no. 8, pp. 1928-1942, **2001**.
- [112] Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., and Shi, S., Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (Dpscs) in Vitro and in Vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, no. 25, pp. 13625-13630, **2000**.
- [113] Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E., Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The

- International Society for Cellular Therapy Position Statement, *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315-317, **2006**.
- [114] Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R., Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells, *science*, vol. 284, no. 5411, pp. 143-147, **1999**.
- [115] Galmiche, M., Koteliensky, V., Briere, J., Herve, P., and Charbord, P., Stromal Cells from Human Long-Term Marrow Cultures Are Mesenchymal Cells That Differentiate Following a Vascular Smooth Muscle Differentiation Pathway, *Blood*, vol. 82, no. 1, pp. 66-76, **1993**.
- [116] Wakitani, S., Saito, T., and Caplan, A. I., Myogenic Cells Derived from Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Exposed to 5-Azacytidine, *Muscle & nerve*, vol. 18, no. 12, pp. 1417-1426, **1995**.
- [117] Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., and Abe, H., Cardiomyocytes Can Be Generated from Marrow Stromal Cells in Vitro, *Journal of Clinical Investigation*, vol. 103, no. 5, pp. 697, **1999**.
- [118] Oswald, J., Boxberger, S., Jørgensen, B., Feldmann, S., Ehninger, G., Bornhäuser, M., and Werner, C., Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated into Endothelial Cells in Vitro, *Stem cells*, vol. 22, no. 3, pp. 377-384, **2004**.
- [119] Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., and Black, I. B., Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neurons, *Journal of neuroscience research*, vol. 61, no. 4, pp. 364-370, **2000**.
- [120] Chagraoui, J., Lepage-Noll, A., Anjo, A., Uzan, G., and Charbord, P., Fetal Liver Stroma Consists of Cells in Epithelial-to-Mesenchymal Transition, *Blood*, vol. 101, no. 8, pp. 2973-2982, **2003**.
- [121] Gebler, A., Zabel, O., and Seliger, B., The Immunomodulatory Capacity of Mesenchymal Stem Cells, *Trends in molecular medicine*, vol. 18, no. 2, pp. 128-134, **2012**.
- [122] Ren, G., Chen, X., Dong, F., Li, W., Ren, X., Zhang, Y., and Shi, Y., Concise Review: Mesenchymal Stem Cells and Translational Medicine: Emerging Issues, *Stem cells translational medicine*, vol. 1, no. 1, pp. 51-58, **2012**.
- [123] Le Blanc, K., and Ringden, O., Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells and Clinical Experience, *J Intern Med*, vol. 262, no. 5, pp. 509-525, Nov, **2007**.
- [124] Ben-Ami, E., Berrih-Aknin, S., and Miller, A., Mesenchymal Stem Cells as an Immunomodulatory Therapeutic Strategy for Autoimmune Diseases, *Autoimmun Rev*, vol. 10, no. 7, pp. 410-415, May, **2011**.
- [125] Ringden, O., Uzunel, M., Rasmusson, I., Remberger, M., Sundberg, B., Lonnie, H., Marschall, H. U., Dlugosz, A., Szakos, A., Hassan, Z., Omazic, B., Aschan, J., Barkholt, L., and Le Blanc, K., Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Therapy-Resistant Graft-Versus-Host Disease, *Transplantation*, vol. 81, no. 10, pp. 1390-1397, May 27, **2006**.
- [126] Carrion, F., Nova, E., Ruiz, C., Diaz, F., Inostroza, C., Rojo, D., Mönckeberg, G., and Figueroa, F., Autologous Mesenchymal Stem Cell Treatment Increased T Regulatory Cells with No Effect on Disease Activity

