

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE GEN TEDAVİ KÜLTÜR
KOŞULLARI VE ENGRAFTMAN OPTİMİZASYONU**

Mehmet Emin ŞEKER

**Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2021

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE GEN TEDAVİ KÜLTÜR
KOŞULLARI VE ENGRAFTMAN OPTİMİZASYONU**

Mehmet Emin ŞEKER

**Kök Hücre Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. FATİMA AERTS KAYA**

ANKARA

2021

ONAY SAYFASI

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE GEN TEDAVİ KÜLTÜR KOŞULLARI VE
ENGRAFTMAN OPTİMİZASYONU

Mehmet Emin ŞEKER

Danışman: Doç. Dr. Fatıma AERTS KAYA

Bu tez çalışması 03.08.2021 tarihinde jürimiz tarafından "Kök Hücre Yüksek Lisans Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ayşen ÖZCAN
(Hacettepe Üniversitesi)

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fatıma AERTS KAYA
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Fahriye Duygu ÇETİNKAYA
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Zeynep Arzu YEGİN
(Gazi Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. İlhan TEZCAN
(Hacettepe Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

09 Ağustos 2021

Prof. Dr. Diclehan Ufhan
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezimin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*" kapsamında tezimin aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

03 /08/2021

(İmza)

Mehmet Emin ŞEKER

¹Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilişkin patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metodların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulgular içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarılan veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlerle ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Dr. Öğr. Üyesi Fatima AERTS KAYA danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Mehmet Emin ŞEKER

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi boyunca bana her zaman destek olan her zamanengin bilgilerinden yararlandığım, bilimsel açıdan bana her zaman bir şeyler öğreten, deneylerimde ve tez yazımda her zaman yanımda olan değerli danışmanım Doç.Dr. Fatima S. F. AERTS KAYA'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Virüs çalışmaları için mikrobiyoloji laboratuvarını kullanmamıza izin veren Prof.Dr. Cumhuri ÖZKUYUMCU'ya, çalışmalar için Rag2 farelerini sağlayan Prof. Dr. Gerard WAGEMAKER'e ve lentiviral plasmidler için Doç. Dr. Niek VAN TIL'e, teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans çalışmalarımda sürekli yanımda olan ve her konuda bilgilerinden faydalandığım ekip arkadaşlarım Uzm. Biyo. Burcu PERVİN, Vet. Hek. Özgür Doğuş EROL, Dr. Gülen ESKEN, Dr. Barış ULUM ve Aynura MAMMADOVA'ya ayrıca kök hücre merkezinde çalışan akademik kadroya, Burcu ÖZÇİMEN, Esin ALPDÜNDAR, Cansu ÖZDEMİR, Özge Burcu ŞAHAN'a, kök hücre merkezinde çalışan Engin ÖZÇELİK ve Özlem KÜÇÜKBAYRAK'a çok teşekkür ederim. Bu süreçte beni her zaman destekleyen, sevgisini esirgemeyen Seda KAFALI'ya teşekkür ederim.

ÖZET

ŞEKER M. E. Hematopoetik Kök Hücre Gen Tedavi Kültür Koşulları ve Engraftman Optimizasyonu, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2021. RAG2, ağır kombine immün yetmezliği (AKİY), nadir görülen, T-/B-/NK+ kalıtsal bir primer immün yetmezliktir (PİY) ve hematopoetik kök hücre (HKH) nakli ile tedavi edilmektedir. Uygun donör bulunmadığında bu hastaların başka tedavi seçeneği olmadığından otolog hücreler kullanılarak gen tedavisi (GT) geliştirilmesine gerek duyulmaktadır. AKİY'lere yapılan nakillerde, HKH'lerin kemik iliği (Kİ)'ne yerleşmesi ve uzun ömürlü engraftman sağlanması için hafif hazırlık rejimleri uygulanmaktadır. RIC'e bağlı toksisite ve yan etkileri önlemek amacıyla alternatif hazırlık rejimi protokollerinin geliştirilmesine de gerek duyulmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında; 1) *ex vivo* fare HKH kültür koşullarının optimizasyonu yapılmıştır, 2) Busulfan (BU) yerine, zararsız *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) ve *very late antigen 4* inhibitörünün (VLA-4I) HKH engraftmanı destekleyebilmesi araştırılmıştır, 3) RAG2 fareler, LV-SF-RAG2co veya LV-UCOE-RAG2co devamlı aktivasyonu sağlayan promotör içeren lentiviral konstraktlar ile transdüse edilmiş HKH'lerle nakledilmiştir. Bu çalışmada kısa dönem *ex vivo* HKH kültürlerinde sadece mTpo'nun eklenmesi yeterli olduğu gösterilmiştir ve bu koşullar LV transdüksiyonlarda kullanılmıştır. Metilasyona dirençli UCOE promotörü, daha güçlü SF promotörüne göre RAG2 farelerde GT 6 ay sonrası periferik kan ve dalakta daha yüksek CD3 ve CD19 oranları vermiştir. G-CSF veya VLA-4I hazırlık rejimi uygulanan RAG2 farelerin HKH nakli ve HKH GT'den sonra engraftman kinetikleri BU grubundan farklı olmasına rağmen 6 ayda immün hücreleri değerlendirildiğinde hem G-CSF hem de VLA-4I'nin kullanımının BU kadar etkili olduğu gösterilmiştir. Bu tez çalışması ile sadece RAG2 için değil, aynı zamanda diğer AKİY hastalıklarında uygulanabilecek yeni bir hazırlık ve tedavi süreci geliştirilmiştir ve ileride klinikte hastaların tedavi veya tedavi desteği olarak kullanılabilmesi için bir alt yapı oluşturulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Hematopoetik Kök Hücre Gen Tedavi, Hazırlık Rejimi, G-CSF, VLA-4I, RAG2-SCID.

Bu çalışma TÜBİTAK-1002, 220S338 no'lu proje tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

ŞEKER M. E. Optimization of Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Culture Conditions and Engraftment, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Stem Cell Program Master Thesis, Ankara, 2021. RAG2 severe combined immunodeficiency (SCID) is a rare, inherited primary immunodeficiency (PID), characterized by a T-/B-/NK+ phenotype and is treated with hematopoietic stem cell (HSC) transplantation. When no suitable donor is available, these patients have no other treatment options. Therefore, it is important to develop gene therapy (GT) strategies, where patient-derived autologous cells can be used. For SCID patients, usually reduced conditioning regimens (RIC) are used to support homing and long-term engraftment of the HSCs in the bone marrow (BM). In order to prevent RIC - related toxicity, alternative conditioning regimen protocols should be developed. In this thesis, we aimed to 1) optimize *ex vivo* mouse HSC culture conditions, 2) compared the effects of the harmless granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and very late antigen 4 inhibitor (VLA-4I) on HSC engraftment, with Busulfan (BU), and 3) transplanted RAG2 mice with HSCs genetically modified with LV-SF-RAG2co or LV-UCOE RAG2co. Here we showed that during short-term *ex vivo* HSC cultures, addition of mTpo alone is sufficient, and therefore we used these conditions during LV transductions. The methylation-resistant UCOE promoter displayed better results than the stronger SF promoter at 6 months after GT in transplanted RAG2 mice in terms of peripheral blood and spleen CD3 and CD19 numbers. Although the engraftment kinetics after HSC transplantation and HSC GT of mice treated with G-CSF or VLA-4I were different from the mice treated with BU, use of both G-CSF and VLA-4I was at least as effective as BU in terms of immune recovery at 6 months after transplantation. With this thesis, we developed a new conditioning and treatment protocol that can be applied to not only RAG2 SCID, but also to other SCIDs and can serve as the basis for future clinical research and treatment/support of SCID patients.

Keywords: Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy, Conditioning Regimen, G-CSF, VLA-4I, RAG2-SCID.

This thesis was supported by a grant from TÜBİTAK-1002, project nr 220S338.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xiv
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ağır Kombine İmmün Yetmezlik	3
2.2. Rekombinasyon Aktive Edici Gen 2 (RAG2)	4
2.3. Rag2 Fare modeli	6
2.4. Hematopoetik Kök Hücre Nakli ve Gen Tedavi	7
2.4.1. Hematopoetik Kök Hücre Nakli	7
2.4.2. Monoetik Gen Tedavi	9
2.5. Kemik İliği Nişi, Mobilizasyon, Homing ve Engraftman	10
2.6. Hazırlık Rejimleri	12
2.7. Retroviral ve Lentiviral Vektörler	15
2.8. Araştırma Sorusu ve Hipotezi	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Kullanılan sağlıklı ve immün yetmezlikli fareler	18
3.2. Kemik iliği izolasyonu ve HKH seleksiyonu	18
3.3. İmmünofenotiplendirme	19
3.4. HKH Koloni Oluşturan Ünite (CFU) testi	19
3.5. Lentiviral vektör üretimi	20
3.5.1. Hücre hatları	20
3.5.2. Stbl3 Kompetan Bakteriler	20
3.5.3. Plazmitlerin İzolasyonu	21
3.5.4. Lentiviral vektör üretimi	23

3.5.5. Vektör titrasyonu	24
3.6. HKH kültürü ve transdüksiyonu	25
3.6.1 HKH kültür optimizasyonu	25
3.6.2. HKH transdüksiyonu	26
3.7. Hazırlık rejimi	27
3.8. HKH Nakli ve Engrafman takibi	28
3.9. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (RT-qPCR)	29
3.9.1. RNA İzolasyonu ve RNA Kantifikasyonu	29
3.9.2. cDNA Sentezi	30
3.9.3. RT-qPCR	30
3.10. Mikoplazma Testleri	31
3.11. İstatistiksel Yöntemler	31
4. BULGULAR	32
4.1. Lineaj Deplesyonu ile Fare HKH Eldesi	32
4.2. Nakil Grupları	33
4.3. Hazırlık Rejimiyle HKH Mobilizasyonu	34
4.4. <i>Ex Vivo</i> Fare Hematopoetik Kök Hücre Kültür Koşulları Optimizasyonu	34
4.5. Transdüksiyon sonrası Rag2 ifadelerinin doğrulanması	35
4.6. HKH kimerizmi ve engraftman takibi	37
4.7. LV-SF-RAG2co ve LV-UCOE-RAG2co farklı promörlerin HKH Kimerizmi ve engraftman takibi	38
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ	49
7. KAYNAKÇA	50
8. EKLER	57
Ek-1. Tez çalışması ile ilgili Etik Kurul izinleri Etik kurul izni	
Ek-2. Tez çalışması ile ilgili bildirimler	
Ek-3. Tez çalışması orijinallik raporu	
Ek-4. Digital Makbuz	
Ek-5. 3.ay PK'daki CD3 ve CD19 FACS oranları gösterilmiştir.	
Ek-6. Nakil edilen Rag2 farelerin periferik kan engraftman sonuçları (%)	
Ek-7 Farelere ait parazit raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADA	Adenosin Deaminaz
AGM	Aort-Gonad-Mezonefroz
AKİY	Ağır Kombine İmmün Yetmezlik (SCID)
BU	Busulfan
cDNA	Komplementer DNA
CFSE	Karboksifloresein Diasetat Süksinimidil Ester
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
Flt3	Flt3 ligand
G-CSF	Granülosit-Koloni Uyarıcı Faktör
G-CSFR	G-CSF Reseptörü
GKK	Göbek Kordon Kanı
GTx	Gen Tedavisi
GvHD	<i>Graft Versus Host</i> Hastalığı
HIV Tip-1	İnsan İmmün yetmezlik Virüs Tip1
HKH	Hematopoetik Kök Hücre
HKH-GTx	Hematopoetik Kök Hücre Gen Tedavi
HKHN	Hematopietik Kök Hücre Nakli
HKHP	Hematopoetik Kök Hücre Projenitörleri
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
HÜDHAM	Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi
Ig	İmmünoglobülin
IVC	Bireysel Havalandırılmış Kafes (<i>Individually Ventilated Cages</i>)
Kİ	Kemik İliği
LB	Luria Bertani
LTR	Uzun Terminal Tekrarlar
LV	Lentiviral
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOI	Multiplicity of İnfection
NK	Doğal Öldürücü Hücreler
PİY	Primer İmmün Yetmezlik

PK	Periferik Kan
RAG1	Rekombinasyon Aktive Edici Gen 1
RAG2	Rekombinasyon Aktive Edici Gen 2
RIC	Azaltılmış Yoğunlukta Hazırlık Rejimi, <i>Reduced Intensity Conditioning</i>
RİPA	Radiyoimmünopresipitasyon Lizis Tamponu
RSS	Rekombinasyon Sinyal Dizisi
RT	Ters Transkriptaz, (<i>Reverse Transcriptase</i>)
SCF	Kök Hücre Faktör (<i>Stem Cell Factor</i>)
SFFV	<i>Spleen Focus Forming Virüs</i>
TBI	Tüm Vücuda Radyasyon (<i>Total Body Irradiation</i>)
TdT	Terminal Deoksinükleotidil Kinaz
TPO	Trombopoietin
UCOE	<i>Ubiquitous Chromatin Opening Element</i>
V(D)J	V, Değişken (<i>Variable</i>); D, Çeşitli (<i>Diverse</i>); J, Katılım (<i>Joining</i>)
VCAM-1	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i>
VLA-4I	<i>Very Late Antigen-4 Inhibitor</i>
X-AKİY	X Kromozomuna Bağlı Ağır Kombine İmmün Yetmezlik

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Ağır kombine immün yetmezlik sınıflandırılması.	3
2.2. V(D)J rekombinasyonunun şematik gösterimi.	5
2.3. AKİY 'in patogenezi.	6
2.4. Hematopoez şeması.	7
2.5. HKH naklinin tarihsel gelişimi	9
2.6. Gen tedavisindeki önemli tarihsel gelişmeler	10
2.7. Kemik iliği nişi	11
2.8. Busulfan, VLA-4I ve G-CSF'nin kemik iliği nişinde etki mekanizması	15
3.1. UCOE.RAG2co plazmit haritası	22
3.2. SF.RAG2co plazmit haritası	23
3.3. RAG2 farelere nakil öncesinde uygulanan hazırlık rejimleri	28
4.1. c-Kit pozitif hücre seleksiyonu	32
4. 2. Lin-/- hücrelerinin koloni oluşturma kapasitesi	33
4.3. Hazırlık rejiminin öncesi ve sonrası beyaz küre sayıları.	34
4.4. Annexin-V ve PI ile hücre kültür koşullarının belirlenmesi.	35
4.5. In vitro fare Lin-/- HKH'lerin farklı ekspansiyon protokolleri	36
4.6. Transdüksiyon sonrası Rag2 ifadesinin doğrulanması.	36
4.7. Transdüksiyon sonrası Rag2 ifadesi.	37
4.8. Periferik kan sonuçlarına göre 1.ayda CD3 ve CD 19 oranları	37
4.9. Periferik kan sonuçlarına göre 3.ayda CD3 ve CD 19 oranları	38
4.10. PK sonuçlarına göre SF-LV veya UCOE-LV verilen grupların 1. ayda CD3 ve CD19 oranları.	39
4.11. PK sonuçlarına göre SF-LV veya UCOE-LV verilen grupların 3. ayda CD3 ve CD19 oranları.	39
4.12. Nakil sonrası dalaktaki değişimler.	40
4.13. Nakil sonrası PK CD3 oranları. Nakil sonrasında CD3 oranlarının aylara göre değişim grafiği verilmiştir.	41
4.14. Nakil sonrası PK CD19 oranları. Nakil sonrasında CD3 oranlarının aylara göre değişim grafiği verilmiştir	42

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
3.1. RT-PCR primer dizileri	30
4.1. HKH nakil grupları	33

1.GİRİŞ

“Nadir hastalık” tanımına uyan 6 binden fazla hastalığın %80’i genetik olarak kalıtılmaktadır. Dünyada 350 milyona (%6), Türkiye’de ise 7 milyona yakın (%9) kişinin bu hastalıklardan muzdarip olduğu bildirilmiştir (1). RAG2^{-/-} (Rekombinasyon aktive edici gen 2 eksikliği) AKİY (Ağır kombine immün yetmezlik, *Severe combined immune deficiency*) bu nadir kalıtsal hastalıklarından biridir (2). RAG genleri, B ve T hücre reseptör genlerinin yeniden düzenlenmesinde ve rekombinasyonunda rol oynayan proteinleri kodlamaktadır. RAG2 geni, adaptif bağışıklık sisteminin çok önemli bileşenleri olan iki hücre tipinin, olgun B ve T lenfositlerinin, üretilmesi için gereklidir. B ve T hücre antijen reseptörlerinin (TCR) oluşması ve çeşitliğinin sağlanması V(D)J (V, değişken, *variable*; D, çeşitli, *diverse*; J, katılım, *joining*) rekombinasyonu ile gerçekleşmektedir (3, 4). RAG2 geninde oluşan mutasyon sonucunda rekombinasyon aşamasında aksamalar meydana gelmekte ve lenfoid hücre oluşumu engellenmektedir (4). RAG2 eksikliği olan hastalarda viral, bakteriyel enfeksiyonlar, çeşitli deri belirtileri görülmekte ve hastalar tedavi edilmediğinde yaşamlarının birinci yılında yitirmektedir (5, 6). Halen RAG2^{-/-} AKİY’in tek küratif tedavisi hematopoetik kök hücre (HKH) naklidir (6). HKH’ler multipotent kaynaklı hücrelerdir ve tüm kanda bulunan miyeloid (eritrosit, nötrofil, eozinofil, bazofil, monosit ve trombosit) ve lenfoid hücreleri (B, T ve NK) oluştururlar. HKH nakli; genellikle kemik iliği (Kİ), granülosit-koloni uyarıcı faktör (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*, G-CSF) ile mobilize edilen periferik kan (PK) veya göbek kordonu kanı (GKK)’ndan türetilen HKH’lerin nakledilmesidir (7). RAG2^{-/-} hastaları için uygun donör bulunmadığında başka bir tedavi seçeneği kalmamaktadır. Son zamanlarda ADA (*adenosine deaminase*)- AKİY ve X- AKİY (X-kromozomuna bağlı AKİY) gibi, bazı AKİY’ler için başarılı retroviral ve/veya lentiviral (LV) hematopoetik kök hücre gen tedavileri (HKH-GTx) geliştirilmiştir veya geliştirilmektedir (8-10). Ancak, RAG2- AKİY hastalığında LV-HKH-GTx henüz klinik aşamalara geçememiştir. Bunun nedeni, *in vitro* HKH’lerde LV transferin koşullarının tam optimize edilmemiş olması ve *in vivo* hayvan deneylerinde düzeltilen RAG2^{-/-} HKH’lerin yetersiz engraftmana ve denksiz B hücre immün rekonstitüsyonuna/ aktivasyonuna bağlı olarak otoimmün benzeri semptomlara yol açmasıdır (11).

Malign olmayan hastalıklar için yapılan HKH nakillerinde; kemik iliğinin boşaltılması, HKH'lerin Kİ'nde yeniden yerleşmesi ve tutulmasının (engraftman) sağlanması için çeşitli hazırlık rejimleri uygulanmaktadır. Günümüzde, klinikte rutin olarak kullanılan alkilleyici ajanlar (Busulfan, Siklofosfamid, Melfalan, Fludarabin vb.) ve TBI (*Total Body Irradiation*, tüm vücut radyasyonu) gibi tedavilerin yüksek toksisitelerinden dolayı çocuklarda büyüme ve gelişme geriliği, ergenlik gecikmesi veya olmaması, infertilite ve kalıcı organ hasarı oluşturabilmektedir (12). Hazırlık rejiminde kullanılan sitotoksik ilaçlar hastalara akut zarar (doku toksisitesi) ve uzun vadede zarar (sekonder malignite) verebilir. Ancak hazırlık rejimi uygulanmadan HKH nakli yapıldığında engraftman yetersiz veya denksiz olabilir (13). Bu nedenle yeterli engraftmanı sağlayan, ancak minimal toksisite veren yeni hazırlık rejimi protokollerinin geliştirilmesine gerek duyulmaktadır. G-CSF ve *very late antigen-4* inhibitörü (VLA-4I) hastaya zarar vermeden, Kİ permeabilizasyonunu ve/veya HKH mobilizasyonunu sağlamaktadır. Bu nedenle, azaltılmış yoğunlukta hazırlık rejimi (*reduced intensity conditioning*, RIC) yerine toksik olmayan, ancak yeterli engraftman sağlayabilen G-CSF veya VLA-4I gibi mobilize edici ajanların kullanılması ve bu şekilde maksimum engraftmanın sağlanması hedeflenmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında;

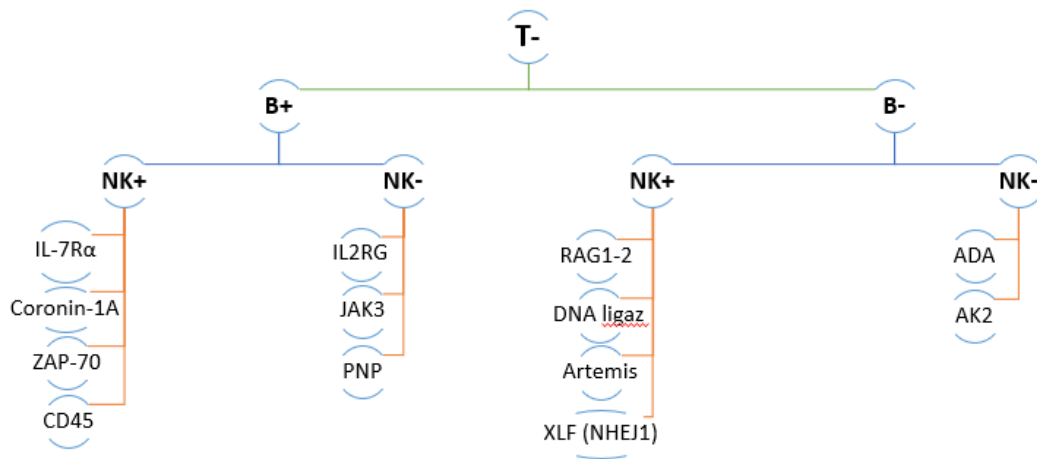
- 1) Genetik olarak düzeltilen, uzun ömürlü hematopoez sağlayabilen HKH'lerin kültür koşulları ve *ex vivo* LV transdüksiyon protokollerinin optimizasyonunun yapılması;
- 2) RAG2^{-/-} fare modelinde hazırlık rejimleri (Busulfan, BU) yerine G-CSF veya VLA-4I kullanılarak bu düzeltilen HKH'lerin engraftmanının sağlanması;
- 3) Bu optimize edilen protokollar kullanılarak RAG2 fare modelinde zararsız hazırlık rejiminden sonra, LV-RAG2 kontraktları ile başarılı HKH-GTx sağlanması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ağır Kombine İmmün Yetmezlik

Ağır kombine immün yetmezlik (AKİY) ilk olarak Glanzmann ve Riniker tarafından tanımlanmıştır (14). AKİY, hem hücresel hem de humoral adaptif immüneyi etkileyen T lenfositlerin yokluğu veya disfonksiyonu ile karakterize kalıtsal primer immün yetmezliktir (PİY) (4). AKİY'ler, T-/B+ ve T-/B- AKİY olarak sınıflandırılabilir, NK hücrelerinin varlığına veya yokluğuna göre de daha ileri alt tiplere ayrılabilir (15). AKİY hastalığının başlıca belirtileri, büyüme geriliği, kalıcı veya tekrarlayan şiddetli enfeksiyonlardır. Tedavi edilmediğinde hastalar birinci yaşam yılında ağır enfeksiyonlardan dolayı yaşamını yitirmektedir (5, 6).

Genel popülasyondaki AKİY prevalansı yaklaşık 1:10.000 canlı doğumdur. Ancak akraba evliliği oranının yüksek olduğu bölgelerde AKİY prevalansı çok daha yüksektir (16). Bu nedenle, Türkiye, Tunus ve Fas gibi bazı ülkelerde genel prevalansın Batı ülkelerine göre daha yüksektir. AKİY 'e sebep olan en sık görülen mutasyonlar IL2RG, ARTEMIS, RAG1, RAG2, ADA, CD45, JAK3 ve IL7R genlerinde bulunmaktadır (Şekil 2.1)(17).



Şekil 2.1. Ağır kombine immün yetmezlik sınıflandırılması. Şekilde T hücre eksiliğinde, B hücre varlığında NK'nın bulunup bulunmamasından ve B hücre yokluğunda NK'nın bulunup bulunmamasından sorumlu mutasyonlar gösterilmiştir. (17)'den uyarlanarak çizilmiştir.