- in Two Systemic Lupus Erythematosus Patients, *Lupus*, vol. 19, no. 3, pp. 317-322, **2010**.
- [127] Freedman, M. S., Bar-Or, A., Atkins, H. L., Karussis, D., Frassoni, F., Lazarus, H., Scolding, N., Slavin, S., Le Blanc, K., and Uccelli, A., The Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell Transplantation as a Treatment for Multiple Sclerosis: Consensus Report of the International Msct Study Group, *Multiple Sclerosis*, vol. 16, no. 4, pp. 503-510, **2010**.
- [128] P De Miguel, M., Fuentes-Julian, S., Blazquez-Martinez, A., Y Pascual, C., A Aller, M., Arias, J., and Arnalich-Montiel, F., Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells: Advances and Applications, *Current molecular medicine*, vol. 12, no. 5, pp. 574-591, **2012**.
- [129] Shi, Y., Su, J., Roberts, A. I., Shou, P., Rabson, A. B., and Ren, G., How Mesenchymal Stem Cells Interact with Tissue Immune Responses, *Trends in immunology*, vol. 33, no. 3, pp. 136-143, **2012**.
- [130] Ben-Ami, E., Miller, A., and Berrih-Aknin, S., T Cells from Autoimmune Patients Display Reduced Sensitivity to Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Role of Il-2, *Autoimmun Rev*, vol. 13, no. 2, pp. 187-196, Feb, **2014**.
- [131] Glenn, J. D., and Whartenby, K. A., Mesenchymal Stem Cells: Emerging Mechanisms of Immunomodulation and Therapy, *World J Stem Cells*, vol. 6, no. 5, pp. 526-539, Nov 26, **2014**.
- [132] Morandi, F., Raffaghello, L., Bianchi, G., Meloni, F., Salis, A., Millo, E., Ferrone, S., Barnaba, V., and Pistoia, V., Immunogenicity of Human Mesenchymal Stem Cells in Hla-Class I-Restricted T-Cell Responses against Viral or Tumor-Associated Antigens, *Stem Cells*, vol. 26, no. 5, pp. 1275-1287, **2008**.
- [133] Jones, B. J., and McTaggart, S. J., Immunosuppression by Mesenchymal Stromal Cells: From Culture to Clinic, *Experimental hematology*, vol. 36, no. 6, pp. 733-741, **2008**.
- [134] Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G. L., and Pistoia, V., Human Mesenchymal Stem Cells Modulate B-Cell Functions, *Blood*, vol. 107, no. 1, pp. 367-372, **2006**.
- [135] Tse, W. T., Pendleton, J. D., Beyer, W. M., Egalka, M. C., and Guinan, E. C., Suppression of Allogeneic T-Cell Proliferation by Human Marrow Stromal Cells: Implications in Transplantation, *Transplantation-Baltimore-*, vol. 75, no. 3, pp. 389-397, **2003**.
- [136] English, K., Barry, F. P., and Mahon, B. P., Murine Mesenchymal Stem Cells Suppress Dendritic Cell Migration, Maturation and Antigen Presentation, *Immunology letters*, vol. 115, no. 1, pp. 50-58, **2008**.
- [137] Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N., and Papamichail, M., Interactions between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells, *Stem cells*, vol. 24, no. 1, pp. 74-85, **2006**.
- [138] Poggi, A., Prevosto, C., Massaro, A.-M., Negrini, S., Urbani, S., Pierri, I., Saccardi, R., Gobbi, M., and Zocchi, M. R., Interaction between Human Nk Cells and Bone Marrow Stromal Cells Induces Nk Cell Triggering: Role of Nkp30 and Nkg2d Receptors, *The Journal of Immunology*, vol. 175, no. 10, pp. 6352-6360, **2005**.

- [139] François, M., Romieu-Mourez, R., Li, M., and Galipeau, J., Human Msc Suppression Correlates with Cytokine Induction of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase and Bystander M2 Macrophage Differentiation, *Molecular Therapy*, vol. 20, no. 1, pp. 187-195, **2012**.
- [140] Wang, L., Zhao, Y., and Shi, S., Interplay between Mesenchymal Stem Cells and Lymphocytes Implications for Immunotherapy and Tissue Regeneration, *Journal of dental research*, vol. 91, no. 11, pp. 1003-1010, **2012**.
- [141] Consortium, I. H. G. S., Finishing the Euchromatic Sequence of the Human Genome, *Nature*, vol. 431, no. 7011, pp. 931-945, **2004**.
- [142] Capecchi, M. R., Gene Targeting in Mice: Functional Analysis of the Mammalian Genome for the Twenty-First Century, *Nature Reviews Genetics*, vol. 6, no. 6, pp. 507-512, **2005**.
- [143] McManus, M. T., and Sharp, P. A., Gene Silencing in Mammals by Small Interfering Rnas, *Nature reviews genetics*, vol. 3, no. 10, pp. 737-747, **2002**.
- [144] Hannon, G. J., Rna Interference, *Nature*, vol. 418, no. 6894, pp. 244-251, **2002**.
- [145] Oates, A. C., Bruce, A. E., and Ho, R. K., Too Much Interference: Injection of Double-Stranded Rna Has Nonspecific Effects in the Zebrafish Embryo, *Developmental biology*, vol. 224, no. 1, pp. 20-28, **2000**.
- [146] Echeverri, C. J., Beachy, P. A., Baum, B., Boutros, M., Buchholz, F., Chanda, S. K., Downward, J., Ellenberg, J., Fraser, A. G., and Hacohen, N., Minimizing the Risk of Reporting False Positives in Large-Scale Rnai Screens, *Nature methods*, vol. 3, no. 10, pp. 777-779, **2006**.
- [147] Gaj, T., Gersbach, C. A., and Barbas, C. F., Zfn, Talen, and Crispr/Cas-Based Methods for Genome Engineering, *Trends in biotechnology*, vol. 31, no. 7, pp. 397-405, **2013**.
- [148] Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., Rothstein, R. J., and Stahl, F. W., The Double-Strand-Break Repair Model for Recombination, *Cell*, vol. 33, no. 1, pp. 25-35, **1983**.
- [149] Taghian, D. G., and Nickoloff, J. A., Chromosomal Double-Strand Breaks Induce Gene Conversion at High Frequency in Mammalian Cells, *Molecular and cellular biology*, vol. 17, no. 11, pp. 6386-6393, **1997**.
- [150] Moczek, A. P., The Nature of Nurture and the Future of Evodevo: Toward a Theory of Developmental Evolution, *Integrative and comparative biology*, pp. ics048, **2012**.
- [151] Shrivastav, M., De Haro, L. P., and Nickoloff, J. A., Regulation of DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice, *Cell research*, vol. 18, no. 1, pp. 134-147, **2008**.
- [152] Laity, J. H., Lee, B. M., and Wright, P. E., Zinc Finger Proteins: New Insights into Structural and Functional Diversity, *Current opinion in structural biology*, vol. 11, no. 1, pp. 39-46, **2001**.
- [153] Wang, J., Friedman, G., Doyon, Y., Wang, N. S., Li, C. J., Miller, J. C., Hua, K. L., Yan, J. J., Babiarz, J. E., and Gregory, P. D., Targeted Gene Addition to a Predetermined Site in the Human Genome Using a Zfn-Based Nicking Enzyme, *Genome research*, vol. 22, no. 7, pp. 1316-1326, **2012**.
- [154] Liu, Q., Segal, D. J., Ghiara, J. B., and Barbas, C. F., Design of Polydactyl Zinc-Finger Proteins for Unique Addressing within Complex Genomes,