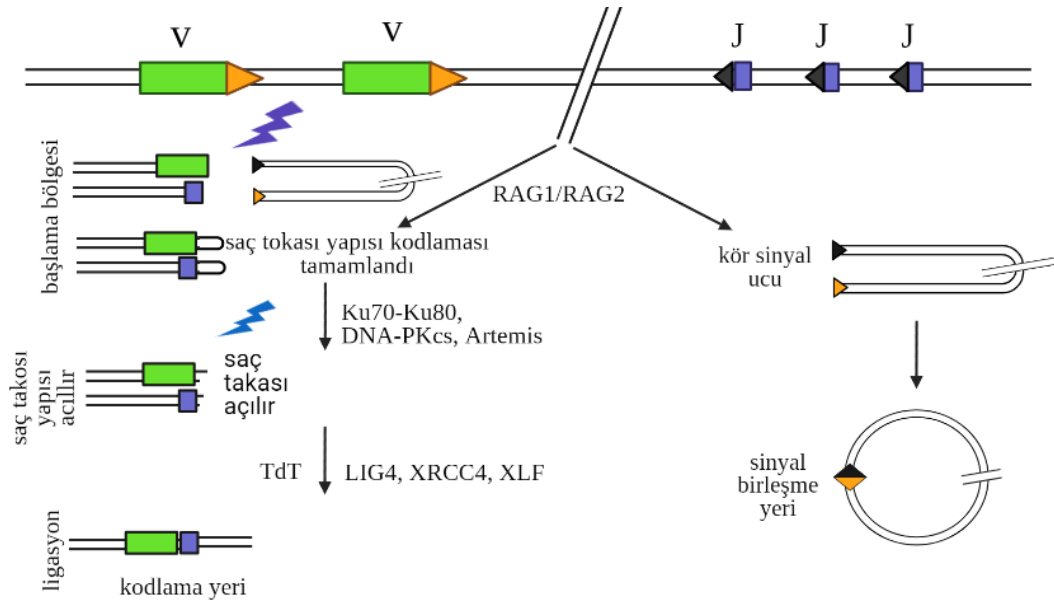
AKİY’li hastalar HKH transplantasyonu ile tedavi edilebilir. Kardeşlerden yapılan HKH nakli oldukça başarılıdır, ancak uygun donör her zaman bulunmayabilir ve alternatif donörlerden yapılan nakillerde yüksek oranda *Graft versus Host Disease* (GvHD) ve tamamlanamayan immün sistem yapılanması görülebilmektedir. Allojenik HKH nakli veya otolog gen tedavisi ile hastalar tedavi edilebilmektedir (18). HKH nakillerinde alıcıda kemik iliği boşaltması ve hematopoezin gerçekleşebilmesi için hazırlık rejimleri uygulanmaktadır (19). ADA ve IL2R γ eksikliği gibi bazı AKİY alt gruplarında retroviral vektörlerle gen tedavi çalışmaları tamamlanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (20). Bu çalışmada, kombine bir yaklaşım ile lentiviral vektörler ve *in vivo* engraftmanı artıran, ancak toksik olmayan ve/veya etkisi devam eden hazırlık rejimleri geliştirilmesi hedeflenmektedir.

2.2. Rekombinasyon Aktive Edici Gen 2 (RAG2)

V-(D)-J rekombinasyonu, T ve B hücre olgunlaşmasının erken aşamalarında meydana gelen somatik rekombinasyon mekanizmasıdır ve B hücrelerinde bulunan çeşitli antikorlar/immünoglobulinler ve T hücre reseptörlerinin (TCR) repertuarının sağlanması ile sonuçlanır. Süreç, adaptif bağışıklık sisteminin tanımlayıcı bir özelliğidir (21). 1980’lerde V(D)J rekombinasyonu tanımlanmasına rağmen bu süreci kontrol eden enzimler, Rekombinasyonu aktive edici gen-1 (RAG-1)’in izolasyonu ile David Schatz ve David Baltimore tarafından keşfedilmiştir. NIH-3T3 hücre hattında RAG-1 aktive V(D)J rekombinasyonunu kodlayan genomik ve cDNA (komplementer DNA) dizilerinin olduğu ve DNA çift sarmallı kırılmaları yapmak için RAG-2 ile uyum içinde çalıştığını göstermişlerdir (22).

Memelilerde adaptif immünitinin gelişimi B ve T lenfositlerde özgün immünoglobülin (Ig) ve T-hücre reseptörü (TCR) oluşumuna bağlıdır. B ve T hücre antijen reseptörlerinin oluşması ve çeşitliliğin sağlanması V(D)J rekombinasyonu ile gerçekleşmektedir (3). Bu süreçte önemli rol oynayan RAG1 ve RAG2 genleri 11. kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır ve B ve T hücre reseptör genlerinin yeniden düzenlenmesinde ve rekombinasyonunda rol oynayan proteinleri kodlamaktadır. RAG2, adaptif bağışıklık sisteminin en önemli bileşenleri olan olgun B ve T lenfositlerin üretilmesi için gereklidir. Antijen reseptör değişkenliği somatik DNA’da değişken bölgenin V(D)J dizisinin yeniden bir araya gelmesi (DNA rearanjmanı) ile

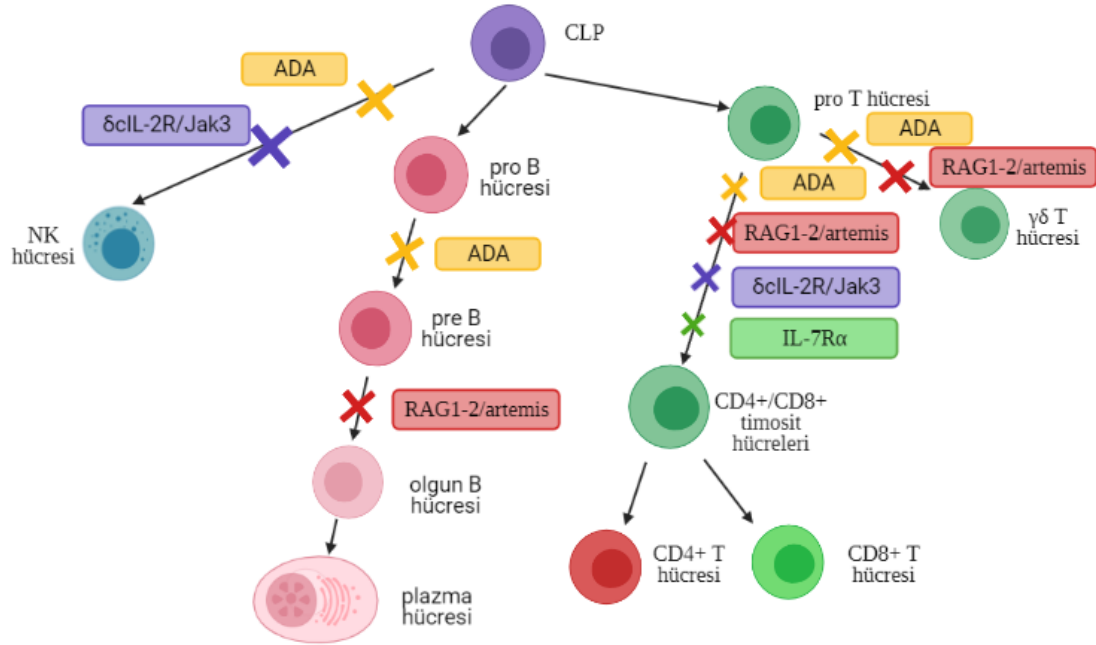
oluşturulmaktadır (23). İlk adımda RAG1 ve RAG2 tarafından kodlanan proteinler bir heterodimer oluşturup rekombinasyon sinyal dizisi (RSS) ve V(D)J gen segmenti arasında tek iplikli bir çentik oluşturmaktadır. Değişken (V) bölgenin yanında bir saç tokası ile kaplanmış kodlama ucu ve RSS tarafında bir kör sinyal ucu oluşumuyla sonuçlanmaktadır. İşlem aşamasının ikinci fazında Ku70, Ku80, Artemis ve DNA-protein kinaz (PK) kompleksi, saç tokası ile kaplanmış kodlama ucuna bağlanmaktadır. Bunun sonucunda saç tokası açılarak TdT (terminal deoksiniükleotidil kinaz) adı verilen bir enzimle genin bir parçası olmayan rastgele nükleotidleri (P veya N) eklemektedir. Son olarak, işlenmiş kırılmış uçların ligasyonu, DNA ligaz IV, XRCC4 enzimleriyle Cernunos-XLF uçlar NHEJ ile (non-homologous end joining,) birleştirilmektedir (Şekil 2.2) (3, 4, 23).



Şekil 2.2. V(D)J rekombinasyonunun şematik gösterimi (4)'ten uyarlanarak çizilmiştir. RAG proteinlerinin kompleksi, antijen reseptörü gen segmentlerini çevreleyen RSS'leri bağlar. RAG protein kompleksi, DNA'yı RSS'leri keserek saç tokası yapıları taşıyan iki kodlama ucu ve iki kör sinyal ucu ile sonuçlanır. DNA onarım aşaması sırasında, Ku70, Ku80 ve DNAPKcs kompleksi doğrudan sinyal uçlarına bağlanır. Artemis ile birlikte bu kompleks, kodlama uçlarının işlenmesi için de gereklidir. Artemis saç tokalarını ayırır, ardından kodlama uçları endonükleaz ve TdT aktivitesi ile değiştirilir. Son olarak, bir DNA ligaz IV, XRCC4 ve Cernunos kompleksi, bir kodlama bölgesi oluşturmak için uçları bağlar.

AKİY, T ve B hücrelerinin gelişimi ve işlevi için önemli olan ve aynı zamanda NK hücrelerini de etkileyebilen çeşitli genlerde meydana gelen mutasyonların neden

olduğu bir sendromdur (24). Farklı genetik kusurların neden olduğu lenfoid gelişimdeki aşamalar ve aksamalar (Şekil 2.3.) gösterilmiştir.



Şekil 2.3. AKİY 'in patogenezi. T hücre, B hücre ve NK gelişimindeki çeşitli adımları etkileyen farklı mekanizmalar gösterilmiştir (25)'ten uyarlanarak çizilmiştir. T ve B hücre gelişimini etkileyen farklı genler, AKİY 'in hüresel fenotiplerini etkilemektedir. ADA eksikliği, T-hücre, B-hücre ve NK hücre gelişimini etkilemektedir. RAG1-2 ve Artemis eksikliği, T hücrelerinin ve B hücrelerinin oluşmamasına neden olur, ancak NK hücre sayıları normal olabilir. $\gamma\delta$ IL-2R ve JAK3'teki mutasyonlar, T ve NK hücre gelişimini etkilerken, B hücre sayıları normaldir, ancak normal işlevden yoksundurlar. IL-7a reseptöründeki mutasyonlar, timusta T hücre gelişiminin durmasına neden olur, ancak B hücre ve NK hücre gelişimi korunmaktadır.

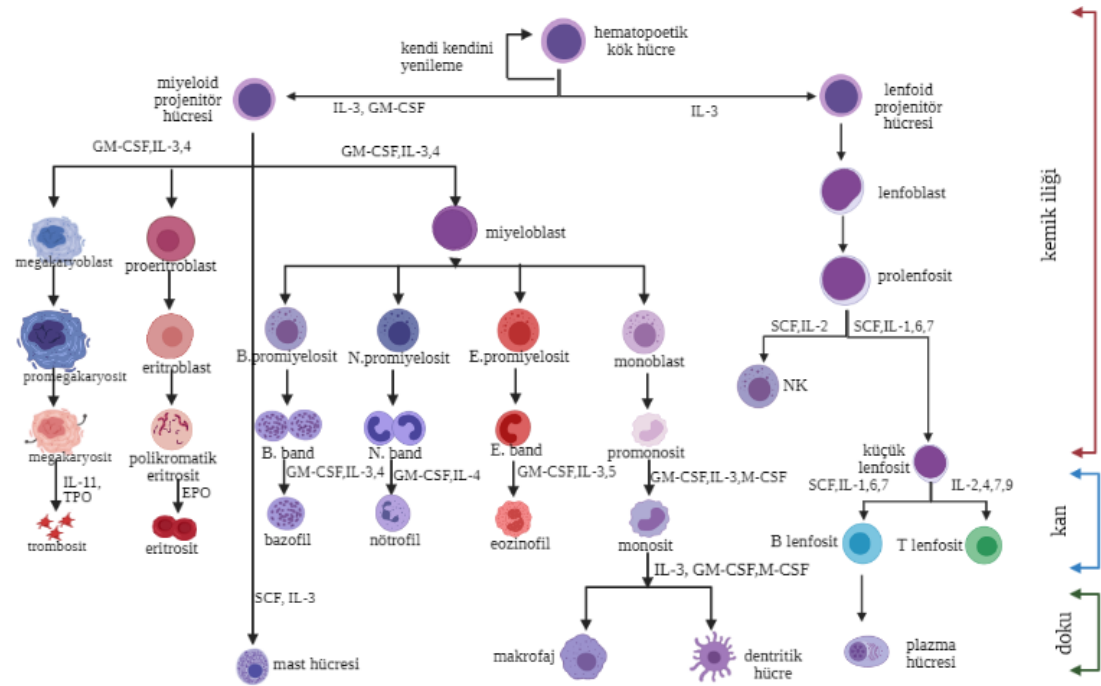
2.3. Rag2 Fare modeli

Rag2 fare modelinde, 1992 yılında Shinkai ve ark. tarafından C57BL/6 ve MFl farelerden Rag2 kodlama bölgesinin büyük bir bölümünün silindiği yeni bir germ hattı mutasyonu taşıyan fareler üretilmiştir. Bu fare suşunun inaktive edilmiş Rag2 genine sahip olmasından dolayı homozigot fareler V(D)J yeniden düzenlemesini başlatamaz ve sonuç olarak olgun T ve B lenfositlerini üretemezler ancak NK hücrelerini az da olsa üretebilmektedir(26). Bu nedenlerle bu fare modeli, transplantasyon deneylerinde ve hematopoez araştırmalarında kullanılmaktadır.

2.4. Hematopoetik Kök Hücre Nakli ve Gen Tedavi

2.4.1. Hematopoetik Kök Hücre Nakli

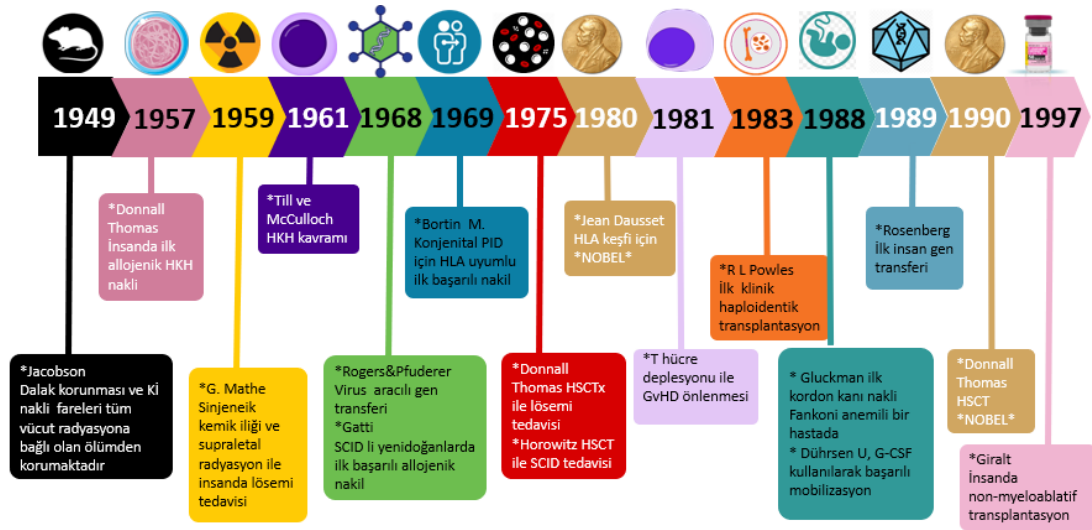
HKH kendi kendini yenileme özelliği olan ve tüm kan hücresi soylarını oluşturabilen multipotent hücrelerdir (27). HKH'ler, miyeloid ve lenfoid hatlarda farklı kan hücrelerini üretmektedirler. Miyeloid hücreler monositler, makrofajlar, nötrofiller, bazofiller, eozinofiller eritrositler, megakaryositlerden; Lenfoid hücreler ise T ve B hücreleri ile doğal öldürücü (NK) hücrelerden oluşmaktadır (28-30). Hematopoez süreci, kan hücrelerinin genetik süreçleri ile çevreleri arasında karmaşık bir etkileşimi içermektedir. Bu etkileşim, HKH'lerin, progenitörlerin ve olgun kan hücrelerinin hareketsiz kalmasını, çoğalmasını, farklılaşmasını, kendini yenilemesini veya apoptoza uğramasını belirlemektedir (31) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Hematopoez şeması. Hematopoez şeması (32, 33)'ten uyarlanarak yapılmıştır. GM-CSF: Granulosit-Makrofaj koloni uyarıcı faktör, G-CSF: Granulosit koloni uyarıcı faktör, TPO: Trombopoetin, EPO: Eritropoetin, SCF: Stem cell factor, IL-2: İnterlökin 2, IL-3: İnterlökin 3, IL-5: İnterlökin 5, IL-6: İnterlökin 6, IL-7: İnterlökin 7, IL-9: İnterlökin 9, IL-11: İnterlökin 11.

Hematopoez yaşam boyunca farklı organlarda gerçekleşmektedir. Fetal dönemin başlarında, yolk sac ve aort-gonad-mezonefroz (AGM), daha sonra karaciğer, dalak ve son olarak da Kİ'nde sürdürülmektedir. Yetişkinlerde kemik iliği yaşam boyunca devam etmektedir. Bazı patolojik durumlarda tekrar ekstramedüller organlarda hematopoez gerçekleşebilmektedir (34). Yetişkinlerde HKH'ler özellikle kalça, omurga ve sternum Kİ'nden, göbek kordon kanı (GKK)'ndan ve mobilize edilen periferik kan (PK)'dan izole edilebilmektedir (35).

HKH nakli (HKHN), işlevsiz veya aplastik Kİ hastalıklarında, tüm hematopoezin ve bağışıklık sisteminin sağlıklı donör hücrelerinin HKH'leri ile değiştirilmesi işlemidir (36, 37). HKHN, Kİ işlevini artırmak ve tedavi edilen hastalığa bağlı olarak, malignitelere tümör hücrelerini yok etmeye, hemoglobinopatiler gibi malign olmayan hastalıklarda işlevsiz hücrelerin yerini alabilecek işlevsel hücreler oluşturmaya izin vermektedir (37). HKHN'nin tarihsel gelişimi (Şekil.2.5'te) gösterilmiştir. HKHN allojenik ve otolog olarak gerçekleştirilmektedir. Otolog HKHN, nakilden önce hastadan toplanan HKH'lerin dondurulup, miyeloablasyon ve/veya uygulanan tedaviden sonra hastaya geri nakil edilmektedir. Allojenik HKHN'de ise sağlıklı bir donörden alınan Majör Histokompatibilite Kompleksi (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) ve insanlarda insan lökosit antijeni (*Human Leukocyte Antigen*, HLA) olarak bilinen uyumlu HKH'ler kullanılmaktadır (38). Uygun aile içi veya aile dışı donör mevcut olmadığında, bazı kalıtsal hastalıklar için otolog HKH'ler gen tedavi çalışmaları kapsamında kullanılabilir. Bu hastalarda alojenik nakillerde görülebilen GvHD benzeri yan etkileri rastlanmamaktadır.

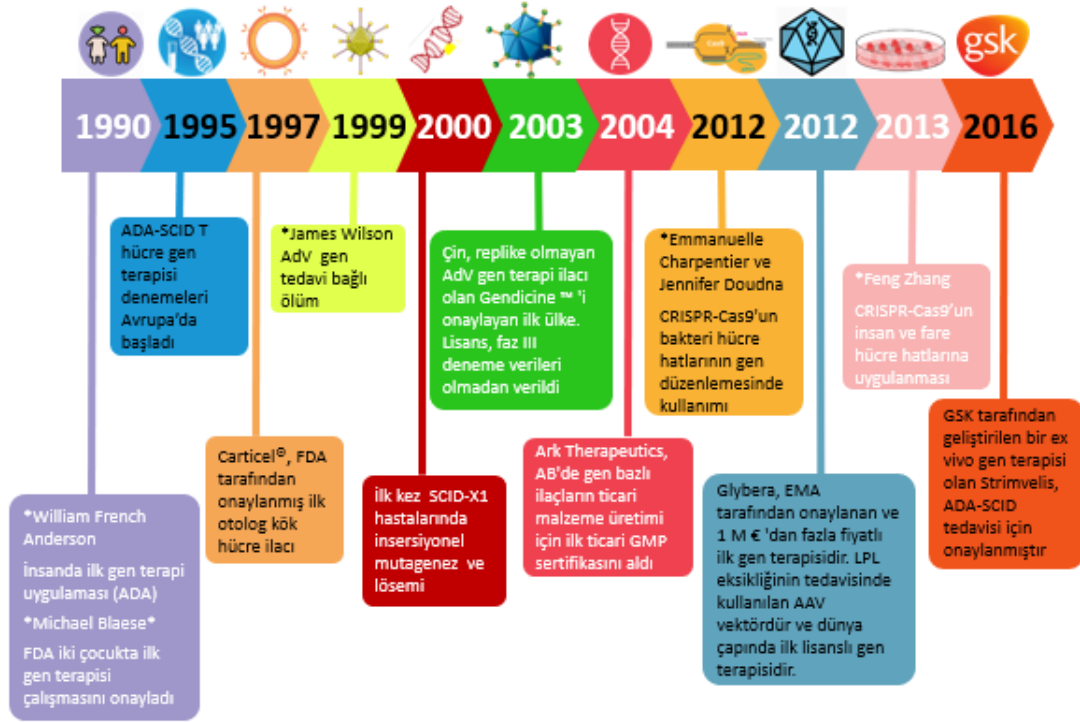


Şekil 2.5. HKH naklinin tarihsel gelişimi (39-41)'den uyarlanmıştır.

2.4.2. Monoetik Gen Tedavi

Monogenetik gen tedavisi, genetik hastalıkların iyileştirilmesi/tamir edilmesi/destek olması amacıyla biyolojik vektörler, fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılarak eksik veya yanlış protein üretilmesine sebep olan, hatalı genleri bulunduran hücreye normal genin eklenmesi veya düzeltilmesidir (42). Gen tedavi ile ilgili ilk çalışmalar 1966 yılında E.L. Tatum tarafından, virüslerin somatik hücre genetiğinde ve genetik terapide kullanılabileceği fikri ile başlamıştır (43). Rogers ve ark. 1968 de virüs aracılı gen transferini ilk kez kanıtlamışlardır (44). Gen tedavisindeki önemli tarihsel gelişmeler Şekil.2.6'da sunulmuştur. Gen tedavisi birçok kişi tarafından tıpta potansiyel bir devrim olarak kabul edilmektedir. Bunun nedeni, gen terapilerinin hastalığın nedenlerini tedavi etmeyi veya ortadan kaldırmayı hedeflerken, mevcut ilaçların çoğunun semptomatik olmasıdır (45).

HKH gen tedavisi (HKH-GTx), AKİY dahil olmak üzere bazı kalıtsal hastalıklar için terapötik bir seçenek olarak başarıyla kullanılmaktadır (46). Gen tedavisinin amacı; insersiyon, gen değişimi, gen ifadesinin baskılanması ve gen ifadesinin yeniden veya daha yüksek seviyelerde sağlanmasıdır (47).



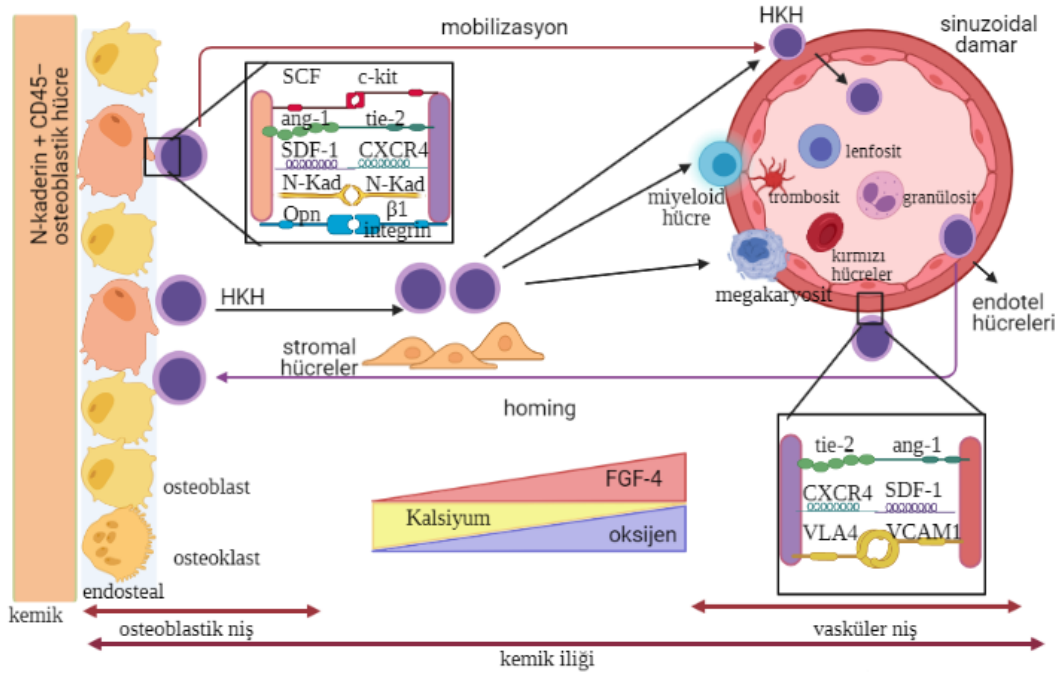
Şekil 2.6. Gen tedavisindeki önemli tarihsel gelişmeler (48-50)'ten uyarlanmıştır.

HKH'ler uzun ömürlü ve çok yönlü olması, erişim kolaylığı, *ex vivo* gen manipülasyonu yapılabilmesi nedeniyle gen tedavisi için ideal bir hedef olmuştur (51). Uyumlu donörler bulunmadığında, hastanın kendi HKH'leri kullanılarak olog HKH-GTx yapılabilir. Böylelikle GvHD veya diğer bağışıklık komplikasyonları gibi olumsuz olaylar yaşanması önlenmiş olacaktır (52).