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 11, pp. 5525-5530, **1997**.
- [155] Carroll, D., Genome Engineering with Zinc-Finger Nucleases, *Genetics*, vol. 188, no. 4, pp. 773-782, **2011**.
- [156] Cai, M., and Yang, Y., Targeted Genome Editing Tools for Disease Modeling and Gene Therapy, *Current gene therapy*, vol. 14, no. 1, pp. 2-9, **2014**.
- [157] Isalan, M., Choo, Y., and Klug, A., Synergy between Adjacent Zinc Fingers in Sequence-Specific DNA Recognition, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 11, pp. 5617-5621, **1997**.
- [158] Mussolino, C., Morbitzer, R., Lütge, F., Dannemann, N., Lahaye, T., and Cathomen, T., A Novel Tale Nuclease Scaffold Enables High Genome Editing Activity in Combination with Low Toxicity, *Nucleic acids research*, vol. 39, no. 21, pp. 9283-9293, **2011**.
- [159] Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A. J., and Voytas, D. F., Targeting DNA Double-Strand Breaks with Tal Effector Nucleases, *Genetics*, vol. 186, no. 2, pp. 757-761, **2010**.
- [160] Sakuma, T., Ochiai, H., Kaneko, T., Mashimo, T., Tokumasu, D., Sakane, Y., Suzuki, K.-i., Miyamoto, T., Sakamoto, N., and Matsuura, S., Repeating Pattern of Non-Rvd Variations in DNA-Binding Modules Enhances Talen Activity, *Scientific reports*, vol. 3, **2013**.
- [161] Takasu, Y., Sajwan, S., Daimon, T., Osanai-Futahashi, M., Uchino, K., Sezutsu, H., Tamura, T., and Zurovec, M., Efficient Talen Construction for Bombyx Mori Gene Targeting, *PloS one*, vol. 8, no. 9, pp. e73458, **2013**.
- [162] Lo, T.-W., Pickle, C. S., Lin, S., Ralston, E. J., Gurling, M., Schartner, C. M., Bian, Q., Doudna, J. A., and Meyer, B. J., Precise and Heritable Genome Editing in Evolutionarily Diverse Nematodes Using Talens and Crispr/Cas9 to Engineer Insertions and Deletions, *Genetics*, vol. 195, no. 2, pp. 331-348, **2013**.
- [163] Beumer, K. J., Trautman, J. K., Christian, M., Dahlem, T. J., Lake, C. M., Hawley, R. S., Grunwald, D. J., Voytas, D. F., and Carroll, D., Comparing Zinc Finger Nucleases and Transcription Activator-Like Effector Nucleases for Gene Targeting in Drosophila, *G3: Genes/ Genomes/ Genetics*, vol. 3, no. 10, pp. 1717-1725, **2013**.
- [164] Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A., Nucleotide Sequence of the lap Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in Escherichia Coli, and Identification of the Gene Product, *Journal of bacteriology*, vol. 169, no. 12, pp. 5429-5433, **1987**.
- [165] Grissa, I., Vergnaud, G., and Pourcel, C., Crisprfinder: A Web Tool to Identify Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, *Nucleic acids research*, vol. 35, no. suppl 2, pp. W52-W57, **2007**.
- [166] Horvath, P., and Barrangou, R., Crispr/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea, *Science*, vol. 327, no. 5962, pp. 167-170, **2010**.
- [167] Richter, C., Chang, J. T., and Fineran, P. C., Function and Regulation of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (Crispr)/Crispr Associated (Cas) Systems, *Viruses*, vol. 4, no. 10, pp. 2291-2311, **2012**.

- [168] Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A. P., Dickman, M. J., Makarova, K. S., Koonin, E. V., and Van Der Oost, J., Small Crispr Rnas Guide Antiviral Defense in Prokaryotes, *Science*, vol. 321, no. 5891, pp. 960-964, **2008**.
- [169] Mojica, F., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J., and Almendros, C., Short Motif Sequences Determine the Targets of the Prokaryotic Crispr Defence System, *Microbiology*, vol. 155, no. 3, pp. 733-740, **2009**.
- [170] Hale, C. R., Majumdar, S., Elmore, J., Pfister, N., Compton, M., Olson, S., Resch, A. M., Glover, C. V., Graveley, B. R., and Terns, R. M., Essential Features and Rational Design of Crispr Rnas That Function with the Cas Ramp Module Complex to Cleave Rnas, *Molecular cell*, vol. 45, no. 3, pp. 292-302, **2012**.
- [171] Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., and Marraffini, L. A., Multiplex Genome Engineering Using Crispr/Cas Systems, *Science*, vol. 339, no. 6121, pp. 819-823, **2013**.
- [172] Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., and Church, G. M., Rna-Guided Human Genome Engineering Via Cas9, *Science*, vol. 339, no. 6121, pp. 823-826, **2013**.
- [173] Sander, J. D., and Joung, J. K., Crispr-Cas Systems for Editing, Regulating and Targeting Genomes, *Nature biotechnology*, vol. 32, no. 4, pp. 347-355, **2014**.
- [174] Gilles, A. F., and Averof, M., Functional Genetics for All: Engineered Nucleases, Crispr and the Gene Editing Revolution, *EvoDevo*, vol. 5, no. 1, pp. 43, **2014**.
- [175] Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., and Jaenisch, R., One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by Crispr/Cas-Mediated Genome Engineering, *Cell*, vol. 153, no. 4, pp. 910-918, **2013**.
- [176] Hai, T., Teng, F., Guo, R., Li, W., and Zhou, Q., One-Step Generation of Knockout Pigs by Zygote Injection of Crispr/Cas System, *Cell research*, vol. 24, no. 3, pp. 372, **2014**.
- [177] Azzam, M., and Algranati, I., Mechanism of Puromycin Action: Fate of Ribosomes after Release of Nascent Protein Chains from Polysomes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 70, no. 12, pp. 3866-3869, **1973**.
- [178] Seaman, W. E., Human Natural Killer Cell Activity Is Reversibly Inhibited by Antagonists of Lipoxygenation, *The Journal of Immunology*, vol. 131, no. 6, pp. 2953-2957, **1983**.
- [179] Opal, S. M., and DePalo, V. A., Anti-Inflammatory Cytokines, *Chest Journal*, vol. 117, no. 4, pp. 1162-1172, **2000**.
- [180] da Silva Meirelles, L., Fontes, A. M., Covas, D. T., and Caplan, A. I., Mechanisms Involved in the Therapeutic Properties of Mesenchymal Stem Cells, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 20, no. 5-6, pp. 419-427, 10//, **2009**.
- [181] Aggarwal, S., and Pittenger, M. F., Human Mesenchymal Stem Cells Modulate Allogeneic Immune Cell Responses, *Blood*, vol. 105, no. 4, pp. 1815-1822, **2005**.