2.5. Kemik İliği Nişi, Mobilizasyon, Homing ve Engraftman

Kemik, vücudun yapısında, korunmasında ve hareketinde önemli bir rol oynar. Memelilerde kemik, farklı gelişim aşamalarındaki kemik hücrelerinden (pre-osteoblastlar, osteoblastlar ve osteositler dahil), kollajen fibrillerden ve kalsiyum ve fosfat gibi mineral birikintilerinden oluşmaktadır (53). Kemik boşluğu yumuşak Kİ ve kan sinüsleriyle doludur. Kemik boşluğu içinde gelişen HKH'ler, olgunlaşarak ve vasküler sisteme salınana kadar Kİ'de tutulmaktadır. Kemik iliği nişi, HKH'lerin kendini yenileme, mobilizasyon, engraftman ve farklılaşması dahil olmak üzere birçok kök hücre aktivitesini düzenleyen, 1978'de ilk defa Schofield tarafından tanımlanan bir mikroçevredir (54, 55). Kİ nişi; HKH'ler, damarlar, stromal hücreler, ekstraselüler

matriks proteinleri, sitokinler, nöral inputlar ve endotel hücreler gibi diğer fonksiyonel unsurları içeren karmaşık bileşenlerden oluşmaktadır (56, 57). Kİ’ndeki HKH’lerin içinde bulunduğu özelleşmiş bölgeler osteoblastik niş ve vasküler niş olarak sınıflandırılmıştır (58, 59). HKH’ler, endosteal osteoblast niş tarafından sessizliğin devamını; vasküler niş ise HKH’lerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve mobilizasyonunu düzenlemektedir (59). Osteoblastik nişte tutulan HKH’lerden türetilen hematopoietik progenitör hücre (HPH)’ler, vasküler nişte kalmak için endotel hücrelere nüfuz eder, daha sonra çeşitli kan hücrelerine farklılaşarak dolaşıma katılmaktadır (60) (Şekil 2.7)



Şekil 2.7. Kemik iliği nişi (55, 61)'tan uyarlanarak çizilmiştir. Normal fizyolojik koşullar altında, HKH'ler ya osteoblastik ya da vasküler niş içinde bulunur. Endosteal kemik yüzeyleri stromal hücrelerle kaplıdır. İğ şeklindeki N-kaderin eksprese eden osteoblastlar, HKH sessizliğini koruyarak farklılaşmasını önlerler. Endosteal niş, sessiz haldeki HKH'leri uzun vadede korumaktadır. Sessiz haldeki HKH'ler aktive olduğunda vasküler nişe mobilizasyon yapabilmektedir. Kİ'deki SDF-1, ang1, N-kad, opn ve SCF seviyelerindeki değişikliklere yanıt olarak HKH'ler harekete geçmeye ve dolaşıma girmeye başlamaktadır. Vasküler niş, mobilizasyon veya homing sırasında HKH transendotelial geçişini kolaylaştırmaktadır. Aynı zamanda HKH proliferasyonunu ve farklılaşmasını destekleyebilmektedir. Hücreler osteoblastik nişten vasküler nişe doğru ilerledikçe daha yüksek FGF-4, düşük kalsiyum ve yüksek oksijen konsantrasyonu, HKH'lerin çoğalması ve farklılaşmasında rol oynayabilmektedir.

2.6. Hazırlık Rejimleri

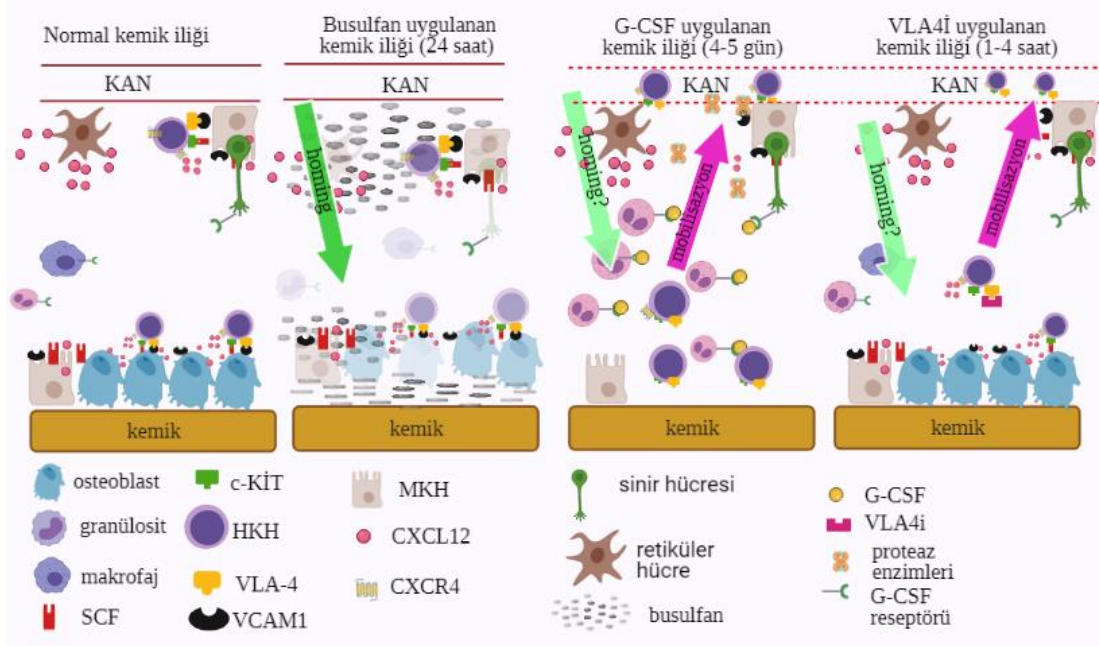
HKH naklinde kök hücrelerin Kİ'nde yerleşmesi ve engraftman göstermesi için çeşitli hazırlık rejimleri uygulanmaktadır. Hazırlık rejimleri; miyeloablatif, miyeloablatif olmayan ve daha hafif olan azaltılmış yoğunluk (RIC) rejimleri olarak sınıflandırılmaktadır. Miyeloablatif rejim; Kİ nakli için en eski hazırlık rejimidir ve yüksek dozda kemoterapi ilaçları (Busulfan, Siklofosamid, Fludaribin vb) ve/veya radyasyon kullanımını içermektedir (62, 63). Miyeloablatif olmayan rejimlerin hedefleri; kanser hücrelerinin yok edilmesi başta olmak üzere, alıcının immün sisteminin baskılanması ve donör immün hücrelerinin engraftmanının sağlanması için kullanılmaktadır (64). RIC rejimlerinde daha düşük kemoterapi ve radyasyon dozları kullanılmaktadır. RIC'in kullanılmasının asıl amacı, nakil ile ilgili komplikasyonları, toksisiteyi ve mortaliteyi azaltılmasıdır (65). Ototolog HKH-GTx hazırlık rejimi; 1) nakledilen graftın reddedilmesini önlemek ve 2) Kİ'nde yer açmak amacıyla yapılmaktadır (66). Hazırlık rejimleri olmadığında RAG2 eksikliği için yapılan HKHN'de yüksek oranda greft reddi görülmektedir (29). Bunun nedeni Kİ ve timus nişlerinin boş olmadığı, mutasyona uğramış progenitor hücrelerin donör kaynaklı hücrelerle rekabet etmesi olarak düşünülmektedir. NK hücreleri de greft reddinde rol alabilmektedir. Bağışıklık, doğru ve dayanıklı kök hücre engraftmanının yokluğunda, hazırlık rejimsiz HKHTx'den sonra lenfoid progenitor hücreler tarafından sağlamaktadır (67). Kemoterapilerde kullanılan alkilleyici ajanlar gibi kimyasalların birden çok yan etkileri olduğu için biz çalışmamızda mobilize edici ajan olan ve alıcıda geçici ve önemli olmayan yan etki gösteren G-CSF (örn. kullanım sırasında kemik ağrısı, yorgunluk ve bulantı gibi) (68) ve VLA-4I (klinik faz çalışmalarında ve fare modellerinde sadece geçici lenfositöz görülmüştür) (68) kullanılması planlanmıştır.

G-CSF, miyeloid progenitor hücrelerin, granülositlerin (özellikle nötrofillere) hem proliferasyonunu hem de farklılaşmasını kontrol eden ana büyüme faktörüdür (69). Fare kaynaklı G-CSF ilk kez 1983'te tanınmış ve saflaştırılmıştır. G-CSF'in insan formu ise 1986'da klonlanmıştır (70-72). G-CSF; Kİ'ni, granülositler ve kök hücreler üretmesi ve kan dolaşımına salması, nötrofil öncüllerinin ve olgun nötrofillerin hayatta kalması, proliferasyonu ve farklılaşması için uyaran bir glikoproteindir (73, 74). G-CSF, kemik iliği stromal hücreleri, endotelial hücreler, makrofajlar, fibroblastlar,

erken miyeloid progenitörler, olgun granüositler ve monositler/makrofajların yanı sıra endotel hücrelerinde eksprese edilmektedir ve G-CSF reseptörü (G-CSFR) aracılığıyla etki etmektedir (75). G-CSF üretimi enflamatuar uyaranlar tarafından indüklenebilir. G-CSF ilk kez 1993'te HKH mobilizasyonu için kullanılmıştır (76). G-CSF ile indüklenen HKH mobilizasyonu, birkaç mekanizmanın aracılık ettiği karmaşık bir biyolojik süreç olduğundan HKH'lerin Kİ'nden PK'a çıkmazı ortalama 3-5 gün almaktadır (77). G-CSF, HKH'lerin Kİ nişindeki adezyon ve kemoatraktan moleküllerin arasındaki bağların (VLA-4/VCAM-1, CXCL12/CXCR4 ve c-kit/scf) parçalayan proteazların (nötrofil elastaz, kathepsin G ve MMP-9) üretimini indüklemektedir ve böylece HKH mobilizasyonu sağlamaktadır (78, 79). Aynı zamanda, HKH'lerin nişte tutunmasında sorumlu olan osteoblastların bağlantılarının kesilmesinde G-CSF'in etkili olduğu bilinmektedir (80). G-CSF uygulamasından sonra olgun osteoblastların sayılarında yaygın indüklenmiş apoptoz nedeniyle bir düşüş tespit edilmekte. Aynı zamanda osteoklastik aktivitede görülen artış ile birlikte HKH mobilizasyonu görülmektedir (81). Sempatik sinir sisteminin genetik veya farmakolojik yollarla bozulduğu farelerde G-CSF ile indüklenen mobilizasyon ciddi şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (57, 82), bu da G-CSF aracılı HKH mobilizasyonunda sinir sisteminin aktif bir rolü olduğunu göstermektedir. Hem $\beta 2$ hem de $\beta 3$ -adrenerjik reseptörlerin bu süreçte iş birliği yaptığı gösterilmiştir (83-85). G-CSF, transplantasyon ve diğer klinik amaçlar için HKH toplanması sırasında, tek başına veya kemoterapi ile birlikte uygulanan en yaygın mobilizasyon ajanı olarak kullanılmaktadır (86).

VLA4, ($\alpha 4\beta 1$ integrin), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ile birlikte HKH progenitörlerinin Kİ stromal hücrelerine sabitlenmesinde, Kİ ve periferal bölgeler arasındaki HKH trafiğinin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (87, 88). VLA-4, kök hücrelerin, progenitör hücrelerin, T, B ve NK hücrelerinin, monositlerin, eozinofillerin ve nötrofillerin yüzeylerinde ifade edilmektedir (68, 89, 90). VLA-4, lökositler, kemotaktik ajanlar veya diğer uyaranlar (genellikle yaralanma bölgesindeki endotelium veya diğer hücreler tarafından üretilir) tarafından aktive edilinceye kadar uygun ligandlarına yapışmazlar. VLA-4'ün birincil ligandları arasında VCAM-1 ve fibronektin bulunmaktadır (91). VLA-4, HKH ve HPH'lerde bulunmaktadır. Bu hücreler, üretildikleri yer olan Kİ'nde ve vücudun geri kalanında bulunmaktadır. VLA-4, özellikle alfa alt birimi, progenitör hücrelerin lokalizasyonu ve dolaşımında

önemli rol oynamaktadır. Farelerde, enjekte edilen anti-alfa antikörlerinin progenitör hücre dolaşımında ve süresinde bir artışa neden olduğu gösterilmiştir (90). VLA-4I, insan, fare ve sıçanlarda $\alpha 4\beta 1$ integrininin hem aktive edilmemiş hem de aktive edilmiş formları için güçlü, oldukça seçici ve yüksek afinite ile bağlanabilen küçük molekül inhibitörü olduğu gösterilmiştir (92). VLA-4I kullanılan çalışmalarda VCAM-1/ VLA-4 bağlantısının kesilmesine takiben HKH/HPH'lerinin periferik dolaşıma hızla salındığı (birkaç saat) ve etkisinin yaklaşık 10 güne kadar devam edebildiği gözlemlenmiş, bu etkileşimin HKH/HPH mobilizasyonu için diğer mobilizasyon yöntemlerinden bağımsız alternatif bir yol izlediği gösterilmiştir (88, 93). Böylelikle VLA-4I ile birlikte diğer mobilizasyon yöntemlerinin kullanılabilceği gösterilmiştir. Kİ nişinde VLA-4/VCAM-1 bağlantıları VLA-4I kullanılarak kesilebilerek çok kısa sürede HKH mobilizasyonu sağlanabilmektedir (68, 93). Fareler ve primatlar ile yapılan çalışmalar, anti-VLA-4 uygulanmasının veya ligandlarının bloke edilmesinin güçlü bir mobilizasyon etkisine yol açtığını göstermiştir (94, 95). VLA-4I bağlı olarak görülen yan etkileri arasında sadece geçici lenfositoz bildirilmiştir. Busulfan, VLA-4I ve G-CSF'nin Kİ nişinde birbirinden farklı etki mekanizmaları Şekil.2.8'de özetlenmiştir.



Şekil 2. 8. Busulfan, VLA-4I ve G-CSF'nin kemik iliği nişinde etki mekanizması (55, 68)'den uyarlanarak çizilmiştir. Busulfan Kİ nişinde miyeloablasyon yaparak Kİ nişinde yer açmaktadır. G-CSF, G-CSF resptörüne bağlanarak granülosit sayısını artırır ve kemik iliği permeabilizasyonu sağlayarak HKH mobilizasyonunu sağlamaktadır. VLA-4I kullanılarak Kİ nişinde VLA4/VCAM-1 bağlantıları kesilebilmektedir böylece HKH mobilizasyonu sağlanabilmektedir

2.7. Retroviral ve Lentiviral Vektörler

Retrovirüsler; yapısal, kompozisyon ve replikatif özelliklerinden dolayı zarflı RNA virüs ailesine aittir (96). Virionların çapı 80-100 nm'dir ve dış lipid zarfları viral glikoproteinleri içermektedir. Virion RNA'sı 7-12 kb boyutundadır ve doğrusal, tek sarmallı, bölümlere ayrılmamış ve pozitif polariteye sahiptir. Retrovirüsler, virion RNA'nın lineer çift sarmallı DNA'ya ters transkripsiyonu ve bu DNA'nın daha sonra hücrenin genomuna entegrasyonu ile replikasyon sağlamaktadır (97, 98). Tüm retrovirüsler, virion proteinleri için bilgi içeren üç ana kodlama bölgesi içermektedir 1) matriks, kapsid ve nükleoprotein yapılarını oluşturan dahili virion proteinlerinin sentezini yöneten *gag*, 2) ters transkriptaz ve integraz enzimleri için bilgi içeren *pol*; ve 3) viral zarf proteininin yüzey ve zar-ötesi bileşenlerinin türetildiği *env*'dir (99, 100). Retroviral vektör teknolojisi, geçmişte entegrasyon sağlayan gen terapisinde gen transferi için en yaygın kullanılan yöntemdir (101). Monogenetik, kalıtsal hastalıklarının gen terapisinde retrovirüslerin, tercih edilmesinin sebebi; kararlı bir şekilde genoma entegre etmesidir (102). Retrovirüslerin mutagenез riskin mevcut

olması (103), düşük titrasyonda elde edilmesi, sadece bölünen hücelere entegre olması ve replikasyon yetkinlikli virüs partikülleri oluşturması gibi önemli dezavantajları vardır (104). Replikasyon yetkinlikli virüs partikülü üretmeyi engellemek için *gag*, *pol* ve *env* genleri ayrı plazmitler kullanılarak önlenilmektedir (105, 106). Retroviral vektör üretimi için bu ayrı ayrı paketleme sistemi hücrelerinin güvenliği önemli ölçüde artırmıştır (105, 107).

İnsan İmmün yetmezlik Virüs Tip1 (*Human Immunodeficiency Virus Type-I*, HIV Tip-1) **lentivirüs** (LV) olarak bilinir ve *retroviridae* ailesi üyesidir. LV'ler genetik materyal olarak 7-10 kb uzunluğunda iki identik tek RNA zinciri içermektedirler. Kendilerine ait ters transkriptaz (*reverse transcriptase*, *RT*) enzimleri vardır. Bu enzim genetik materyalleri olan RNA'dan konakçı hücre içinde cDNA (*complementary DNA*, cDNA) sentezi yapmayı sağlamaktadır. Bu sayede cDNA çekirdek içine girerek ve entegraz (*integrase*) enzimi ile genoma entegre olur (108, 109). HIV-1'den tasarlanan LV vektörlerinde HIV patojenitesinden sorumlu olan tüm gen dizileri silinmiştir ve sadece *gag*, *pol* ve *rev* genleri bırakılmıştır. Biyogüvenlik açısından, “uzun terminal tekrarlarının (*Long Terminal Repeats*, LTR) regülasyon elementleri silinerek kendini inaktive eden vektör (self-inactivating vector)” elde edilmiştir (110, 111). Promotörler, genin transkripsiyon başlangıç bölgesinde transkripsiyon faktörlerinin öncesinde bulunan ve RNA polimerazın bağlandığı DNA bölgesidir. RNA polimeraz, DNA'yı fonksiyonel bir proteine çevrilen mRNA'ya kopyalanması sağlamaktadır. Böylelikle promotör bölge, ilgilenilen genin organizmada ne zaman ve nerede ifade edileceğini kontrol etmektedir (112, 113). UCOE (*ubiquitous chromatin opening element*) promotörü, orta seviye gen ifadesi sağlayan, devamlı aktif olan bir promotördür. Bu promotörün özelliği susturulmaya karşı dirençli olmasıdır (114). SFFV (*spleen focus forming virüs*), devamlı aktif olan, güçlü bir promotördür. Genetik modifiye edilen hücrelerde H yüksek seviyede gen ifadesi sağlması için kullanılmaktadır.(115). LV vektörler hem bölünen hem de bölünmeyen hücrelerde genoma kalıcı entegrasyon sağlayabilmektedir. LV vektörlerin yukarıda bahsedilen retroviral vektörlerde gözlemlenen insersiyonel mutagenез riski çok daha düşük olduğu için entegrasyon gereken gen tedavilerde tercih edilmektedir (116, 117). Bu çalışmada UCOE ve SF promotörleri kullanılmıştır.

2.8. Araştırma Sorusu ve Hipotezi

Günümüzde RAG2^{-/-} AKİY'in tek küratif tedavisi HKH naklidir (6). Uygun donör bulunmadığında, bu hastaların başka bir tedavi seçeneği yoktur. Şimdiye kadar ADA- AKİY ve X- AKİY gibi, en sık görülen AKİY'ler için başarılı retroviral veya lentiviral HKH-GTx'ler geliştirilmiştir. Ancak, RAG2- AKİY hastalıkları için LV HKH-GTx henüz klinik aşamalara gelinememiştir. Bunun nedeni, *in vitro* HKH'lerde LV transdüksiyon koşullarının tam optimize edilmemiş olması ve bundan dolayı *in vivo* hayvan deneylerinde düzeltilen RAG2 nakavt HKH'lerin yetersiz engraftmana ve denksiz B hücre immün rekonstitüsyonuna/aktivasyonuna bağlı olarak otoimmün benzeri semptomların ortaya çıkmasıdır.

Hazırlık rejiminde kullanılan sitotoksik ilaçlar hastalara zarar verebilir, ancak hazırlık rejimi uygulanmadan HKH nakli yapıldığında immün sistemin rekonstitüsyonu ve engraftmanı yetersiz olabilmektedir (13). Bu nedenle yeterli engraftmanı sağlayan, ancak minimal toksisite veren yeni hazırlık rejimi protokollerinin geliştirilmesine gerek duyulmaktadır. G-CSF ve VLA-4I hastaya zarar vermeden Kİ permeabilizasyonu ve HKH mobilizasyonunu sağlamaktadır. Bu sebeplerle, RIC yerine toksik olmayan ancak yeterli engraftman sağlayabilen G-CSF veya VLA-4I mobilize edici ajanlar kullanılarak RAG2 fare modelinde HKHN ve HKH-GT'den sonra maksimum engraftmanı sağlanması hedeflenmektedir.

Bu şekilde;

- 1) Genetik olarak düzeltilen, uzun ömürlü hematopoez sağlayabilen HKH'lerin kültür koşulları ve *ex vivo* LV transdüksiyon protokollerinin optimizasyonu yapılmış;
- 2) RAG2^{-/-} fare modelinde hazırlık rejimleri (Busulfan, BU) yerine G-CSF ve/veya VLA-4I kullanılması ile bu düzeltilmiş HKH'lerin engraftmanı sağlanmış olacaktır.
- 3) Bu optimize edilen protokollar kullanılarak RAG2 fare modelinde toksik olmayan hazırlık rejiminden sonra, LV-RAG2 konstraktları ile başarılı HKH-GTx sağlanması hedeflenmiştir.

Hedeflere ulaşıldığında, sadece RAG2 immün yetmezliği için değil diğer benzer hastalık için de yeni bir tedavi yöntemi ve süreci geliştirilmiş olacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan sağlıklı ve immün yetmezlikli fareler

Sağlıklı BALB/c fareler (n=23) Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan satın alınmıştır. Swiss fareler (n=10) Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (HÜDHAM) temin edilmiştir. BALB/c-RAG2^{-/-} (RAG2) fareler (n=38) Erasmus Üniversitesi Rotterdam, Prof. Dr. Gerard WAGEMAKER tarafından hibe edilmiştir. Tüm fare çalışmaları Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (HÜDHAM) bulunan Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (PEDİSTEM) ait laboratuvarında bireysel havalandırılmış kafeslerde (*Individually Ventilated Cages*, IVC) gerçekleştirilmiştir. Hayvan deneyleri için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alınmıştır (Karar no: 2020/06-02). Ek.1

3.2. Kemik iliği izolasyonu ve HKH seleksiyonu

Aşağıdaki *in vitro* çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmıştır. Lineaj depleksiyonu: T hücreleri, B hücreleri, monositler/makrofajlar, granülositler, eritrositler ve bunların kararlı öncüleri dahil olmak üzere olgun hematopoetik hücrelerin verimli bir şekilde tek bir süreçle uzaklaştırılması için kullanılmaktadır. Lineaj depleksiyonu için ticari olarak alınan kit (Miltenyi, kat no #130-090-858) protokolü uygulanmıştır. Tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kısaca; 1×10^7 Kİ hücresi için 40 uL MACS buffer (PBS, %0,5 BSA, 2mM EDTA), 10 uL biotin antikor kokteyli (Miltenyi, kat no #130-090-858) eklenmiştir. +4°C 15 dk inkübasyon sonrasında hücre süspansiyonu üzerine 30 uL MACS buffer ve 20 uL anti-biotin mikrobuncuk (Miltenyi, kat no #5181107680) eklenmiştir ve iyice karıştırılarak +4°C 15 dk mini rotatörde (Miltenyi, Germany) inkübe edilmiştir. Hücreler 2-3 mL MACS buffer ile 240 xg'de 5 dk yıkanmıştır. Mıknatıs BSL-II laminer akım kabin (Biolab kat no #BH-EN2004) içine alınmıştır. LS kolon (Miltenyi, kat no #130-042-401) midiMACS separatöre (Miltenyi kat no #130-042-302) takılarak 2-3 mL MACS buffer ile ıslatılmıştır. LS kolon üzerine pre-separation filtre (30 um, Miltenyi, kat no 130-041-407) yerleştirilmiştir. Hücreler LS kolondan geçirilerek toplanmıştır. İlk toplanan fraksiyon, lineaj negatif hücrelerden

(Lin-) oluşmaktadır. Miknatıstan uzaklaştırılan LS kolon ayrı bir tüpe alınmış ve 2x5 mL MACS buffer ile piston yardımıyla lineaj pozitif (Lin+) hücreler toplanmıştır. Lin- ve Lin+ hücreler Türk's boyası ile sayılarak Lin-'lerden 1×10^5 hücre FACS ve 1×10^4 hücre koloni assay için ayrılmıştır. Kalan hücrelerden CD117 seleksiyonu yapılmıştır.

CD117 seleksiyonu için anti-CD117 mikroboncuk kiti (Miltenyi, kat no #130-091-224) protokolü kullanılmıştır. 1×10^7 hücre için; 80 uL MACS buffer ve 20 uL CD117 mikroboncuk kullanılmıştır ve süspansiyonun karışması için $+4^\circ\text{C}$ 30 dk mini rotatörde (Miltenyi, kat no #130-090-753) döndürülmüştür. Hücreler 1-2 mL MACS buffer ile 240 xg 5 dk'da 2 defa yıkandıktan sonra MS kolondan (Miltenyi, kat no #130-042-201) geçirilerek toplanmıştır. İlk toplanan fraksiyon CD117- hücrelerdir. Miknatıstan uzaklaştırılan MS kolon 2x2 mL MACS buffer ile piston yardımıyla CD117+ hücreler toplanmıştır. CD117- ve CD117+ hücreler MACS buffer ile yıkanmış ve Türk's boyası ile sayılmıştır. FACS için 1×10^4 hücre ayrılmıştır, kalan hücreler kültüre alınmıştır.

3.3. İmmünofenotiplendirme

Hücreler 2 mL PBN tamponu (PBS + %0,5 BSA + %0,05 NaN_3) kullanılarak 240 xg'de, 5 dk santrifüj edilmiştir. Hücreler 2 uL anti-c-kit antikoru (CD117, BioLegend kat no #105812) ve/veya anti-sca-1 antikoru (BioLegend kat no #108116) ile 100 uL PBN+%2 NMS (normal fare serumu) içinde oda sıcaklığında karanlıkta 15 dk inkübasyondan sonra 2 defa PBN ile yıkanmıştır. 200 uL PBN eklenip BD Accuri cihazında okutulmuştur.

3.4. HKH Koloni Oluşturan Ünite (CFU) testi

Lineaj depleasyonu sonrası ayrılan 10^4 hücre 2 mL Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM Gibco kat no #21980-032) medyumuna içine koyulmuştur. CFU-GM için 300 uL süspansiyon alınıp büyüme faktörleri içeren 2,7 mL M3534 (Stem Cell Technologies, kat no #03534) içine koyulmuştur, BFU-e için 300 uL hücre süspansiyonu 0,2 mM hemin (Sigma kat no #H9039) ve 3 uL mScf alınıp eritropoetin içeren 2,4 mL M3334 (Stem Cell Technologies, kat no #03334) ile karıştırılmıştır. Küt uçlu iğne (Stem Cell Technologies kat no #28110) ve enjektör ile 35 mm'lik (BD Falcon kat no # 351008) steril petrilere 1 ml ekilmiştir. Kültürden 10-14 gün sonra

hücrelerin koloni oluşturma kapasiteleri ışık mikroskobu (Olympus CKX41) altında değerlendirilmiştir.

3.5. Lentiviral vektör üretimi

3.5.1. Hücre hatları

HEK293T hücreleri %10 FBS- HI (ısı ile inaktive edilmiş-Fetal Buzağı Serum, Life Technologies, kat no 10270-106) ve %1 Penisilin/Streptomisin (P/S, Gibco, kat no: 15140-122) içeren, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM+Glutamax, Life Technologies, kat no 31966-021) besi yeri içerisinde haftada iki kez medyum değiştirilerek çoğaltılmıştır. %70-80 doluluğa ulaşan HEK293T hücreleri lentiviral vektörlerin paketlenmesi için kullanılmıştır. HeLa hücre hattı %10 FBS-HI, %1 P/S içeren DMEM besi yerinde kültürü yapılmıştır. %70-80 doluluktaki HeLa hücreleri virüs titrasyonunu belirlemek için kullanılmıştır.

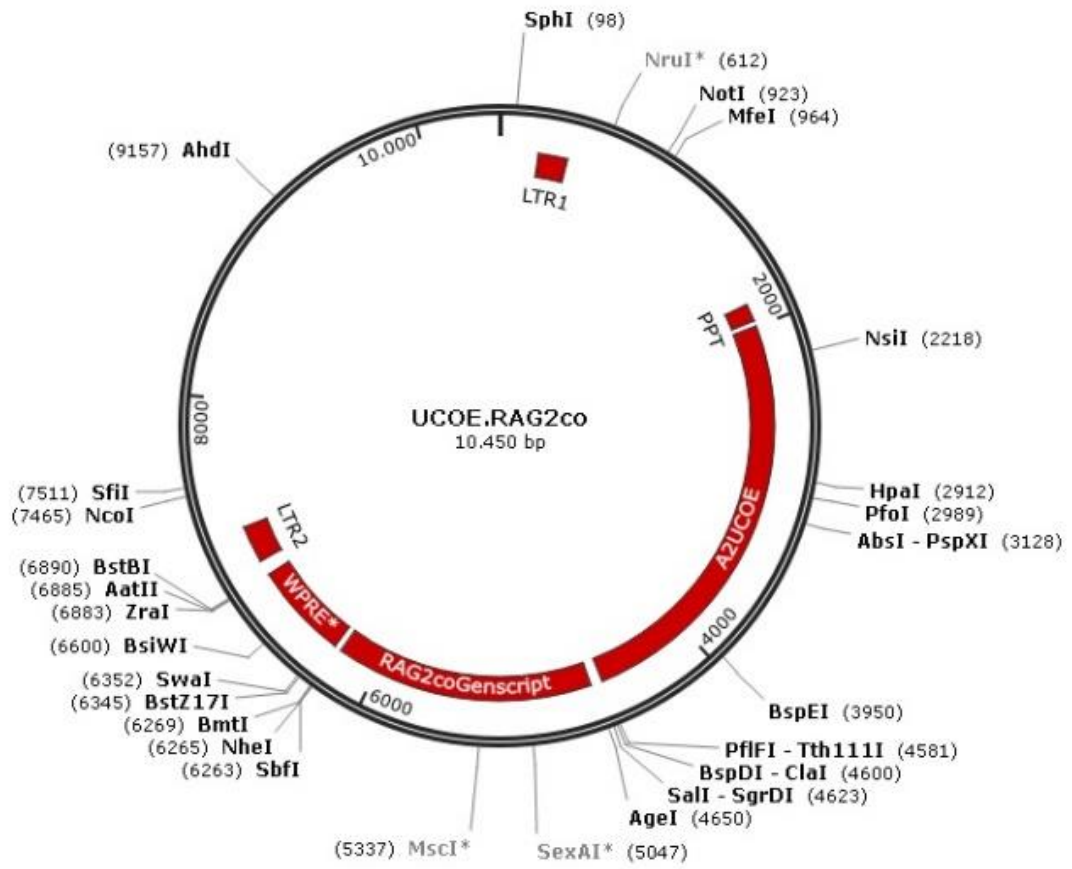
3.5.2. Stbl3 Kompetan Bakteriler

Tüm plazmitler Stbl3 kompetan bakterilerine (OneShot Stbl3, Invitrogen, Thermo Fisher, kat no #C7373-03) transforme edilmiştir. Stbl3 özellikle lentiviral ekspresyon vektörlerinde bulunan doğrudan tekrarları klonlamak için tasarlanmış bir *E. Coli* suşudur. TOP10 *E. Coli* suşunun farklı olarak, bu hücreler Lentiviral Ekspresyon Vektörlerinde ve diğer retroviral vektörlerde bulunan uzun terminal tekrarlarının homolog rekombinasyon sıklıklığını azaltır. Stbl3 hücrelerinden plazmit DNA eldesinin verimliliği genellikle TOP10 >10 kat daha yüksek olduğu için LV plazmit üretimi için tercih edilmektedir. Transformasyon için; 2,5 g maya özü (Sigma, kat no #70161), 5 g Tripton (Sigma, kat no #95039-1KG-F), 5 g Sodyum klorür (Merck, CASno: 7647-14-5) ve 7,5 g Bacto-Agar tartılıp 500 mL distile su ile çözdürülerek otoklavlanmıştır. 100 ug/mL ampisilin (Sigma, kat no #A0166) eklendikten sonra 20 mL agar/100 mm petrilere dökülmüştür. Kompetant bakteriler "L" sekline agar üzerine yayılıp, ters çevrilerek 37°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Sıvı kültürü için; Luria Bertani (LB) besiyeri kullanılmıştır: 2,5 g maya özü (Sigma, kat no #70161), 5 g Tripton (Sigma, kat no #95039-1KG-F), 5 g Sodyum klorür (Merck, CASno: 7647-14-5, lot no: K49980304847) tartılıp 500 mL distile suda

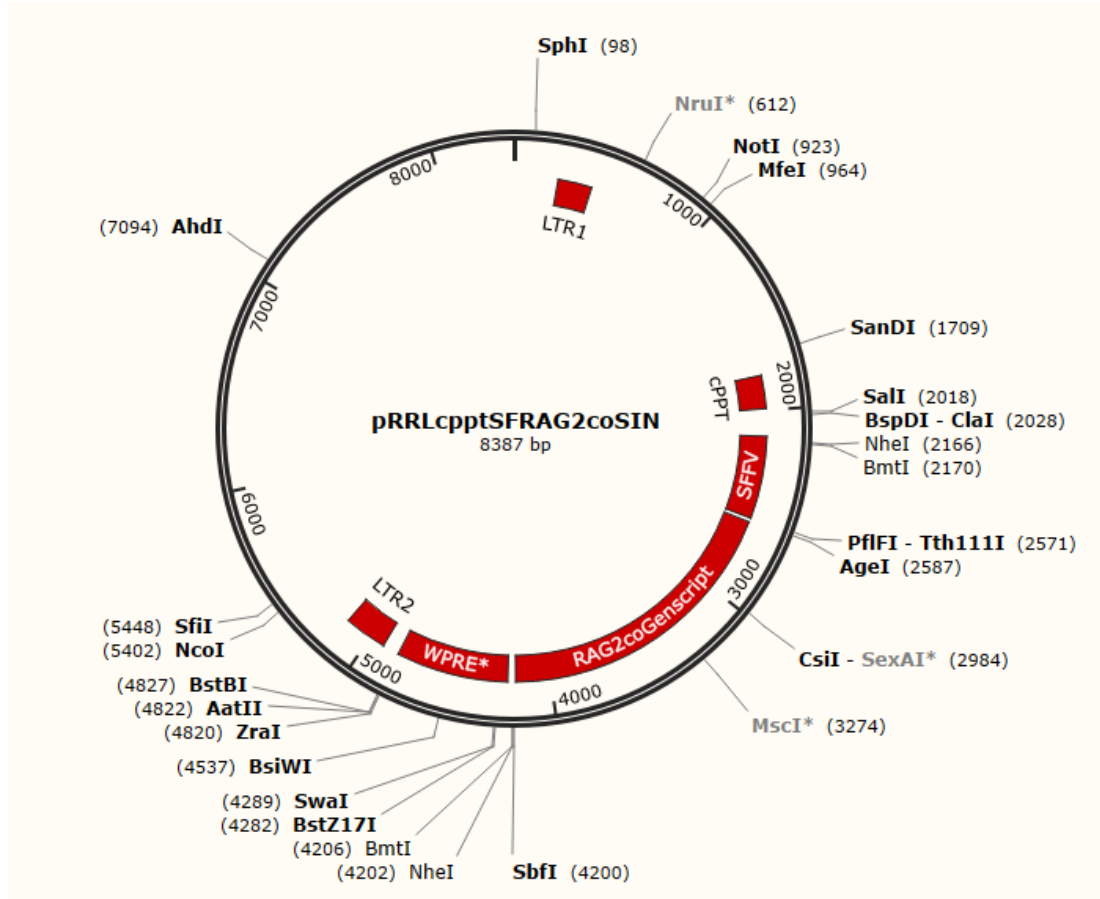
çözdürülerek otoklavlanmıştır. Hazırlanan LB medyuma 100 ug/mL Ampisilin eklenmiştir. Seçilen koloniler 5 mL sıvı besiyeri içerisinde gece boyunca 37°C'de çalkalamalı etüvde çoğaltılmıştır. Transformasyonu gerçekleştirilen plazmitlerden gliserol stok hazırlanmıştır. Gliserol stok için kısaca; çoğaltılan bakteriler 230 xg'de 15 dk 4°C'de çöktürülmüştür ve 0,5 mL 75 mM CaCl₂ ile süspansiyon edilip içerisinde 1 mL %75 gliserol eklenerek son konsantrasyonu %15 olarak ayarlanmıştır ve 200 uL olarak -80°C'de saklanmıştır.

3.5.3. Plazmitlerin İzolasyonu

Plazmit izolasyonu için Macherey-Nagel Nucleospin Easypure Miniprep (Kat no: 740727.250, lot no: 1803/004) kiti kullanılmıştır. Klonlama doğrulandıktan sonra yüksek miktarda plazmit izolasyonu için Macherey-Nagel nucleobond Xtra Maxi (kat no: 740414.100, lot: 1902/003) kiti kullanılmıştır. NanoDrop2000 cihazında 260/280 ve 260/230 nm'de spektrofotometrik olarak DNA miktarları belirlenmiştir. Bu çalışmada UCOE.RAG2co ve SF.RAG2co plazmitleri (Utrecht Üniversitesi, Doç. Dr. Niek VAN TİL tarafından hibe edilmiştir) kullanılmıştır (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2)'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. UCOE.RAG2co plazmit haritası



Şekil 3.2. SF.RAG2co plazmit haritası

3.5.4. Lentiviral vektör üretimi

HEK293T hücreleri 1 adet T-175 kültür kabında %70-80 doluluğa ulaştığında 20 mL DMEM+%10 FBS+%1 P/S (komple medyum) medyum içeren 5 ayrı 145 mm'lik petriye bölünmüştür. Ertesi gün 20 ug transfer vektör (UCOE-RAG2co veya SF-RAG2co), 5 ug NovB2 plazmiti, 7 ug zarf (pMD2-VSV.g, invitrogen kat no #PF532), 13 ug p.GAG.POL.RRE (pMDLg/p-RRE, invitrogen kat no #PF531) ve 5 ug p.REV (pRSV-REV, invitrogen kat no #PF530) plazmitlerini içeren karışım hazırlanmıştır. RAG2co transfer plazmitleri *Rous Sarcoma Virus* (RSV) kimerik promotörü içermektedir (RRL backbone). Bu plazmit ayrıca *central polypurine tract* (cPPT), UCOE promotörü ve *Woodchuck posttranslational regulatory element* (WPRE) kaseti içermektedir. Karışıma total hacmin %10'u kadar sodyum asetat eklenmiştir. Yine total hacmin 2,5 katı kadar %100 etanol eklenerek -80°C'de 4-5 saat inkübasyona bırakılmıştır. Transfeksiyondan (kalsiyum fosfat kiti, Takara bio, kat no

#631312) 3-4 saat önce HEK293T'lerin medyumları değiştirilmiştir. 4-5 saat sonra plazmit karışımı 4°C'de 14000 rpm'de (Eppendorf 5810R) 5 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılmış ve pelet her bir petri için 875 uL ddH₂O ve 125 uL kalsiyum solüsyon (2 M) karışımında çözdürülmüştür. Pelet vortekslenip, 10 dk bekletilmiştir. Karışım, her petri için 1 mL 2X HEPES buffer köpürtülerek içine damla damla eklenmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu petrilere 2 mL olacak şekilde damla damla dağıtılmış ve %5 CO₂ ile 37°C'de inkübe edilmiştir. Transfeksiyondan 18 saat sonra hücrelerin medyumları değiştirilmiştir. Ertesi gün lentiviral vektör içeren süpernatantlar toplanıp 45 um'lik filtreden geçirilmiştir. Filtre edilen viral vektör süpernatantlar SW32 rotoruna uygun 6x35 mL (Beckman Coulter kat no #326823) tüplere eşit olarak dağıtılmıştır. Süpernatantlar 20.000 rpm'de 2 saat 4°C'de santrifüjlenmiştir. Medyum süpernatantı atılmıştır ve peletler 250 uL PBS/tüp ile çözdürülerek konsantre virüsler kriyotüplere 25 uL olarak dağıtılmıştır. 24 saat sonra aynı işlem tekrarlanmıştır.

3.5.5. Vektör titrasyonu

10 uL konsantre LV-SF-Rag2co ve LV-UCOE-Rag2co virüsler 990 uL medyum içinde dilüe edilmiştir ve 6 kuyucuklu kültür kabı içerisinde bulunan 37.500 HeLa hücreleri üzerine 5 uL, 50 uL ve 500 uL hacimlerde eklenmiştir. RAG2 oranlarını belirlemek için ayrılan hücreler fiksasyon buffer (%90 MeOH) ile 20 dk boyunca oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Hücreler 1 mL bloklama buffer (%3 BSA +PBS) ile 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. 100 uL bloklama buffer içine RAG2 primer (Proteintech cat:#11825-1-AP) antikoru eklenmiştir ve oda sıcaklığında karanlıkta 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler 2 defa 1 mL PBS ile 150 xg'de 5 dk yıkanmıştır. 100 uL sekonder antikor Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit (Abcam cat: ab150077) eklenmiş ve 1 saat oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Hücreler 2 defa 1 mL PBS ile 150 xg'de 5 dk yıkanmıştır. 300 uL PBS ile resüspanse edilip FACS cihazında okutulmuştur. Titrasyon (transdüksiyon ünitesi/mL) = [enfeksiyon için kullanılan her bir kuyucuktaki hücre sayısı x raportör gen ifadesi görülen hücre oranı] / [kuyucuktaki hücreleri enfekte eden virus volümü x dilüsyon katsayısı] formülü ile hesaplanmıştır.

3.6. HKH kültürü ve transdüksiyonu

3.6.1 HKH kültür optimizasyonu

Fare $Lin^{-/-}$ hücrelerin optimal hücre kültür koşullarını belirlemek için farklı HKH büyüme faktörlerinin kombinasyonları ve konsantrasyonları test edilmiştir. $Lin^{-/-}$ hücreler (2×10^3) 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir ve insan (h) (Peprtech kat no # 300-18) veya fare (m) rekombinant TPO (10 veya 30 ng/ml, Peprtech kat no # 315-14), SCF (Peprtech kat no # 250-03), ve/veya FLT3 (Peprtech kat no # 250-31L), varlığında serumsuz HKH ekspansiyon medyumunda kültürlenmiştir. $Lin^{-/-}$ HKH'ler 2, 4 ve 7 günlük farklı sitokin kombinasyonları ve farklı kültür kapları (12 ml'lik polipropilen yuvarlık dipli tüp veya polistiren 24 kuyucuklu plaka) ile kültür edilmiştir.

HKH proliferasyon testleri

Hücre proliferasyonu, WST-1 hücre proliferasyon kiti (Roche, kat no:11 644 807 001) kullanılarak değerlendirilmiştir. WST deneyi ile formazana tetrazolyum tuzu WST-1'in mitokondriyal dehidrojenazları tarafından bölünmeye dayalı olarak kantitatif olarak hücre proliferasyonu gösterilmektedir. Formazan üretimi, kültürdeki metabolik aktif hücrelerin sayısı ile ilişkilidir. Her koşul için 3 tekrar yapılmıştır. 96 kuyucuklu kültür kabında belirli bir kültür süresinden sonra (2, 4 veya 7 gün), her bir kuyucuğa (6 kuyucuk) %10 WST-1 reaktifi eklenmiştir ve 4 saat boyunca 37°C , %5 CO_2 'de inkübe edilmiştir. Absorbansı ölçümü 450 nm dalga boyunda bir mikropilaka okuyucusunda (Tecan, İsviçre) >600 nm'lik bir referans değeriyle ölçülmüş ve hücre canlılığı hesaplanmıştır. Absorbansı normalize etmek için boş bir numune (hücresiz HKH kültür medyumunu) ölçülmüştür.

Annexin-V ve Propidium İyodür Apoptoz Analizi

Hücre apoptozunu belirlemek için farklı sitokin konsantrasyonlarıyla kültür edilen hücrelere Annexin-V FITC (Ann-V, BioLegend, kat no #640906) ve Propidium iyodür (PI, Sigma-Aldrich, kat no #P4170) kullanılarak ölçülmüştür. 100.000 hücre, 24 kuyucuklu plakalarda kültür edilmiştir. İşlemin ardından hücreler dikkatlice

toplanmıştır ve 240 xg'de 5 dakika yıkanmıştır. Hücreler, pH 7.4'te 100 mM HEPES, 140 mM NaCl, 25 mM CaCl₂'den oluşan 100 µL Annexin Bağlama Tamponu içinde yeniden süspanse edilmiştir. 5 µL Ann-V ve 5 µL PI Stok Çözeltisi (1 mg/mL) eklenmiş ve hafifçe pipetlenmiştir. Karanlıkta oda sıcaklığında 15 dk inkübasyondan sonra, her tüpe 100 µL Annexin Binding Buffer eklenmiştir ve 15 dakika sonra hücreler BD Accuri cihazında okutulmuştur.

3.6.2. HKH transdüksiyonu

CD117+ seleksiyonu sonrası hücreler 24 kuyucuklu kültür kabına 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Kültür medyumunu olarak 30 ng/mL TPO içeren StemMACS HSC ekspansiyon medyumunu (Miltenyi kat no #130-100-463) kullanılmıştır. LV-SF-Rag2co ve LV-UCOE-Rag2co MOI (*Multiplicity of Infection*):10 olarak kuyucuklara eklenmiştir. Transdüksiyonlar 2 gün art arda yapılmıştır. Virüs ve hücre kültür medyumları günlük olarak tazelenmiştir. Deney bitiminde toplanan hücreler 240 xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Hücreler Türk's boyası ile sayılmıştır ve 1×10^4 hücre LSK ve RAG2 oranı akım sitometri ile belirlenmiştir. RNA izolasyonu için hücreler Qiazol (Qiagen, kat no #79306) içine alınarak -80 °C dondurucuya kaldırılmıştır. Geri kalan hücreler nakil için kullanılmıştır.

Western Blot (WB)

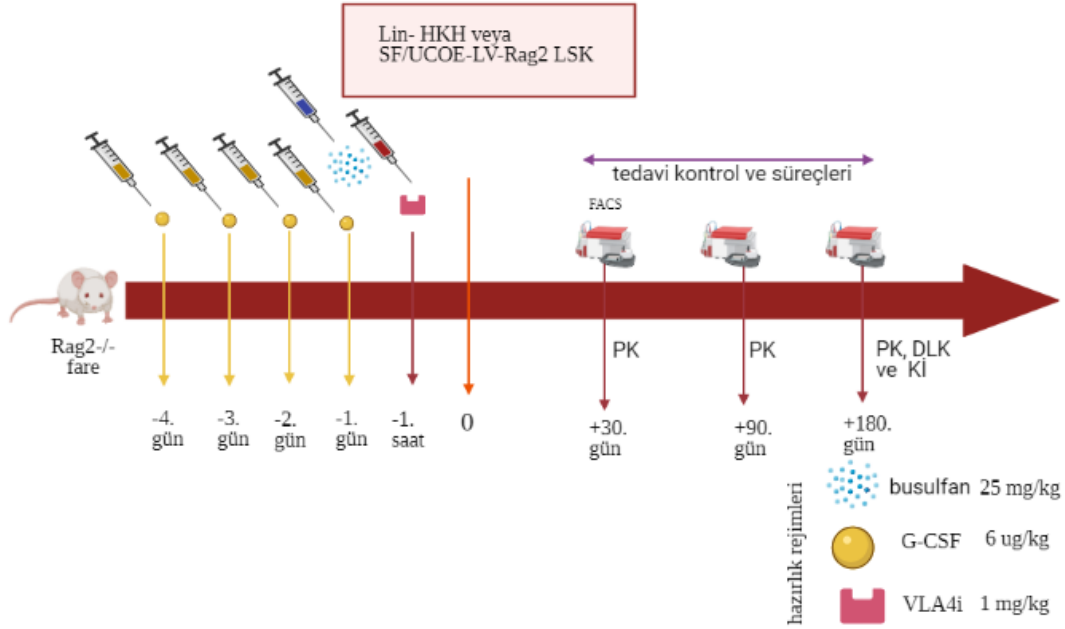
Transdüksiyon sonrası Rag2 gen ifadelerini ve proteinin (62 kDa) varlığını belirleyebilmek için WB yöntemi kullanılmıştır. Qiazol içine alınan hücreler bire bir soğuk %99 etanol (Kimetsan kat no # KMT-EL/05FS) ile iyice karıştırılmıştır. Direct-zolTM RNA izolasyon kiti (Zymo research kat no #R2050) kullanılarak, filtrede kalan fraksiyon RNA için, altta kalan fraksiyon protein izolasyonu için kullanılmıştır. Protein fraksiyonuna 4 kat kadar soğuk aseton eklenmiştir ve +4°C'de 30 dk bekletilmiştir. 16000 xg'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. 400 uL etanol eklenip, 1 dk 16000 xg'de santrifüj edilmiştir. Sonra 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Proteaz inhibitörü ve sodyum ortovanadat içeren 100 uL RİPA buffer (Radiyo immünopresipitasyon Lizis Tamponu, Santa Cruz, kat no #sc-24948A) ile pellet çözdürülmüştür. Protein miktarları BCA protein assay kit (Thermo Scientific kat no

#23227) ile Nanodrop 1000 cihazında ölçülüp hesaplanmıştır. %15 resolving jel için 10 mL (2,4 mL H₂O; 5 mL %30 akrilamid/bisakrilamid; 2,5 mL 1.5 M Tris-HCl (pH:8.8); 50 uL %10 SDS; 100 uL %10 APS; 10 uL TEMED), ve %5 stacking jel (2,7 mL H₂O; 0,67 mL %30 akrilamid/bisakrilamid; 0,63 mL 1.0 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.05 mL %10 SDS, 0.05 mL %10 APS, 5 uL TEMED) hazırlanmıştır. Örnekler NuPAGE 4x LDS sample buffer (kat no #NP007) ve NuPAGE 10x Sample Reducing agent (kat no #NP0009) eklenmiştir ve 5 dk boyunca 95°C’de PCR cihazında (termal cycler’da) kaynatılarak denatürasyonu sağlanmıştır. Rag2 protein lizatları ladder (Thermo Fisher kat no #26628) ile birlikte SDS-poliakrilamid jel elektroforezine (SDS-PAGE) yüklenmiştir. Proteinler, Tris running tampon solüsyonu (100 mM Tris-baz, 100 mM Trisin, %0,1 SDS) içerisinde 30 dk 90 V’ta, sonrasında 120 V’ta oda ısısında yürütülmüştür (BioRad,USA). Jelde yürütülen proteinler, Trans-Blot Turbo Blotting (BioRad,USA) sisteminde PVDF membrana transfer edilmiştir. Membranlar %0,1 Tween-20 içeren 1X Tris buffer solüsyonu (TBS-T) içerisinde %5 yağsız süt tozu (kat no #1706404) ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca bloklanmıştır ve 1:1000 oranındaki tavşan-anti-fare Rag2 primer antikoru (Proteintech kat no #11825-1-AP) ile gece boyunca +4°C’de inkübe edilmiştir. Sonrasında, membranlar 3 kez TBS-T içerisinde yıkayıp, 1:10000 dilüe edilmiş anti-tavşan sekonder antikor (Invitrogen kat no #11-4220-82) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilip, membranlar 3 kez TBS-T içerisinde yıkamıştır. Peroksidaz aktivitesi, Clarity Western ECL Substrat kiti (Thermo Scientific kat no #32132) ile belirlenmiştir. Gapdh antikoru (Thermo Scientific kat no #MA515738) için membran yeniden %5 yağsız süt tozu ile bloklanmıştır ve +4°C’de gece boyu beklenip, TBS-T ile 3 kez yıkayıp 1:10000 dilüe edilmiş anti-fare sekonder antikoru (Advansta kat no #R-05071-500) ile oda sıcaklığında 1,5 saat inkübe edildikten sonra ECL kiti kullanılarak FluorChem FC3 System (Protein Simple, USA) görüntülenmiştir.

3.7. Hazırlık rejimi

RAG2 farelere nakil öncesinde hazırlık rejimi uygulanmıştır. Fareler; Kontrol (PBS), Busulfan (Sigma, kat no #BCBS8240V), G-CSF (Dong-a St Co. Ltd Leucostim 30) ve VLA-4I (Selleck Chemicals kat no #S7198) olarak 4 gruba ayrılmıştır. Busulfan nakil öncesi-1. günde 25 mg/kg intraperitoneal olarak, G-CSF nakil öncesi -4,-3,-2, ve

-1. günde 6 ug/kg subkütan olarak ve VLA-4I nakil öncesi -1. günde (30-120 dk önce) 1 mg/kg intravenöz olarak verilmiştir (Şekil 3.1). PK total beyaz küre oranları hazırlık rejimi öncesi ve bitiminde (nakilden hemen önce) sayılmıştır.



Şekil 3.3. RAG2 farelere nakil öncesinde uygulanan hazırlık rejimleri. G-CSF nakilden önce 4 gün boyunca 6 ug/kg subkutan, Busulfan nakil öncesi 25mg/kg intraperitoneal ve VLA-4I nakilden 1 saat önce 1mg/kg intravenöz olarak verilmiştir. 0. gün nakil yapılmıştır. Nakilden 1. 3. ve 6. ayda tedavi kontrolleri FACS ile yapılmıştır.

3.8. HKH Nakli ve Engrafman takibi

RAG2 farelere nakil sonrası 1. ve 3. ayda periferik kanda CD45 (BioLegend kat no #147708), CD3 (BioLegend kat no #100204), CD19 (BioLegend kat no #152408), CD11b (BioLegend kat no #108706), CD45R (BioLegend kat no #103212), NK1.1 (BioLegend kat no #108706) oranlarına, 6. ayda farelerin periferik kan, dalak ve kemik iliği CD45, CD3, CD19, CD11b, CD45R, NK1.1, CD117 (c-kit) ve ly6A (Sca-1) oranlarına akım sitometri ile bakılacaktır. Nakil sonrası 1. ve 3. ayda farelerden periferik kan EDTAlı tüplere (MiniCollect® TUBE kat no #450530) alınmıştır. Alınan kanların Türk's ile absolut hücre sayısı belirlenmiştir. Kırmızı hücreleri patlatmak için liziz tampon (8.26 g Amonyum Klorür [Merck 1145], 1.0 g KHCO₃ [Merck 4854], 0.037 g EDTA [Sigma ED2SS], 1 L MilliQ su) kullanılmıştır. Hücreler 2 mL FACS

tamponu kullanılarak 240 xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir. FACS tüplerine 1. boyasız (negatif kontrol); 2. CD45, CD3 ve CD19; 3. CD11b, CD45R ve NK1.1 antikorları eklenmiştir. Hücreler tüplere eşit olarak dağıtılmıştır. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için hücreler 100 uL PBN+%2 NMS (normal fare serumu) ortamında oda sıcaklığında karanlıkta 15 dk inkübe edilmiştir. 2 defa PBN ile yıkanmıştır. 200 uL PBN eklenip BD Acurri cihazında okutulmuştur. 6. ayda kemik ve dalaklar toplanmıştır. Dalakların ağırlıkları hassas terazide (Shimadzu AUW 2000) ölçülmüştür. Dalakların ölçümü yapıldıktan sonra 50 ml konik tüp üzerine koyulan 40 µm süzgeçler (Falcon, kat no #352340) üzerinde çok az PBS ile mekanik olarak parçalanmıştır. PK, kemik iliği ve dalak hücresi 1. Boyasız; 2. CD45, CD45R ve CD11b; 3. NK1.1, CD19 ve CD3; 4. c-Kit ve Sca-1 oranları değerlendirilmiştir. Hücrelerin üzerine 100 uL PBN+%2 NMS eklenmiştir. Tüpler oda sıcaklığında karanlıkta 15 dk inkübe edilmiştir. 2 defa PBN ile yıkanmıştır. 200 uL PBN eklenip BD Acurri cihazında okutulmuştur.

3.9. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (RT-qPCR)

3.9.1. RNA İzolasyonu ve RNA Kantifikasyonu

RNA izolasyonu için kültüre alınmış olan hücreler toplanıp 240 xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Medyumun tamamen uzaklaştırılmasına dikkat edilmiştir. RNA izolasyonu yapılmadan önce hücreler 1×10^6 hücre için 1 mL Qiazol Lysis Reagent eklenerek -80 °C buzdolabına kaldırılmıştır. RNA izolasyonu için Direct-zol™ RNA izolasyon kiti (Zymo research kat no #R2050) kullanılmıştır. Qiazol içindeki hücrelere 1-1 oranında %99 soğuk etanal eklenmiştir ve iyice karıştırmıştır. Oluşan karışım Zymo-Spin™ IIICG Column2'dan 16000 xg 30 sn santrifüj edilmiştir. 400 uL RNA Wash Buffer ile 16000 xg 30 sn santrifüj edilmiştir. Kolon üzerine 5 uL DNaseI ve 75 uL DNA Digestion Buffer eklenerek oda sıcaklığında 20 dk bekletilmiştir. Daha sonra 2 defa RNA PreWash buffer ile yıkanmıştır altta toplanan kısımlar çöpe atılmıştır. Tekrar kolon üzerine 700 uL RNA Wash Buffer eklenerek santrifüj yapılmıştır. Son olarak RNA'arı toplamak için önceden 37°C ısıtılan DNase/RNase-Free su ile 16000 xg 'de 1 dk boyunca RNA'lar toplanmıştır. Elde edilen RNA'lar nanodrop (ThermoFisher Scientific #ND-100) cihazında nükleik asit programından RNA-40

seçilerek A260/280 ve A260/230 ng/ μ L RNA konsantrasyonları ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda RNA'lar kullanıma kadar -80 °C dondurucuya kaldırılmıştır.

3.9.2. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezlemek için Transcriptor high fidelity cDNA synthesis kiti (Roche, kat no #05081963001) kullanılmıştır. Bütün çalışmalar buz üzerinde yapılmıştır. cDNA sentezi için elde edilen RNA miktarları göz önüne alındığında ortalama 210 ng/uL RNA kullanılarak yapılmıştır. Toplam hacim 11,4 uL olacak şekilde PCR grade su eklenmiştir. Elde edilen örnekler 65 °C 10 dk GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) cihazı kullanılarak denature edilmiştir. Daha sonra her örnek için 1X ters transkriptaz (*reverse transkriptase*) reaksiyon tamponu, 20U Protector Rnase inhibitörü, 1 mM deoksinükleotit karışımı, 5 mM DTT ve 10U ters transkriptaz eklenmiştir. PCR tüpleri GeneAmp PCR system 9700 cihazına yerleştirilip, 29 °C 10 dk, 48 °C 60 dk, 85 °C 5 dk cDNA sentezi için ters transkripsiyon reaksiyonu başlatılmıştır. Elde edilen cDNA'lar kullanıma kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.9.3. RT-qPCR

Elde edilen cDNA; LightCycler 480 II sisteminde, LightCycler® 480 II SYBR Green I Master-Roche kiti kullanılarak RT-qPCR ile rölatif hedef gen ifadesinin saptanması için kullanılmıştır. Transdüksiyon sonrası UCOE-Rag2 hücrelerde, kontrol olarak BALB/c (pozitif) ve Rag2 (negatif) hücrelerde *Rag2* ifadesi değerlendirilmiştir. Housekeeping gen olarak *Gapdh* kullanılmıştır (Tablo 3.1). Örnekler 384 kuyucuklu plaka ile Light-Cycler 480II cihazında okutulmuştur (Roche). Bütün örneklerle ait her bir gen için aynı koşullarda üç tekrar çalışılmıştır.

Tablo 3.1. RT-PCR primer dizileri

Gen	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
Gapdh	CATCACTGCCACCCAGAAGAC	TGACCTTGCCACAGCCTTG
Rag2	ATTCAACCAGGCTTCTCACTT	TGCAGGCTTCAGTTTGAGATG

Bütün deneylere ait CT değerleri, amplifikasyon eğrileri ve diğer veriler LightCycler 480 (Roche) yazılımı ile elde edilmiştir. Verilerin istatistiksel analizi için Excel yazılımı

kullanılmıştır. *Rag2* geni, *Gapdh* geni ile ΔCT ($C_t^{\text{hedef gen}} - C_t^{\text{referans gen}}$) metodu kullanılarak normalize edilmiştir. Rölatif gen ifadelerinin hesaplamaları için $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılmıştır.

3.10. Mikoplazma Testleri

Dondurulan hücre örnekleri açıldığında mikoplazma kontaminasyonunun olup olmadığı belirlenmesi için MycoAlert (Lonza, #LT07-710) kiti kullanılmıştır. Hücre kültüründen 1 mL süpernatant alınmıştır. 200 xg'de 5 dk santrifüj edilmiştir. 100 uL süpernant üzerine 100 uL MycoAlert™ PLUS Reagent eklenip oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. Lucetta™ Luminator Lüminometre (Lonza) cihazında absorbansı ölçülmüştür (A oranı). Daha sonra 100 uL MycoAlert™ PLUS Substrate eklenip 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tekrar Lucetta™ Luminator Lüminometre cihazında absorbans ölçümü yapılmıştır (B oranı). B/A oranı <1 olduğunda sonuç negatif, B/A oranı 1-1.2 olduğunda borderline ve B/A oranı >1.2 olduğunda sonuç pozitifdir. Pozitif hücreler %10'luk çamaşır suyu ile dekontamine edilerek kimyasal atık çöpüne atılmıştır. Tüm deneyler mikoplazma negatif hücreler ile yapılmıştır.

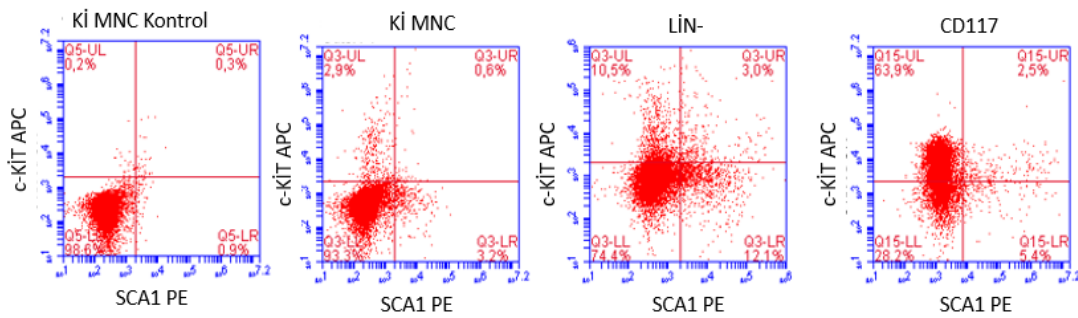
3.11. İstatistiksel Yöntemler

Çalışma sonucunda elde edilen veriler için SPSS.26, Excel yazılımı ve Graphpad Prisma 8 programlarından yararlanılmıştır. İki grup arasındaki farkları belirlemek için Student's T-testi Excel kullanılarak yapılmıştır. İki ve daha fazla grup arasındaki farkların anlamlı olup olmadığını belirlemek için SPSS 26 programından ANOVA testi kullanılmıştır. $P < 0,05$ olduğu zaman farklar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

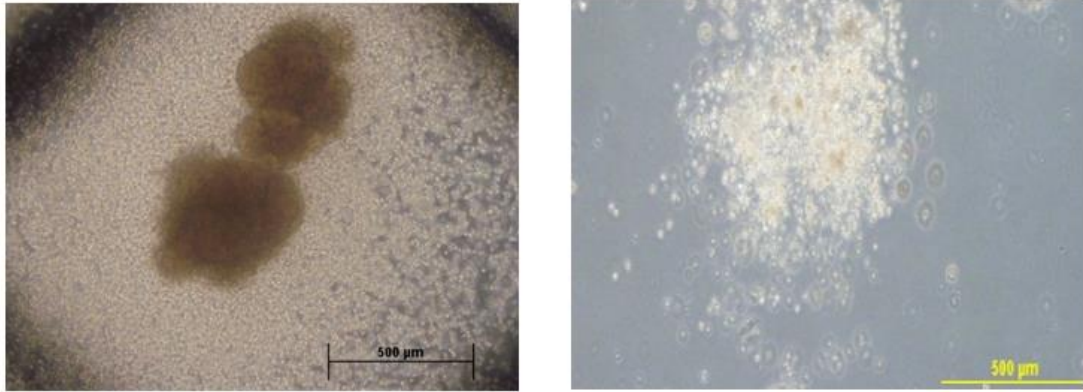
4.1. Lineaj Depleasyonu ile Fare HKH Eldesi

Lin depleasyonu genel olarak 7-8 farelerin kemik ilikleri birleştirilerek yapılmıştır. Kİ'nden $2,1 \times 10^8 \pm 1,4 \times 10^6$ başlangıç hücre sayısı elde edilmiştir. Lin- hücre sayısı $5,9 \times 10^6 \pm 3,1 \times 10^6$ olarak bulunmuştur. Başlangıçtaki hücre sayısına göre lin depleasyon başarısı $\%3,3 \pm 1,7$ olarak bulunmuştur. Lin- öncesi hücrelerdeki c-Kit ve Sca-1 oranları sırasıyla $3,7 \pm 1,6$ ve $3,9 \pm 1,1$ Lin- sonrası hücrelerdeki c-Kit ve Sca-1 oranları sırasıyla $\%9,2 \pm 3$ ve $\%7,3 \pm 6,3$ olarak hesaplanmıştır. Yüksek oranda c-Kit eldesi için CD117 mikrobuncuk kiti kullanılmıştır. c-Kit oranları pozitif seleksiyondan sonra $\%66,4$ 'e kadar yükselmiştir Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. c-Kit pozitif hücre seleksiyonu. X-aksisinde anti-fare Sca-1 antikoru, Y aksisinde anti-mouse c-Kit antikoru kullanılmıştır. Plotlar soldan sağa doğru Lin öncesi kontrol, Lin öncesi Sca-1+c-Kit, Lin- Sca-1+c-Kit ve CD117+ Sca-1+c-Kit'i göstermektedir. Lin öncesi c-Kit oranı $\%3,5$, Lin- c-Kit oranı $\%13,5$ dir. CD117 pozitif seleksiyon yapılarak c-Kit $\%66,4$ kadar yükselmiştir.

Nakil öncesi elde edilen Lin- Kİ ve pozitif seleksiyondan sonra elde edilen c-Kit + hücrelerin koloni oluşturma kapasiteleri değerlendirilmiştir. Lin- hücrelerden 1×10^3 hücrede ortalama $57,65 \pm 28,1$ CFU-GM ve $19,55 \pm 8,5$ BFU-E koloni oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. Lin^{-/-} hücrelerinin koloni oluşturma kapasitesi. Kemik iliği örneklerinin klonojenik potansiyeli görüntüleri. Solda: BFU-E (burst-forming unit-erythroid): olgun eritroid progenitörlerini temsil eden klonojenik projenitörler; Sağda: CFU-GM (colony forming unit-granulocyte/macrophage) gösterilmektedir. Görüntüler 10X büyütülmüş olarak çekilmiştir.

4.2. Nakil Grupları

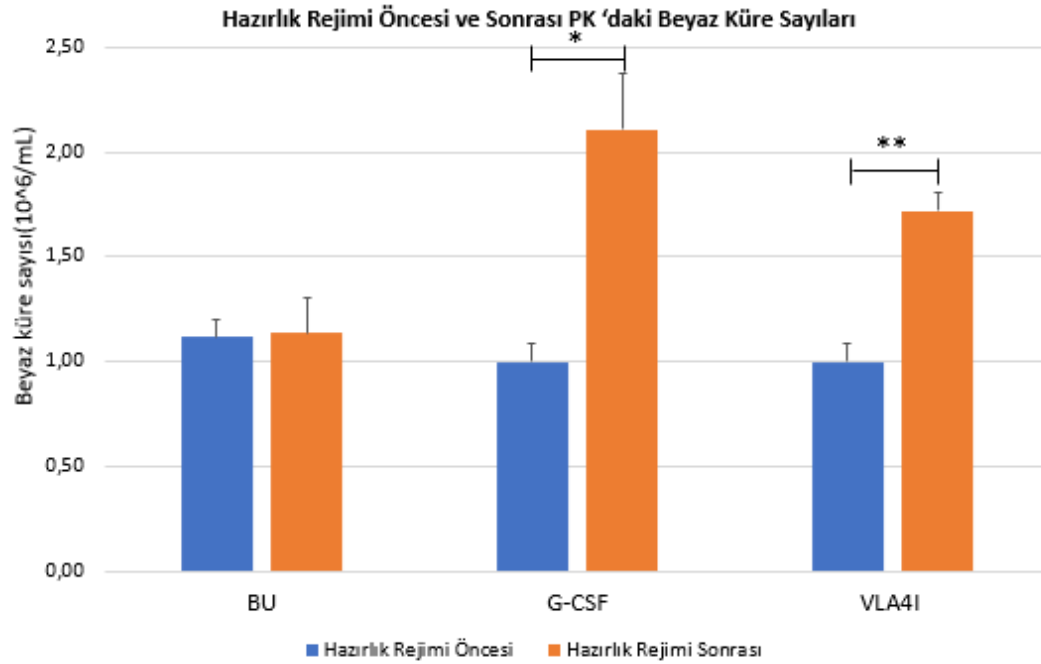
Hematopoetik kök hücre naklinin başarılı olabilmesi için, önce alıcının kemik iliğinin “boşaltılması” ve yer açılması gerekmektedir. Kemik iliğinin baskılanması için sitoredüktif ajanlar ile yapılmaktadır. Toplam 11 farklı grup RAG2^{-/-} farelere HKH nakli yapılmıştır. Grupların özellikleri aşağıdaki Tablo 4.1’de sunulmuştur.

Tablo 4.1. HKH nakil grupları

Donör	Alıcı RAG2 ^{-/-}	Hazırlık rejimi	Hücre Türü	Transdüksiyon	Hücre sayısı	Verilen c-Kit sayısı
Swiss	n=3	BU	Lin ^{-/-}	-	5x10 ⁵	2x10 ⁴
Rag2 ^{-/-}	n=3	BU	Lin ^{-/-}	LV-RAG2	1x10 ⁶	2x10 ⁴
Balb/c	n=6	BU	Lin ^{-/-}	-	1x10 ⁶	2x10 ⁴
Rag2 ^{-/-}	n=2	BU	c-Kit	UCOE-RAG2	2x10 ⁴	2x10 ⁴
Swiss	n=3	G-CSF	Lin ^{-/-}	-	1x10 ⁶	2x10 ⁴
Rag2 ^{-/-}	n=3	G-CSF	Lin ^{-/-}	LV-RAG2	1x10 ⁶	2x10 ⁴
Balb/c	n=4	G-CSF	Lin ^{-/-}	-	1x10 ⁶	2x10 ⁴
Rag2 ^{-/-}	n=2	G-CSF	c-Kit	UCOE-RAG2	2x10 ⁴	2x10 ⁴
Balb/c	n=5	VLA-4I	Lin ^{-/-}	-	1x10 ⁶	2x10 ⁴
Rag2 ^{-/-}	n=2	VLA-4I	c-Kit	UCOE-RAG2	2x10 ⁴	2x10 ⁴
Balb/c	n=5	-	Lin ^{-/-}	-	1x10 ⁶	2x10 ⁴
Balb/c	n=3	BU	c-Kit	Mock	2x10 ⁴	2x10 ⁴
Balb/c	n=3	VLA-4I	c-Kit	Mock	2x10 ⁴	2x10 ⁴

4.3. Hazırlık Rejimiyle HKH Mobilizasyonu

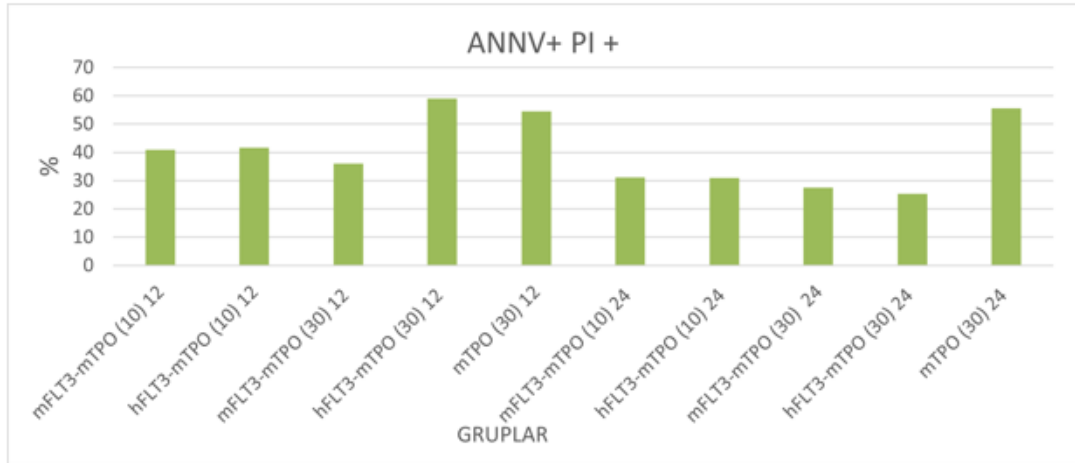
Hazırlık rejimi uygulanan farelerden öncesinde ve sonrasında PK'dan total hücre sayımı yapılmıştır. BU, G-CSF ve VLA-4I grubundaki hazırlık rejimi öncesinde ve sonrasındaki artış oranları verilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Hazırlık rejiminin öncesi ve sonrası beyaz küre sayıları. Rag2^{-/-} farelere hazırlık rejimi olarak BU (Busulfan), G-CSF (Granülosit-koloni uyarıcı faktör) ve VLA-4I (Very late antijen 4 inhibitörü) uygulanmıştır. BU grubunda hazırlık rejimi öncesi hücre sayısı $1,1 \times 10^6 \pm 0,08 \times 10^6$, hazırlık rejimi sonrasında hücre sayısı $1,1 \times 10^6 \pm 0,17 \times 10^6$ 'tir. G-CSF grubunda hazırlık rejimi öncesinde $1,0 \times 10^6 \pm 0,08 \times 10^6$ hazırlık rejimi sonrasında hücre sayısı $2,1 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$ 'e ve VLA-4I grubunda ise hazırlık rejimi öncesi hücre sayısı $1,0 \times 10^6 \pm 0,08 \times 10^6$, hazırlık rejimi sonrasında hücre sayısı $1,7 \times 10^6 \pm 0,08 \times 10^6$ 'e kadar yükselmiştir* $p < 0,05$, ** $< 0,01$

4.4. Ex Vivo Fare Hematopoetik Kök Hücre Kültür Koşulları Optimizasyonu

Hücre kültür koşullarını test etmek 12 mL polipropilen tüp ve 24 kuyucuklu polistiren plakalarda hücreler 7 gün boyunca farklı sitokin kombinasyonları ile kültür edilmiştir. Annexin-V ve PI kullanılarak hücre apoptoz testleri yapılmıştır. Apoptoz oranı ve kullanılan sitokin kombinasyonları göz önüne alındığında 24 kuyucuklu plaka kullanılması daha uygun görülmüştür (Şekil 4.4).

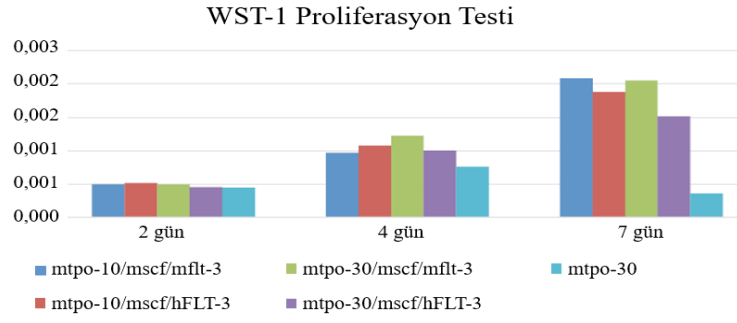


Şekil 4.4. Annexin-V ve PI ile hücre kültür koşullarının belirlenmesi. Hücreler 12 mL polipropilen tüp ve 24 kuyucuklu polistiren plakalarda hücreler 7 gün boyunca farklı sitokin kombinasyonları (1) 10 ng/mL fare (m) tpo, 100 ng/mL scf, 50 ng/mL flt; (2) 10 ng/mL tpo, 100 ng/mL scf, 50 ng/mL insan (h)FLT3; (3) 30 ng/mL tpo, 100 ng/mL scf, 50 ng/mL flt; (4) 30 ng/mL tpo, 100 ng/mL scf, 50 ng/mL FLT 5) 30 ng/mL tpo ile kültür edilmiştir (Tek deneyden elde edilen sonuç).

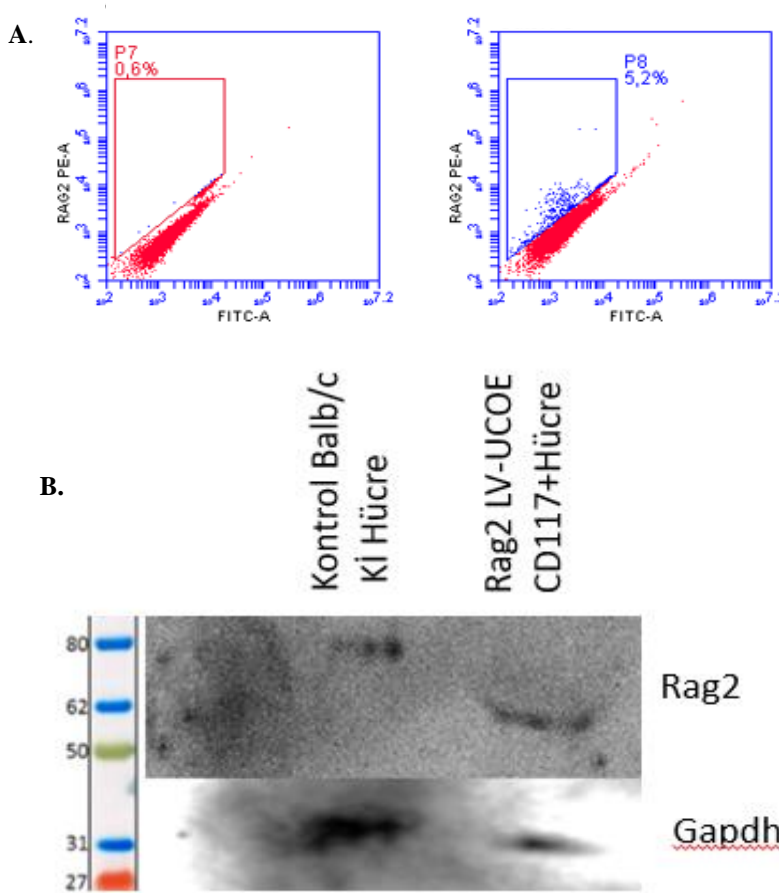
En uygun HKH kültür koşullarını belirlemek amacıyla hücrelerin proliferasyonu 2-7 günlük hücre kültürlerinde takip edilmiştir. İki günlük HKH kültüründen sonra kullanılan farklı hücre kültür koşulları arasında hücre proliferasyon üzerinde herhangi bir fark görülmemiştir. 4 günlük HKH kültürü için en uygun koşul 30 ng/mL mTpo+mScf+mFlt3 olarak belirlenmiştir. 7 günlük HKH hFLT3-mTpo ve sadece Tpo içeren hücre kültür koşulları HKH'lerin sağ kalımını ve proliferasyonunu desteklememektedir. Bu nedenle yapılan 2 günlük süren gen tedavi aktarımlarında 30 ng/ml mTpo kullanılmıştır, 1 haftalık kültür için 30 ng/mL mTpo, 100 ng/mL mScf ve 50 ng/mL mFlt3 kullanılmıştır (Şekil 4.5).

4.5. Transdüksiyon sonrası Rag2 ifadelerinin doğrulanması

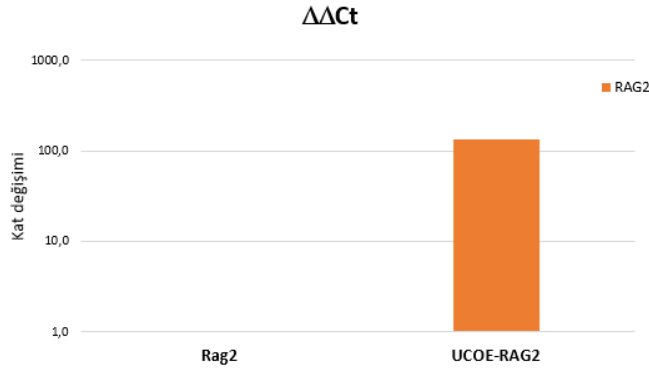
Farelerden izole edilen CD117+ HKH'lerin kültür öncesi, 2 gün hücre kültüründen sonra ve transdüksiyon sonrası Rag2 ifadelerini belirlemek için FACS ve qRT-PCR ile yapılmıştır. 2 günlük transdüksiyon sonrası c-Kit hücrelerdeki Rag2 ifadesi %5,2'dir ve WB'de Rag2 protein tespit edilmiştir (Şekil 4.6), rölatif Rag2 gen ifadelerinde bir artış tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Ancak tek deneyden alınan sonuçlar olduğu için istatistiksel analizler yapılamamıştır.



Şekil 4.5. *In vitro* fare Lin^{-/-} HKH'lerin farklı ekspansiyon protokolleri test edilmiştir. Gen tedavi süreçlerini taklit etmek için 2 günlük hücre kültürü yapılmıştır. HKH ekspansiyon kültürü optimizasyonu için hücreler 4 veya 7 gün boyunca farklı sitokin dozları ve kombinasyonları ile kültür edilmiştir. mTpo: fare Trombopoietin, mScf: fare Stem Cell Factor, mFlt3: fare Flt3 ligand, hFLT3: İnsan Flt3 ligand. (Tek deneyden elde edilen sonuç.)



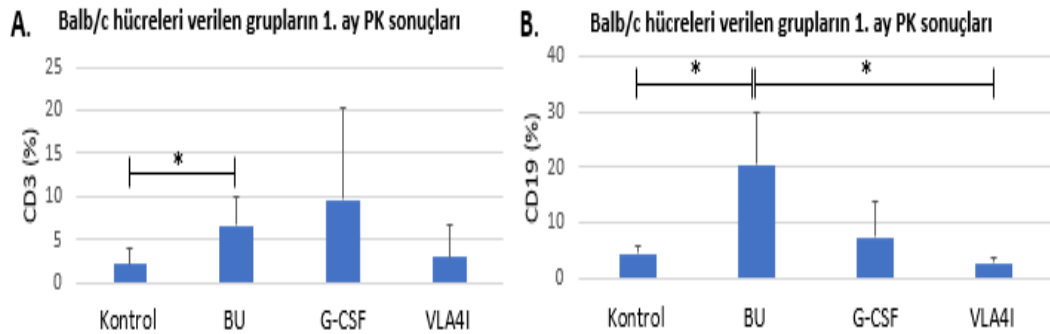
Şekil 4.6. Transdüksiyon sonrası Rag2 ifadesinin doğrulanması. A. FACS'ta X aksisinde antikor olmadan, Y aksisinde Rag2 antikorunu kullanılmıştır. B. Sağlıklı Balb/c ve Rag2 LV-UCOE CD117+ hücrelerin protein varlığı yapılan WB ile gösterilmiştir. Sağlıklı Balb/c'de Rag1 (119 kDa) ve Rag2 (62 kDa) kompleksi olduğundan proteinler 62-119 kDa arasında görülmüştür. Rag2 LV-UCOE CD117+ (62 kDa) protein görülmüştür. Kontrol olarak Gapdh (35 kDa) kullanılmıştır.



Şekil 4.7. Transdüksiyon sonrası Rag2 ifadesi. CD117+ hücelere 2 gün ard arda LV-UCOE.RAG2co ile transdüksiyon yapıldıktan sonra Rag2 qRT-PCR ile rölative gen ifadeleri değlendirilmiştir (tek deneyden elde edilen sonuç).

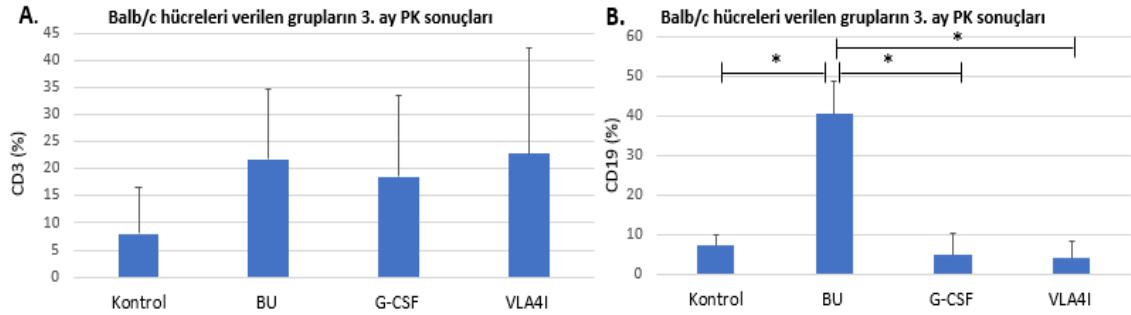
4.6. HKH kimerizmi ve engraftman takibi

HKH kimerizmi ve engraftman takibi için nakil edilen hayvanlar 6 aya kadar takip edilmiştir. 1. ay PK sonuçlarına göre kontrol grubuna göre beklenildiği üzere sadece BU grubunda anlamlı farklar gözlemlenmiştir. Busulfan grubu VLA-4I ve G-CSF grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar gözlemlenmemiştir. Ayrıca hem Balb/c fareler hem de Swiss fareler kullanılmıştır. Balb/c ve Swiss fare grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir. 1 ay PK sonuçlarına göre CD3 ve CD 19 oranları verilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Periferik kan sonuçlarına göre 1.ayda CD3 ve CD 19 oranları. **A.** Balb/c hüceleri verilen grupların 1. ayda CD3 oranları gösterilmiştir. Sadece BU grubu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. **B.** Balb/c hüceleri verilen grupların 1. Ayda CD19 oranları gösterilmiştir. BU grubu kontrol ve VLA-4I grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (*:p<0,05). BU: Busulfan, G-CSF: Granülosit-koloni uyarıcı faktör, VLA-4I: Very late antigen 4 inhibitor.

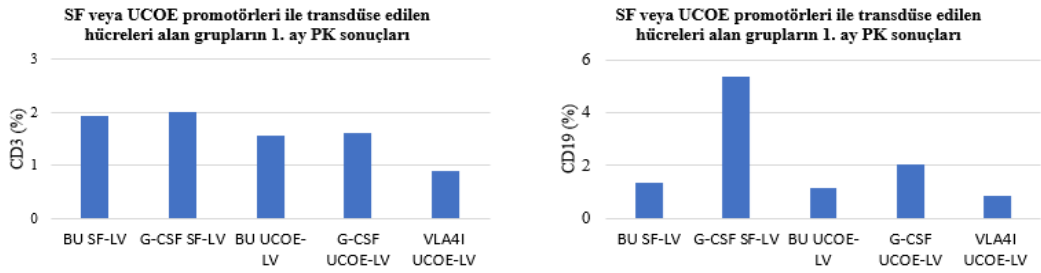
PK'dan 3. aydaki CD3 ve CD19 değerlerine bakıldığında CD3 ve CD19 oranları tüm gruplarda artmaya devam etmiştir. BU grubunda CD19 oranları Balb/c fare kullanılan grupta Swiss fare kullanılan gruba ve diğer hazırlık rejimi uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. CD3 oranlarına bakıldığında BU grubu ve diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar bulunmamıştır. 3. ayda PK sonuçlarına göre CD3 ve CD19 oranları verilmiştir (Şekil 4.9).



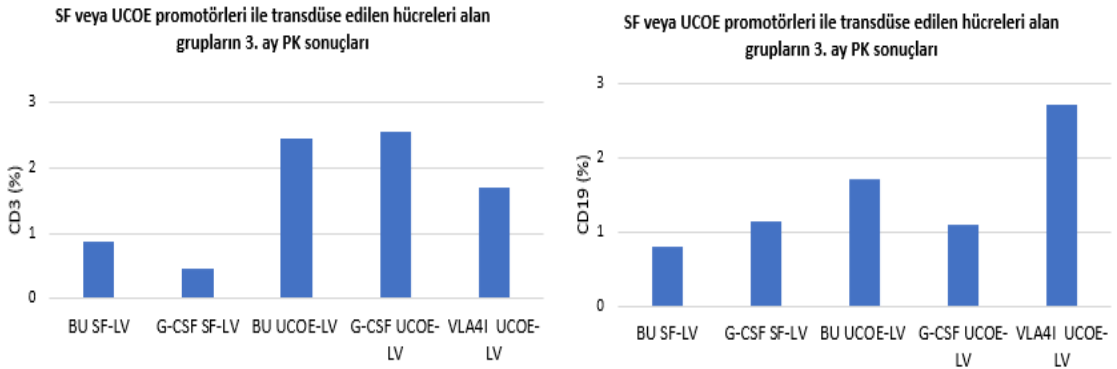
Şekil 4.9. Periferik kan sonuçlarına göre 3.ayda CD3 ve CD 19 oranları. **A.** Balb/c hücreleri verilen grupların 3. Ayda CD3 oranları gösterilmiştir. BU grubu sadece kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. **B.** Balb/c hücreleri verilen grupların 3. Ayda CD19 oranları gösterilmiştir. BU grubu diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlenmiştir (*: p<0,05). BU: Busulfan, G-CSF: Granülosit-koloni uyarıcı faktör, VLA-4I: Very late antigen 4 inhibitör.

4.7. LV-SF-RAG2co ve LV-UCOE-RAG2co farklı promörlerin HKH Kimerizmi ve engraftman takibi

Trandüze edilmiş ve nakil edilen SF-LV ve UCOE-LV hücrelerin 1. ay PK sonuçları farklı hazırlık rejimi verilen (BU, VLA-4I ve G-CSF) gruplar arasında CD3 ve CD19 oranları verilmiştir (Şekil 4.10). Transdüze edilmiş ve nakil edilen SF-LV ve UCOE-LV hücrelerin 3. ay PK sonuçları farklı hazırlık rejimi verilen (BU, VLA-4I ve G-CSF) gruplar arasında CD3 ve CD19 oranları verilmiştir (Şekil 4.11.). PK'da 3. aydaki oranları 1. aya göre artmaya devam etmiştir.



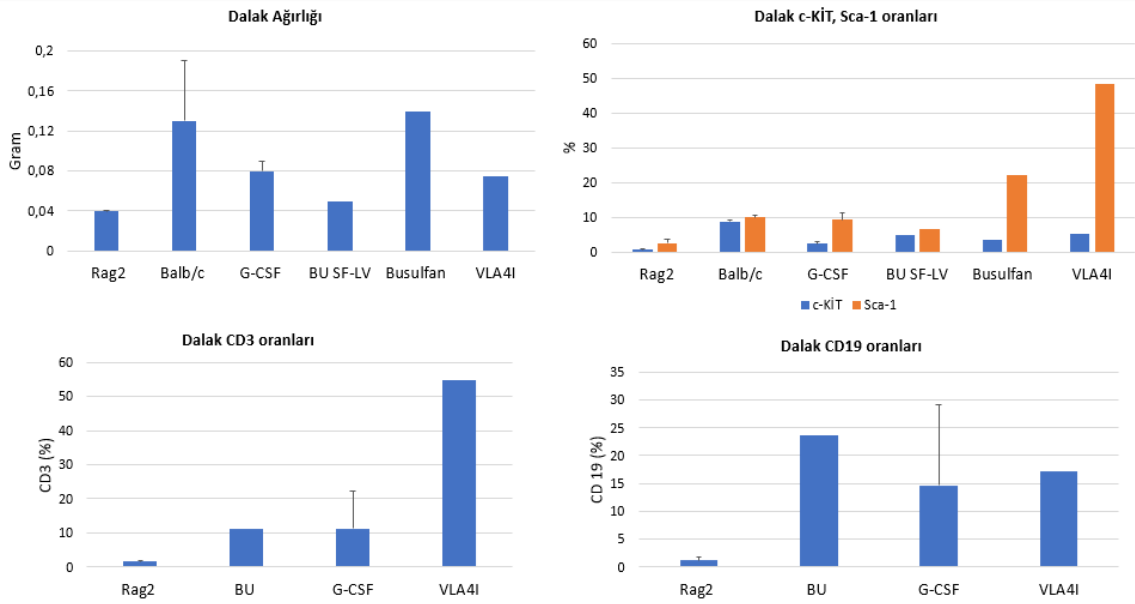
Şekil 4.10. PK sonuçlarına göre SF-LV veya UCOE-LV verilen grupların 1. ayda CD3 ve CD19 oranları. Solda Rag2 hücreleri 2 gün SF-LV ve UCOE-LV ile transdüksiyon sonrası nakil gruplarının 1. ay CD3 oranları gösterilmiştir. Sağda Rag2 hücreleri 2 gün SF-LV veya UCOE-LV ile transdüksiyon sonrası nakil gruplarının 1. ay CD19 oranları gösterilmiştir. SF-LV: spleen focus forming virüs, UCOE: ubiquitous chromatin opening element, LV: lentivirüs, BU: Busulfan, G-CSF: Granülosit-koloni uyarıcı faktör, VLA-4I: Very late antijen 4 inhibitör.



Şekil 4.11. PK sonuçlarına göre SF-LV veya UCOE-LV verilen grupların 3. ayda CD3 ve CD19 oranları. Sağda Rag2 hücreleri 2 gün SF-LV ve UCOE-LV ile transdüksiyon sonrası nakil gruplarının 3. ayda CD3 oranları gösterilmiştir. Sol tarafta Rag2 hücreleri 2 gün SF-LV veya UCOE-LV ile transdüksiyon sonrası nakil gruplarının 3. ayda CD19 oranları gösterilmiştir. SF-LV: spleen focus forming virüs, UCOE: ubiquitous chromatin opening element, LV: lentivirüs, BU: Busulfan, G-CSF: Granülosit-koloni uyarıcı faktör, VLA-4I: Very late antijen 4 inhibitörü.

Dalak, farelerde en önemli hematopoetik ve lenfoid organlardan biri olduğu için nakil sonrası 6. ayda dalak ağırlıkları belirlenmiş, c-KIT, Sca1, CD3 ve CD19 oranları FACS yöntemi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4. 11). Gruplardaki fare sayıları 3'ten az olduğu için istatistiksel olarak anlamlılık hesaplanamamıştır, ancak tüm gruplarda dalak ağırlıklarında artış olduğu görülmüştür. Dalaktaki c-Kit ve Sca-1 oranlarındaki artış en yüksek VLA-4I grubunda tespit edilmiştir. Kontrole göre diğer

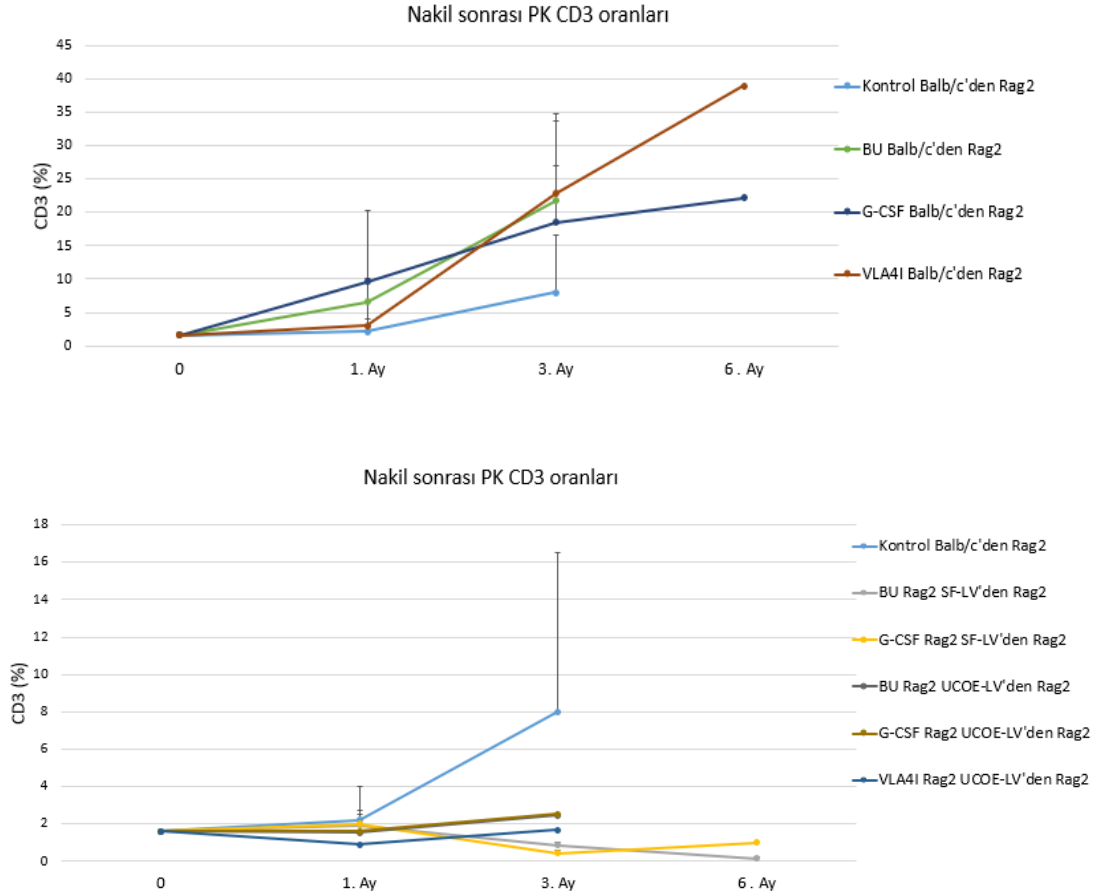
gruplarda da artış vardır. Dalaktaki CD3 oranlarının da kontrole oranla artmış olduğu görülmüştür. En çok artış gösteren grup VLA-4I grubudur ve CD19 oranları da tedavi almayan gruba göre yüksek gözlemlenmiştir.



Şekil 4.12. Nakil sonrası dalaktaki değişimler. **A.** Nakil sonrası dalak ağırlıkları, **B.** Nakil sonrasında dalaktaki c-KIT ve Sca1 oranları, **C.** Dalaktaki CD3 oranları **D.** Dalaktaki CD19 oranları gösterilmektedir. SF-LV: spleen focus forming virüs, UCOE: ubiquitous chromatin opening element, LV: lentivirüs, BU: Busulfan, G-CSF: Granülosit-koloni uyarıcı faktör, VLA-4I: Very late antijen 4 inhibitörü, Sca1: Stem cells antigen-1.

Nakil sonrası PK CD3 ve CD19 oranları 6 aya kadar takip edilmiştir (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14). Sağlıklı Balb/c Lin- hücre nakil edilen farelerde özellikle VLA-4I ile tedavi edilen grupta deney bitiminde yüksek oranda PK CD3 hücreler görülmüştür. Ancak kontrol ve BU gruplarında 6. ay sonuçları halen beklenmektedir. VLA-4I ve G-CSF'in etkileri o zaman karşılaştırılabilecektir. Transdüksiyon yapılmış olan gruplara bakıldığında VLA-4I, G-CSF ve BU grupları arasında anlamlılığı yüksek farklar olmayıp 6. ay sonuçları beklenmektedir. Ancak LV-UCOE ile transdüse edilen gruplardaki CD3 oranlarının, LV-SF gruplarına göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Nakil sonrasında CD19 oranlarındaki artma CD3'e oranla daha geç ortaya çıkmıştır. Bu gruplarda sağlıklı Balb/c Lin- hücre nakil edilen farelerde 3.ayda en yüksek PK CD19 hücre sayıları BU grubunda görülmüştür. Ancak kontrol grubu

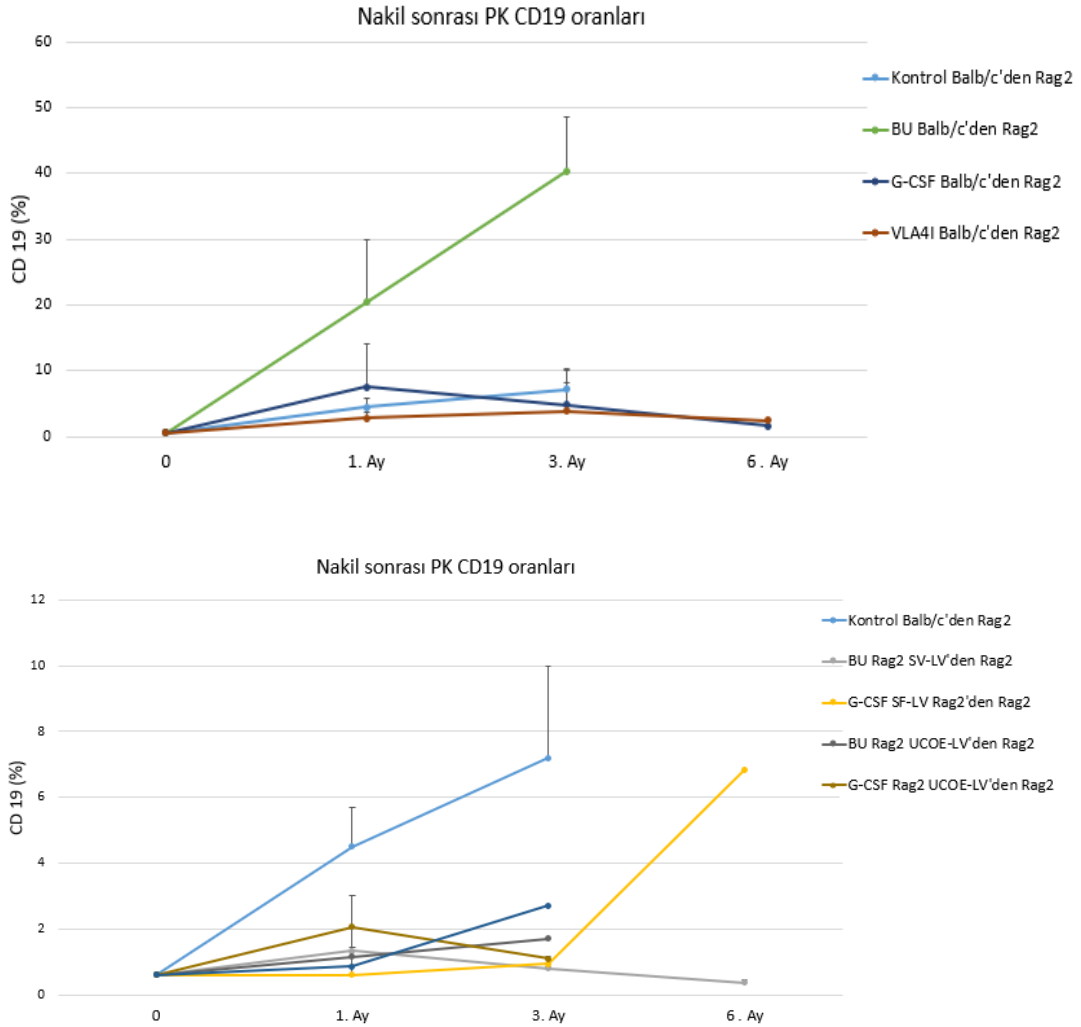
ve BU gruplarında 6.ay sonuçları hala beklenmektedir. VLA-4I ve G-CSF gruplarında 6. ayda düşük oranda CD19 gözlemlenmiştir.



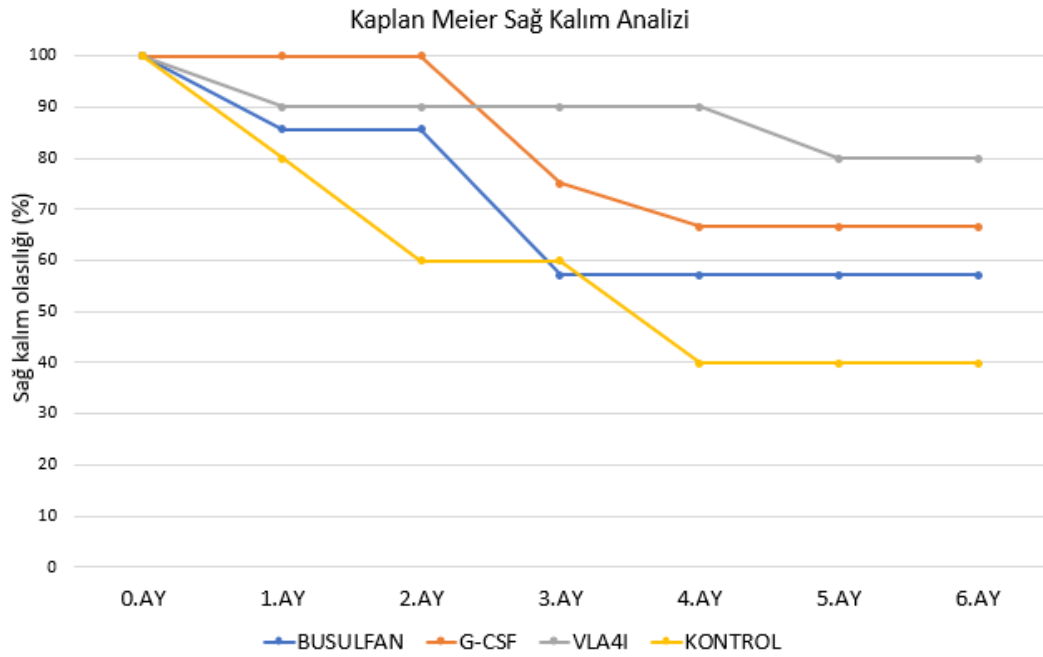
Şekil 4.13. Nakil sonrası PK CD3 oranları. Nakil sonrasında CD3 oranlarının aylara göre değişim grafiği verilmiştir. Üst: Sağlıklı Balb/c Lin- hücreler farklı hazırlık rejimlerinden sonra Rag2 farelere nakil edilmiş ve 6 aya kadar takip edilmiştir. Alt: Rag2 fare CD117+ hücreleri 2 gün transdüksiyon sonrası farklı hazırlık rejimlerinden sonra Rag2 farelere nakil edilmiştir ve 3 aya kadar takip edilmiştir. SF-LV: spleen focus forming virüs, UCOE: ubiquitous chromatin opening element, LV: lentivirüs, BU: Busulfan, G-CSF: Granülosit-koloni uyarıcı faktör, VLA-4I: Very late antijen 4 inhibitörü.

Transdüksiyon yapılmış olan gruplara bakıldığında, LV-SF gruplarında G-CSF tedavisi BU uygulanmasına göre daha etkili engraftman sağlamıştır. LV-UCOE gruplarında 3.ayda en yüksek CD19 oranları VLA-4I tedavisi alan grupta görülmüştür. Ancak daha 6.ay sonuçları beklenmektedir. Hazırlık rejimi verilen tüm fare gruplarının sağ kalım takibi 6 aya kadar Kaplan Meier analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.15).

En yüksek ölüm oranları hazırlık rejimi almayan ve BU grubunda gözlemlenmiştir. En düşük ölüm oranı VLA-4I grubunda gözlemlenmiştir.



Şekil 4.14. Nakil sonrası PK CD19 oranları. Nakil sonrasında CD3 oranlarının aylara göre değişim grafiği verilmiştir. Üst: Sağlıklı Balb/c Lin- hücreler farklı hazırlık rejimlerinden sonra Rag2 farelere nakil edilmiş ve 6 aya kadar takip edilmiştir. Alt: Rag2 fare CD117+ hücreleri 2 gün transdüksiyon sonrası farklı hazırlık rejimlerinden sonra Rag2 farelere nakil edilmiştir ve LV-UCOE grupları 3 aya kadar, LV-SF grupları 6 aya takip edilmiştir. LV-SF: spleen focus forming virüs, UCOE: ubiquitous chromatin opening element, LV: lentivirüs, BU: Busulfan, G-CSF: Granülosit-koloni uyarıcı faktör, VLA-4I: Very late antijen 4 inhibitörü.



Şekil 4.15. Hazırlık rejimi verilen farelerin sağkalım analizi. Hazırlık rejimi almayan ve BU grubunda yüksek oranda ölümler meydana gelmiştir. VLA-4I ve G-CSF grubunda ölüm oranı daha düşük olduğu gösterilmiştir. BU: Busulfan, G-CSF: Granülosit-koloni uyarıcı faktör, VLA-4I: Very late antijen 4 inhibitörü

5. TARTIŞMA

Halen RAG2^{-/-} AKİY'in tek küratif tedavisi HKH naklidir (6). Uygun donör bulunamadığında, bu hastaların başka bir tedavi seçeneği yoktur. Şimdiye kadar ADA-AKİY ve X- AKİY gibi, en sık görülen AKİY'ler için başarılı retroviral veya lentiviral HKH-GTx'ler geliştirilmiştir (9, 11, 102) . Ancak, RAG2- AKİY hastalıkları için başarılı bir gen tedavi süreci henüz klinik aşamaya gelememiştir. Bunun nedeni; 1) *in vitro* HKH'lerde LV transfer koşullarının tam optimize edilmemiş olması ve 2) bundan dolayı *in vivo* hayvan deneylerinde düzeltilen RAG2 nakavt HKH'lerin yetersiz engraftmana ve denksiz B hücre immün rekonstitüsyonuna/aktivasyonuna bağlı olarak otoimmün benzeri semptomların ortaya çıkmasıdır (118).

Hazırlık rejiminde kullanılan sitotoksik ilaçlar hastalara zarar verebilir ancak hazırlık rejimi uygulanmadan HKH nakli yapıldığında immün sistemin rekonstitüsyonu ve engraftmanı yeterli değildir (13). Tedavisini hedeflediğimiz PİY'li çocukların immün yetmezliklerinden dolayı ağır hazırlık rejimi kullanılmaktadır, ancak bu hastaların yaşı küçük olduğu için verilen yan etkilerden dolayı tercih edilmemektedir. Bu nedenlerle; HKH engraftmanı sağlayabilen ve minimal toksisite veren yeni veya daha hafif hazırlık rejimi protokollerinin geliştirilmesine gerek duyulmaktadır. G-CSF, hastaya zarar vermeden Kİ permeabilizasyonu ve HKH mobilizasyonunu sağlar. VLA-4I henüz klinikte uygulanmamaktadır ancak hayvan deneylerinde HKH mobilizasyonu sağlayabildiği gösterilmiştir (68, 90, 93). Bu tez kapsamında, 1) *ex vivo* HKH kültür ve gen transfer koşullarının optimizasyonu; 2) halen kullanılan RIC protokollerinin yerine toksik olmayan ancak yeterli engraftman sağlayabilen yeni bir protokolün belirlenmesi; 3) ve bu Şekilde PİY hastalıkları için daha uygun bir HKH (gen) tedavi protokolü geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Allojenik HKH sayılarının yetersiz olduğu durumlarda ve gen tedavisinde kullanılan otolog hücrelerin *ex vivo* transdüksiyon süreçlerinde hücreler için uygun kültür koşullarının geliştirilmesi ve optimizasyonunun yapılması gerekmektedir. Bunun için; lineaj depleksiyonundan sonra veya CD117 seleksiyonu ile elde edilen hücreler farklı sitokin kombinasyonları, farklı kültür plakaları ile farklı zamanlarda kültür edilmiştir. Sonuçlar apoptoz ve WST-1 testlerine bakılarak değerlendirilmiştir. Transd ksiyonlar için gerekli 2 günlük kültür koşullarında 30 ng/ml mTpo ve 24

kuyucuklu plakaların kullanılmasının en uygun olduğu, 7 günlük kültürler için mTpo, mScf ve mFlt-3 sitokin kombinasyonu içeren kültür koşulunun ekspansiyonu en iyi desteklediği belirlenmiştir. 7 günlük kültürde sadece 30 ng/ml mTpo'nun ekspansiyon için önemli fark oluşturmadığı ve mFlt-3'ün, hFLT-3' den daha iyi olduğu anlaşılmaktadır.

G-CSF, uzun zamandır klinikte HKH mobilizasyonu ve nötropeni tedavilerinde kullanılmaktadır (119, 120) ve yaygın kullanılmasına rağmen çok nadir kemik ağrısı dışında önemli yan etkilere rastlanmamıştır. VLA-4I HKH mobilizasyonu sağladığı bilinmektedir (68) ancak henüz klinikte kullanılmamaktadır. Yaptığımız çalışmada, KI permeabilizasyonu için verilen 4 günlük G-CSF ve 1 kez uygulanan VLA-4I'dan sonra PK beyaz küre sayılarında anlamlı oranda artış gözlemlenmiştir. BU grubunda ise herhangi bir değişim görülmemiştir. G-CSF ve VLA-4I birbirinden çok farklı mekanizmalarla HKH mobilizasyonu sağlamasına rağmen sadece 1 kez uygulanan VLA-4I ile 4 kez uygulanan G-CSF, benzer HKH mobilizasyonu göstermiştir.

RAG2 fareleri immün yetmezlikli oldukları için engraftman takibi CD3 ve CD19 ifadelerine bakılarak yapılabilmektedir. Farklı hazırlık rejimi uygulanan tüm gruplarda engraftman olduğu görülmüştür. Özellikle G-CSF ve VLA-4I verilen gruplara 3. ayda bakıldığında BU (pozitif kontrol) ile tedavi edilmiş gruplar kadar CD3 oluştuğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, negatif kontrole göre tüm gruplarda yüksek oranda CD3 oluşmuştur. CD19 oranlarına bakıldığında engraftman CD3 kadar başarılı olmamıştır ve en iyi sonuçlar yine standart olarak uygulanan BU grubunda görülmüştür. Allojenik HKH naklinden sonra sağ kalım için immün rekonstitüsyon en önemli faktörlerden birisidir (121). Genellikle ilk aşamada NK ve T hücreler oluşurken B hücrelerin oluşumu daha sonra gerçekleşmektedir. Bunun nedeni CD19 pozitif olan hücrelerin oluşumunun CD3 ile ilişkili olmasıdır. Klinikte genel olarak HKH naklinden 1 sene sonrasında tüm immün hücrelerin sayıları %80'e ulaşması beklenmektedir (122). Bu nedenle çalışmalarımızda görülen düşük CD19 oranlarının sonraki aylarda artması beklenmektedir.

Rag2 için gen tedavi geliştirmek amacıyla, SF ve UCOE olarak bilinen iki farklı promotör kodon optimize edilmiş Rag2 taşıyan lentiviral vektör karşılaştırılmıştır. Hücreler 2 günlük transdüksiyondan sonra LSK oranlarına göre Rag2 farelere nakil edilmiştir. PK sonuçlarına bakıldığında 1. ayda, SF grubunda CD3

ve CD19 oranları, UCOE grubuna göre daha yüksek iken; 3. ayda UCOE promotörü ile transdüse edilen hücrelerin CD3 ve CD19 oranları daha yüksektir. Bunun sebebi, SF promotörünün, güçlü ve devamlı aktif olduğundan susturulmaya daha duyarlı olması (115) ve UCOE promotörünün, epigenetik modifikasyonlara daha dirençli olmasıdır (114). Bundan dolayı, daha sonraki aylarda UCOE promotörleri ile transdüse edilen gruplardaki CD3 ve CD19 oranlarının daha fazla artması beklenmektedir. Hazırlık rejimi olarak VLA-4I verilen SF ve UCOE gruplarında 1. ayda düşük miktarda CD3 ve CD19 gözlemlenirken; 3. ayda en yüksek artış VLA-4I grubunda olduğu bulunmuştur.

Transdüksiyon sonrası FACS yöntemi ile Rag2 ifadeleri tespit edilmiştir ancak kullanılan lentiviral vektörlerin titresi çok yüksek olmadığından dolayı, optimize edilmiş kültür koşullarına rağmen Rag2 ifadeleri düşük çıkmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda immün yetmezlikli hasta ve farelerde gen aktarımı başarısı düşük olduğunda bile transdüse edilen hücrelerin selektif çoğalma avantajından dolayı zamanla düzeltilen hücre sayılarının artabildiği gösterilmiştir (123, 124). LV-UCOE-Rag2co transdüksiyondan sonra yapılan qRT-PCR sonuçlarına göre CD117+ hücrelerde kalıcı entegrasyon olduğu ve rölatif *Rag2* gen ifadelerinde bir artış olduğu tespit edilmiştir. Ancak LV-SF-Rag2co transdüksiyon sonrası mRNA'lar toplanmadığı için qRT-PCR yapılmamıştır. Rag2 protein varlığını doğrulamak için WB yapılmıştır. Ancak Rag2 protein bantların sağlıklı Balb/c ve UCOE-LV transdüksiyon sonrası farklı yerlerde görülmüştür. Bunun nedeni Balb/c'lerde RAG1 ve RAG2 kompleksinin oluşmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (125).

Dalak, farelerde en önemli hematopoetik ve lenfoid organlardan biri olduğu için nakil sonrası ağırlıkları, hücre sayıları ve hücresel içerikleri değerlendirilmiştir. Tedavi edilen tüm grupların dalak ağırlıkları, tedavi almayan Rag2 farelerine göre artmıştır. c-KİT ve Sca1 oranlarının tüm gruplarda tedavi almayan gruba göre artmış olduğu, en yüksek artışın VLA-4I grubunda olduğu gözlemlenmiştir. Dalaktaki CD3 ve CD19 oranlarında, tedavi almayan gruba oranla yüksek oranda artış olduğu bulunmuştur. CD3'teki en yüksek artış VLA-4I grubunda; CD19'da ise G-CSF, BU ve VLA-4I grubunda benzer oranda artışlar meydana geldiği görülmüştür.

Hazırlık rejimi verilen farelerin takip süresi boyunca sağ kalım oranları Kaplan Meier sağ kalım analizi ile değerlendirilmiştir. En yüksek ölüm oranları herhangi bir hazırlık rejimi almayan grupta ve BU grubunda gözlemlenmiştir. En düşük ölüm oranı

VLA-4I grubunda gözlemlenmiştir. BU grubunda ölüm oranının yüksek olmasının sebebi BU'nun toksik bir alkilleyici ajan olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir ve öngörülen bir sonuçtur (62, 63). Hazırlık rejimi almayan grupta ölüm beklenmemesine rağmen oran yüksektir. Tüm gruplardaki hayvanların yaşları eşit olduğundan dolayı kontrol grubundaki ölümlerin yaş ile bağlantılı olmadığı düşünülmektedir. Farelere sinjenik nakil yapıldığı için GvHD beklenmemektedir, ancak ölen farelerdeki semptomlar (ishal, kilo kaybı, halsizlik vb.) GvHD benzeri klinik tablo göstermiştir. Balb/c Rag2 fareler Hollanda Erasmus Üniversitesi'nden, sağlıklı Balb/c fareler Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden temin edildiğinden bu fareler arasında MHC açısından herhangi bir fark beklenmemektedir. Ancak bu fareler inbred olmasına rağmen zaman içerisinde iki grup arasında minör antijen değişikliklerinin oluşma ihtimali bulunmaktadır(126).

Hazırlık rejimi, HKH nakillerde ve gen tedavilerde kemik iliğinde yer açmak amacıyla uygulanmaktadır. Şu an klinikte hazırlık rejimleri için BU, siklofosamid, fludarabine, melfalan, metotreksat, TBI vb ilaçlar kullanılmaktadır. Yaptığımız çalışmalarda BU kontrol olarak kullanıp, alternatif tedavi olarak G-CSF ve VLA-4I etkinlikleri değerlendirilmiştir. Bu rölatif zararsız ilaçların engraftman mekanizmaları ve süreçleri (zaman) farklı olmasına rağmen, en az BU kadar etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu tez çalışmasında, SF ve UCOE promotörlerinin metilasyon durumuna bakılmamıştır ve sonuçlara etkileri henüz bilinmemektedir. Devam çalışmalarımızda SF ve UCOE promotörleri ile nakil edilen grupların kemik iliği ve dalak hücrelerinin metilasyon paternlerine bakılması planlanmaktadır. Ayrıca nakil sonrası 6. ayda dalak lenfosit popülasyonlarının fonksiyonel olup olmadığının *in vitro* olarak Karboksifloresein Diasetat Süksinimidil Ester (CFSE) proliferasyon testi ile değerlendirilmesi hedeflerimiz arasındadır. *In vivo* planladığımız tekrar deneylerimizde 3. ve 6. ayda B hücrelerinin fonksiyonunu incelemek için farelere tetanoz, difteri, boğmaca ve pnömokok aşuların yapılması ve oluşan antikor seviyelerinin ELISA ile ölçülmesi planlanmaktadır. Ayrıca, G-CSF ve VLA-4I'nın birlikte kullanılması gelecek planımızdır.

Bu tez çalışmasında; Swiss, BALB/c ve Rag2 farelerinden kemik iliği izolasyonu yapılarak elde edilen hücrelerin kültür koşullarının optimizasyonu

yapılmıştır. Ayrıca SF promotörü UCOE'ya göre güçlü olmasına rağmen UCOE ile daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Bu şekilde farklı promotörler ile genetik olarak düzeltilen, uzun ömürlü hematopoez sağlayabilen HKH'lerin, *ex vivo* LV transdüksiyon protokollerinin optimizasyonu yapılmıştır.

6. SONUÇ

- Lin depleasyonu ve CD117 seleksiyonundan sonra yüksek saflıkta fare HKH'leri elde edilmiştir ve başarılı bir şekilde farelere nakil edilmiştir.
- G-CSF ve VLA-4I uygulanan farelerde BU alan ve tedavi edilmeyen kontrol farelere göre kandaki beyaz kürelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilmiştir.
- Hücre kültür koşulları için 24 kuyucuklu plakaların 12 mL tüpten daha uygun olduğu gösterilmiştir.
- İki günlük HKH kültürleri için sadece Tpo, 4 günlük HKH kültür için 30 ng/mL mTpo+mScf+mFlt3 ve 7 günlük HKH kültürler için 30 ng/mL mTpo, 100 ng/mL mScf ve 50 ng/mL mFlt3 içeren kültür medyumlarının en uygun olduğu gösterilmiştir.
- 2 günlük transdüksiyon yapılan CD117+ hücrelerde kalıcı entegrasyon ve Rag2 ifadeleri tespit edilmiştir.
- Nakilden sonra PK CD19 oranları tüm gruplarda CD3'e göre daha düşük ve daha geç geliştiği görülmüştür.
- Genel olarak engraftman kinetikleri farklı olup G-CSF ve VLA-4I'nın BU kadar etkili olduğu gösterilmiştir.
- SF daha güçlü promotör olmasına rağmen, uzun süreli hematopoez sağlaması bakımından UCOE promotörleriyle bu çalışmada daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.
- Nakilden sonra dalak ağırlıklarında ve c-KİT, Sca1, CD3 ve CD19 hücre sayılarında bir artış olduğu gösterilmiştir ve en yüksek c-KİT, Sca1 ve CD3 oranları VLA-4I grubunda görülmüştür.
- Nakil edilen farelerde en yüksek sağ kalım VLA-4I grubunda gözlemlenmiştir.
- Sonuçlara göre, RAG2 fare modelinde BU hazırlık rejimi yerine G-CSF ve/veya VLA-4I kullanılabileceği gösterilmiştir.

7. KAYNAKÇA

1. Sanal O, Tezcan I. Thirty years of primary immunodeficiencies in Turkey. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1238:15-23.
2. Niehues T, Perez-Becker R, Schuetz C. More than just SCID--the phenotypic range of combined immunodeficiencies associated with mutations in the recombinase activating genes (RAG) 1 and 2. *Clin Immunol.* 2010;135(2):183-92.
3. Ru H, Chambers MG, Fu TM, Tong AB, Liao M, Wu H. Molecular Mechanism of V(D)J Recombination from Synaptic RAG1-RAG2 Complex Structures. *Cell.* 2015;163(5):1138-52.
4. van der Burg M, Gennery AR. Educational paper. The expanding clinical and immunological spectrum of severe combined immunodeficiency. *Eur J Pediatr.* 2011;170(5):561-71.
5. Gelfand EW. SCID continues to point the way. *N Engl J Med.* 1990;322(24):1741-3.
6. Worth AJ, Booth C, Veys P. Stem cell transplantation for primary immune deficiency. *Curr Opin Hematol.* 2013;20(6):501-8.
7. Felfly H, Haddad GG. Hematopoietic stem cells: potential new applications for translational medicine. *J Stem Cells.* 2014;9(3):163-97.
8. Bushman FD. Retroviral integration and human gene therapy. *J Clin Invest.* 2007;117(8):2083-6.
9. Cavazzana M, Six E, Lagresle-Peyrou C, Andre-Schmutz I, Hacein-Bey-Abina S. Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency: Where Do We Stand? *Hum Gene Ther.* 2016;27(2):108-16.
10. Kuo CY, Kohn DB. Gene Therapy for the Treatment of Primary Immune Deficiencies. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2016;16(5):39.
11. van Til NP, de Boer H, Mashamba N, Wabik A, Huston M, Visser TP, et al. Correction of murine Rag2 severe combined immunodeficiency by lentiviral gene therapy using a codon-optimized RAG2 therapeutic transgene. *Mol Ther.* 2012;20(10):1968-80.
12. Overbeek A, van den Berg MH, van Leeuwen FE, Kaspers GJ, Lambalk CB, van Dulmen-den Broeder E. Chemotherapy-related late adverse effects on ovarian function in female survivors of childhood and young adult cancer: A systematic review. *Cancer Treat Rev.* 2017;53:10-24.
13. Buckley RH. Treatment options for genetically determined immunodeficiency. *Lancet.* 2003;361(9357):541-2.
14. Glanzmann E, Riniker P. [Essential lymphocytopenia; new clinical aspect of infant pathology]. *Ann Paediatr.* 1950;175(1-2):1-32.
15. de Vries E, Driessen G. Educational paper: Primary immunodeficiencies in children: a diagnostic challenge. *Eur J Pediatr.* 2011;170(2):169-77.
16. International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary I, Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova JL, Chapel H, et al. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(6):1161-78.
17. Gaspar HB, Qasim W, Davies EG, Rao K, Amrolia PJ, Veys P. How I treat severe combined immunodeficiency. *Blood.* 2013;122(23):3749-58.
18. Mamcarz E, Zhou S, Lockey T, Abdelsamed H, Cross SJ, Kang G, et al. Lentiviral Gene Therapy Combined with Low-Dose Busulfan in Infants with SCID-X1. *N Engl J Med.* 2019;380(16):1525-34.

19. Rivers L, Gaspar HB. Severe combined immunodeficiency: recent developments and guidance on clinical management. *Arch Dis Child*. 2015;100(7):667-72.
20. Gaspar HB, Bjorkegren E, Parsley K, Gilmour KC, King D, Sinclair J, et al. Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. *Mol Ther*. 2006;14(4):505-13.
21. Schatz DG, Baltimore D. Uncovering the V(D)J recombinase. *Cell*. 2004;116(2 Suppl):S103-6, 2 p following S6.
22. Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell*. 1989;59(6):1035-48.
23. Notarangelo LD, Villa A, Schwarz K. RAG and RAG defects. *Curr Opin Immunol*. 1999;11(4):435-42.
24. Buckley RH, Schiff RI, Schiff SE, Markert ML, Williams LW, Harville TO, et al. Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. *J Pediatr*. 1997;130(3):378-87.
25. Fischer A, Le Deist F, Hacein-Bey-Abina S, Andre-Schmutz I, Basile Gde S, de Villartay JP, et al. Severe combined immunodeficiency. A model disease for molecular immunology and therapy. *Immunol Rev*. 2005;203:98-109.
26. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*. 1992;68(5):855-67.
27. Birbrair A, Frenette PS. Niche heterogeneity in the bone marrow. *Ann N Y Acad Sci*. 2016;1370(1):82-96.
28. Kondo M. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunol Rev*. 2010;238(1):37-46.
29. Schuetz C, Neven B, Dvorak CC, Leroy S, Ege MJ, Pannicke U, et al. SCID patients with ARTEMIS vs RAG deficiencies following HCT: increased risk of late toxicity in ARTEMIS-deficient SCID. *Blood*. 2014;123(2):281-9.
30. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. 1961. *Radiat Res*. 2011;175(2):145-9.
31. Smith C. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control*. 2003;10(1):9-16.
32. Fernandez KS, de Alarcon PA. Development of the hematopoietic system and disorders of hematopoiesis that present during infancy and early childhood. *Pediatr Clin North Am*. 2013;60(6):1273-89.
33. Hematopoietic Growth Factors. *Encyclopedic Reference of Molecular Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2004. p. 447-9.
34. Chapman J, Zhang Y. Histology, Hematopoiesis. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2021.
35. Hordyjewska A, Popiolek L, Horecka A. Characteristics of hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cytotechnology*. 2015;67(3):387-96.
36. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006;354(17):1813-26.
37. Khaddour K, Hana CK, Mewawalla P. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2021.
38. Hatzimichael E, Tuthill M. Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells Cloning*. 2010;3:105-17.

39. Little MT, Storb R. History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):231-8.
40. Singh AK, McGuirk JP. Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Historical and Scientific Overview. *Cancer Res*. 2016;76(22):6445-51.
41. Granot N, Storb R. History of hematopoietic cell transplantation: challenges and progress. *Haematologica*. 2020;105(12):2716-29.
42. Attar A. Gene therapy techniques: Physical and chemical methods. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*. 2017;74:103-12.
43. Tatum EL. Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. *Perspect Biol Med*. 1966;10(1):19-32.
44. Rogers S, Pfuderer P. Use of viruses as carriers of added genetic information. *Nature*. 1968;219(5155):749-51.
45. Mountain A. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol*. 2000;18(3):119-28.
46. Booth C, Gaspar HB, Thrasher AJ. Treating Immunodeficiency through HSC Gene Therapy. *Trends Mol Med*. 2016;22(4):317-27.
47. Staal FJT, Aiuti A, Cavazzana M. Autologous Stem-Cell-Based Gene Therapy for Inherited Disorders: State of the Art and Perspectives. *Front Pediatr*. 2019;7:443.
48. Wirth T, Parker N, Yla-Herttuala S. History of gene therapy. *Gene*. 2013;525(2):162-9.
49. Uddin F, Rudin CM, Sen T. CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. *Front Oncol*. 2020;10:1387.
50. Lee JH, Wang JH, Chen J, Li F, Edwards TL, Hewitt AW, et al. Gene therapy for visual loss: Opportunities and concerns. *Prog Retin Eye Res*. 2019;68:31-53.
51. Morgan RA, Gray D, Lomova A, Kohn DB. Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy: Progress and Lessons Learned. *Cell Stem Cell*. 2017;21(5):574-90.
52. Staal FJ, Pike-Overzet K, Ng YY, van Dongen JJ. Sola dosis facit venenum. Leukemia in gene therapy trials: a question of vectors, inserts and dosage? *Leukemia*. 2008;22(10):1849-52.
53. Boskey AL, Posner AS. Bone structure, composition, and mineralization. *Orthop Clin North Am*. 1984;15(4):597-612.
54. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7-25.
55. Yu VW, Scadden DT. Hematopoietic Stem Cell and Its Bone Marrow Niche. *Curr Top Dev Biol*. 2016;118:21-44.
56. Zhang P, Zhang C, Li J, Han J, Liu X, Yang H. The physical microenvironment of hematopoietic stem cells and its emerging roles in engineering applications. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):327.
57. Aerts-Kaya F, Ulum B, Mammadova A, Kose S, Aydin G, Korkusuz P, et al. Neurological Regulation of the Bone Marrow Niche. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1212:127-53.
58. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425(6960):841-6.
59. Yoon KA, Cho HS, Shin HI, Cho JY. Differential regulation of CXCL5 by FGF2 in osteoblastic and endothelial niche cells supports hematopoietic stem cell migration. *Stem Cells Dev*. 2012;21(18):3391-402.

60. Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:349-56.
61. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1195-201.
62. Gyurkocza B, Sandmaier BM. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood*. 2014;124(3):344-53.
63. Hassan M. The role of busulfan in bone marrow transplantation. *Med Oncol*. 1999;16(3):166-76.
64. Champlin R, Khouri I, Anderlini P, Gajewski J, Kornblau S, Molldrem J, et al. Nonmyeloablative preparative regimens for allogeneic hematopoietic transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27 Suppl 2:S13-22.
65. Sengsayadeth S, Savani BN, Blaise D, Malard F, Nagler A, Mohty M. Reduced intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult acute myeloid leukemia in complete remission - a review from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Haematologica*. 2015;100(7):859-69.
66. Champlin R, Khouri I, Shimoni A, Gajewski J, Kornblau S, Molldrem J, et al. Harnessing graft-versus-malignancy: non-myeloablative preparative regimens for allogeneic haematopoietic transplantation, an evolving strategy for adoptive immunotherapy. *Br J Haematol*. 2000;111(1):18-29.
67. Delmonte OM, Schuetz C, Notarangelo LD. RAG Deficiency: Two Genes, Many Diseases. *J Clin Immunol*. 2018;38(6):646-55.
68. Rettig MP, Ansstas G, DiPersio JF. Mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells using inhibitors of CXCR4 and VLA-4. *Leukemia*. 2012;26(1):34-53.
69. Touw IP, Palande K, Beekman R. Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling: implications for G-CSF responses and leukemic progression in severe congenital neutropenia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2013;27(1):61-73, viii.
70. Metcalf D. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Science*. 1985;229(4708):16-22.
71. Nagata S, Tsuchiya M, Asano S, Kaziro Y, Yamazaki T, Yamamoto O, et al. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature*. 1986;319(6052):415-8.
72. Souza LM, Boone TC, Gabilove J, Lai PH, Zsebo KM, Murdock DC, et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science*. 1986;232(4746):61-5.
73. Deotare U, Al-Dawsari G, Couban S, Lipton JH. G-CSF-primed bone marrow as a source of stem cells for allografting: revisiting the concept. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50(9):1150-6.
74. Tay J, Levesque JP, Winkler IG. Cellular players of hematopoietic stem cell mobilization in the bone marrow niche. *Int J Hematol*. 2017;105(2):129-40.
75. Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*. 1991;78(11):2791-808.
76. Dreger P, Suttorp M, Haferlach T, Loffler H, Schmitz N, Schroyens W. Allogeneic granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells for treatment of engraftment failure after bone marrow transplantation. *Blood*. 1993;81(5):1404-7.
77. Hoggatt J, Pelus LM. Many mechanisms mediating mobilization: an alliterative review. *Curr Opin Hematol*. 2011;18(4):231-8.

78. Levesque JP, Liu F, Simmons PJ, Betsuyaku T, Senior RM, Pham C, et al. Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. *Blood*. 2004;104(1):65-72.
79. Robinson SN, Seina SM, Gohr JC, Sharp JG. Hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin in the absence of matrix metalloproteinase-9. *Stem Cells Dev*. 2005;14(3):317-28.
80. Ferraro F, Lymperi S, Mendez-Ferrer S, Saez B, Spencer JA, Yeap BY, et al. Diabetes impairs hematopoietic stem cell mobilization by altering niche function. *Sci Transl Med*. 2011;3(104):104ra1.
81. Kollet O, Dar A, Shvitiel S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainberg Y, et al. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med*. 2006;12(6):657-64.
82. Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*. 2006;124(2):407-21.
83. Mendez-Ferrer S, Battista M, Frenette PS. Cooperation of beta(2)- and beta(3)-adrenergic receptors in hematopoietic progenitor cell mobilization. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1192:139-44.
84. Aerts-Kaya F, Kilic E, Kose S, Aydin G, Cagnan I, Kuskonmaz B, et al. G-CSF treatment of healthy pediatric donors affects their hematopoietic microenvironment through changes in bone marrow plasma cytokines and stromal cells. *Cytokine*. 2021;139:155407.
85. Kose S, Aerts-Kaya F, Kopru CZ, Nemutlu E, Kuskonmaz B, Karaosmanoglu B, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells secrete endocannabinoids that stimulate in vitro hematopoietic stem cell migration effectively comparable to beta-adrenergic stimulation. *Exp Hematol*. 2018;57:30-41 e1.
86. Bendall LJ, Bradstock KF. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(4):355-67.
87. Jacobsen K, Kravitz J, Kincade PW, Osmond DG. Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and gamma-irradiated mice. *Blood*. 1996;87(1):73-82.
88. Papayannopoulou T, Craddock C, Nakamoto B, Priestley GV, Wolf NS. The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(21):9647-51.
89. Hyun YM, Lefort CT, Kim M. Leukocyte integrins and their ligand interactions. *Immunol Res*. 2009;45(2-3):195-208.
90. Yang GX, Hagmann WK. VLA-4 antagonists: potent inhibitors of lymphocyte migration. *Med Res Rev*. 2003;23(3):369-92.
91. Imai Y, Shimaoka M, Kurokawa M. Essential roles of VLA-4 in the hematopoietic system. *Int J Hematol*. 2010;91(4):569-75.
92. Leone DR, Giza K, Gill A, Dolinski BM, Yang W, Perper S, et al. An assessment of the mechanistic differences between two integrin alpha 4 beta 1 inhibitors, the monoclonal antibody TA-2 and the small molecule BIO5192, in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;305(3):1150-62.

93. Ramirez P, Rettig MP, Uy GL, Deych E, Holt MS, Ritchey JK, et al. BIO5192, a small molecule inhibitor of VLA-4, mobilizes hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2009;114(7):1340-3.
94. Bonig H, Papayannopoulou T. Hematopoietic stem cell mobilization: updated conceptual renditions. *Leukemia*. 2013;27(1):24-31.
95. Bonig H, Papayannopoulou T. Mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells: general principles and molecular mechanisms. *Methods Mol Biol*. 2012;904:1-14.
96. Coffin JM. Structure and Classification of Retroviruses. In: Levy JA, editor. *The Retroviridae*. Boston, MA: Springer US; 1992. p. 19-49.
97. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. The Interactions of Retroviruses and their Hosts. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY)1997.
98. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. *Retroviruses*. 1997.
99. Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, et al. The International Committee on Taxonomy of Viruses. In: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, et al., editors. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Vienna: Springer Vienna; 1995. p. 509-29.
100. Nermut M, Hockley D. Comparative morphology and structural classification of retroviruses. *Morphogenesis and Maturation of Retroviruses*. 1996:1-24.
101. Russell SJ. Science, medicine, and the future. *Gene therapy*. *BMJ*. 1997;315(7118):1289-92.
102. Anson DS. The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genet Vaccines Ther*. 2004;2(1):9.
103. Havenga M, Hoogerbrugge P, Valerio D, van Es HH. Retroviral stem cell gene therapy. *Stem Cells*. 1997;15(3):162-79.
104. Lewis PF, Emerman M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *Journal of virology*. 1994;68(1):510-6.
105. Cosset F-L, Takeuchi Y, Battini J-L, Weiss RA, Collins M. High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *Journal of virology*. 1995;69(12):7430-6.
106. Markowitz D, Goff S, Bank A. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *Journal of virology*. 1988;62(4):1120-4.
107. Miller AD, Buttimore C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Molecular and Cellular Biology*. 1986;6(8):2895-902.
108. Nisole S, Saib A. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology*. 2004;1:9.
109. Shuljak BF. LENTIVIRUSES IN UNGULATES. I. GENERAL FEATURES, HISTORY AND PREVALENCE. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2006;9:175-81.
110. Gardlik R, Palffy R, Hodosy J, Lukacs J, Turna J, Celec P. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit*. 2005;11(4):RA110-21.

111. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2003;4(5):346-58.
112. Haberle V, Stark A. Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(10):621-37.
113. Weingarten-Gabbay S, Nir R, Lubliner S, Sharon E, Kalma Y, Weinberger A, et al. Systematic interrogation of human promoters. *Genome Res.* 2019;29(2):171-83.
114. Muller-Kuller U, Ackermann M, Kolodziej S, Brendel C, Fritsch J, Lachmann N, et al. A minimal ubiquitous chromatin opening element (UCOE) effectively prevents silencing of juxtaposed heterologous promoters by epigenetic remodeling in multipotent and pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(3):1577-92.
115. Demaison C, Parsley K, Brouns G, Scherr M, Battmer K, Kinnon C, et al. High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of imunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther.* 2002;13(7):803-13.
116. Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Hubank M, Kempinski H, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest.* 2008;118(9):3143-50.
117. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.* 1996;272(5259):263-7.
118. Capo V, Castiello MC, Fontana E, Penna S, Bosticardo M, Draghici E, et al. Efficacy of lentivirus-mediated gene therapy in an Omenn syndrome recombination-activating gene 2 mouse model is not hindered by inflammation and immune dysregulation. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;142(3):928-41 e8.
119. Winkler IG, Pettit AR, Raggatt LJ, Jacobsen RN, Forristal CE, Barbier V, et al. Hematopoietic stem cell mobilizing agents G-CSF, cyclophosphamide or AMD3100 have distinct mechanisms of action on bone marrow HSC niches and bone formation. *Leukemia.* 2012;26(7):1594-601.
120. Mehta HM, Malandra M, Corey SJ. G-CSF and GM-CSF in Neutropenia. *J Immunol.* 2015;195(4):1341-9.
121. Koehl U, Bochennek K, Zimmermann SY, Lehrnbecher T, Sorensen J, Esser R, et al. Immune recovery in children undergoing allogeneic stem cell transplantation: absolute CD8+ CD3+ count reconstitution is associated with survival. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39(5):269-78.
122. Tian DM, Wang Y, Zhang XH, Liu KY, Huang XJ, Chang YJ. Rapid Recovery of CD3+CD8+ T Cells on Day 90 Predicts Superior Survival after Unmanipulated Haploidentical Blood and Marrow Transplantation. *PLoS One.* 2016;11(6):e0156777.
123. Watts KL, Adair J, Kiem HP. Hematopoietic stem cell expansion and gene therapy. *Cytotherapy.* 2011;13(10):1164-71.
124. Qasim W, Gennery AR. Gene therapy for primary immunodeficiencies: current status and future prospects. *Drugs.* 2014;74(9):963-9.
125. Hiom K, Gellert M. A stable RAG1-RAG2-DNA complex that is active in V(D)J cleavage. *Cell.* 1997;88(1):65-72.
126. Kaplan DH, Anderson BE, McNiff JM, Jain D, Shlomchik MJ, Shlomchik WD. Target antigens determine graft-versus-host disease phenotype. *J Immunol.* 2004;173(9):5467-75.

8. EKLER

Ek-1. Tez çalışması ile ilgili Etik Kurul izinleri Etik kurul izni



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575-56

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 14.07.2020 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2020/06
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2020/27
KARAR NUMARASI	: 2020/06- 02
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 14.07.2025
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Dr. Öğr. Üyesi Fatima Aerts KAYA
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Dr. Öğr. Üyesi Fatima Aerts KAYA, Mol. Bio.
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: Mehmet Emin ŞEKER(Yüksek Lisans Tezi), Uzm. Bio. Burcu PERVİN, Vet. Hek. Özgür Doğuş EROL
DİĞER YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: -
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 120 Adet Balb/C-RAG2 Fare (2-8 Ay)

Üniversitemiz Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi Fatima Aerts KAYA'nın araştırma yürütücüsü olduğu 2020/27 kayıt numaralı "**Hematopoetik Kök Hücre Gen Tedavi Kültür Koşulları ve Engrafman Optimizasyonu**" isimli çalışma Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarihinden sonraki 1 ay içerisinde proje sonuç raporunu Kurulumuza teslim etmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU İMZA SİRKÜLERİ

TOPLANTI TARİHİ VE SAATİ : 14.07.2020 (SALİ)
TOPLANTI SAATİ : 14.00
TOPLANTI SAYISI : 2020/06
PROJE NUMARASI : 2020/27
KARAR NUMARASI : 2020/06-02

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ (Başkan)	Prof. Dr. Nüket Örnek BÜKEN (Üye)	(İZİNLİ) Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye)
Prof. Dr. Aytekin AKYOL (Üye)	Prof. Dr. Gülşen ESENDAĞLI (Üye)	Prof. Dr. Abdullah C. AKMAN (Üye)
(İZİNLİ) Prof. Dr. Ersoy KONAŞ (Üye)	Doç. Dr. Meltem TUNCER (Üye)	Doç. Dr. İlhan ÖZBAŞILAR (Üye)
Dr. Öğr. Üyesi Banu Cahide TEL (Üye)	Doç. Dr. M. Alper ÇETİNKAYA (Üye)	Dr. Öğr. Üyesi Esin Akbay ÇETİN (Üye)
(İZİNLİ) Mevlüt ÖKSÜZOĞLU (Üye)	Doç. Dr. Sedat ÇAKIROĞLU (Üye)	Avukat Yasemin ÖZSELÇUK (Üye)

Ek-2. Tez çalışması ile ilgili bildiriler

İstinye Üniversitesi Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Sempozyumu. 28.02.2021 tarihinde sözlü sunum olarak sunulmuştur.

Ek-3. Tez çalışması orijinallik raporu

Mehmet Emin ŞEKER Yüksek
Lisans Tezi
by Mehmet Emin Şeker

Submission date: 06-Aug-2021 04:07PM (UTC+0300)
Submission ID: 1628424569
File name: Mehmet_Emin_Tez_for_Turnitin_06-08-21.FA.pdf (2.39M)
Word count: 11744
Character count: 75313

Mehmet Emin ŞEKER Yüksek Lisans Tezi

ORIGINALITY REPORT

2%

SIMILARITY INDEX

2%

INTERNET SOURCES

1%

PUBLICATIONS

1%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

acikerisim.dicle.edu.tr

Internet Source

<1%

2

link.springer.com

Internet Source

<1%

3

K Ikebuchi. "Stromal cell-dependent ex vivo expansion of human cord blood progenitors and augmentation of transplantable stem cell activity", Bone Marrow Transplantation, 10/01/2000

Publication

<1%

4

Submitted to Wageningen University

Student Paper

<1%

5

avesis.hacettepe.edu.tr

Internet Source

<1%

6

www.nature.com

Internet Source

<1%

7

C. Pafumi, P. Bosco, A. Cavallaro, M. Farina et al. "TWO CD34 + STEM CELLS FROM UMBILICAL CORD BLOOD ENRICHMENT

<1%

Ek-4. Digital Makbuz



Digital Receipt

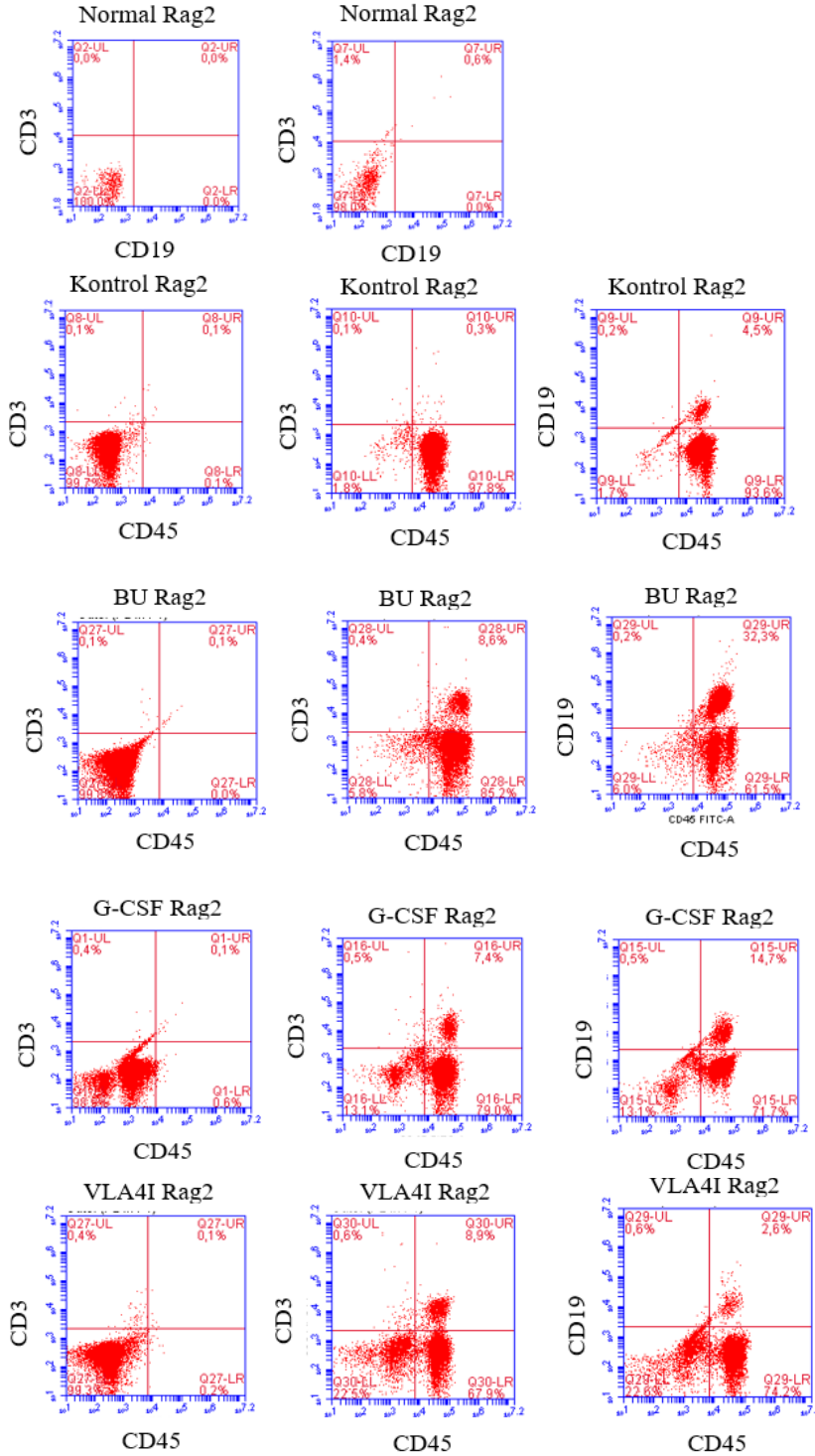
This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Mehmet Emin Şeker
Assignment title: Mehmet Emin Şeker Tez 06-08-21
Submission title: Mehmet Emin ŞEKER Yüksek Lisans Tezi
File name: Mehmet_Emin_Tez_for_Turnitin_06-08-21.FA.pdf
File size: 2.39M
Page count: 51
Word count: 11,744
Character count: 75,313
Submission date: 06-Aug-2021 04:07PM (UTC+0300)
Submission ID: 1628424569



Ek-5. 3.ay PK'daki CD3 ve CD19 FACS oranları gösterilmiştir.



3.ay PK daki CD3 ve CD19 FACS oranları gösterilmiştir. Tedavi almayan, hazırlık rejimi almayan ve hazırlık rejimi olarak BU, G-CSF, VLA-4I verilen grupların 3.ayda PK'dan yapılan FACS sonuçları gösterilmektedir. BU: Busulfan, G-CSF: Granülosit-koloni uyarıcı faktör, VLA4I: Very late antijen 4 inhibitörü

Ek-6. Nakil edilen Rag2 farelerin periferik kan engraftman sonuçları (%)

Grup	CD45RA (%)	CD3 (%)	CD19 (%)	NK (%)
BU RAG2 (1m) (swiss)		4,83±0,63	7,4±5,59	4,7±1,59
BU RAG2 (3m) (swiss)		6,3±5,5	2,16±1,52	6,13±0,77
BU RAG2 (6m) (swiss)	11,5±4,5	3,86±3,51	3,56±2,17	2,56±1,15
G-CSF RAG2 (1m) (swiss)		1,93±0,83	0,6±0,43	6,83±2,74
G-CSF RAG2 (3m) (swiss)		2,4±0,80	0,93±0,2	3,43±1,9
G-CSF RAG2(6m) swiss)	6,3±2,75	1,4±0,2	6,85±0,25	5,35±2,55
BU RAG2 (1m) (SF-rag2)		1,93±0,56	1,33±0,09	7,5±0,22
BU RAG2 (3m) (SF-rag2)		0,86±0,16	0,8±0,04	5,03±1,54
BU RAG2 (6m) (SF-rag2)	1,2±0,46	0,16±0,12	0,36±0,09	1,23±0,82
G-CSF RAG2 (1m) (SF-rag2)		2±079	5,37±2,4	5,97±0,24
G-CSF RAG2 (3m) (SF-rag2)		0,45±0,15	1,15±0,25	3,75±0,45
G-CSF RAG2 (6m) (SF-rag2)		1	0,2	0,8
Kontrol RAG2 (1m) (balbc)	5,6±1,9	0,7±0,5	4,5±1,2	20,7±13,1
Kontrol RAG2 (3m) (balbc)	9,7±2,8	8,0±8,5	7,2±2,8	6,1±5,4
BU RAG2 (1m) (balbc)	23,6±9	6±3,2	20,4±9,4	10,6±9,6
BU RAG2 (3m) (balbc)	44,1±8	21,7±13	40,4±8,2	1,7±1,06
G-CSF RAG2 (1m) (balbc)	8,35±6,1	11,17±11	2,9±2	15,85±6,6
G-CSF RAG2 (3m) (balbc)	9,7±6,8	18,5±15,14	4,85±5,5	10±6,7
VLA-4I RAG2 (1m) (balbc)	12,4±14,5	2,4±2,9	2,8±0,9	7,15±7,13
VLA-4I RAG2 (3m) (balbc)	6,4±5,1	22,8±19,4	3,9±4,3	1,8±04
BU RAG2 (1m) (UCOE-rag2)	2,65±0,45	1,55±0,45	1,15±0,35	2,1±0,3
BU RAG2 (3m) (UCOE-rag2)	8,75±2,85	2,45±1,55	1,7±0,4	9±0,4
G-CSF RAG2 (1m) (UCOE-rag2)	2,7±0,7	1,6±0,3	2,05±0,25	2,25±0,65
G-CSF RAG2 (3m) (UCOE-rag2)	8,7±2,7	2,55±1,45	1,1±0	4,6±2,5
VLA-4I RAG2 (1m) (UCOE-rag2)	1,8±2	0,9±0,1	0,85±0,25	1
VLA-4I RAG2 (3m) (UCOE-rag2)	6,45±1,45	1,7±0,1	2,7±0,8	13,35±5,5

Ek-7 Farelere ait parazit raporu



ARDEN
Araştırma & Deney
Araştırma Deneysel Tıp malzemeleri
Deney Hayvanları yemleri
Şeker Mah. 1408. Cadde 30/9 Etimesgut ANKARA

01.03.2021 tarihinde flotasyon metodu kullanılarak yapılan parazitolojik muayenede, alınan örnekler genç, orta yaşlı ve yaşlı olarak gruplara ayrılmış ve üç grupta incelenmiştir. Yapılan parazitolojik analiz sonuçları ve değerlendirmesi aşağıda belirtilmiştir.

Parazitolojik Analiz Bulguları

Numune	Kullanılan Yöntem	Sonuç
Genç Fare	Flotasyon	Negatif
Orta Yaşlı Fare	Flotasyon	Negatif
Yaşlı Fare	Flotasyon	Negatif

Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Yapılan analizler neticesinde rastgele alınan 3 grup örneğin hiçbirinde paraziter hastalık etkenine rastlanmamıştır.

Aşkın Nur DERİNÖZ

Vet. Hekim

ARDEN ARAŞTIRMA DENEY
Yüküm İDE

9. ÖZGEÇMİŞ