- [182] Giuliani, M., Poggi, A., Griscelli, B. A., and Lataillade, J., Ifngamma Priming Protects Fetal and Embryonic Msc from Nk Cell-Mediated Killing and Improves Their Immunosuppressive Properties: Role of Activating and Inhibitory Receptors, *Journal of Cell Science & Therapy*, vol. 5, no. 3, pp. 1, **2014**.
- [183] Miyagishi, R., Kikuchi, S., Takayama, C., Inoue, Y., and Tashiro, K., Identification of Cell Types Producing Rantes, Mip-1 α and Mip-1 β in Rat Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by in Situ Hybridization, *Journal of neuroimmunology*, vol. 77, no. 1, pp. 17-26, **1997**.
- [184] Nagafuji, K., Nonami, A., Kumano, T., Kikushige, Y., Yoshimoto, G., Takenaka, K., Shimoda, K., Ohga, S., Yasukawa, M., and Horiuchi, H., Perforin Gene Mutations in Adult-Onset Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, *Haematologica*, vol. 92, no. 7, pp. 978-981, **2007**.
- [185] Ishii, E., Ohga, S., Tanimura, M., Imashuku, S., Sako, M., Mizutani, S., and Miyazaki, S., Clinical and Epidemiologic Studies of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Japan, *Medical and pediatric oncology*, vol. 30, no. 5, pp. 276-283, **1998**.
- [186] K. Hayashi, N. T. T. A., Animal in Vivo Models of Ebv-Associated Lymphoproliferative Diseases: Special References to Rabbit Models, *Histology and Histopathology*, vol. 17, pp. 1293-1310, **2002**.
- [187] Vara, J. A., Portela, A., Ortin, J., and Jimenez, A., Expression in Mammalian Cells of a Gene from Streptomyces Alboniger Conferring Puromycin Resistance, *Nucleic acids research*, vol. 14, no. 11, pp. 4617-4624, **1986**.
- [188] Nagashima, S., Mailliard, R., Kashii, Y., Reichert, T. E., Herberman, R. B., Robbins, P., and Whiteside, T. L., Stable Transduction of the Interleukin-2 Gene into Human Natural Killer Cell Lines and Their Phenotypic and Functional Characterization in Vitro and in Vivo, *Blood*, vol. 91, no. 10, pp. 3850-3861, **1998**.
- [189] Chia, J., Thia, K., Brennan, A. J., Little, M., Williams, B., Lopez, J. A., Trapani, J. A., and Voskoboinik, I., Fatal Immune Dysregulation Due to a Gain of Glycosylation Mutation in Lymphocyte Perforin, *Blood*, vol. 119, no. 7, pp. 1713-1716, **2012**.
- [190] Grund, E. M., and Muise-Helmericks, R. C., Cost Efficient and Effective Gene Transfer into the Human Natural Killer Cell Line, Nk92, *Journal of immunological methods*, vol. 296, no. 1, pp. 31-36, **2005**.
- [191] Trompeter, H.-I., Weinhold, S., Thiel, C., Wernet, P., and Uhrberg, M., Rapid and Highly Efficient Gene Transfer into Natural Killer Cells by Nucleofection, *Journal of immunological methods*, vol. 274, no. 1, pp. 245-256, **2003**.
- [192] Cooper, L. J., Lee, D. A., Biswal, L., Raphael, R., and Killian, T. C., Device and Method for Transfecting Cells for Therapeutic Use, Google Patents, 2009.
- [193] Zhou, X., Xin, J., Fan, N., Zou, Q., Huang, J., Ouyang, Z., Zhao, Y., Zhao, B., Liu, Z., Lai, S., Yi, X., Guo, L., Esteban, M., Zeng, Y., Yang, H., and Lai, L., Generation of Crispr/Cas9-Mediated Gene-Targeted Pigs Via Somatic Cell Nuclear Transfer, *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 72, no. 6, pp. 1175-1184, 2015/03/01, **2015**.

- [194] Rasmusson, I., Immune Modulation by Mesenchymal Stem Cells, *Exp Cell Res*, vol. 312, no. 12, pp. 2169-2179, Jul 15, **2006**.
- [195] Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F., Jorgensen, C., and Noël, D., Immunosuppression by Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms and Clinical Applications, *Stem cell research & therapy*, vol. 1, no. 1, pp. 2, **2010**.
- [196] Xishan, Z., Baoxin, H., Xinna, Z., and Jun, R., Comparison of the Effects of Human Adipose and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on T Lymphocytes, *Cell Biol Int*, vol. 37, no. 1, pp. 11-18, Jan, **2013**.
- [197] Fang, B., Song, Y. P., Liao, L. M., Han, Q., and Zhao, R. C., Treatment of Severe Therapy-Resistant Acute Graft-Versus-Host Disease with Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells, *Bone Marrow Transplant*, vol. 38, no. 5, pp. 389-390, Sep, **2006**.
- [198] Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R., and Harrington, L. E., Il-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages, *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 25, pp. 821-852, **2007**.
- [199] Hakonarson, H., Maskeri, N., Carter, C., Chuang, S., and Grunstein, M. M., Autocrine Interaction between Il-5 and Il-1 β Mediates Altered Responsiveness of Atopic Asthmatic Sensitized Airway Smooth Muscle, *Journal of Clinical Investigation*, vol. 104, no. 5, pp. 657, **1999**.
- [200] Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., and Vinante, F., Role for Interferon- Γ in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, *Stem cells*, vol. 24, no. 2, pp. 386-398, **2006**.
- [201] Lin, J.-X., Migone, T.-S., Tseng, M., Friedmann, M., Weatherbee, J. A., Zhou, L., Yamauchi, A., Bloom, E. T., Mietz, J., and John, S., The Role of Shared Receptor Motifs and Common Stat Proteins in the Generation of Cytokine Pleiotropy and Redundancy by Il-2, Il-4, Il-7, Il-13, and Il-15, *Immunity*, vol. 2, no. 4, pp. 331-339, **1995**.
- [202] Gerszten, R. E., Garcia-Zepeda, E. A., Lim, Y.-C., Yoshida, M., Ding, H. A., Gimbrone, M. A., Luster, A. D., Luscinskas, F. W., and Rosenzweig, A., Mcp-1 and Il-8 Trigger Firm Adhesion of Monocytes to Vascular Endothelium under Flow Conditions, *Nature*, vol. 398, no. 6729, pp. 718-723, **1999**.
- [203] Wong, G. G., Witek, J. S., Temple, P. A., Wilkens, K. M., Leary, A. C., Luxenberg, D. P., Jones, S. S., Brown, E. L., Kay, R. M., and Orr, E. C., Human Gm-Csf: Molecular Cloning of the Complementary DNA and Purification of the Natural and Recombinant Proteins, *Science*, vol. 228, no. 4701, pp. 810-815, **1985**.
- [204] Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., and Middleton, J., Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing, *Stem cells*, vol. 25, no. 11, pp. 2739-2749, **2007**.
- [205] Stenger, S., and Rölinghoff, M., Role of Cytokines in the Innate Immune Response to Intracellular Pathogens, *Annals of the rheumatic diseases*, vol. 60, no. suppl 3, pp. iii43-iii46, **2001**.
- [206] Mougiakakos, D., Machaczka, M., Jitschin, R., Klimkowska, M., Entesarian, M., Bryceson, Y. T., Henter, J. I., Sander, B., and Le Blanc, K., Treatment of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis with Third-Party

- Mesenchymal Stromal Cells, *Stem Cells Dev*, vol. 21, no. 17, pp. 3147-3151, Nov 20, **2012**.
- [207] Shi, M., Liu, Z. W., and Wang, F. S., Immunomodulatory Properties and Therapeutic Application of Mesenchymal Stem Cells, *Clinical & Experimental Immunology*, vol. 164, no. 1, pp. 1-8, **2011**.
- [208] Introna, M., Lucchini, G., Dander, E., Galimberti, S., Rovelli, A., Balduzzi, A., Longoni, D., Pavan, F., Masciocchi, F., and Algarotti, A., Treatment of Graft Versus Host Disease with Mesenchymal Stromal Cells: A Phase I Study on 40 Adult and Pediatric Patients, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, vol. 20, no. 3, pp. 375-381, **2014**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Handan SEVİM

Doğum Yeri : Ankara

Medeni Hali : Bekar

E-posta : sevimh@hacettepe.edu.tr

Adresi : Durali Alıç mahallesi, Doğukent caddesi, 332/19 Mamak Ankara

Eğitim

Lise : Başkent Lisesi

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü

Doktora : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce, iyi

İş Deneyimi

Araştırma görevlisi, 2007-devam ediyor

Deneyim Alanları

Hücre Fizyolojisi, Kök hücre uygulamaları

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Mezenşimal Kök Hücrelerin İmmün Modülatör Etkisinin Hemofagositik Sendrom Klinik Uygulamalarına Temel Oluşturmak Üzere *in vitro* Modelde İncelenmesi, TÜBİTAK 1002-Hızlı destek projesi (Proje No:114S57), 30000 TL.

Mezenşimal Kök Hücrelerin İmmün Modülatör Etkisinin Hemofagositik Sendrom Klinik Uygulamalarına Temel Oluşturmak Üzere *in vitro* Modelde İncelenmesi,

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje ID:7904), 2300TL.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar