

**pGITRL AKTARILAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
KÜÇÜK HÜCRELİ AKCİĞER KANSERİNE *İN VİTRO*
ETKİSİ VE ALTIN NANOPARTİKÜLLERLE
İŞARETLENMESİ**

***İN VİTRO* EFFECT OF pGITRL TRANSFECTED
MESENCHYMAL STEM CELLS ON SMALL CELL
LUNG CANCER AND THEIR LABELLING WITH GOLD
NANOPARTICLES**

ÇAĞLA ZÜBEYDE KÖPRÜ

PROF. DR. PETEK KORKUSUZ
Tez Danışmanı

DOÇ. DR. AYŞEN GÜNEL-ÖZCAN
İkinci Tez Danışmanı

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

2015

ÇAĞLA ZÜBEYDE KÖPRÜ' nün hazırladığı "pGITRL Aktarılan Mezenkimal Kök Hücrelerin Küçük Hücreli Akciğer Kanserine *in vitro* Etkisi ve Altın Nanopartiküllerle İşaretlenmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI'** nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya
Başkan



Prof. Dr. Petek Korkusuz
Danışman



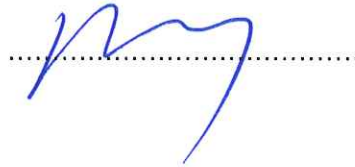
Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş
Üye



Doç. Dr. Dilek Şendil Keskin
Üye



Doç. Dr. Barış Baykal
Üye



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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Anneme ve Babama

ETİK

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

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

beyan ederim.

19/06/2015



ÇAĞLA ZÜBEYDE KÖPRÜ

ÖZET

pGITRL AKTARILAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN KÜÇÜK HÜCRELİ AKCİĞER KANSERİNE *İN VİTRO* ETKİSİ VE ALTIN NANOPARTİKÜLLERLE İŞARETLENMESİ*

Çağla Zübeyde KÖPRÜ

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşen GÜNEL-ÖZCAN

Haziran 2015, 112 sayfa

Glukokortikoidle indüklenen tümör nekrozis faktör reseptörü (GTR) ve ligandı GITRL, tümör nekrozis faktör (TNF) ailesi üyeleridir. GTR ve GITRL kanser mikroçevresinde birçok hücrede bulunmakta ve tümör davranışını düzenlemede rol oynayabilmektedir. Mezenkimal kök hücreler (MKH) hem mezenkimal hem de mezenkimal olmayan birçok dokuya farklılaşma özelliğinde olan erişkin kök hücrelerdir. İmmün yanıtı düzenleme özellikleri ve malign büyüme yerlerine spesifik göç kapasiteleri MKH'lerin hücresel araçlar olarak kullanılabilmesini ve böylece otoimmün hastalıklar ve kanser tedavisinde etkili olabileceklerini göstermektedir. Akciğer kanserlerinden çok malign ve agresif gidişli bir tümör olan küçük hücreli akciğer kanserinin (KHAK) tedavisinde GTR ve ligandının etkileri hiç araştırılmamış ve bu amaçla MKH taşıyıcı sistem olarak hiç kullanılmamıştır.

Tez çalışması kapsamında GITRL ile transfekte edilen MKH'ler GTR ekspres eden (SCLC-21H) ve GTR ekspres etmeyen (NCI-H82) KHAK hücre hatlarıyla ko-kültüre edilerek tümör hücrelerinin proliferasyon ve apoptoz davranışları araştırıldı. İleride yapılacak *in vivo* çalışmalara yönelik olarak GITRL ifade eden MKH'ler altın nanopartiküller ile işaretlendi. Çalışmamızda ilk olarak kanser hücrelerinde ve MKH'lerde GTR ve GITRL protein ve mRNA ifadeleri araştırıldı.

GITRL taşıyan plazmid ile MKH'lerin transfekte edilmesinde lipozomal sistemler ve elektroporasyon sistemi kullanılarak en etkili yöntem araştırıldı. Transfeksiyon sonucu hem geçici hem de kalıcı transgen taşıyan MKH'lerin karakterizasyonları yapıp, SCLC-21H ve NCI-H82 hücre hatlarıyla ko-kültüre edilerek apoptoz, proliferasyon ve canlılıkları araştırıldı. Ayrıca MKH'ler altın nanopartiküller ile işaretlenerek hem tek başlarına hem de ko-kültür ortamında transmisyon elektron mikroskopunda görüntülenmeleri sağlandı. Sonuç olarak GITRL transgenini taşıyan MKH'lerin GTR ifade eden KHAK hücrelerinin çoğalma ve apoptoz davranışlarını değiştirebileceği saptandı.

Anahtar kelimeler: mezenkimal kök hücre (MKH), altın nanopartikül, küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK), GTR, GITRL, apoptoz, proliferasyon

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (# 011D04101013) ve TÜBİTAK (# 112T474) tarafından desteklenmiştir.*

ABSTRACT

IN VITRO* EFFECT OF pGITRL TRANSFECTED MESENCHYMAL STEM CELLS ON SMALL CELL LUNG CANCER AND THEIR LABELLING WITH GOLD NANOPARTICLES

Çağla Zübeyde KÖPRÜ

**Doctor of Philosophy, Department of Nanotechnology and
Nanomedicine**

Supervisor: Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

Co-supervisor: Doç. Dr. Ayşen GÜNEL-ÖZCAN

June 2015, 112 pages

Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor (GITR) and its ligand GITRL are members of tumor necrosis factor (TNF) family members. GITR and GITRL found in many cells of cancer microenvironment and can modulate tumor behaviours. Mesenchymal stem cells (MSCs) are non-hemotopoietic stem cells that have capability to differentiate both mesenchymal and non-mesenchymal origin of various tissues. The modulation of immune response and migration capabilities to the malign tissues makes them good candidates for using them as cellular vehicles for autoimmune and cancer therapy. GITR and GITRL interaction have not been investigated in small cell lung cancer (SCLC) which is an aggressive and malign type of tumor. And MSCs have not been used as cellular vehicles.

In thesis study, the apoptosis and proliferation of tumor cells were investigated by co-culturing of GITRL transgene carrying MSCs and GITR expressing (SCLC-21H) and not expressing cell lines (NCI-H82). GITRL expressing MSCs were labeled with gold nanoparticles for the *in vivo* forthcoming studies. In our study, GITR and GITRL protein and mRNA levels were investigated in both MSCs and cancer cells.

For MSCs transfection with GITRL, the most efficient system were assessed by using liposomal and electroporation systems. After transfection, both transient and stable transfected MSCs were characterized and co-cultured with SCLC-21H and NCI-H82 cell lines and studied for apoptosis, proliferation and viability. Additionally, they were labeled with gold nanoparticles both in co-culture environment and alone by transmission electron microscopy. In conclusion, GITRL expressing MSCs can change proliferative and apoptotic behaviours of GITR expressing SCLC.

Keywords: mesenchymal stem cell (MSC), gold nanoparticle, small cell lung cancer (SCLC), GITR, GITRL, apoptosis, proliferation

*This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Project Coordination Unit (# 011D04101013) and TUBITAK (# 112T474).

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, sonsuz sabırla beni her zaman çalışmaya teşvik eden ve güven veren, değerli danışmanım Prof. Dr. Petek Korkusuz'a,

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini her aşamada benimle paylaşan ve önerileriyle bana yol gösteren ikinci tez danışmanım Doç. Dr. Ayşen Günel-Özcan'a

Labaratuvarlarının kapılarını her zaman sonuna kadar açmış olan ve beni her zaman Kök Hücre ailesinin bir üyesi olarak gören Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya'ya

Tez çalışmamda geri bildirimleri ile desteklerini gördüğüm tez izleme komitesi üyeleri hocalarım Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş ve Doç. Dr. Dilek Şendil Keskin'e

Tez ve tez harici çalışmalarda her zaman katkı ve desteğini gördüğüm Doç. Dr. Güneş Esendağlı'ya

Bilgi ve yardımlarını benimle paylaşan Yrd. Doç. Dr. Fatima Aerts Kaya ve Dr. Betül Saltık Çelebi'ye

Akım sitometrisi deneylerinde yardımlarını esirgemeyen İrem Akar Soycan'a

Floresan mikroskop çalışmalarında çok yardımını gördüğüm Selda Ayhan'a

Dostluğunu ve yardımseverliğini hiçbir zaman benden esirgemeyen ve hep yanımda olan sevgili arkadaşım Ilgın Çagnan'a

Kök hücre ailesine katıldığım ilk günden itibaren her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Sevil Köse'ye

Benden hiçbir konuda yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen kök hücre ailesindeki tüm arkadaşlarıma

Tez çalışmam boyunca yol arkadaşlığı yaptığım ve beni hep destekleyen Berna Kankılıç'a

Sevgisini ve güvenini her zaman bana hissettiren sevgili eşim Burak Köprü'ye

Hayatımın her anında destekçim olan olan sevgili aileme

Teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tümör Mikroçevresi	4
2.2. Akciğer Kanseri	5
2.3. Kök Hücreler ve Mezenkimal Kök Hücreler	6
2.4. Tümör Mikroçevresi ve Mezenkimal Kök Hücreler	10
2.5. Tümör Mikroçevresi ve Glukokortikoidle Uyarılan Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü/ Ligandı (GITR/GITRL)	12
2.6. GITR/ GITRL ve Tümör Mikroçevresi	14
2.7. Altın Nanopartiküller	18
2.7.1 Altın Nanopartiküllerin Hücre İçine Alınması	20
2.7.2. Altın Nanopartiküller ile Kanser Hücrelerinin İzlenmesi	21
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	24
3.1. Hücre Kültürü ve Karakterizasyon Deneyleleri	24
3.1.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü	24
3.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünofenotipik Karakterizasyonu	24
3.1.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklanma Analizi	25
3.1.4. Kanser Hücre Hatlarının Kültürü	26
3.1.5. Mezenkimal Kök Hücre ve Kanser Hücre Hatlarının TEM ile İncelenmesi .	26
3.2. GITR ve GITRL' nın İfadelerinin Araştırılması	27
3.2.1. GITR ve GITRL İfadesinin Protein Düzeyinde Araştırılması	27
3.2.2. GITR ve GITRL İfadesinin mRNA Düzeyinde Araştırılması	27
3.3. Transformasyon	31
3.3.1. Kompetan Hücreye Plazmid Aktarımı	31

3.3.2. Plazmid İzolasyonu	32
3.3.3. Restriksiyon Enzimleri ile Kesilen Ürünlerin Agaroz Jelde Görüntülenmesi	32
3.3.4. Mezenkimal Kök Hücrelere Plazmid Aktarımı (Transfeksiyon)	33
3.4. GITRL Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	34
3.4.1. Akım sitometrisi ile GITRL İfadesinin Araştırılması	34
3.4.2. qPCR ile GITRL İfadesinin Araştırılması	35
3.4.3. İmmünfloresan İşaretleme Yöntemi ile GITRL Varlığının Araştırılması	35
3.4.4. GITRL Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünofenotipik Karakterizasyonu	35
3.4.5. GITRL Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklanma Potansiyellerinin Araştırılması	36
3.4.6. GITRL Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerin Göç Etme Özelliklerinin Araştırılması	36
3.5. Kanser Hücrelerinin Rekombinant GITRL ile Kültürü	36
3.6. Altın ve Demir Nanopartiküller	37
3.6.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Altın Nanopartiküller ile İşaretlenmesi	37
3.6.2. Altın ile İşaretlenmiş Mezenkimal Kök Hücrelerin Proliferasyonu	37
3.6.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Demir Nanopartiküller ile İşaretlenmesi	38
3.7. Ko-kültür Çalışmaları	38
3.7.1. Ko-kültüre Edilen Hücrelerin Apoptoz Etkinliğinin Belirlenmesi	38
3.7.2. Ko-kültüre Edilen Hücrelerin Siva İfadesinin Araştırılması	40
3.7.3. Ko-kültüre Edilen Hücrelerin Proliferasyon Etkinliğinin Belirlenmesi	40
3.7.4. Altın ile İşaretlenmiş Mezenkimal Kök Hücrelerin Kanser Hücreleri ile Ko- kültürü	40
3.8. İstatistiksel Yöntem	41
4. BULGULAR	42
4.1. Hücre Kültürü ve Karakterizasyon Deneyleri	42
4.1.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünofenotipik Karakterizasyonu	42
4.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklanma Analizi	42
4.2. GITR ve GITRL'nin İfadelerinin Araştırılması	43
4.2.1. GITR ve GITRL İfadesinin Protein Düzeyinde Araştırılması	43
4.2.2. GITR ve GITRL İfadesinin mRNA Düzeyinde Araştırılması	44
4.3. Transformasyon	45
4.3.1. Mezenkimal Kök Hücreye Plazmid Aktarımı (Transfeksiyon)	46

4.3.2. Kalıcı Transfektanların Elde Edilmesi	48
4.4. GITRL Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	49
4.4.1. Akım sitometrisi ile GITRL İfadesinin Araştırılması	49
4.4.2. qPCR ile GITRL İfadesinin Araştırılması	49
4.4.3. İmmünfloresan Boyama ile GITRL İfadesinin Araştırılması	50
4.4.4. Transfekte Hücrelerin İmmunofenotipik Karakterizasyonu	51
4.4.5. GITRL Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklanma Potansiyellerinin Araştırılması	51
4.4.6. Transfekte Hücrelerin Göç Etme Özelliklerinin Araştırılması	54
4.4.7. Transfekte Hücrelerin Transmisyon Elektron Mikroskopunda İncelenmesi .	58
4.5 Kanser Hücre Hatlarının Rekombinant GITRL Proteini ile Kültürü	60
4.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Altın ve Demir Nanopartikülleri ile İşaretlenmesi	62
4.6.1. Altın ile İşaretli Mezenkimal Kök Hücrelerin Proliferasyonu	64
4.6.2. Altın ile İşaretli pGITRL Taşıyan Mezenkimal Kök Hücrelerin Proliferasyonu	65
4.7. Ko-kültür Çalışmasının Sonuçları	65
4.7.1. Ko-kültüre Edilen Kanser Hücrelerinin Annexin/PI ile Apoptozunun Araştırılması	65
4.7.2. Ko-kültüre Edilen Kanser Hücrelerinin TUNEL Yöntemi ile Apoptozunun Araştırılması	68
4.7.3. Ko-kültürlerdeki Kanser Hücrelerinde SIVA Ekspresyon Düzeyleri	69
4.7.4. Ko-kültürlerdeki Kanser Hücrelerinde ELISA ile Siva Protein Düzeyleri	70
4.7.5. GITRL Transgenini Taşıyan MKH'lerin Kanser Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Etkisi	73
4.7.6. Altın ile İşaretli pGITRL Taşıyan Mezenkimal Kök Hücrelerin Kanser Hücreleri ile Ko-kültürü	75
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇLAR	86
KAYNAKLAR	88
EKLER	109
EK-1. Etik Kurul İzni	109
ÖZGEÇMİŞ	110

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Mezenkimal kök hücre kaynaklı biyoaktif moleküller.	8
Çizelge 2.2. Mezenkimal kök hücrelerin tümörlü bölgeye göçünde etkili olan sitokinler ve işlevleri	10
Çizelge 2.3. GITR-GITRL etkileşiminin tümördeki etkilerinin çalışıldığı son <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> araştırmalar	18
Çizelge 2.4. Altın nanopartiküllerin kanser hücrelerinin görüntülenmesinde ve tedavisinde kullanılmasına yönelik çalışmalar.	23
Çizelge 3.1. Mezenkimal kök hücrelerin immünofenotipik karakterizasyonunda kullanılan yüzey belirteçleri	25
Çizelge 3.2. cDNA sentezinin basamakları	28
Çizelge 3.3. Gerçek zamanlı kantitatif PCR analizinin basamakları	29
Çizelge 3.4. Gerçek zamanlı kantitatif PCR analizinde kullanılan primer dizileri	30
Çizelge 4.1. Lipozomal sistem ile yapılan transfeksiyon sonucu elde edilen en yüksek GITRL ifade değerleri.	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Tez çalışmasının amaç ve araştırma soruları.....	3
Şekil 2.1 Mezenkimal kök hücelere tümör hücrelerinin göçü.	9
Şekil 2.2. Tümör hücreleri ile makrofaj, Treg, DH, efektör T hücresi ve NK hücrelerindeki GITR ve GITRL dağılımı ve etkileşimi	13
Şekil 2.3. GITR uyarımıyla CD4 ve CD8 ile işaretli efektör ve regülatuar T hücrelerinin kısa ve uzun dönemli düzenlenmesi.	14
Şekil 2.4. Konakta tümöre karşı bağışıklık yanıtından kaçmak için tümör mikroçevresinin düzenlediği immün baskılama.	15
Şekil 2.5. Altın nanopartiküllerin tıp ve sağıktaki uygulama alanları.	19
Şekil 3.1. pCR3::GITRL vektörünün haritası.	31
Şekil 4.1. Mezenkimal kök hücrelerin immunofenotipik karakterizasyonu.	42
Şekil 4.2. Mezenkimal kök hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklanma kapasitesi.	43
Şekil 4.3. Mezenkimal kök hücre, NCI-H82 ve SCLC-21H hücrelerinin GITR ve GITRL protein düzeylerinin akım sitometrisi görüntüleri.	44
Şekil 4.4. qPCR'da mezenkimal kök hücre, NCI-H82 ve SCLC-21H hücrelerinin GITR ve GITRL hedef gen ekspresyon düzeyleri.	45
Şekil 4.5. Restriksiyon enzimi ile kesilen ürünlerin agoroz jel görüntüsü.	46
Şekil 4.6. Elektroporasyon ile yapılan optimizasyon çalışmasının floresan mikrografları.	47
Şekil 4.7. DNA optimizasyon çalışması sonucu akım sitometrisi ile mezenkimal kök hücrelerdeki GITRL protein düzeyleri.	48
Şekil 4.8. Farklı G418 konsantrasyonlarında büyütülen mezenkimal kök hücrelerin zamana göre değişen miktarları.	48
Şekil 4.9. Geçici ve kalıcı transfeksiyon sonrası GITRL protein düzeylerinin akım sitometrisi histogramları.	49
Şekil 4.10. Kalıcı transfektanlarda GITRL hedef gen ekspresyon düzeyleri.	50
Şekil 4.11. Kalıcı transfeksiyon sonrası hücrelerin floresan mikrografları.	50
Şekil 4.12. GITRL aktarılmış mezenkimal kök hücrelerin akım sitometrisi ile immünofenotipik karakterizasyonu.	51

Şekil 4.13. Boş ve transfekte olmuş mezenkimal kök hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklanma potansiyeli.....	52
Şekil 4.14. Adipojenik farklanma genlerinin ifade düzeylerinin kat değişimi grafiği.....	53
Şekil 4.15. Osteojenik farklanma genlerinin ifade düzeylerinin kat değişimi grafiği.....	54
Şekil 4.16. <i>In vitro</i> yara iyileşmesi modelinde çizik sonrası geçici transgen taşıyan mezenkimal kök hücrelerin göç etme özelliklerine ait mikrograflar	55
Şekil 4.17. <i>In vitro</i> yara iyileşmesi modelinde çizik sonrası kalıcı transgen taşıyan mezenkimal kök hücrelerin göç etme özelliklerine ait mikrograflar	57
Şekil 4.18. Mezenkimal kök hücre, NCI-H82 ve SCLC-21H akciğer tümör hücre hatlarına ait elektronmikrograflar.	59
Şekil 4.19. Sağa doğru artan büyütmelede pCR3 ve pGITRL ile transfekte mezenkimal kök hücre elektronmikrografları.	60
Şekil 4.20. SCLC-21H ve NCI-H82 kanser hücre hatlarının artan rekombinant GITRL ile uyarımı sonucu çoğalma eğrileri.....	61
Şekil 4.21. Altın nanopartiküller ile işaretli hücrelerin elektronmikrografları.....	62
Şekil 4.22. Demir nanopartiküller ile işaretli mezenkimal kök hücrelere ait mikrograflar/electronmikrograflar.....	63
Şekil 4.23. WST-1 yöntemiyle altın nanopartiküllerin mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonuna etkisi.	64
Şekil 4.24. WST-1 yöntemiyle altın nanopartiküllerin kalıcı pGITRL taşıyan mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonuna etkisi.	65
Şekil 4.25. Kanser hücrelerinin akım sitometrisinde spontan ölüm yüzdeleri	66
Şekil 4.26. Ko-kültür sonucu SCLC-21H ve NCI-H82 hücrelerinde saptanan hücre ölümü.....	67
Şekil 4.27. TUNEL yöntemiyle mezenkimal kök hücrelerle ko-kültür sonucu kanser hücrelerindeki apoptotik indeks kat değişimi grafikleri ve mikrograflar..	69
Şekil 4.28. Geçici ve kalıcı transfekte mezenkimal kök hücreler üzerindeki kanser hücrelerinin <i>SIVA1</i> ifadesi kat değişimi grafiği ve jel görüntüsü.	70

Şekil 4.29. ELISA'da Siva analizi için OD450nm'de ortalama abzorban değerleri hesaplanarak oluşturulan standart eğri grafiği.....	71
Şekil 4.30. ELISA yöntemiyle SCLC-21H ve NCI-H82 hücrelerinde Siva protein düzeyleri.....	72
Şekil 4.31. Ko-kültür sonucu SCLC-21H ve NCI-H82 hücrelerinde saptanan hücre proliferasyonu.....	74
Şekil 4.32. Altın ile işaretli pGITRL ile transfekte mezenkimal kök hücrelerin SCLC-21H hücreleri ile ko-kültürüne ait elektronmikrograflar.....	76

KISALTMALAR

AICD	Aktivasyonla uyarılan hücre ölümü
AITR	Aktivasyonla uyarılan tümör nekrozis faktör ailesi reseptörü
ALPL	Alkaline phosphatase
ASH	Antijen sunucu hücre
BGH	Bovine growth hormone
BSA	Bovine serum albumin
bFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü
BT	Bilgisayarlı tomografi
CAF	Kanser ile bağlantılı fibroblastlar
CBFA1	Core binding factor alpha 1
ColE1	Colicin E1
CXCL	c-x-c motif kemokin ligand
CXCR	Kemokin reseptör
DAB	Diaminobenzidine
DMEM-HG	Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose
DMEM-LG	Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low Glucose
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESM	Hücreler arası matriks
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
DEPC	Dietilpirokarbonat
DH	Dendritik hücre
EGF	Endotel büyüme faktörü
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal sığır serumu
GITR	Glukokortikoidle uyarılan tümör nekrozis faktör reseptörü

GITRL	Glukokortikoidle uyarılan tümör nekrozis faktör reseptör ligandı
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni uyaran faktör
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HIF-1	Hipoksiyle indüklenen faktör-1
HLA-G5	İnsan lökosit antijen G izoform
IFN-gama	İnterferon gama
IPKH	İndüklenmiş pluripotent kök hücre
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
LPS-PKMNH	Lipopolisakkarit ile uyarılmış periferik kan mononükleer hücreleri
LTi	Lenfoid doku indükleyicisi
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein-1
MDSCs	Miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler
MKH	Mezenkimal kök hücre
MMP	Matriks metalloproteinaz
NK	Doğal öldürücü hücreler
NP	Nanopartikül
KHAK	Küçük hücreli akciğer kanseri
PBS	Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi
PCMV	Sitomegalovirüs promotörü
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF	Platalet kökenli büyüme faktörü
PEG	Polietilen glikol
PGE2	Prostaglandin E2
PGF	Plasental büyüme faktörü
PPAR γ	Peroksizom proliferator-activated receptor gamma

qPCR	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
rGITRL	Rekombinant GITRL
SCD	Stearoyl-CoA desaturase
SDF-1 alfa	Stromal kökenli büyüme faktörü-1 alfa
TKpA	Timidin kinaz poliadenilasyon sinyali
Treg	Regülatuvar T hücreleri
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling
TGF-1	Transforme edici büyüme faktörü 1
TGF- beta 1	Transforme edici büyüme faktörü beta 1
TGF-ss1	Transforme edici büyüme faktörü-ss1
TLR	Toll benzeri reseptör
TNF-alfa	Tümör nekrozis faktör alfa
TNFR	Tümör nekrozis faktör reseptör
VCAM	Vasküler hücre adezyon molekülü
VEGF	Vasküler endotel büyüme faktörü
VEGF-A	Vasküler endotel büyüme faktörü A

1. GİRİŞ

Günümüzde tüm dünyada toplum sağlığını tehdit eden en önemli hastalık gruplarından birini oluşturan kanserin etyopatogenezi, tanı ve tedavi seçenekleri yoğun biçimde araştırılmaktadır. Dünya istatistikleri incelendiğinde en fazla ölüme neden olan kanser türü akciğer kanseridir [1] Akciğer kanseri, Uluslararası Kanser Ajansı verilerine göre Türkiye ve dünyada erkeklerde en sık görülen kanserlerde birinci sıradayken, kadınlarda beşinci sıradadır [2]. Bunlardan küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) hızlı seyirli olduğu için öncelikli önem taşımaktadır. Akciğer kanserlerinin %20'lik kısmını oluşturan KHAK'nin erken yayılma kapasitesi ve çoklu ilaç direnci göstermesi nedeniyle tedavisi zordur [3, 4]. KHAK tanısı konulan hastalarda tedaviye başlanan her yüz hastanın sadece beşi, beş yıl veya daha fazla yaşamaktadır [5]. Bu sebeple KHAK hücreleri ve tümör mikroçevresinin bileşenleri arasındaki ilişkiyi araştırmak yeni tedavi seçeneklerini aydınlatmış olacaktır.

Glukokortikoidle uyarılan tümör nekrozis faktör reseptörü (GTR) ve ligandı (GITRL) kanser mikroçevresinde pek çok hücrede bulunmakta ve tümör davranışını düzenlemektedir. Fakat reseptör ve ligandın etkileri oldukça karmaşıktır. Birlikte veya tek başlarına hareket ederek sinyal iletisi yapabilirler. GTR-GITRL etkileşimi farklı immün efektör hücre tiplerinde de değişiklikler gösterir. Bu farklılık sinyal iletisine göre ve immün yanıtın düzeyine göre değişir.

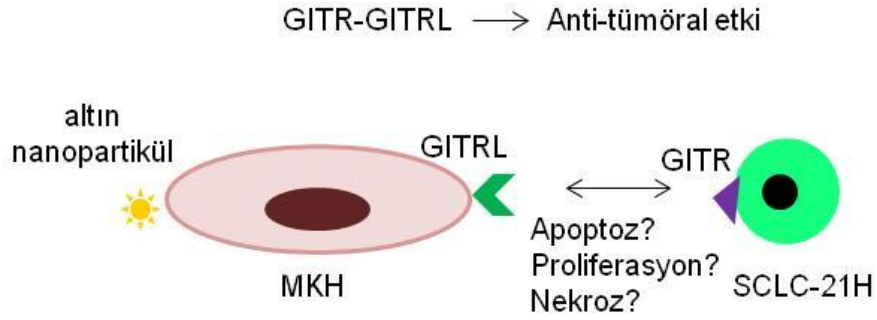
Küçük hücreli akciğer kanseri çok malign ve agresiv gidişli bir tümördür ve GTR eksprese etmektedir [6, 7]. Bu nedenle GITRL ile etkileşimine yanıtı yeni bir hücre ve/veya gen tedavisi yaklaşımı için önemli bilgi sağlayabilir. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda GTR'ünü çeşitli yollarla tetiklemek veya GITRL'nı regülatuar T hücreleri (Treg) aracılı immün baskılamanın engellenmesi amacı ile transfekte etmek kanser tedavisi adına önemli katkılar sağlamıştır [8-11]. Anti-GTR'nün B16 melanoma [12], sarkoma [13], kolon karsinoma [14] gibi kanserlerin tedavisinde etkinliği gösterilmiştir. Tümörlere adenovirüs 5 eksprese eden membran bağlı ya da çözümlü GITRL enfekte edilerek tümöre karşı bağışıklığın sağlanmasını amaçlayan *in vitro* çalışmalar yapılmaktadır [15]. GITRL aracılığıyla transfeksiyon yapılarak tümör hücrelerinin hedeflenmesi amaçlayan birçok çalışma bulunmaktadır [8-11, 16-18]. Bu alanda gen ve hücre bazlı tedaviler umut vaat

etmektedir [19, 20]. Fakat farklılaşmış hücrelerin klinik uygulamaları, tedavide çok sayıda hücrenin gerekmesi, hücrelerin *in vitro* koşullarda çoğaltılmalarındaki zorluklar ve tümörlü bölgeye tutunma oranlarının zayıf olması gibi nedenlerden ötürü sınırlı olabilmektedir [21]. Malign bölgelere göç etme özelliği bulunan mezenkimal kök hücreler (MKH) bu tip çalışmalarda kullanılabilir. MKH'ler, hematopoietik olmayan yetişkin kök hücrelerdir ve mezodermden köken alırlar. Kendi kendini yenileme ve birçok dokuya farklılaşabilme özellikleri vardır [22]. Buna ek olarak MKH'ler istenilen ajanların tümörlü bölgeye taşınmasında etkili hücre tedavi araçları olarak bildirilmektedir [23, 24]. Örneğin fare MKH'lerinin hem *in vitro* olarak tümör hücrelerine ve *in vivo* olarak akciğer tümör dokusuna göç ettikleri gösterilmiştir [25]. IFN-beta, TRAIL, PEDF ve IL-12 gibi genler ile genetik olarak modifiye edilmiş MKH'lerin, melanoma, glioma, meme ve prostat kanserinde *in vivo* etkileri çalışılmıştır [26]. Genetik olarak modifiye edilmiş MKH'lerin intravenöz enjeksiyonunun tümöre karşı etkileri akciğer, beyin ve deri altı tümörlerinde gösterilmiştir [24, 27-29]. MKH'lerin tümör hedefli tedavilerde sık kullanılmasının en önemli nedenleri genetik modifikasyonlarının, *in vitro* kültür ve çoğaltılmalarının kolay olmasıdır [30]. MKH'lerin göç eğilimi gösterdikleri tümör mikroçevresi ya da tümörün (melanoma, glioma, prostat ve meme tümörü gibi) kendisi üzerinde doğrudan proliferasyon ya da apoptozis davranışlarıyla ilişkili etkilere sahip olduğu bilinmektedir [26]. GITRL ile transfekte edilmiş MKH'ler, diğer fenotipik özelliklerinin onlara getirdiği avantajla, GTR taşıyan küçük hücreli akciğer tümör hücrelerinin davranışlarını (canlılık, proliferasyon, apoptoz) değiştirebilir.

Buradan yola çıkarak çalışmamızda GITRL ile transfekte edilen insan kökenli MKH'lerle GTR eksprese eden tümör hücrelerinin hedeflenmesi planlandı. Bu kapsamda araştırma sorularımız aşağıda sıralanmıştır.

- MKH'ler GTR ve GITRL'nı bulunduruyor mu?
- Eğer bulundurlarsa MKH'lerin tümör hücreleriyle etkileşiminde GTR ve GITRL'in rolü nedir?
- Eğer bulundurmuyorsanız GITRL geni aktarılan MKH'ler agresif gidişli akciğer tümör hücre hatlarında GTR-GITRL aracılı hangi etkileri gösteriyor olabilir?

- İleriye yönelik *in vivo* çalışmalarda kullanılmak üzere MKH'ler biyoyumlu nanotaniciklerle işaretlenebilir mi?



Şekil 1.1. Tez çalışmasının amaç ve araştırma soruları şematize edilmiştir.

Bu amaçla ilk olarak MKH'ler GITR ve GITRL varlığı açısından değerlendirildi. İkinci basamakta MKH'ler GITRL ile transfekte edildikten sonra GITR eksprese eden KHAK hücreleriyle ko-kültüre edildi ve tümör hücrelerinin canlılık, proliferasyon ve apoptoz davranışları incelendi. GITRL ile transfekte edilen MKH'ler altın nanopartiküller ile işaretlendi ve SCLC-21H hücreleri ile ko-kültüre edilerek görüntülenmeleri sağlandı (Şekil 1.1).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tümör Mikroçevresi

Tümör mikroçevresi tümör tarafından oluşturulan bir ortamdır. Gelişen bir tümörün mikroçevresinde çoğalan tümör hücreleri, tümör stroması, kan damarları, buraya göç eden inflamatuvar hücreler ve ilgili birçok hücre yer alır [31]. Özetle tümör mikroçevresi;

- 1) Tümör hücreleri,
- 2) Normal hücreler (parankim hücreleri, epitel hücreleri, vb.),
- 3) ESM (hücreler arası matriks),
- 4) Fibroblastlar,
- 5) Damar hücreleri (endotel hücreleri, perisitler ve düz kas hücreleri),
- 6) İmmün sistem hücreleri (T lenfositler, dendritik hücreler (DH), B lenfositler, doğuştan bağışıklığın efektör hücreleri, polimorfonükleer lökositler, makrofajlar, mast hücreleri ve doğal öldürücü hücreler (NK hücreleri))

içeren ve bunların birbirleriyle olan etkileşimleri için bir ortam sağlayan fonksiyonel bir bölgedir [31-33].

Malign ve transforme olmamış hücreler arasındaki etkileşim tümör mikroçevresini oluşturur. Karsinogenezin tüm aşamalarında malign olmayan hücrelerin dinamik ve sıklıkla da tümörü geliştirici rolleri vardır. Hücreler arası iletişim sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, inflamatuvar ve matriksi şekillendiren enzimlerin karmaşık ve dinamik ilişkisi ile yürütülür. Tümör mikroçevresi yara iyileşmesi ve inflamasyon süreci ile benzerlik taşır fakat makrofaj gibi kanserde rol alan hücrelerin kronik inflamasyonla bir ilişkisi yoktur. Çünkü inflamasyon ve yara iyileşme süreçleri malign hücrelerdeki onkogenik mutasyonları aktive eder [34].

Kanser hücreleri, immün yanıt sürecinde, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla konakçının bağışıklık sisteminden saklanır veya tümöre karşı bağışıklık yanıtını baskılar. Bu nedenle immün sistem tümör hücrelerini tanımakta zorlanır ve yeterince aktive olamaz. Etkili bir immün yanıt oluşamadığı için tümör hücreleri çoğalarak yaşamlarına devam eder [35].

İnsanda tümörler konakçının bağışıklık sisteminden kaçmak için 4 temel mekanizma geliştirir;

- 1) Tümöre karşı bağışıklık yanıtının uyarılmasının engellenmesi
- 2) Tümör mikroçevresinde efektör hücrelerin yetersiz işlevi
- 3) Tanıma sinyallerinin azlığı
- 4) Tümör tarafından immün direnç geliştirilmesi [31]

Fizyolojik koşullarda organizmayı otoimmüniteden koruma görevi olan Treg hücreleri, son yıllarda kaçış mekanizmaları ile bağlantılı olarak sıkça araştırılmaktadır [31, 36]. Kanserde regülatuvar T lenfositler çoğalıp tümör bölgelerine göç ederler ve efektör T hücrelerinin proliferasyonunu önlerler [37, 38].

2.2. Akciğer Kanseri

Akciğer kanserleri gelişmiş ülkelerde en sık görülen ve ölümcül seyreden tümörlerdir. Global kanser istatistik verilerine göre akciğer kanseri halen tüm dünyada kanserler arasında %12,8 oranında görülürken, tüm kanser ölümlerinin %17,8'ini oluşturmaktadır [39]. ABD'de 2002 yılında 169.400 kişi akciğer kanseri tanısı almıştır, 2003 yılında 154.900 kişi bu hastalığa yakalanmıştır. Yaklaşık bir milyon kişinin her yıl tüm dünyada bu hastalıktan öldüğü tahmin edilmektedir. 2005 yılı Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı verilerine göre Türkiye'de %30,18 (erkeklerde yüz binde kırk insidans bildirilmektedir) sıklıkla en fazla akciğer ve bronş kanserleri görülmektedir [40]. Ülkemizdeki yüksek sigara içme oranları dikkate alındığında (erkeklerde %63, kadınlarda %24) akciğer kanseri tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de en sık görülen organ kanserlerindedir. Tütün kullanımı nedeniyle, kanser insidansının ülkemizde her yıl %6 arttığı bilinmektedir. Tütün nedenli agresiv davranışlı akciğer kanserlerinin başında küçük hücreli akciğer tümörleri gelmektedir.

Küçük hücreli akciğer kanseri, tüm akciğer kanserlerinin %20'lik kısmını oluşturur [41]. KHAK, bronş epitelinin nöroendokrin hücrelerinden köken alan nöroektodermal bir tümördür. KHAK'de, nöroblastomada olduğu gibi N-myc geni amplifiye olmuştur [42]. KHAK, küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerine (KHDAK) göre daha az görülür [43]. KHAK hücrelerinin hızlı çoğalma kapasitesi nedeniyle ilk basamakta konvansiyonel kanser tedavilerine iyi yanıt verir [44]. Ancak, bu kanser hücrelerinin erken dönemdeki ileri disseminasyon ve uzak metastaz kapasitesi yüksek mortalite riskini beraberinde getirir [43, 45]. Düşük

evreli KHAK'nde bile sisplatin temelli kemoterapi ve torasik irradyasyon ile yaklaşık %20 oranında tedavi yanıtı alınabilmektedir. İleri evredeki hastalarda kombine kemoterapi ile yaşam süresi uzatılsa da uzun dönem hayatta kalım oranı düşüktür. KHAK tedavisi için, pek çok yeni sitotoksik ajan ile klinik çalışmalar yürütülmektedir. Preklinik çalışmalarda molekül hedefli tedavi stratejileri ile yeterli deneysel başarı henüz elde edilememiştir [43-45].

Adjuvan tedavi olarak tasarlanan immünoterapi ve aşı çalışmalarında alınan umut vaat edici sonuçlar KHAK hücrelerinin immün sistem ile olan yakın ilişkisini göstermektedir [46]. KHAK hücreleri, özellikle disseminasyon sırasında, dolaşımda sıklıkla karşılaştıkları immün hücrelerden saklanmak ve onları baskılamak için özel mekanizmalara sahiptir [35, 47]. Özellikle akciğer kanseri immün sistem hücrelerinin baskılayıcı tipleri tarafından seçici olarak infiltre edilir [48].

2.3. Kök Hücreler ve Mezenkimal Kök Hücreler

Uygun koşullar altında spesifik doku tiplerine farkanabilen ve kendi kendini yenileme kapasitesine sahip farkanmamış pluripotent hücrelere kök hücre denir [49]. Farklanma özelliklerine göre dört tip kök hücre bulunmaktadır. Bunlardan; totipotent kök hücre: intra ve ekstra embriyonik hücrelere farkanabilen, pluripotent kök hücre: sadece intra-embriyonik hücrelere farkanabilen, multipotent kök hücre: birçok hücre tipine farkanabilen, unipotent kök hücre ise sadece tek bir hücre tipine farkanabilen hücrelerdir [50]. Bu sınıflandırma dışında kök hücreler embriyonik kök hücreler, fetal kök hücreler ve yetişkin kök hücreleri olmak üzere üç alt grupta incelenir [51]. Bu sınıflandırmaya indüklenmiş pluripotent kök hücreler (IPKH) de katılmıştır [52] IPKH'leri somatik hücrelerden yeniden programlanma ile oluşturulur [52-54]. Yetişkin kök hücre sınıfına dahil olan MKH'ler; hem mezenkimal hem de mezenkimal kökenli olmayan dokulara farkanma özelliğindeki, hematopoietik olmayan kök hücrelerdir [55]. Bu hücreler ilk olarak yaklaşık kırk yıl önce Friedentstein ve arkadaşları tarafından fibroblast benzeri yapışkan hücreler olarak tanımlanmışlardır [56]. MKH'ler, kemik iliğinin stromal kompartmanından, yağ dokusundan, trabeküler kemikten ve iskelet kasından izole edilebilir [57]. MKH'lerin; osteoblastik, kondrojenik ve adipojenik hücre serilerine farkanmalarının yanı sıra son zamanlarda nöronal ve kardiyomiyojenik hücrelere

farklandıkları da gösterilmiştir [55]. MKH'ler kemik iliğinden elde edildiklerinde, tekniğe bağlı olarak her bir aspiratta yaklaşık olarak %0,001- %0,01 oranında sayılmışlardır [55].

Literatürde MKH'lere özel hücresel tek bir belirteç ya da reseptör bildirilmemektedir [55, 56]. MKH biyolojisini daha kolay çalışmak ve MKH'leri tanımlamak için ISCT (International Society of Cellular Therapy) üç ana kriter belirlemiştir. Bunlar aşağıda sıralanmıştır:

(1) izole hücrelerin kültür ortamında zemine tutunması

(2) CD105 (SH2;endoglin), CD73 (SH3 ve SH4) ve CD90 (Thy-1) gibi belirteçlerin ekspresyonu (>%95), CD34, CD45, CD14 ya da CD11B, CD79A ya da CD19 ve insan lökosit antijeni- DR (HLA-DR)' nin eksprese olmaması (>%95)

(3) osteosit, adiposit ve kondrosite farklanma kapasitesi [55, 56, 58].

İnsan MKH'leri hematopoietik belirteçleri (CD11a/ *lymphocyte function associated antigen 1*, CD14, CD31, CD34, or CD45) ya da kostimulatuar molekülleri (CD80, CD86 ve CD40) eksprese etmez. Fakat farklı koşullarda davranışlarını belirleyen CD44, CD49, CD54/CD102, CD71, CD73, CD90, CD105, CD166 ve CD271 gibi belirteçleri eksprese eder [58-61].

Birçok bölgeden (kemik iliği, yağ doku, amniyon sıvısı, periosteum, fetal dokular) izole edilebilme özelliğine sahip olan MKH'lerin *in vitro* çoğalma kapasiteleri yüksektir. Bu özellikleri onların *in vivo* tedavi çalışmaları için istenilen sayıya ulaşmalarını sağlar [62, 63]. Bu özelliklerinden ötürü MKH'ler klinik çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Hücre bazlı tedavilerde amaç; otolog ya da allojenik hücreler kullanarak yerine koymak, tedavi etmek, hücre, doku, organ ve sistemlerin fonksiyonunu kolaylaştırmaktır. Burada MKH'lerin embriyonik ya da fetal kök hücrelere göre avantajları immuntolerans, farklanma ve transformasyon gibi biyolojik özelliklerinin olmasıdır [59]. Yani MKH'lerin klinikte kullanımlarını etkileyen, onların biyolojik özellikleridir. Bu özellikler şu şekilde de sıralanabilir;

- 1) MKH'ler yaralanma sonrası intravenöz olarak enjekte edildiklerinde inflamasyon bölgesine göç eder.
- 2) MKH'ler birçok hücre tipine farklanabilir.
- 3) MKH'ler yaralı hücrelerin yerine konmasını uyarıcı ve inflamasyonu engelleyen birçok biyoaktif molekül salgılar.

4) İmmünogenesite özellikleri yoktur ve bağışıklık sistemini düzenleyici görevler yapabilirler [62].

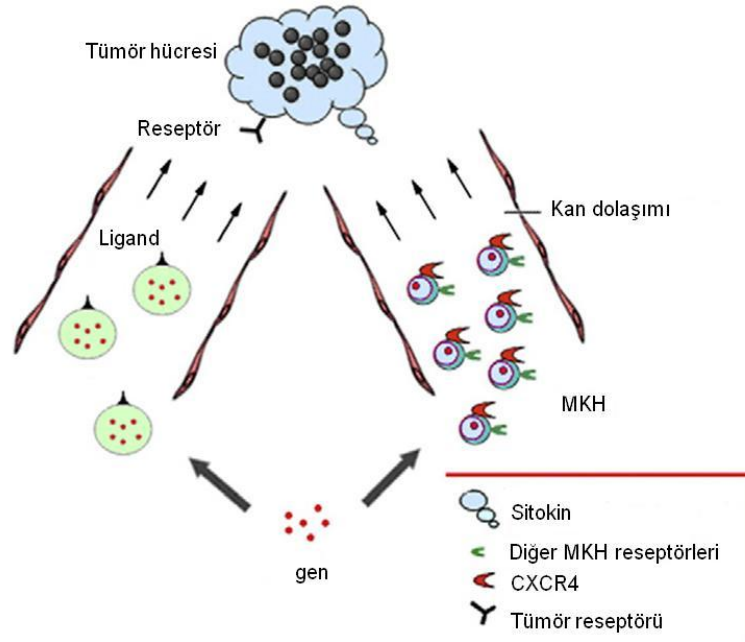
Yapılan çalışmalarda MKH'lerin dokudan bağımsız olarak yaralı bölgelere göç ettiği gösterilmiştir [62]. Örneğin bir çalışmada mürin MKH'leri yaralanmaya yanıt olarak akciğerlere göç etmiş ve fare akciğer dokusunda yaralanmaya yanıt olarak epitel benzeri fenotip göstererek inflamasyonu azaltmıştır [64]. Hücre göçü yaralı hücrelerden salgılanan ve büyüme faktörlerinden kemokinlere kadar uzanan birçok sinyale bağlıdır [65]. Yapılan çalışmalar MKH'lerin göçünün platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) gibi reseptör kinaz büyüme faktörleri ve CCR2, CCR3, CCR4 ya da CCL5 gibi kemokinlerin kontrolünde olduğunu göstermektedir [66]. Çizelge 2.1'de MKH'lerden salgılanan biyoaktif moleküller (büyüme faktörü, sitokin ve kemokinler) özetlenmiştir. Salgılanan bu faktörler MKH'lerin doku onarımına destek verir [62].

Çizelge 2.1. Mezenkimal kök hücre kaynaklı biyoaktif moleküller ve işlevleri özetlenmiştir.

Biyoaktif moleküller	Görevleri
PGE2	Proliferasyonu baskılayıcı araçlar [67] İnflamasyon baskılayıcı [68]
IL-10	İnflamasyon baskılayıcı [69, 70]
TGF-1, HGF	T lenfosit proliferasyonunun baskılayıcı [71]
İnterlökin 1 reseptör antogonist	İnflamasyon baskılayıcı [72]
HLA-G5	Naif T hücrelerini baskılayıcı [73]
LL-37	İnflamasyonu azaltıcı [74]
Anjiopoitin-1	Epitelyal protein geçirgenliğini korur [75]
MMP3, MMP9	Neovaskülarizasyonu düzenler [76]
Keratinosit büyüme faktörü	Alveolar epitelyal sıvı taşınması [77]
EGF, bFGF, PIGF, MCP-1	Endotel ve düz kas hücrelerinin proliferasyonunu kolaylaştırır [78, 79]

Mezenkimal kök hücrelerin bağışıklık sistemini düzenleme yetenekleri ilk olarak Bartholomew ve arkadaşları [80] tarafından tanımlanmıştır. Fakat kesin mekanizma hala tam olarak anlaşılammıştır. Doğrudan hücre-hücre temasının ya da çözünür immün baskılayıcı faktörlerin salınmasının rol oynadığı düşünülmektedir. MKH'ler bağışıklık sistemi hücrelerinin (T hücreleri, B lenfositler, NK hücreleri ve DH'ler gibi) büyük bir kısmı ile etkileşime girer [62]. MKH'ler,

antijen sunucu hücreler (makrofajlar, DH'ler, B lenfositler) üzerinde bulunan bir molekül olan MHC II'yi (*major histocompatibility complex II*) bulundurmaz. Bu hücreler CD40, CD80, CD86 gibi kostimulatuar molekülleri bulundurmaz. Böylece immün baskılama olmaksızın allojenik transplantasyonda kullanılabilirler [55]. MKH'ler; prostaglandin, TGF- β ve HGF salgılayarak T hücrelerine ait immün yanıtı düzenler, sitotoksik T hücre yanıtını baskılar [57]. Sistemik olarak sağlıklı hayvanlara verildiğinde MKH'lerin akciğer, karaciğer ve kemik dokusuna yerleştikleri görülmüştür. Yaralanmayla beraber göç, yaralı bölgeye doğru değişmektedir [57]. MKH'lerin, iskemik doku ve tümör stroması gibi hipoksik çevrelere göç etme özellikleri vardır [55]. Ayrıca IL-8, transforme edici büyüme faktörü-ss1 (TGF-ss1) ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi parakrin büyüme faktörlerinin tümör bölgesinde artması, MKH'lerin bu bölgeye göç etmesini sağlar [55, 81]. Bu tip seçici göç, gen tedavisi için vektör olarak rol oynama kapasitesine sahiptir ve burada MKH'ler sistemik yan etkileri azaltarak anti-neoplastik tedaviler sağlar [55]. Aşağıdaki şekilde genetik olarak modifiye edilmiş MKH'ler tümörlü bölgeye taşınması şematize edilmiştir (Şekil 2.1). Aynı zamanda bu göç sırasında tümör hücrelerinden salgılanan sitokin ve MKH'lerden salgılanan kemokin reseptör 4 (CXCR4) gibi kemokinlere dikkat çekilmiştir.



Şekil 2.1 Mezenkimal kök hücrelere tümör hücrelerinin göçü [21] numaralı referanstan alınarak düzenlenmiştir.

2.4. Tümör Mikroçevresi ve Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücrelerin, tümör stroması gibi hipoksik çevrelere göç etme özelliklerinin mekanizması tam olarak anlaşılmamış olsa da, tümör mikroçevresinin biyolojik özelliğine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir [55, 82]. Karsinogenez ilerlerken MKH'lerin tümörlü bölgeye göç etmesi, tümör hücrelerinden salınan çözünür faktörler sayesinde olur [83]. Bu göçün en önemli nedeninin tümörden salınan kemotaktik faktörler olduğu düşünülmektedir. MKH'ler yüzeylerinde büyük miktarda kemokin ve sitokin reseptörleri bulundurur ve bunlar *in vitro* olarak ligandlarına yanıt verir. Bu reseptör ve ligandların manipülasyonu göç şeklini *in vivo* olarak değiştirir. Tümörlerin ürettiği kemokin ve sitokinler, MKH reseptörlerine ligand olarak sunulur [84]. Tümör mikroçevresi MKH göçüne; EGF, vasküler endotel büyüme faktörü A (VEGF-A), fibroblast büyüme faktörü (FGF), PDGF, stromal kökenli büyüme faktörü-1 alfa (SDF-1 alfa), IL-8, IL-6, granülosit makrofaj koloni uyaran faktör (GM-CSF), granülosit koloni-uyaran faktör, Ang1, MCP-1, hematopoietik büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü beta-1 (TGF beta-1) ve ürokinaz-tip plazminojen aktivatör gibi çözünür faktörlerin salgılanmasıyla yardımcı olur [82, 85] (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Mezenkimal kök hücrelerin tümörlü bölgeye göçünde etkili olan sitokinler

Sitokinler	Kaynaklar
İnflamatuvar sitokinler	[86, 87]
TNF- α	[87]
IFN- γ	[86]
IL-1 β	[86]
IL-6	[88, 89]
IL-8	[90]
Büyüme faktörleri	
TGF- β	[91]
PGF	[92]
PDGF	[86]
HGF	[86]
Kemokinler	
SDF-1/CXCR4	[93, 94]
MMP	[95]
VCAM-1	[96]
CXCL	[88, 90]
MCP-1	[97]
Diğer faktörler	
HIF-1	[92]
LL-37	[98]

Birçok çalışma MKH'lerin tümörlü bölgeye göç etme yeteneklerini göstermiş olsa da, uygulama yolu, tümör hücrelerinin tipi, yeri ve de MKH tipi bu süreçte önem arz etmektedir [99]. Yapılan *in vivo* çalışmalarda MKH'lerin tümörlü bölgeye göçünün spesifik olmadığı ve göç yöneliminin intravenöz, intraarteriyel ve peritümöral bölgelere uygulandığı zaman gerçekleştiği gözlenmiştir [100-103]. Non-spesifik olarak dışarıdan uygulanan MKH'ler akciğerde, kemik iliğinde, lenfoid organlarda lokalize olur. Buna ek olarak lokalize kronik inflamasyon gözlenen yerlerde görülmeleri de yara iyileşme sürecine dahil olmalarını açıklar [100].

Mezenkimal kök hücrelerin göç yeteneklerinin yanısıra, tümör büyümesini düzenleme özellikleri de tartışma konusudur. MKH'lerin kanseri ilerletici etki gösterdiğine dair var olan çalışmalarda neden gösterilen mekanizmalardan biri immünbaskılamadır. MKH'ler immün sistemin neredeyse tüm hücreleri ile etkileşime girerek immün baskılamaya gösterir. Bu etkileşimler tümörlerin immün sistemden kaçmasını kolaylaştırır [99, 100]. MKH'lerin tümör oluşumunu desteklemelerinin bir diğer sebebi de kanser hücrelerinin MKH'ler üzerinde oluşturduğu transforme edici etkiden kaynaklanır. Örneğin MKH'lerin meme kanserinde kanser ile bağlantılı fibroblastlara (CAF) dönüştüğü düşünülmektedir [100, 104].

Mezenkimal kök hücrelerin tümör oluşumunu engellediğine ya da tümör boyutunu küçülttüğüne yönelik çalışmalar ise daha fazladır. MKH'lerin aşağıda sıralanan bazı yararları, onların kanseri tedavi edici ajanların taşınması amacıyla kullanımını gündeme getirmiştir. Bu özellikler;

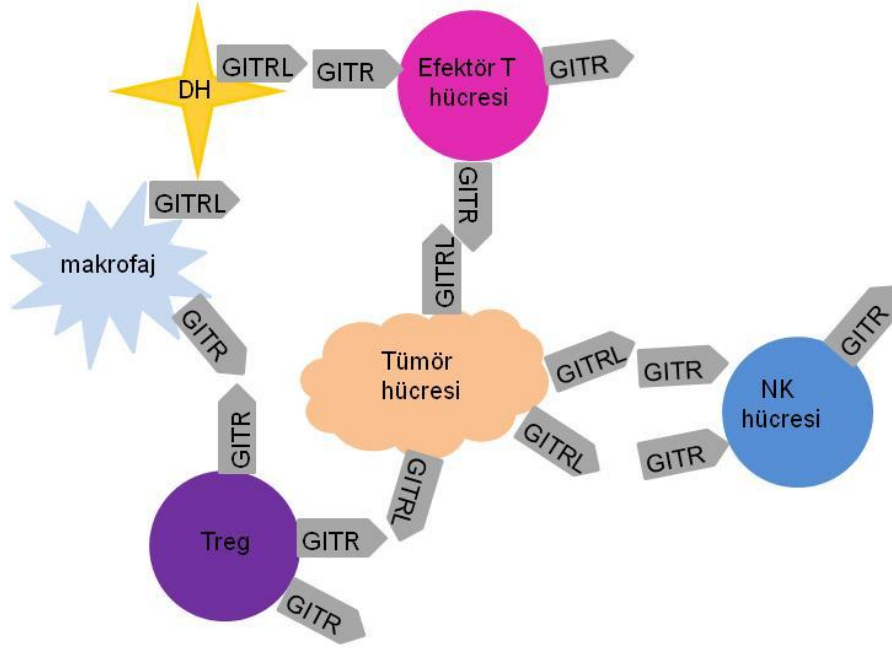
- 1) Mezenkimal kök hücrelerin kolayca elde edilebilmesi ve *in vitro* olarak kolaylıkla çoğaltılabilmesi
- 2) Mezenkimal kök hücrelerin yara ya da tümörlü bölgeye göç yeteneklerinin yüksek olması
- 3) Mezenkimal kök hücrelerin immünojenliği ve intrinsik mutasyon oranının düşüklüğü
- 4) Mezenkimal kök hücrelerin nörotoksisite ve tümörögenez göstermemesi
- 5) Tedavi edici proteinlerin ekspresyonu ve bu proteinlerin salgılanması ile MKH'lerin genetik olarak modifiye edilebilmesidir [21].

2.5. Tümör Mikroçevresi ve Glukokortikoidle Uyarılan Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü/ Ligandı (GITR/GITRL)

CD4⁺ CD25⁺ T hücreleri (Treg) T hücrelerinin bir alt sınıfını oluşturur ve T hücre cevabının kontrolünde yani aşırı immün yanıtı korumada görevlidir. Treg'lerin yokluğu organ-spesifik oto immüniteye neden olur. Buna zıt olarak Treg'lerin varlığı tümöre karşı immüniteden koruduğu için zararlı da olabilir. Kanserin çoğunda Treg'ler periferik kanda ve tümör mikroçevresinde fazlaca bulunur. Bu da Treg'lerin tümöre karşı bağışıklıkta negatif olarak rol oynadığını gösterir [9, 105, 106].

Tümör nekrozis faktör reseptör (TNFR) ailesinin üyeleri ve bunların ligandları hücrelerin proliferasyon, farklılaşma ve aktivasyonunda; hem tümör hücreleri hem de immün efektör hücrelerin ölümünde önemli rol oynar. GITR (AITR; aktivasyonla uyarılan tümör nekrozis faktör ailesi reseptörü ya da TNFRSF18) bu ailenin üyelerinden biridir ve tip I transmembran proteindir [107]. Treg hücreleri üzerinde fazlaca ekspresyon olur. CD4⁺ CD8⁺ T hücreleri, makrofajlar, NK hücreleri ve B lenfositleri üzerinde düşük düzeylerde bulunur. Fakat aktivasyonla beraber CD4⁺ CD8⁺ T hücreleri üzerinde upregüle olur [9]. İnsanlarda GITR ekspresyonu makrofajlarda ve NK hücrelerinde bildirilmişken, farelerde B lenfositlerinde, NK hücrelerinde, NKT hücrelerinde, granülositlerde ve makrofajlarda gözlenmiştir. Bazı hematolojik olmayan dokularda (deri, akciğer) GITR mRNA ekspresyonu hem farelerde hem de insanlarda belirlenmiştir [107].

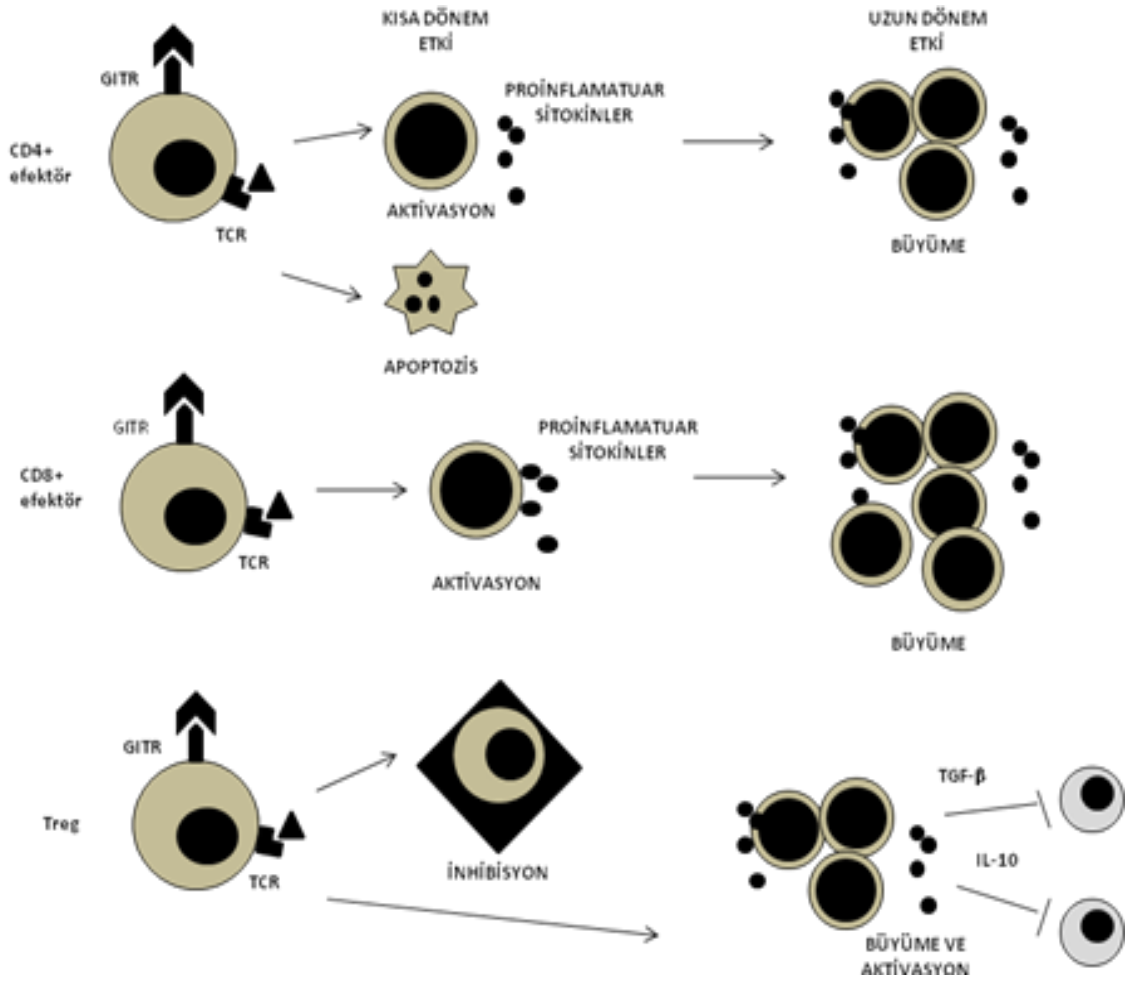
GITRL (TNFSF18 ya da AITR ligand) çoğu TNF ailesinin ligandları gibi tip II transmembran proteindir [107]. Endotel hücreleri, B lenfositler, makrofajlar ve kemik iliği kökenli DH'lerde ekspresyon olur. GITRL ekspresyonu, antijen sunucu hücrede (ASH) toll benzeri reseptör (TLR) ile upregüle edilir ama *in vitro* olarak 48 saat içinde downregüle olur [108]. Aşağıdaki şekilde GITR ve GITRL'nin farklı hücrelerdeki etkileşimi gösterilmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Tümör hücreleri ile makrofaj, Treg, DH, efektör T hücresi ve NK hücrelerindeki GITR ve GITRL dağılımı ve etkileşimi görülmektedir.

Kararlı durum koşullarında $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ Treg hücrelerinde GITR ekspresyonu konvansiyonel CD4 ve CD8 T hücrelerine göre daha fazla gözlenir [109]. GITR, GITRL ligandı ile bağlandığı zaman Treg'lerin baskılama fonksiyonu engellenir [107, 110, 111]. Sonuç olarak Treg'ler üzerinde GITR sinyalizasyonu fonksiyonel inaktivasyona yol açmaktadır. Ancak konvansiyonel T hücrelerinde GITR'nün ligandı ile bağlanması aktivasyonla sonuçlanan kostimulasyona yol açar [112-114].

GITR uyarımı sonucu $CD4^+$ efektör T, $CD8^+$ efektör T ve Treg hücrelerinde kısa ve uzun dönemde farklı etkiler görülmektedir. Aşağıdaki şekilde GITR uyarımının çeşitli etkileri gösterilmiştir (Şekil 2.3).



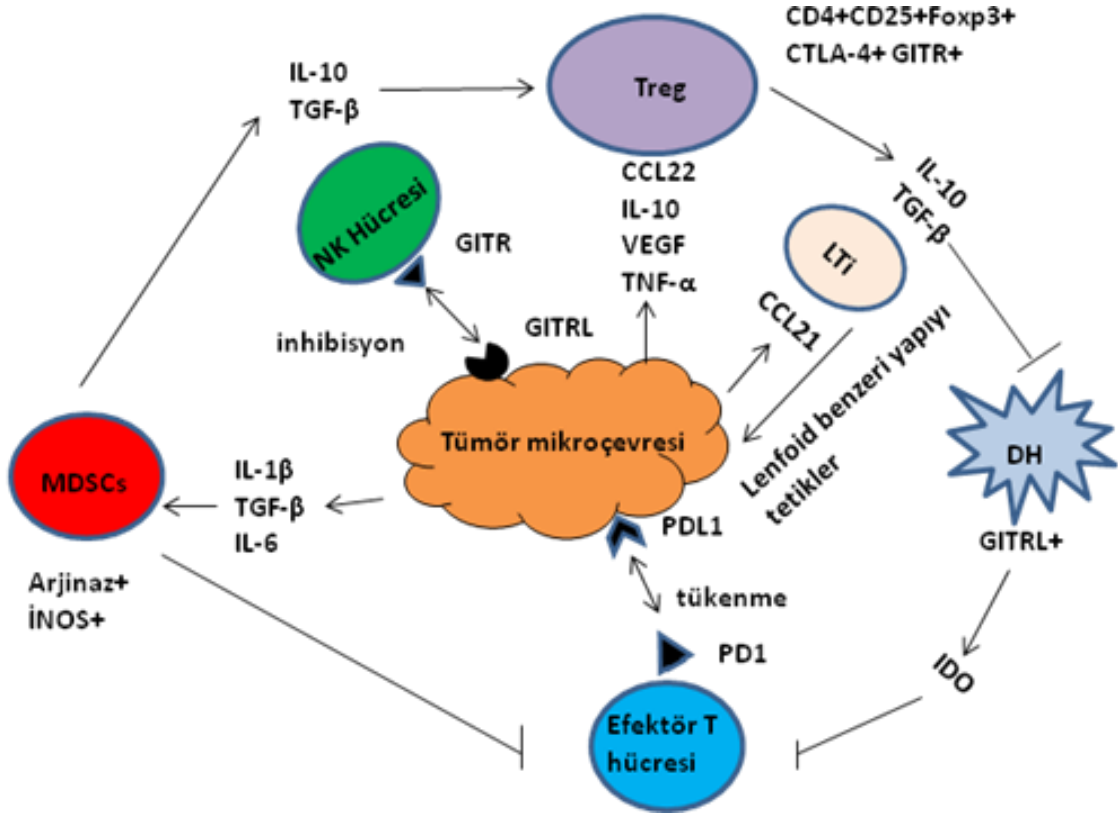
Şekil 2.3. GITR uyarımıyla CD4 ve CD8 ile işaretli efektör ve regülatuar T hücrelerinin kısa ve uzun dönemli düzenlenmesi gösterilmiştir. [115] numaralı referanstan alınarak düzenlenmiştir.

GITR uyarımı CD+ efektör T hücrelerinde kısa dönemde aktivasyon ya da apoptoza yol açarken, uzun dönemde hücrelerin artışı sağlar. CD8+ efektör T hücrelerinde kısa dönemde aktivasyon, uzun dönemde hücre artışı sağlar. Treg'lerde ise inhibisyona yol açar ve hücre artışı ve aktivasyon engellenir.

2.6. GITR/ GITRL ve Tümör Mikroçevresi

Tümör mikroçevresinde bulunan immünbaskılayıcı büyüme faktörleri ve sitokinler; farklılaşma, büyüme ve birçok düzenleyici hücre popülasyonunun (Treg ve miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler; MDSCs) bu bölgeye toplanmasını sağlar. Treg'ler otoimmün hastalıkların denetlenmesinde önemli rol oynarlar fakat tümör mikroçevresinde Treg'lerin varlığı tümör spesifik CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin

efektör fonksiyonlarını baskılar ve bu da tümör gelişimine neden olur. Treg'ler tarafından gerçekleştirilen immün baskılama mekanizması IL-10 ve TGF- β salınımını içerir ve bu da DH olgunlaşmasını ve sitotoksik T hücre aktivasyonunu engeller [111] (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Konakta tümöre karşı bağışıklık yanıtından kaçmak için tümör mikroçevresinin düzenlediği immün baskılama şematize edilmiştir. Tümör tarafından salgılanan sitokin, büyüme faktörü ve kemokinler MDSC ve Treg'lerin çoğalmasını sağlar. Bu hücreler tümör hücrelerinin büyümesini tetikler ve sitotoksik T hücrelerinin fonksiyonlarını engeller. Lenfoid doku indükleyicisi hücreler (LTI) tümörün etrafında lenfoid benzeri yapı oluşturarak tümör büyümesini tetikler. [111] numaralı referanstan alınarak düzenlenmiştir.

In vitro olarak GITR'nün tetiklenmesi yanıt veren T hücrelerini ko-stimüle eder ve Treg hücre baskılama aktivitesini yok eder. Böylece efektör T hücre aktivasyonu artar. Fakat GITR tetiklenmesinin uzun dönemde etkileri bilinmemektedir. Örneğin GITR'nü tetiklemek apoptozisten koruma sürecine de neden olabilir. Hangi faktörlerin (T hücre fenotipine mi, T hücre aktivasyonuna mı bağlı?) üstün geldiği bilinmemektedir [116]. GITR düzenlenmesi 2010 yılında Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından en çok umut vaat eden 25 konu arasında listelenmiş ve son zamanlarda

GITR ile ilgili çalışmalarda agonist anti-GITR antikorlarının tümör spesifik T hücre sayısını ve tümöre karşı aktiviteyi arttırdığı bildirilmektedir. Bu çalışmalarda GITRL aracılığıyla transfeksiyon yapılarak tümör hücrelerinin hedeflenmesi amaçlanmıştır [8-11, 16-18]. Birçok grup, GITR'nün agonistik antikorla tetiklenmesini, transfektanlarda GITRL ekspresyonunu, ya da GITRL'nin çözünür formunun eklenmesiyle mürin CD4⁺ CD25⁺ Treg'lerin baskılama fonksiyonunun engellendiği göstermiştir [108]. İnsan Treg'inde ise aksine, GITR'nün antikorla uyarımından sonra baskılayıcı fonksiyon korunmaktadır. Buradan GITR'nün insan ve farelerde farklı etkiler gösterdiği anlaşılmaktadır. Fare çalışmalarında taze izole edilmiş Treg'ler kullanılırken, insan çalışmalarında kanser hastalarından izole edilmiş Treg'ler ya da CD4⁺ CD25⁺ T hücrelerinin poliklonal populasyonları kullanılmaktadır. Bundan dolayı GITR'nü tetiklemek için kullanılan koşullar GITR-GITRL etkileşiminin fonksiyonel sonucunu etkiler [115].

GITR; Treg aktivasyonunu düzenlemesinin dışında, T hücrelerinde kostimulatuar sinyalleri düzenleme yeteneğine sahiptir. Ayrıca GITR'nün tetiklenmesi (sGITRL, agonistik antikor ya da GITRL eksprese eden transfektanlar ile) insanlarda ve kemiricilerde T hücre proliferasyonunu ve sitokin üretimini arttırdığı için ilgi çekici olmaya başlamıştır. GITR kostimülasyonu, ilk sinyalin gücüne bağlıdır. Yani GITR tetiklenmesi, immün aktivasyonun düzeyinden etkilenebilir [107].

In vitro koşullarda Treg hücreleri üzerindeki GITR'nün agonistik antikorunu DTA-1'e bağlanması, Treg'lerin baskılama özelliğini engeller. Coe ve arkadaşları [117] yaptıkları çalışmada; *in vivo* koşullarda GITR bağlamasının, DTA-1 ile muamele edilmiş farelerin Treg hücrelerini hasara uğratmadığını göstermiştir. Foxp3/GFP *knock-in* fareleri DTA-1 ile etkileştirmek, Treg hücrelerinin seçici olarak azalmasına neden olmuş ve böylece DTA-1'in Treg hücrelerini hedefleyen ve azaltıcı etki gösteren bir antikor olduğu anlaşılmıştır. Tümör taşıyan farelerde Treg hücrelerinin DTA-1 aracılı deplesyonu sadece tümörlerde izlenmiş, tümör drane lenf nodlarında görülmemiştir. Bu özellikler tümör antijen spesifik Treg hücreleri kullanılarak yapılan, adoptif transfer modelinde doğrulanmıştır. İlginç olarak, tümör dokusundaki Treg hücreleri GITR ekspresyonunu, tümör drane lenf nodlarına göre daha fazla göstermektedir. Buradan Treg deplesyonunun etkinliğinin GITR ekspresyon düzeyi ile ilişkili olabileceği sonucu çıkmaktadır [117]. Aynı yıl Cohen ve arkadaşları [118] ise DTA-1'in hem efektör T hücrelerini hem de Treg'leri

düzenlediğini göstermiştir. Monoterapi olarak DTA-1 kullanıldığı zaman B16 melanom tümörleri küçülmüştür. Sonuçta efektör T: Treg oranı ve CD8⁺ T hücre aktivitesi artmıştır. Araştırmacılar DTA-1'in tümör içindeki Treg birikimini, stabiliteelerini değiştirerek koruduğunu, Foxp3 ekspresyon kaybı sonucu tümör içi baskılama kapasitesini düzenlediğini göstermişlerdir. Bu sonuçlar agonist anti-GITR antikollarının kanserde kullanımında, immünotörapatik stratejilerin gelişmesi gerektiğini açıklamaktadır [118]. Cote ve arkadaşlarının [119] yaptığı çalışmada ise zayıf immünojenik melanoma karşı GITR uyarımının koruyucu etkisi çalışılmıştır. CD4-depleksiyon terapisine zıt olarak, GITR uyarımı melanom taşıyan CD8 T hücreleri üzerinde direkt koruyucu etki göstermiştir [119]. İmai ve arkadaşları [120] ise 2009'da yaptıkları çalışmada; GITR uyarımının adoptif transfer edilmiş T hücrelerindeki rolüne bakmışlardır. Çalışmada kemirici fibrosarkom CMS5 için spesifik adoptif transfer edilmiş CD8⁺ T hücreleri kullanılmıştır. Sonuçta GITR ekspresyonu, transfer edilmiş hücrelerde tek hücre düzeyinde, çok fonksiyonluluğu (T hücrelerinin birçok efektör fonksiyon göstermesi; sitokin, kemokin ya da tek hücre düzeyinde sitotoksisiteyi düzenleyen moleküllerin üretimi) kolaylaştırmıştır. Buradan efektör T hücre çok fonksiyonluluğunun, GITR uyarımı ile birlikte başarılı bir tedavi seçeneği olduğu anlaşılmaktadır [120].

Calmels ve arkadaşlarının [15] 2005 yılında yaptıkları çalışmada; kemirici GITRL'i adenovirüs-5 vektörüne klonlanmış (Adv-GITRL) ve bu *konstrakt* ile enfekte tümör hücrelerinin CD4⁺ CD25⁺ baskılayıcı Treg'ler varlığında T hücrelerini aktive edip etmeyeceği araştırılmıştır. Bu amaçla *konstraktlar* (Adv-GITRL) B16 tümörlerine enjekte edilmiş ve tümör gelişimine herhangi bir etkisi olup olmadığına bakılmıştır. Sonuçta GITRL ile yapılan tedavi (gen transferi ya da sistemik enjeksiyon) sonucu hem CD4⁺ CD25⁻ hem de CD8⁺ T hücrelerinin proliferasyonu artmıştır [15].

GITRL Treg aracılı immün baskılamayı engellemek, efektör T hücrelerini direkt kostimüle etmek ve efektör T hücrelerini aktivasyon ile uyarılan hücre ölümünden (AICD) korumak gibi kombine bir etkiye sahiptir. Bu özellikler GITRL'ni kanser tedavisi için cazip kılmaktadır. GITRL'ni gen transferi ya da rekombinant GITRL *solubl* proteininin sistemik enjeksiyonuyla vermek kanser tedavisi için önemli klinik yarar sağlayabilir [15]. 2011 yılında yapılan bir çalışmada kemik iliği kökenli DH'ler (BMDCs), GITRL eksprese eden rekombinant adenovirüsler ile transfekte edilmiş

(pAd-GITRL-BMDCs) ve Lewis akciğer karsinomlu mürin modelinde tedavi edici etkisi araştırılmıştır. *In vitro* koşullarda pAd-GITRL-BMDCs, efektör T hücre proliferasyonunu arttırmış ve Treg hücrelerinin baskılayıcı özelliğini ortadan kaldırmıştır. pAd-GITRL-BMDCs ile yapılan aşılama sonucu tümör gelişimi engellenmiştir. Bu engellenme IFN-gama üreten CD8⁺ T hücrelerinin artması ve Treg hücrelerinin *in vivo* koşullarda azalması ile birlikte olmaktadır [121].

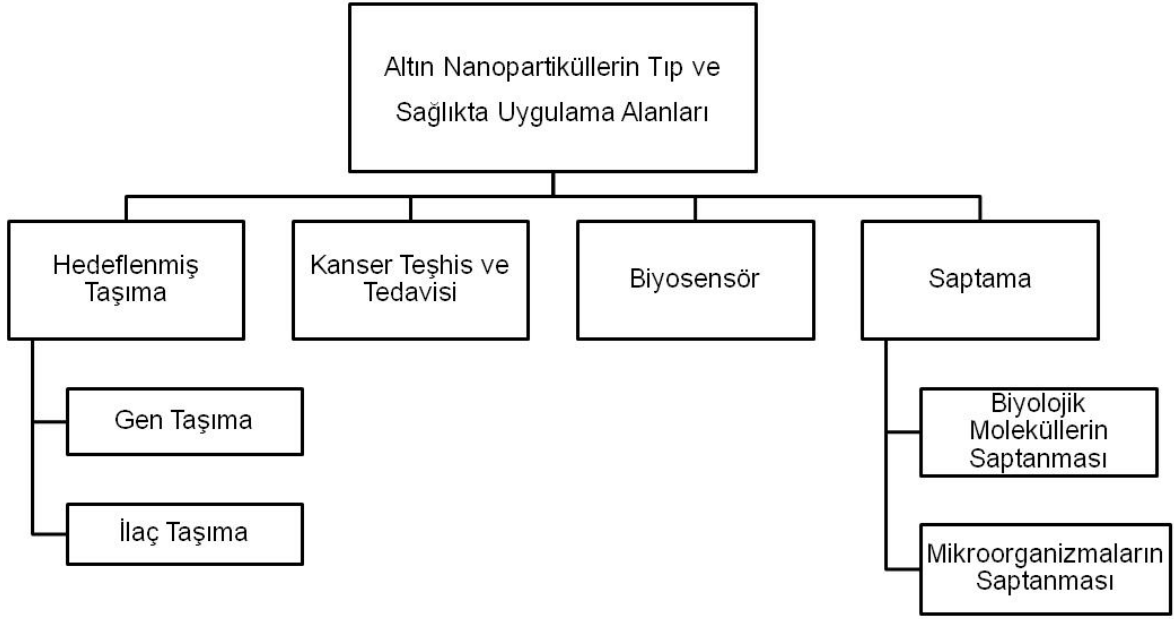
Yukarıda detaylarıyla açıklandığı üzere GITR'ünü çeşitli yollarla tetiklemek veya GITRL'ni Treg aracılı immün baskılamının engellenmesi amacı ile transfekte etmek kanser tedavisi adına önemli katkılar sağlamıştır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. GTR-GITRL etkileşiminin tümördeki etkilerinin çalışıldığı son *in vitro* ve *in vivo* araştırmalar özetlenmiştir.

Kanser tipi	<i>in vivo/ in vitro</i>	Etki
Hepatoselüler karsinom	<i>in vitro</i>	Tümöre infiltre olan Treg'lerin etkisi azalarak tümöre karşı immün yanıt gelişmiştir [122].
Melanom	<i>in vivo</i>	Agonist anti-GITR antikoru ile T hücresi aracılı rejeksiyon gerçekleşmiştir [118].
Mesane karsinomu	<i>in vitro</i>	Anti-GITR antikoru ile Treg'lerin azalması sağlanmıştır [117].
Kolorektal karsinom	<i>in vitro</i>	GITR-GITRL bağlanmasıyla CD8+ T hücre infiltrasyonu tümör büyümesini azaltmıştır[9].
Yassı hücreli karsinom	<i>in vivo</i>	Tümör çevresine GITRL enjeksiyonu ile tümör büyümesi engellenmiştir [10].
Sarkom	<i>in vivo</i>	Tümörlü bölgeye GITRL uygulanmış ve tümöre direnç artmıştır [11].

2.7. Altın Nanopartiküller

Tıp ve endüstri uygulamalarında NP'lerin kullanımı ve avantajları literatürde kabul görmektedir [123-125]. Biyolojik olarak bu nanomalzemelerin büyüklüğü, şekli, hücre içine alımı ve dağılımları son zamanlarda önem kazanmıştır [123]. Altın, elli yıldan fazla zamandır kimyasal inert olma özelliği ile dış başta olmak üzere implant olarak ve radyoaktif işaretlendiğinde kanser tedavisinde kullanılmaktadır. [123, 126, 127] (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Altın nanopartiküllerin tıp ve sağlıktaki uygulama alanları özetlenmiştir [128].

Biyouyumluluk ve kararlılık özellikleri, sitotoksik etkilerinin azlığı, birçok biyokimyasal molekül ile fonksiyonize edilebilme özellikleri ve güçlü spektroskopik yetenekleri sayesinde biyoloji ve nanotıp alanlarında altın NP'lerin kullanımı yaygınlaşmaktadır [129-132]. Altın NP'ler görünür, *near-infrared* ışığı absorbe eder ve saçar. Plazmon rezonans bandı bazı parametreler (büyüklük, şekil gibi) ile oynanarak değiştirilebilir [133]. Işık saçan sinyal yoğundur ve kimyasal floroforlardan daha parlaktır. Aynı zamanda solma ve parlamaya neden olmaz. Bu da tek molekül görüntülemelerinde avantaj sağlar [134]. Boyaların, floroforların ya da quantum dotların düşük sinyal yoğunlukları, kompleks parlama fenomenleri ve solma özellikleri nedeniyle kullanımları sınırlı olmaktadır. Boyutu 30 nm'nin altındaki nanopartiküllerde absorpsiyon saçılma baskın gelmekte ve fototermal mikroskop ile molekülleri saptamak amacıyla kullanımlarına olanak sağlamaktadır. Çeşitli büyüklükte altın NP'ler stabilize ajanlar varlığında altın tuzlarının redüksiyonu ile hazırlanır. Stabilize ajanlar NP'lerin agregasyonu önler ve büyümeyi kontrol eder [135-137].

Altın NP'lerin kolayca fonksiyonize edilebilme özellikleri tiyol bağlayıcılarının bağlanması ile sağlanır. Peptidler, proteinler, antikorlar, oligosakkaritler ve nükleik asitler fonksiyonel biyonanokonyuje moleküllere örnek olarak verilebilir [138-144]. Bunlar teşhis ve tedavi amaçlı olarak nanomalzemelerin multifonksiyonel platformlar olarak rol oynamasını sağlar [145].

Altın NP'ler özellikle radyografi ve radyoterapide tedavi edici ajan olarak kullanılabilir [146, 147]. Bu alanlarda kullanım amacı, altın NP'lerin dolaşım sistemine uygulandıktan sonra, tümör hücrelerine gitmeleri ve bu bölgede görüntülenebilmeleri ya da tedavi edici etki gösterebilmeleridir. Genel olarak altın NP'ler ile tümör hücrelerini hedeflemede iki yaklaşım geliştirilmiştir. Pasif ve aktif hedefleme yolu [148]. Pasif hedeflemede artmış damar geçirgenliği sonucu NP'ler tümörlü bölgede birikir. Aktif hedefleme yolunda ise NP'ler üzerindeki ligandlar tümör hücrelerindeki spesifik reseptörleri tanır. Bu ligandlar küçük moleküller, proteinler ya da peptidler olabilir [149].

Altın NP'ler ile *in vivo* hedeflemede immün sistemin önemli bir bileşeni olan mononükleer fagositer sistemi geçmek önemlidir. Mononükleer fagositer sistemden kaçabilmek için NP'lere bir gizlilik işlevi kazandırılmalıdır [150]. Bu işlev için polietilen glikol (PEG) sıkça uygulanmaktadır. Biyouyumlu olan bu malzeme, partikülleri stabilize eder ve doku reaksiyonunu azaltır [151]. *In vivo* olarak, PEG ile kaplı NP'ler, tümör damarlarının artan geçirgenlik özelliğinden ötürü burada birikir [152, 153]. Aynı zamanda PEG, NP'lerin yüzeyini hidrofille eder ve ilaçların bağlanması ve genlerin hedef hücrelere taşınması için ligand olarak görev yapar [154].

2.7.1 Altın Nanopartiküllerin Hücre İçine Alınması

Altın NP'lerin hücre içine alınması reseptör aracılı olmakta ve etkinliği partikül büyüklüğü, ligand kaplaması ve hücre tipine göre değişmektedir [152]. NP'ler hücre içine alındıktan sonra buradaki yerleşimleri ve hareketleri önemlidir. Bu durum sitotoksikite ve medikal fonksiyonlarla yakından ilgilidir. Genel olarak NP'ler hücre içine girdikten sonra endozomal ya da lizozomal veziküller yolu ile hareket eder [155].

Altın NP'lerin hücre içine alınmasını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar NP'ün büyüklüğü, şekli, yüzey yükü ve kaplamadır. Kolloidal altın partiküller için çoğu data optimum çap aralığını 30-50 nm olarak belirlemiştir [156, 157]. Fakat hücre içine alımda hücrenin tipi de önem taşımaktadır. Bunların dışında altın NP'lerin endositozu inkübasyon zamanı ve sıcaklıktan da etkilenir. Altın NP'lerin PEG ile fonksiyonize edilmesi endositoz etkinliğini azaltmaktadır. Bu NP'ün alımını reseptör aracılı yoldan diğer mekanizmalara kapatmasından olabilir. Yapılan çalışmalarda PEG ile kaplı nanorodların PEG ile kaplı nanosferlerden daha aktif olarak girdiği fakat her iki partikül tipinin de karaciğerde aynı miktarlarda biriktiği gösterilmiştir. Bu özellik altın NP'in fototermal tedavide kullanımında önem taşımaktadır [152].

Yüzey fonksiyonizasyon özelliklerine bakıldığında pozitif yüklü polimerlerin hücre içine en iyi alındığı görülmektedir. Kendine ait pozitif yük dışında polimerin kimyasal yapısı da önemlidir. Örneğin dördüncül aminler ile kaplı NP'ler, birincil aminlerle kaplı NP'lere göre hücre içine daha kolay alınır [152].

Fonksiyonize altın NP'lerde araştırılan bir diğer konu da hücre kültürü için kullanılan besiyerlerindeki protein bileşenleridir. Yüzey hidrofobitesinin serum protein bağlanmasını etkileyen önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir ki bu da altın NP'lerin hücre içine alınmasını zorlaştırır. Özellikle kültür-besiyeri serum proteinleri penetre olan peptidlerin taşıma fonksiyonunu etkiler ve hücrenin alım gücünü azaltır [152].

Altın NP'lerin immün sistem ile ilişkisine bakıldığında proinflamatuvar sitokinleri aktive ettiği ve immüno stimulatuar olduğu belirtilmiştir. Bu da yeni aşı adjuvalarının geliştirilmesi için önemlidir. Çoğu araştırmacıya göre altın NP'lerin makrofajlar tarafından alımı çöpçü reseptörler tarafından olmaktadır. Fakat fonksiyonize altın NP'lerin immün sistem hücreleri ile etkileşiminin anlaşılması zordur ve halen araştırılmaktadır [152].

2.7.2. Altın Nanopartiküller ile Kanser Hücrelerinin İzlenmesi

Kanser hücrelerinin görüntülenmesinde bilgisayarlı tomografi (BT) yöntemi kullanılmaktadır. BT kemik dokusunda elektron yoğun, yumuşak dokuda elektronlüsent olmasıyla iki doku arasında bir kontrast yaratarak ayrıntılı

görüntüleme imkanı sağlar [158]. Fakat farklı yoğunlukta iki farklı yumuşak dokunun ayırımında gücü sınırlıdır. Bu ayırımın sağlanmasında NP'ler önem kazanır [158]. Bunun yanısıra NP'ler yüksek atomik numaraları ve elektron yoğunluklarıyla BT görüntülemeye ideal ajanlar olarak düşünülmektedir [159]. Ek olarak, biyouyumlu olmaları ve hedef ajanlara bağlanabilme özellikleri kontrast ajanları olarak kullanılmasına imkan sağlar. Kontrast metallere iyot yüksek derecede damarlanmış tümörlerin fotoelektrik foton absorpsiyonunu artırır, tümör tanısını kolaylaştırır. Bu noktada altın iyoda göre daha yüksek kontrastlı bir ajandır. Bu nedenle altın NP'ler daha küçük tümörlerin dahi tanısına olanak verir [160, 161].

Nanotıp alanındaki gelişmelerle beraber tümör hücrelerine metal NP'lerin hedeflenmesi amaçlanmıştır. Lazer üreten iyonize olmayan elektromanyetik radyasyon kaynağı uygulandığı zaman, metal NP'lerde ısı enerjisine dönüşüm gerçekleşir [160, 162]. Altın nanokabuklarda, NP boyutu değiştirilerek optik rezonans istenilen dalga boyuna ayarlanabilir. Bu sebeple altın nanokabuklar tümör tanısında etkindir [163]. Altın nanokabuklar 100 nm silika kor ve 15 nm altın kaplamadan oluşan, kan ve dokunun maksimum geçirgen olduğu, rezonans piki yakın kızılötesi bölgeye (650-950 nm) çeken partiküllerdir [160, 163]. *In vivo* yapılan bir çalışmada 100 nm boyutundaki altın nanokabukların, damar içine enjeksiyonundan yirmidört saat sonra SK-BR-3 meme tümörü hattında biriktiği gösterilmiştir [160, 164]. Benzer bir çalışmada da 110 nm büyüklüğündeki PEG ile kaplı altın nanokabuklar insan PC3 prostat tümörlerinin tedavisi için kullanılmıştır [160, 165]. Bu tekniğin kullanımındaki sınırlama ise lazerin dokunun bir kaç santimetre içine girebilmesidir. Bu nedenle lazer dozlarının değiştirilmesi gerekmektedir [160, 162, 163]. Çizelge 2.4'de altın NP'lerin kanser hücrelerinin görüntülenmesinde ve tedavisinde kullanılmasına yönelik yapılan son çalışmalar özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. Altın nanopartiküllerin kanser hücrelerinin görüntülenmesinde ve tedavisinde kullanılmasına yönelik çalışmalar tablolanmıştır.

Nanopartikül	Kanser tipi	Etki
Dendrimer ile kaplı Altın NP	Epidermal karsinom	Kanser hücrelerinin hedeflenmesi için kullanılmıştır [166]
Altın nano kafes	Gliyoblastom	NP ile işaretli MKH'ler tümörlü bölgeye enjekte edilip görüntülenmiştir [167].
Altın NP	Gliyoblastom	NP ile işaretli MKH'ler BT yöntemi ile görüntülenmiştir [168].
Epidermal büyüme faktörü antikoru bağlı altın NP	Baş ve boyun skuamoz hücre karsinom	NP'ler tümörlü farelere enjekte edilip görüntülenmiştir [169].
Dendrimer ile kaplı Altın NP	Akciğer adenokarsinomu	Kanser hücreleri BT ile izlenmiştir [170].
Altın nanorod	Over kanseri	Kanser hücreleri fotoakustik ve raman sistemi ile görüntülenmiştir [171].

Son yıllarda kanser mikroçevresi, kanser oluşumuna ve tedaviye yönelik yeni hedeflerin bulunmasında sıkça araştırılmaktadır. GİTR ve ligandı GİTRL'in de kanser mikroçevresinde etkili moleküller olduğu bilinmektedir. MKH'lerin tümörlü bölgeye yönelme durumları, bu hücrelerin kanser mikroçevresindeki önemini göstermektedir. Birçok tümöre karşı genin hedeflenmesinde kullanılan MKH'lerin, immün sistem hücrelerinde de ifade olan GİTR ve GİTRL ile ilişkili olarak ortaya çıkarabileceği etki henüz araştırılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda tedavisi zor olan ve GİTR ifade ettiği bilinen KHAK hücreleri, GİTRL eksprese ettirilen MKH'ler ile ko-kültüre edilerek olası apoptotik ve proliferatif etkiler araştırılmıştır. Bunun yanısıra GİTRL ifade eden MKH'ler farklı büyüklükte altın nanopartiküller ile işaretlenerek görüntülenmeleri sağlanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda gelecekte GİTR ve GİTRL etkileşimi *in vivo* modellerde çalışılabilir ve görüntüleme amaçlı altın nanopartiküller kullanılabilir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Hücre Kültürü ve Karakterizasyon Deneyleri

3.1.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü

GITR ve GITRL protein ve mRNA düzeylerinin belirlenmesinde, etik kuruldan alınan onay (Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Araştırmalar Yerel Etik Kurulu, karar no: FON 11/20-24) ile arşivlenerek dondurulmuş stok insan kemik iliği kökenli donör MKH'leri kullanıldı (n=9). Transfeksiyon deneyleri için insan kemik iliği kökenli MKH'ler ticari olarak sağlandı (*Poietics human mesenchymal stem cells*; PT-2501, Lonza, ABD) kullanıldı. Hücreler 2. pasajda dondurulmuştu. Bu nedenle çoğaltılarak 3. pasajdan itibaren kullanıldı. Hücreler çözündükten sonra, %60 *Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low Glucose* (DMEM-LG; ref: 31600-083, Invitrogen, Gibco, İngiltere), %40 MCDB-201 besiyeri (# M6770-1L, Sigma, ABD), %10 fetal sığır serumu (FBS; # 41F1133K, Invitrogen, Gibco, İngiltere), %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin, # A2213, Biochrom AG, Almanya), %1 L-glutamin (Biochrom AG, Almanya) içeren tam besiyerine alındı ve 453 g'de 5 dakika, oda ısısında DMSO (Serva, lot: 131067, Almanya) içeren dondurma ortamının uzaklaştırılması için santrifüj (Eppendorf, Almanya) edildi. Hücreler 37°C'de nemli atmosfer ve %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edildi ve besiyerleri 3-4 günde bir taze besiyeri ile değiştirildi. Hücreler subkonfluent olunca (%70-80) %0,25 Tripsin-EDTA (# 27250-018, Invitrogen, Gibco, İngiltere) içeren solüsyon ile kaldırıldı ve tripan mavisi (# 03-102-1B, Biological Industries, İsrail) ile 1:1 oranında sulandırılarak sayıldı. Hücreler pasajlanıp, daha sonra kullanılmak üzere dondurma besiyeri; %20 FBS ve %10 DMSO içeren DMEM-LG ile dondurularak -196 °C'lik sıvı azot tankında saklandı.

3.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünofenotipik Karakterizasyonu

Mezenkimal kök hücreler subkonfluent olduğunda %0,25 Tripsin-EDTA ile kaldırıldı ve tek hücre süspansiyonları hazırlanarak homojenize edilen hücre pelleti üzerine Çizelge 3.1'de belirtilen antikorlardan (Becton Dickinson, ABD) 100µl fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) (# A9162, Applichem, Almanya) ile birlikte 5µl eklendi. Örnekler +4°C'de ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon

bitiminde 2 kez PBS ile yıkama yapılan örnekler, 200 µl PBS eklenerek FACS Aria (Becton Dickinson, ABD) cihazı ile okutuldu.

Çizelge 3.1. Mezenkimal kök hücrelerin immünofenotipik karakterizasyonunda kullanılan yüzey belirteçlerine ait antikorların türleri tablolanmıştır.

Yüzey belirtecinin adı	Yüzey belirtecinin türü, işareti ve klonu
CD29 (integrin beta-1)	IgG ₁ , farede insana karşı, PE işaretli, MAR4
CD44	IgG ₁ , farede insana karşı, FITC işaretli, L178
CD73 (ekto-5'-nükleotidaz)	IgG ₁ , farede insana karşı, PE işaretli, AD2
CD90 (Thy-1)	IgG ₁ , farede insana karşı, PE işaretli, 5E10
CD105(endoglin)	IgG ₁ , farede insana karşı, PE işaretli, 266
CD14	IgG _{2a} , farede insana karşı, APC işaretli, M5E2
CD45	IgG ₁ farede insana karşı, FITC işaretli, 2D1
HLA-DR	IgG _{2a} , farede insana karşı, APC işaretli, L243

3.1.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklanma Analizi

3.1.3.1. Kemik Hücrelerine Farklanma

Mezenkimal kök hücreler %70-80 konfluent olana kadar 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarında çoğaltıldıktan sonra büyüme ortamı, osteojenik ortam (%10 FBS, 100 nM deksametazon, 10 mM β-gliserofosfat (# A2253, Applichem, Almanya) ve 0,2 mM L-askorbik asit (# A4403, Sigma, ABD) içeren DMEM-LG) ile değiştirildi. Ortam 3-4 günde bir yenilendi. 21. günde kuyucuklardan besiyerleri toplandı ve 1 ml PBS ile yıkama yapıldı. Farklanma analizi için hücreler %10'luk formol ile 20 dakika fikse edildikten sonra hücrelerin üzerine 1 ml Alizarin Red S (# A5533, Sigma, ABD) boyası eklenerek 10 dakika bekletildi. Ardından boya toplanarak kuyucuklar 1 ml distile su ile yıkandı ve dijital görüntüleme sistemi (Olympus, Japonya) ile görüntülenip, kuyucukların fotoğrafı çekildi.

3.1.3.2. Yağ Hücrelerine Farklanma

Mezenkimal kök hücreler %90-100 konfluent olana kadar 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarında çoğaltıldıktan sonra büyüme ortamı, adipojenik ortam (10% FBS, 1 µM dexamethasone (Invitrogen, ABD), 60 µM indomethacine (# 61K1368, Sigma, ABD), 500 µM isobutylmethylxanthine (# A0695, IBMX, Applichem, Almanya) ve 5 µg/ml insulin (Sigma, ABD) içeren DMEM-LG) ile değiştirildi. Ortam 3-4 günde bir yenilendi. 21. günde kuyucuklardan besiyerleri toplandı ve 1 ml PBS ile yıkama

yapıldı. Farklanma analizi için hücreler %10'luk formol ile 20 dakika fikse edildi. Fiksasyonun ardından kuyucuklara 1 ml Oil Red O boyası (# O0625, Sigma, ABD) eklendi ve 10 dakika beklendi ve ardından distile su ile 2 kere yıkama yapıldı. Dijital görüntüleme sistemi ile görüntülenip, kuyucukların fotoğrafı çekildi.

3.1.4. Kanser Hücre Hatlarının Kültürü

İki farklı ticari insan küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattı kullanıldı. Süspansiyon halinde bulunan SCLC-21H (# ACC-372, DSMZ, Almanya), %90 Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose (DMEM-HG) (ref # 41965-039, Invitrogen, Gibco, İngiltere), %10 FBS , %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin), %1 L-glutamin içeren büyüme ortamında, yine süspansiyon halinde bulunan diğer kanser hücre hattı NCI-H82 (# ACC-556, DSMZ) ise %90 RPMI 1640 (ref # 21875-034, Invitrogen, Gibco, İngiltere), %10 FBS, %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin), %1 L-glutamin içeren büyüme ortamında 37°C'de nemli atmosfer ve %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edildi.

3.1.5. Mezenkimal Kök Hücre ve Kanser Hücre Hatlarının TEM ile İncelenmesi

Mezenkimal kök hücreler ve kanser hücreleri TEM'da incelendi. Bu amaçla kültüre edilen hücreler PBS ile yıkandıktan sonra fiksatif olarak PBS içinde hazırlanmış % 2'lik gluteraldehit çözeltisi eklendi. Hücre pelleti daha sonra PBS ile yıkanıp % 1'lik osmiyum tetroksit ile post-fikse edildi. Bir saat sonunda hücreler 37 °C'de sıvı hale getirilmiş agara gömüldü. Oda ısısında sertleştirilen agarın içerisindeki hücre pelletine doku örnekleri için uygulanan rutin elektron mikroskop takibi yapıldı. Bunun için, dereceli alkollerde dehidratasyon ve propilen oksit ile şeffaflandırma yapıldıktan sonra örnekler plastik bloklara gömüldü. Örneklerden elde edilen yarı ince kesitler metilen mavisi azur II, ince kesitler uranil asetat kurşun sitratla boyandı. Hücrelerin ince yapı özellikleri JEM 1400 Jeol marka transmisyon elektron mikroskopunda (ABD) incelendi; elde edilen görüntüler GATAN dijital kamera sistemiyle (ABD) bilgisayara aktarılarak değerlendirildi.

3.2. GITR ve GITRL' nin İfadelerinin Araştırılması

3.2.1. GITR ve GITRL İfadesinin Protein Düzeyinde Araştırılması

Homojenize edilen hücre pelleti üzerine 100 µl PBS ile birlikte sırasıyla 5 µl/10⁵ hücre ve 10 µl/10⁶ hücre şeklinde GITR-APC (# FAB689A, R&D, ABD) ve GITRL-PE (# FAB6941P, R&D, ABD) eklendi. Örnekler +4°C'de ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde 2 kez PBS ile yıkama yapılan örnekler 200 µl PBS eklenerek FACS Aria cihazı ile okutuldu.

3.2.2. GITR ve GITRL İfadesinin mRNA Düzeyinde Araştırılması

Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ile gen bankalarında dizileri mevcut olan GITR (TNFRSF18) (Roche, İsviçre) ve GITRL (TNFSF18) (Roche, İsviçre) genlerinin gen ekspresyon düzeylerine bakıldı. Bu amaçla total cDNA'den gene özgü spesifik primer ve taqman problemleri içeren *single assayler* ve Lightcycler 480 Probe Master mix (Roche, İsviçre) kullanıldı. Her PCR reaksiyonu için negatif PCR kontrolü ve internal kontrol kullanıldı. Pozitif kontrol olarak lipopolisakkarit ile uyarılmış periferik kan mononükleer hücreleri (LPS-PKMNH) kullanıldı.

3.2.2.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu miRNAeasy Mini Kit (# 217004, Qiagen, ABD) ile yapıldı. İzolasyon sırasında kullanılacak malzemeler dietilpirokarbonat (DEPC) ile önceden muamele edilerek RNaz aktivitesi engellendi.

Daha önceden hücreleri parçalamak amacıyla Qiazol Lysis Reagent (# 79306, Qiagen, ABD) ile toplanmış ve -80°C'de saklanmış olan örnekler eritildi ve 140µl kloroform eklenerek 15 saniye şiddetli bir biçimde karıştırıldı. Homojenat 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 2 dakika sonunda, 15 dakika +4°C'de 12000g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 3 faza ayrılan örnekten RNA'nın bulunduğu saydam üst faz alındı ve yeni bir tüpe geçirildi. Üzerine 1,5 katı kadar %100 etanol eklendi ve karıştırıldı. Karışım kit içeriğinde bulunan *spin* kolonlara alınarak ≥8000g'de 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi. Altta kalan kısım döküldü ve karışımdan kalan kısma aynı yöntem uygulanarak tekrarlandı. Bu aşamadan sonra örnekler RNase-free DNase Digestion (# 79254, Qiagen, ABD) ile muamele edildi. Bu amaçla 350µl tampon RWT ile ≥8000g'de, 15 saniye santrifüj edilerek kolon

yıkandı. Altta kalan kısım döküldü. Örnek başına 10µl DNaseI stok solüsyonu ve 70 µl tampon RDD karışımı olacak şekilde eklendi ve oda sıcaklığında yarım saat bekletildi. İnkübasyon sonrası 500 µl tampon RWT ile $\geq 8000g$ 'de, 15 saniye santrifüj edilerek yıkama yapıldı. Bu aşamadan sonra kolon 2 kere 500 µl tampon RPE ile yıkandı ve altta kalan kısım döküldü. Kolon yeni bir tüpe geçirilerek 30 µl RNase içermeyen distile su ile muamele edildi ve $\geq 8000g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. Altta kalan RNA örneklerinin konsantrasyonu ve kalitesi spektrofotometrik olarak NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazı ile ölçüldü. RNA kalitesi A260/280 ve A260/230 oranlarına göre değerlendirildi. Total RNA $-80^{\circ}C$ 'de kullanılıncaya kadar saklandı.

3.2.2.2. cDNA Sentezi

Komplementer DNA (cDNA) 260 ng RNA örneğinden Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kiti (ref # 05081963001, Roche, İsviçre) kullanılarak sentezlendi. Standart cDNA sentez tepkimesinin yanısıra RNA içermeyen fakat su içeren negatif kontrol tepkimesi de hazırlandı. cDNA sentezi üretici firmanın önerileri doğrultusunda Çizelge 3.2'de belirtildiği gibi yapıldı. Her örnek için cDNA'ler triplike olarak sentezlendi. cDNA'ler $-20^{\circ}C$ 'de saklandı.

Çizelge 3.2. cDNA sentezinin basamakları özetlenmiştir.

Bileşen	Miktar	Son Konsantrasyon
Total RNA değişken		1ng-4µg
Random Hekzamer Primer	2µl	60 µM
Su değişken		Total miktarı= 11,4 µl
Total hacim	11,4 µl	
İnkübasyon: $65^{\circ}C$, 10 dakika		
Reverse Transkriptaz		
Reaksiyon tamponu, 5X	4 µl	1X (8Mm $MgCl_2$)
Protektör RNase İnhibitör (40U/ µl)	0,5µl	20U
Deokdinükleotid karışımı (10Mm)	2 µl	1Mm
DTT	1 µl	5Mm
Reverse Transkriptaz	1,1 µl	10U
Total hacim	20 µl	
İnkübasyon: $29^{\circ}C$, 10 dakika		
$48^{\circ}C$, 60 dakika		
$85^{\circ}C$, 5 dakika		

3.2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Gerçek zamanlı qPCR için *taqman* problemleri ile önceden validasyonu yapılmış *Real Time Ready Single Assayler* (Roche Applied Science, İsviçre) kullanıldı. Final PCR reaksiyonu 10 µl olacak şekilde 96 çukurlu PCR plaklarında üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı (Çizelge 3.3). LightCycler® 480 (Roche, İsviçre) yazılımı kullanılarak hedef ve referans genler için *crossing point* (Cp; veya *threshold cycle* –Ct-) değeri *Second Derivative Maximum* metoduna göre hesaplandı. Tüm hedef genler, *house keeping* gen olan *ACTB* ve *B2M* genine normalize edildi. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile rölatif kantifikasyon analizi yapıldı. 40 değerine eşit veya büyük olan Ct değerleri jel elektroforezinde analiz edildi. Çizelge 3.4’de kullanılan primerlerin özellikleri verilmiştir.

Çizelge 3.3. Gerçek zamanlı kantitatif PCR analizinin basamakları tabloланmıştır.

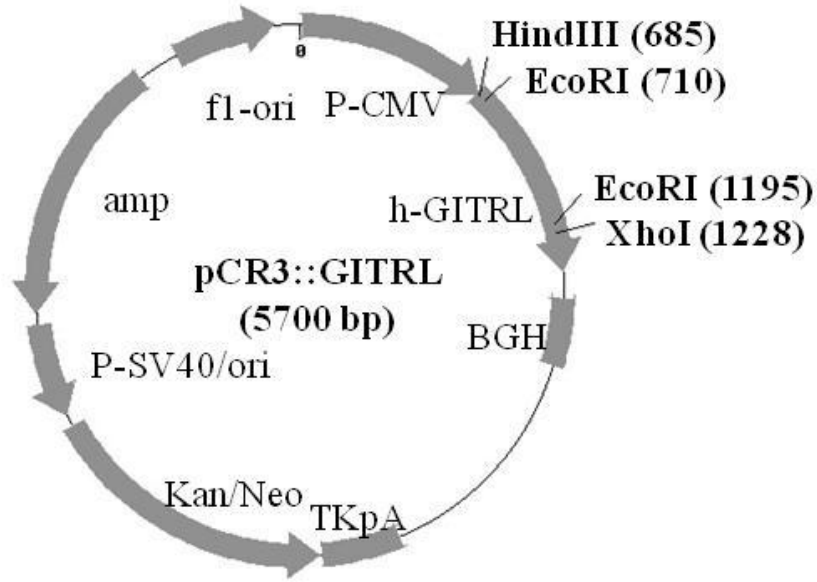
	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Denatürasyon	95	10 dk	1
PCR amplifikasyon (toplam 45 döngü)			
Denatürasyon	95	10 sn	
Bağlanma	60	30 sn	
Uzama	72	5 sn	
Soğuma	40	30 sn	

Çizelge 3.4. Gerçek zamanlı kantitatif PCR analizinde kullanılan primer dizileri listelenmiştir.

Gen ismi	Forward primer	Reverse primer	Amplikon uzunluğu	Amplikon başlangıç ve bitişi
TNFRSF18	AGTGGGACTGCATGTGTGTC	ACACTGGAAGCCAAAAGTAA	131	326..456
TNFSF18	GCCCTGTATGGCTAAGTTTGG	GGCCATAAATTAATATAAGCCATTCT	131	188..318
ACTB	GGCCAGGTCATCACCATT	GGATGCCACAGGACTCCAT	91	925..1015
B2M	CCGTGTGAACCATGTGACTTT	CCTCCATGATGCTGCTTACA	76	370..445
SIVA1	AGTGTGAGCGAGCCCTGT	CACTTTCTCGTACATGTCACTGC	110	455..564
CBFA1	GCCTAGGCGCATTTCAGAT	CTGAGAGTGGAAGGCCAGAG	66	1215..1280
ALPL	AGAACCCCAAAGGCTTCTTC	CTTGGCTTTTCCTTCATGGT	74	1215..1288
PPARγ	GACAGGAAAGACAACAGACAAATC	GGGGTGATGTGTTTGAAGTTG	96	916..1011
SCD	CCGGGAGAATATCCTGGTTT	AGGAGTGGTGGTAGTTGTGGA	65	1227..1291

3.3. Transformasyon

CMV promotörü altında GITRL genini taşıyan pCR3, yüksek kopya sayılı plazmid vektörüdür. pCR3 vektörünün DNA dizisi uzunluğu 5,1 kb (=5100 bp)'dir. (BGH: bovine growth hormone; ColE1: Colicin E1; TKpA: timidin kinaz poliadenilasyon sinyali; Pcmv: sitomegalovirüs promotörü; F1 orijin: prokaryotlarda replikasyon sağlar; PSV40: ökaryotlarda replikasyon sağlar; kan/neo: ökaryotlarda seçicilik sağlar; ampisilin: prokaryotlarda seçicilik sağlar). Vektör, Lausanne Üniversitesi, Biyokimya Bölümü'nde görevli Dr. Pascal Schneider tarafından hediye edilmiştir [172]. pCR3::GITRL vektörüne ait harita NetPlasmid programı kullanılarak çizilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. pCR3::GITRL vektörünün haritası görülmektedir.

3.3.1. Kompetan Hücreye Plazmid Aktarımı

Kompetan hücre olarak One Shot TOP 10 E. coli (# 21C4040-10, Invitrogen, ABD) kullanıldı. 1 vial One Shot E.Coli kompetan hücre buz üzerinde çözüldü. 50µl su içerisinde çözülen vektör, çözülen kompetan hücreye (50µl) eklendi. Pipetleme yapılmadan nazikçe karıştırılma işlemi gerçekleştirildi. 20 dakika buzda inkübasyon yapıldı. 42°C su banyosunda, 30sn inkübasyon yapılarak ısı şoku gerçekleştirildi. Isı şokundan sonra hücrelere 250µl SOC besiyeri eklenip 1 saat horizontal çalkalamalı (2000 rpm), 37°C inkübatörde çoğaltıldı ve 100µg/µl

amfisilin (# A9518, Sigma, ABD) içeren L-agar petri kaplarına 100µl hücre yayılarak ekim yapıldı ve gece boyunca 37°C'de inkübe edildi.

3.3.2. Plazmid İzolasyonu

Amfisilin içeren seçici ortamda büyüyen bakteri kolonileri alınarak 15 ml'lik falkon tüpler içerisinde 3 ml amfisilinli LB sıvı besiyeri ortamına inoküle edildi ve gece boyu orbital çalkalayıcıda büyütülüp bu hücrelerden Endofree Plazmid Maxi Kit (# 12362, Qiagen, ABD) ile plazmid DNA'sı saflaştırıldı. Gece boyunca sıvı ortamda üreyen bakteriler kısa santrifüj işlemleriyle, 1,5 ml'lik tüp içerisinde pellet haline getirilip besi ortamından kurtarıldı. Pellet üzerine sırasıyla 200µl resüspanسیون çözeltisi, hücre lizis çözeltisi ve nötralizasyon çözeltisi seri şekilde eklenerek karışmaları sağlandı. 7 dakika, 11000 rpm santrifüj sonrasında toplanan süpernatant ile çalışmaya devam edildi. Kit içerisinde sağlanan minikolonlar 1,5 ml'lik tüplere yerleştirildi. 2 ml'lik enjektör içerisine koyulan 1 ml rezin çözeltisi üzerine süpernatant eklendi ve piston yavaşça itilerek karışım kolonlardan geçirildi. 2 ml yıkama çözeltisi de aynı şekilde kolonlardan geçirilerek, minikolon 2 dakika, 11000 rpm'de santrifüj edildi. 57°C-60°C sıcaklıktaki distile su doğrudan minikolon içerisindeki membrana koyuldu ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 20 saniye 11000 rpm'de santrifüj sonrasında plazmid DNA kolonlardan toplandı ve -20°C'de saklandı.

3.3.3. Restriksiyon Enzimleri ile Kesilen Ürünlerin Agaroz Jelde Görüntülenmesi

Restriksiyon enzimleri, saflaştırılan plazmid DNA'larının doğrulanması amacıyla kullanıldı. Kesim için Eco-RI-HF (New England Bio Labs, İngiltere) enzimi kullanıldı. EcoRI enzimi pCR3-GITRL'nı 77. ve 645. bölgelerden kesmektedir. Restriksiyon enzimi Eco-RI-HF, NEB Tampon 2 (New England Bio Labs, İngiltere) ve BSA 100X (New England Bio Labs, İngiltere) karıştırılarak 3,5 saat 37°C'de inkübe edildi. Kesim ürünleri agaroz jelde yürütülerek gösterildi.

3.3.4. Mezenkimal Kök Hücrelere Plazmid Aktarımı (Transfeksiyon)

3.3.4.1. Lipozomal Sistem ile Plazmid Aktarımı

Hücrelere lipozomal sistem ile plazmid aktarımı Lipofectamine LTX (# 15338100, Invitrogen, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Aktarım optimizasyonunda farklı DNA: lipozom oranları kullanıldı. Bu optimizasyona ek olarak, ayrıca DNA ve lipozom inkübasyon süreleri de optimize edildi. DNA lipozom oranları (1:2; 1:2,5; 1:3,5; 1:4,5) şeklindeyken, DNA ve lipozom inkübasyon süreleri 5, 15, 20, 25 ve 30 dakika şeklindeydi. Bu amaçla çoğaltılan hücreler %70 yoğunluğa ulaştığında tripsin ile kaldırıldı ve 24 kuyucuklu kültür kabına ekildi. Protokolde belirtildiği gibi yeterli miktarda DNA, serumsuz besiyerinde çözüldü. DNA ile birebir oranında *plus reagent* (kit içeriğinde bulunan ve firma tarafından transfeksiyon etkinliğini arttırdığı belirtilen solüsyon) eklenip, inkübe edildi. Bu DNA karışımına yukarıda belirtilen oranlarda Lipofectamine LTX eklenip, yukarıda belirtilen beş farklı zamanda inkübasyon yapıldı. Hücreler serumsuz besiyerine alınıp, DNA-lipofektamin kompleksi her bir kuyucuğa belirtilen koşullarda eklendi. Hücreler 37°C inkübatörde inkübe edildi. Deneyden 24 saat sonra hücrelerin besiyeri serumlu besiyeri ile değiştirildi. 48 saat sonunda transfeksiyon etkinliği akım sitometrisinde değerlendirildi.

3.3.4.2. Elektroporasyon ile Plazmid Aktarımı

Elektroporasyon ile plazmid aktarımında Neon transfeksiyon sistemi (Invitrogen, ABD) kullanıldı. Transfeksiyon optimizasyonu firmanın önerileri doğrultusunda 24 kuyucuklu kültür kabında farklı koşullar (1500V, 20ms, 1p; 1500V, 30ms, 1p; 1200V, 30ms, 1p; 1200V, 20ms, 2p; 1000V, 40ms, 2p; 1000V, 30ms, 2p; 1500V, 10ms, 3p; 1500V, 10ms, 2p) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla kuyucuk başına 5×10^4 hücre ve 500 ng/ μ l DNA kullanıldı. Hücre ve DNA karışımı kit içeriğinde bulunan Neon resuspansiyon tamponu ile 10 μ l'lik uçlara çekildi. Aynı zamanda başka bir firmanın elektroporasyon cihazının (Nucleofector; Lonza, ABD) tamponu olan Nucleofector resuspansiyon tamponu da tüm koşullar için denendi. Transfeksiyon sonrası ışımaya yapan hücreleri belirleyebilmek için pGITRL aynı oranda pmax-GFP (Lonza, ABD) ile karıştırılarak da optimizasyon koşulları denendi. Işıma yapan hücreler 24 saat sonra floresan mikroskopunda incelendi.

Neon transfeksiyon cihazı kullanılarak plazmid DNA miktarı optimize edildi. Bu amaçla 2×10^5 hücre başına 3 farklı DNA oranı (0,5µg; 1,5µg; 2,5µg) kullanıldı. Bu amaçla hücreler 453 g'de 5 dakika santrifüj ile çöktürülüp PBS ile yıkandıktan sonra *resuspension buffer R*'de çözüldü. Bu aşamadan hemen sonra belirlenen oranlarda DNA eklendi. Hazırlanan süspansiyon elektrik akımı verildikten sonra antibiyotiksiz besiyeri içeren 6 kuyucuklu kültür kaplarına bırakıldı ve 37°C %5 CO₂ inkübatöre alındı. Deneyden 24 saat sonra hücrelerin ortamı antibiyotikli ortam ile değiştirildi. 48 saat sonra transfeksiyon etkinliği akım sitometrisinde değerlendirildi.

3.3.4.3. Kalıcı Transfeksiyon

pCR3 vektörü kalıcı transfektanların seçimini sağlayan neomisin dirençlilik geni taşımaktadır. Bu nedenle kalıcı transfektanların seçimini sağlayabilmek için öncelikle transfeksiyon yapılmamış MKH'leri dört gün ve bir haftada öldüren minimum neomisin dozu saptama çalışması yapıldı. Bu çalışma için bir neomisin analogu olan *geneticin* (G418) (# 11811031, Invitrogen, ABD) kullanıldı. 100-1000µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda G418 içeren kültür ortamlarının MKH'ler üzerindeki ölüm etkisi ölçüldü. Yüzde yüz ölüm dozu belirlenmesinde ölü hücrelerin sayımı tripan mavisi ile boyanarak gerçekleştirildi. Deneyler 12 kuyucuklu kültür kabında gerçekleştirildi.

Mezenkimal kök hücreleri öldüren minimum doz bulunduktan sonra bu doz ile rekombinant proteini kalıcı eksprese eden hücrelerin seçimi sağlandı. Bu amaçla hücreler transfeksiyondan sonra seçici olmayan besiyerinde 1-2 gün tutulup daha sonra seçici besiyerine (G418 içeren) ekildi. Boş plazmid aktarılan MKH'lerin de seleksiyon ortamında seçimi sağlandı. Seçici besiyerinin kullanımı 20 gün boyunca sürdürüldü ve ölü hücrelerin temizlenmesi amacıyla sık sık değiştirildi. Elde edilen hücreler kalıcı transfekte hücreler olarak kullanıldı.

3.4. GITRL Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

3.4.1. Akım sitometrisi ile GITRL İfadesinin Araştırılması

Transfeksiyon sonrası geçici ve kalıcı transfektanların GITRL ifadesine akım sitometrisi ile bakıldı. Bu amaçla hücreler tripsin ile kaldırılıp homojenize edilen

hücre pelleti üzerine 100 µl PBS+AB serum eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ile 2,5µg/ml GITRL antikoruna eklendi. Tüpler +4°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde 2 kez PBS ile yıkama yapılan tüplere 200 µl PBS eklenerek FACS Aria cihazı ile okutuldu. Kontrol olarak GITRL ile transfekte edilmemiş (boş) MKH'ler kullanıldı.

3.4.2. qPCR ile GITRL İfadesinin Araştırılması

Transfeksiyon sonrası kalıcı transfektanların GITRL ifadesine qPCR ile bakıldı. Bu amaçla kalıcı transfektanların RNA'sı toplandı. Toplanan RNA'lardan cDNA sentezi yapıldı. Sentezlenen cDNA'larda gen ekspresyon düzeyleri araştırıldı.

3.4.3. İmmüno Floresan İşaretleme Yöntemi ile GITRL Varlığının Araştırılması

GITRL ile transfekte edilen MKH'lerdeki kalıcı GITRL varlığı immüno floresan işaretleme yöntemi ile incelendi. Bu amaçla transfekte edilmeyen ve kalıcı transfekte hücreler 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler PBS ile yıkandı, metanol ile fikse edildi. Fiksasyon sonrası hücrelere 30 dakika oda ısısında serum blokajı uygulandı. Blokaj sonrası hücrelere yıkama yapılmadan üç farklı dilüsyonda (1/50, 1/100, 1/200) primer antikor; tavşan poliklonal anti-GITRL/TNFSF18 antikoruna (# ab25948, Abcam, İngiltere) hazırlandı. Her bir örneğe primer antikor koyularak +4°C'de gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün hücreler 3 defa PBS ile yıkandı. Sekonder antikor (keçi anti-tavşan IgG H&L, Alexa Fluor® 488, # ab181448, Abcam, İngiltere) ile hücreler 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 3 defa PBS ile yıkama yapıldı. DAPI ile çekirdek boyaması yapılarak hücreler floresan mikroskopta incelendi.

3.4.4. GITRL Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmüno Fenotipik Karakterizasyonu

Geçici ve kalıcı transfektanlar subkonfluent olduğunda %0,25 Tripsin-EDTA ile kaldırıldı ve tek hücre süspansiyonları hazırlanarak homojenize edilen hücre pelleti üzerine Çizelge 1'de belirtilen antikorlardan 100µl PBS (# A9162, AppliChem, Almanya) ile birlikte 5µl eklendi. Örnekler +4°C'de ve karanlıkta 30 dakika inkübe

edildi. İnkübasyon bitiminde 2 kez PBS ile yıkama yapılan örneklerle, 200 µl PBS eklenerek FACS Aria (Becton Dickinson, ABD) cihazı ile okutuldu.

3.4.5. GITRL Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklanma Potansiyellerinin Araştırılması

Adipojenik ve osteojenik farklanma analizleri için transfekte hücrelerin adipojenik ve osteojenik ortamlarda farklanmaları sağlanıp hem boyamaları yapıldı hem de farklanma kültüründeki hücrelerden 21. günde total RNA izolasyonu yapılarak, qPCR'da osteojenik (*CBFA1: core binding factor alpha 1*, *ALPL: alkaline phosphatase*) ve adipojenik genlerinin (*PPARgamma: peroksizom proliferator-activated receptor gamma*, *SCD: stearyl-CoA desaturase*) ekspresyonları araştırıldı.

3.4.6. GITRL Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerin Göç Etme Özelliklerinin Araştırılması

Aktarım sonrası MKH'lerin göç yeteneklerinde değişim olup olmadığını göstermek için lateral hareket yöntemi olarak da bilinen 'yara iyileşmesi' migrasyon yöntemi kullanıldı. Deneyler 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen ve pCR3 aktarılmış, GITRL aktarılmış veya boş MKH'ler %100 yoğunluğa ulaştığında gerçekleştirildi. Tek katlı hücre tabakası üzerinde boşluk yaratmak amacı ile mekanik olarak (20 µl'lik, steril bir pipet ucu ile) bir çizik yaratıldı. Ardından oluşturulan boşluğun etrafındaki hücrelerin fotoğrafı boşluk oluşumundan sonra geçici transfektanlarda 0, 3, 7 ve 24. saatlerde çekildi. Kalıcı transfektanlarda süre 52. saate kadar uzatıldı. Her hücre grubu için her zaman noktasından elde edilen 5 ayrı ölçümün ortalaması alınarak motilite indeksi ($MI=1-Wt/W0$) hesaplandı [173].

3.5. Kanser Hücrelerinin Rekombinant GITRL ile Kültürü

Kanser hücre hatları kuyucuk başına 5×10^3 ve 2×10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kabına ekildi ve 24 saat, 37°C ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. 24 saat sonunda hücreler farklı dozlarda (1, 10, 100 ve 1000 ng/ml) rekombinant insan GITRL proteini ile (# 694-GL-025, R&D, ABD) muamele edildi. Rekombinant protein ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sonrası proliferasyon analizi

cell proliferation reagent WST-1 (# 0501594401, Roche, İsviçre) testi ile yapıldı. 3 farklı inkübasyon süresi sonunda kuyucuklara 10 µl WST-1 boyası eklendi ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi. ELISA okuyucu (Tecan, İsviçre) ile 450 nm'de absorbansı ölçüldü.

3.6. Altın ve Demir Nanopartiküller

Amin ile modifiye edilmiş ve polietilen glikol (PEG; 5000 Mw) kaplı, 10nm (# 765309) ve 30nm (# 765376) büyüklüğünde iki adet nanopartikül ticari olarak satın alındı (Sigma, ABD).

Hücreler altın NP'lere ek olarak 35 nm büyüklüğünde, demir oksit bazlı süperparamanyetik MRI kontrast ajanı olan Molday Ion Rhodamine B (MIRB) (# CL-50Q02-6A-50) ile işaretlendi. MIRB, Biopal (İngiltere) firmasından satın alındı.

3.6.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Altın Nanopartiküller ile İşaretlenmesi

Boş MKH'ler ve pGITRL transgenini geçici olarak taşıyan MKH'ler %70 yoğunluğa ulaştığında büyüme ortamları 3µl/ ml altın NP içeren iki farklı büyüklükte (10nm ve 30nm) ortam ile değiştirildi. İşaretli hücreler 24 saat boyunca 37°C'de nemli atmosfer ve %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edildi. 24 saat sonunda hücreler TEM'da incelendi.

3.6.2. Altın ile İşaretlenmiş Mezenkimal Kök Hücrelerin Proliferasyonu

Altın nanopartiküller ile işaretli hücrelerin proliferasyonuna Cell Proliferation Reagent WST-1 (# 0501594401, Roche, İsviçre) ile bakıldı. Bu amaçla 5x10³ hücre 96 kuyucuklu kültür kabına ekildi ve 24 saat, 37°C ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. Hücrelerin yoğunluğu %70-80'e ulaştığında, besiyeri farklı konsantrasyonlarda (2,5µl/ml; 5µl/ml; 10µl/ml; 15µl/ml ve 20µl/ml) nanopartikül içeren besiyeri ile inkübe edildi. Kontrol olarak altın NP ile işaretlenmemiş hücre, hücresiz besiyeri ve hücresiz besiyeri ve altın NP kullanıldı. Her bir grup üç tekrarlı yapıldı. 24 saat inkübasyon sonucunda 10 µl WST-1 boyası kuyucuklara eklendi ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi. ELISA okuyucu (Tecan, İsviçre) ile 450 nm'de absorbansı ölçüldü.

3.6.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Demir Nanopartiküller ile İşaretlenmesi

Mezenkimal kök hücreler %70 yoğunluğa ulaştığında büyüme ortamları farklı dozlarda 25µg/ml demir NP (rodamin B işaretli) içeren ortam ile değiştirildi. İşaretli hücreler 24 saat boyunca 37°C'de nemli atmosfer ve %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edildi. 24 saat sonunda hücreler florasan mikroskopta ve TEM'da incelendi. MIRB ile işaretli hücrelerdeki demir içeriği prusya mavisini boyaması ile gösterildi. Bu amaçla işaretli hücreler 2 defa PBS ile yıkandıktan sonra %4 paraformaldehid ile fikse edildi. Daha sonra hücreler potasyum ferrosiyanit (%10) ve hidroklorik asit (%20) solüsyonu ile 20 dakika muamele edildi. Nuclear fast red boyası ile 5 dakika zıt boyama yapıldı. Hücreler 2 defa PBS ile yıkandı ve ışık mikroskopunda incelendi.

3.7. Ko-kültür Çalışmaları

Geçici ve kalıcı transgen taşıyan MKH'ler (pGITRL ve pCR3) ve boş MKH'lerin SCLC-21H ve NCI-H82 ile ko-kültür çalışmasında farklı oranlarda kanser hücresi/ MKH (1/8; 1/4; 1/2; 1/1; 2/1) kullanıldı. Oranlar oluşturulurken MKH sayısı sabit tutuldu. MKH'ler, 24 kuyucuklu kültür kaplarında her bir kuyucukta 40.000 hücre olacak şekilde bazal MKH ortamında (%10 FBS, %1 penicilin/streptomisin, 2mM L-glutamin içeren DMEM-LG + %40 MCDB201) kültüre edildi. MKH'ler istenilen yoğunluğa ulaştığında, ortam ko-kültür ortamı ile değiştirildi. Ko-kültür için kanser hücre hatlarının ortamı (SCLC-21H için %90 DMEM-HG+ %10 FBS; NCI-H82 için %90 RPMI 1640+ %10 FBS) kullanıldı. 48 saat süre ile 37°C ve %5 CO₂'li ortamda inkübasyon sonrası akım sitometrisinde hücre ölümü veya hücre proliferasyonu açısından değerlendirilerek ko-kültür etkisi analiz edildi. Aynı zamanda por büyüklüğü 0,4µm olan transweller (# 662640, Greiner, Avusturya) kullanılarak da 24 kuyucuklu kültür kaplarında ko-kültür yapıldı ve buradan elde edilen süpernatantlar ELISA deneyinde kullanıldı.

3.7.1. Ko-kültüre Edilen Hücrelerin Apoptoz Etkinliğinin Belirlenmesi

3.7.1.1. Annexin-V PI ile Apoptozun Araştırılması

Ko-kültür sonrası kanser hücrelerinin apoptozuna Annexin-V-FITC Apoptoz Deteksiyon Kiti (# STK556547, Becton Dickinson, ABD) ile bakıldı. Bu amaçla

hücreler iki defa soğuk PBS ile yıkandı. Tampon solüsyon (1X) ile konsantrasyon 10^6 hücre/ml olacak şekilde ayarlandı. Elde edilen hücre solüsyonundan 100 μ l (10^6 hücre) 5 ml'lik falkon tüpüne alındı. 5 μ l Annexin -V-FITC ve 5 μ l PI pipetlendi. 15 dakika, oda ısısında, karanlıkta inkübe edildi. 400 μ l 1X *Binding Buffer* eklendi ve akım sitometrisi cihazı ile okuma yapıldı.

3.7.1.2. TUNEL Yöntemi ile Apoptozun Araştırılması

In situ apoptoz etkinliğine TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling) yöntemi ile incelendi. TUNEL yönteminde apoptotik hücre çekirdeğindeki DNA kırıkları diaminobenzidine (DAB) ile reaksiyona girerek kahverengi görünmektedir. Hematoksilen ile zıt boyama yapılan ve apoptotik olmayan hücreler ise mor görünmektedir.

TUNEL yöntemi için In Situ Cell Detection Kit, POD (# 11684817910, Roche, İsviçre) kullanıldı. Bu amaçla transfekte ve boş MKH'ler ile ko-kültüre edilen kanser hücreleri 48 saatin sonunda kaldırılarak sitospin cihazı (Shandon Cytospin, ABD) ile 600 rpm'de 3 dakika çevrilerek hücrelerin poli-L-lizin kaplı lamlara yapışması sağlandı. Lamlara alınan hücreler, fiksasyon solusyonunda 1 saat (oda sıcaklığı) bekletildi. Fiksasyon sonrası lamalar PBS ile yıkandı. bloklama solusyonunda 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bloklama sonrası tekrar PBS ile yıkanan hücreler permeabilizasyon solusyonunda 2 dakika buzda inkübe edildi. Daha sonra boyama ve enzim solusyonları hazırlanıp, örnekler eklendi. Negatif kontrollere sadece boyama solusyonu eklendi. Örnekler 60 dakika nemli ortamda 37°C'de karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası PBS ile yıkanan hücreler kapama medyumu ile kapatıldı ve dijital kamera ataşmanlı ışık mikroskopunda (Leica DMR 6000, Almanya) apoptotik hücreler sayılarak apoptotik indeks (apoptotik hücre yüzdesi) hesaplandı. Apoptozun belirlenmesinde ölü hücre sayısı tüm hücre sayısına oranlanarak apoptotik indeks hesaplandı. Apoptotik hücrelerin sayılmasında bir defa yapılan deneyde 10 farklı alan sayıldı.

3.7.2. Ko-kültüre Edilen Hücrelerin Siva İfadesinin Araştırılması

3.7.2.1. Siva İfadesinin ELISA Yöntemi ile Araştırılması

Ko-kültür sonrası hücrelerin apoptoza uğrayıp uğramadığı elde edilen hücre süpernatantlarında Siva protein düzeyine bakılarak belirlendi. Bu amaçla human Siva protein elisa kit (# E3336h, EIAab, Çin) kullanıldı. İlgili sitokin konsantrasyonunun belirlenebilmesi için ayrı ELISA kuyucuklarına kit içeriğinde bulunan standartlar hazırlanarak “standart eğri” oluşturuldu. İnkübasyon ve yıkama işlemlerini takiben, sekonder antikor eklendi ve yeniden inkübasyon ve yıkama işlemleri yapıldı. Spesifik bağlanmanın ölçülebilmesi amacıyla renklendirici substrat eklendi. İnkübasyon süresinin sonunda reaksiyon durduruldu ve eliza okuyucu (SpectraMax Plus Microplate Reader, ABD) ile renk değişimi spektrofotometrik olarak 450nm dalga boyunda ölçüldü. Tüm örnekler ikili teknik tekrar ile çalışıldı.

3.7.2.2. SIVA İfadesinin qPCR Yöntemi ile Araştırılması

GITR-GITRL etkileşimi ile uyarıldığı bildirilmiş olan pro-apoptotik bir protein olan *SIVA1* ekspresyonuna qPCR ile incelendi. Bu amaçla önceden validasyonu yapılmış *Real Time Ready Single Assay* kullanıldı.

3.7.3. Ko-kültüre Edilen Hücrelerin Proliferasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Ko-kültür sonrası hücre proliferasyonuna CellTrace CFSE hücre proliferasyon kiti (# C34554, İnvitrogen, ABD) ile bakıldı. 10^6 hücre/ml, PBS/ %0,1 BSA'da çözüldü. 2 µl CFSE solüsyonundan eklendi ve 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Hücrelere beş katı kadar buz soğukluğunda besiyeri eklendi. 5 dakika buzda inkübasyon yapıldı. Santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Hücreler taze besiyeri ile yıkandı. Daha sonra ko-kültür yapıp, akım sitometrisi cihazı ile okutuldu.

3.7.4. Altın ile İşaretlenmiş Mezenkimal Kök Hücrelerin Kanser Hücreleri ile Ko-kültürü

Farklı büyüklükteki altın nanopartiküller ile işaretlenmiş ve GITRL taşıyan MKH'ler ve boş MKH hücreler SCLC-21H ile ko-kültür edildi. Kanser hücresi/ MKH oranı 2/1 olacak şekilde yapıldı. MKH'ler, 60 mm'lik kültür kaplarında her bir kuyucukta

1000.000 hücre olacak şekilde MKH ortamında (%10 FBS, %1 antibiyotik, %1 L-glutamin içeren %60 DMEM-LG + %40 MCDB201) kültüre edildi. MKH'ler konfluent olunca ortam ko-kültür ortamı ile değiştirildi. Ko-kültür için kanser hücre hatlarının ortamı (SCLC-21H için %90 DMEM-HG+ %10 FBS; NCI-H82 için %90 RPMI 1640+ %10 FBS) kullanıldı. 48 saat süre ile 37°C %5 CO₂ inkübe edildi. İnkübasyon sonucu hücrelerin morfolojisi TEM'da incelendi.

3.8. İstatistiksel Yöntem

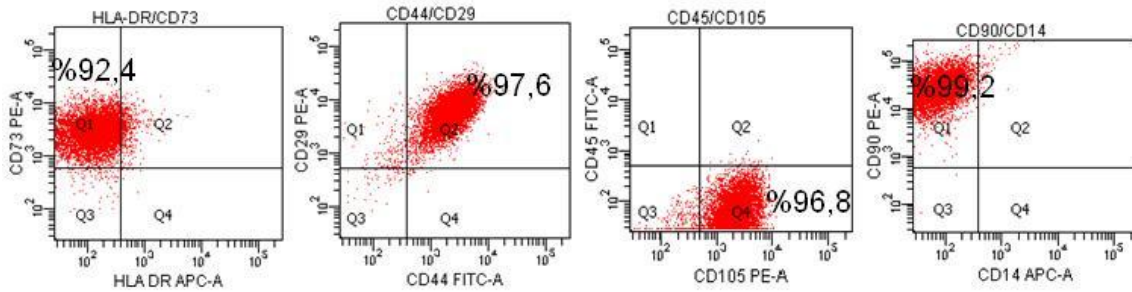
Yara iyileşmesi, apoptoz ve proliferasyon verilerinin analizleri SPSS Versiyon 20 programı kullanılarak yapıldı. Veriler normal dağılmadığı ve/veya örneklem sayıları az olduğu için çoklu gruplar arasındaki fark parametrik olmayan Kruskal Wallis H testiyle, iki grup arasındaki fark ise ile Bonferoni düzeltmesi yapılarak Mann Whitney U-Testi ile değerlendirildi. Yüzde doksanbeşlik güven aralığında çalışıldı. Grafikler *Graphpad Prism Versiyon 5* programı kullanılarak çizildi.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü ve Karakterizasyon Deneyleri

4.1.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünofenotipik Karakterizasyonu

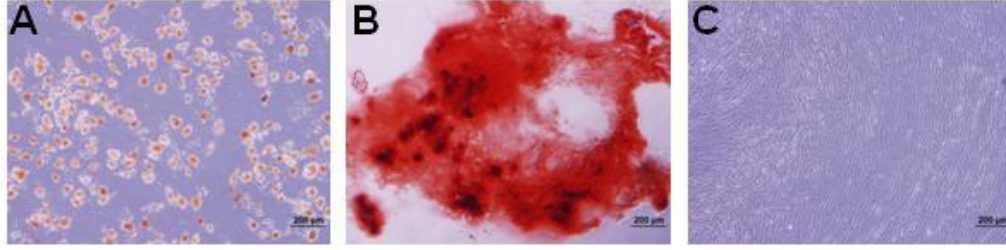
Ticari olarak satın alınan MKH'ler deneysel çalışmalar kısmında belirtildiği gibi uygun ortamlarında büyütüldükten sonra immunofenotiplendirilmesi yapıldı. İmmünofenotipik karakterizasyon sonucu hematopoetik belirteçler olan HLA-DR, CD45 ve CD14'te protein ifadesi görülmedi. Stromal belirteçler olan CD73, CD29, CD44, CD105 ve CD90 pozitif olarak saptandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Mezenkimal kök hücrelerin immunofenotipik karakterizasyonu için akım sitometrisi tekniği ile stromal belirteçleri (CD73, CD29, CD44, CD105, CD90) bulundurduğu, hematopoetik belirteçleri (HLA-DR, CD45, CD14) bulundurmadığı görülmektedir.

4.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklanma Analizi

Mezenkimal kök hücreler 21 gün boyunca adipojenik farklanma besiyeri ile indüklendikten sonra Oil Red-O boyası ile pozitif boyanan hücrelerde nötral lipid oluşumu gözlemlenirken (A), osteojenik farklanma besiyeri ile indüklendiğinde Alizarin Red S boyası ile pozitif boyanan hücrelerde kalsiyum depozitleri (B) gözlemlendi (Şekil 4.2).

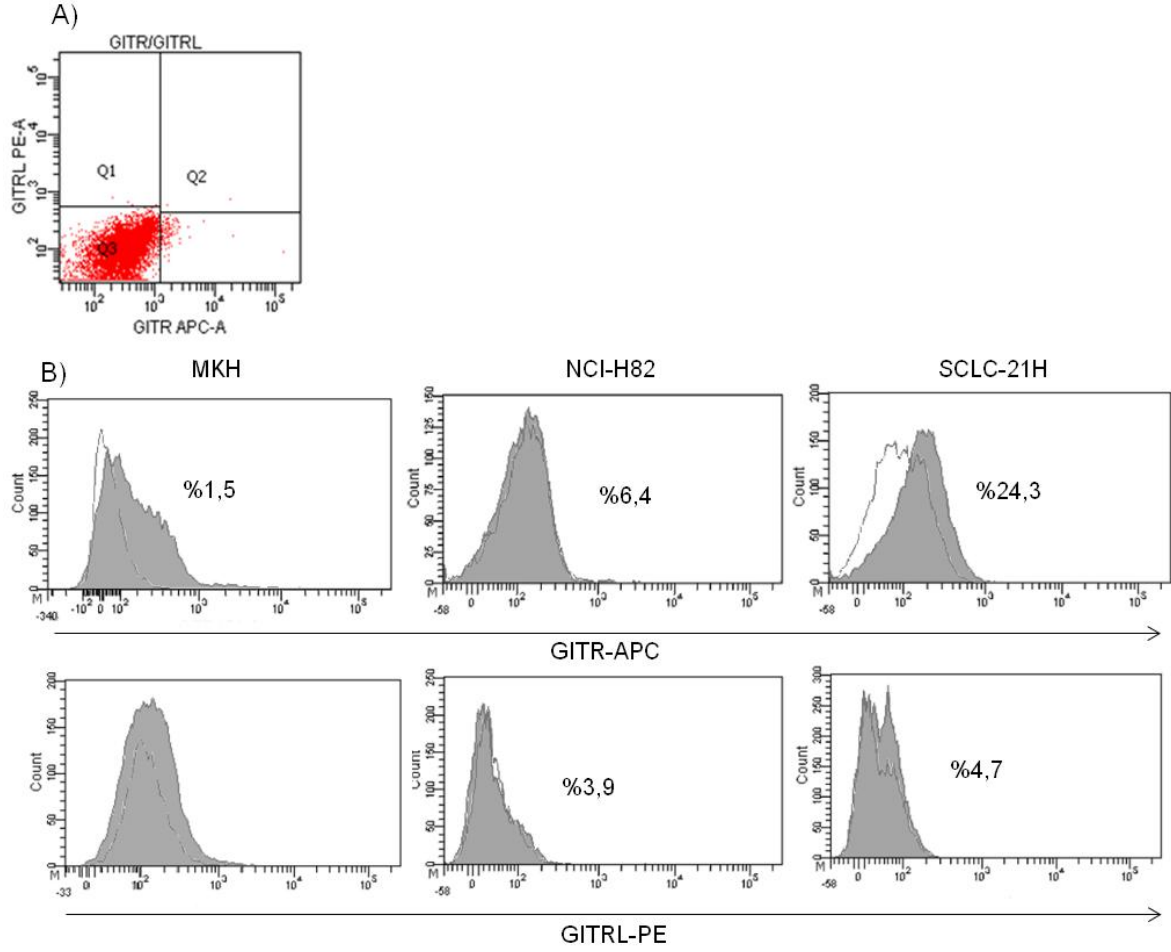


Şekil 4.2. Mezenkimal kök hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitesi görüntülenmiştir. (A) Adipojenik farklılaşma, Oil Red O x10. (B) Osteojenik farklılaşma, Alizarin Red S x10. (C) Kontrol büyüme ortamı, Oil Red O x10.

4.2. GITR ve GITRL'nin İfadelerinin Araştırılması

4.2.1. GITR ve GITRL İfadesinin Protein Düzeyinde Araştırılması

Dört farklı donörde GITR ve GITRL varlığı akım sitometrisi ile analiz edildiğinde, donörlerin hiçbirinde GITR ve GITRL ifadesi protein düzeyinde saptanmadı. Şekil 4.3A'da bir donöre ait akım sitometrisi görüntüsü verilmiştir. Ticari olarak satın alınan MKH'lerde ve kanser hücre hatlarında (SCLC-21H ve NCI-H82), GITR ve GITRL ifadelerinin varlığı akım sitometrisi ile araştırıldığında MKH'lerde GITR ve GITRL ifadesi saptanmadı. NCI-H82 hücrelerinde GITR ve GITRL ifadeleri düşük oranlarda (GITR: % 6,4; GITRL: %3,9) saptandı. SCLC-21H hücrelerinde ise GITR ifadesi %24,3; GITRL ifadesi %4,7 oranında saptandı. (Şekil 4.3B).

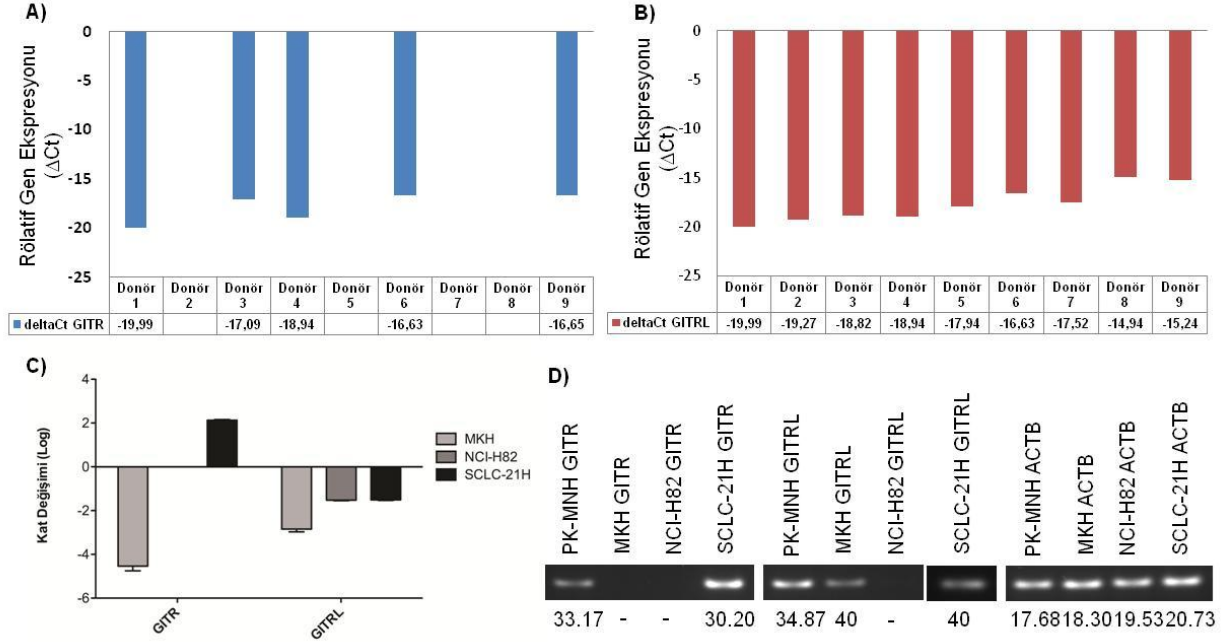


Şekil 4.3. Mezenkimal kök hücre, NCI-H82 ve SCLC-21H hücrelerinin GITR ve GITRL protein düzeylerinin akım sitometrisi görüntüleri. (A) Arşivden elde edilen MKH'lere ait dot plot görüntüsü (B) Ticari olarak alınan MKH'lerin histogram görüntüleri. Saydam histogramlar izotipik kontrolü, gri histogramlar GITR veya GITRL boyamasını göstermektedir.

4.2.2. GITR ve GITRL İfadesinin mRNA Düzeyinde Araştırılması

Arşivden elde edilen MKH'lerinde GITR ve GITRL ifadesi mRNA düzeyinde araştırıldığında, dört donörde GITR ifadesi görülmezken, üç donörde çok düşük düzeyde GITR ifadesi saptandı (Şekil 4.4A). GITRL ifadesi araştırıldığında ise yedi donörde çok düşük düzeyde GITRL ifadesi saptandı (Şekil 4.4B). Ticari olarak satın alınan MKH'lerde mRNA düzeyinde yapılan analizlerde, pozitif kontrol olarak kullanılan LPS-PKMNH'lerine göre MKH'lerde ve NCI-H82 hücre hattında GITR ekspresyonu saptanmazken, SCLC-21H hücre hattında saptandı. GITRL

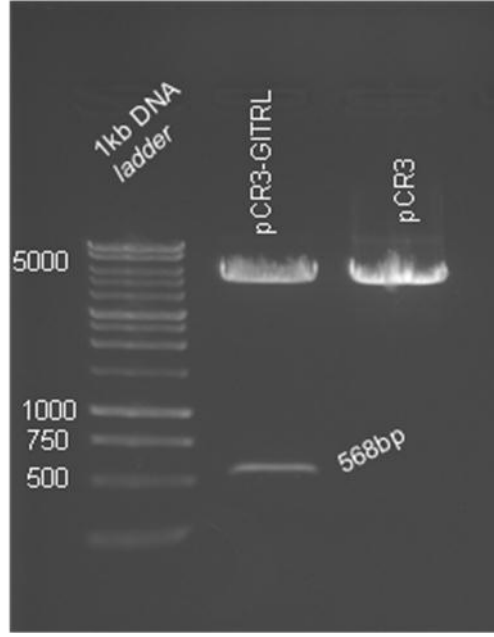
ekspresyonu ise MKH, NCI-H82 ve SCLC-21H hücre hatlarında çok düşük düzeyde saptandı. (Şekil 4.4.C). PCR ürünleri agaroz jelde de yürütülerek doğrulandı (Şekil 4.4.D).



Şekil 4.4. qPCR’da mezenkimal kök hücre, NCI-H82 ve SCLC-21H hücrelerinin GITR ve GITRL hedef gen ekspresyon düzeyleri görülmektedir. (A) ve (B) sırasıyla arşivden elde edilen MKH örneklerindeki GITR ve GITRL ekspresyonunu (C) ticari olarak alınan MKH’lerdeki GITR ve GITRL ekspresyon düzeylerinin kat değişimi grafiğini göstermektedir. Y eksenindeki $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri için log transformasyonu uygulanmıştır. (D) PCR ürünlerinin agaroz jel görüntülerini göstermektedir. GITR; 131bp, GITRL; 131bp.

4.3. Transformasyon

Kompetan hücrelere aktararak çoğaltılan ve daha sonra izole edilen plazmid DNA’ları (pCR3 ve pCR3-GITRL) EcoRI restriksiyon enzimi ile kesilip agaroz jelde görüntülendi. DNA ladder’da 750 bp ve 500 bp arasına tekabül eden pCR3-GITRL DNA’sında bant GITRL dizisinin (568 bp) varlığını göstermektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Restriksiyon enzimi ile kesilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü görülmektedir.

4.3.1. Mezenkimal Kök Hücreye Plazmid Aktarımı (Transfeksiyon)

4.3.1.1. Lipozomal Sistem ile Plazmid Aktarımı

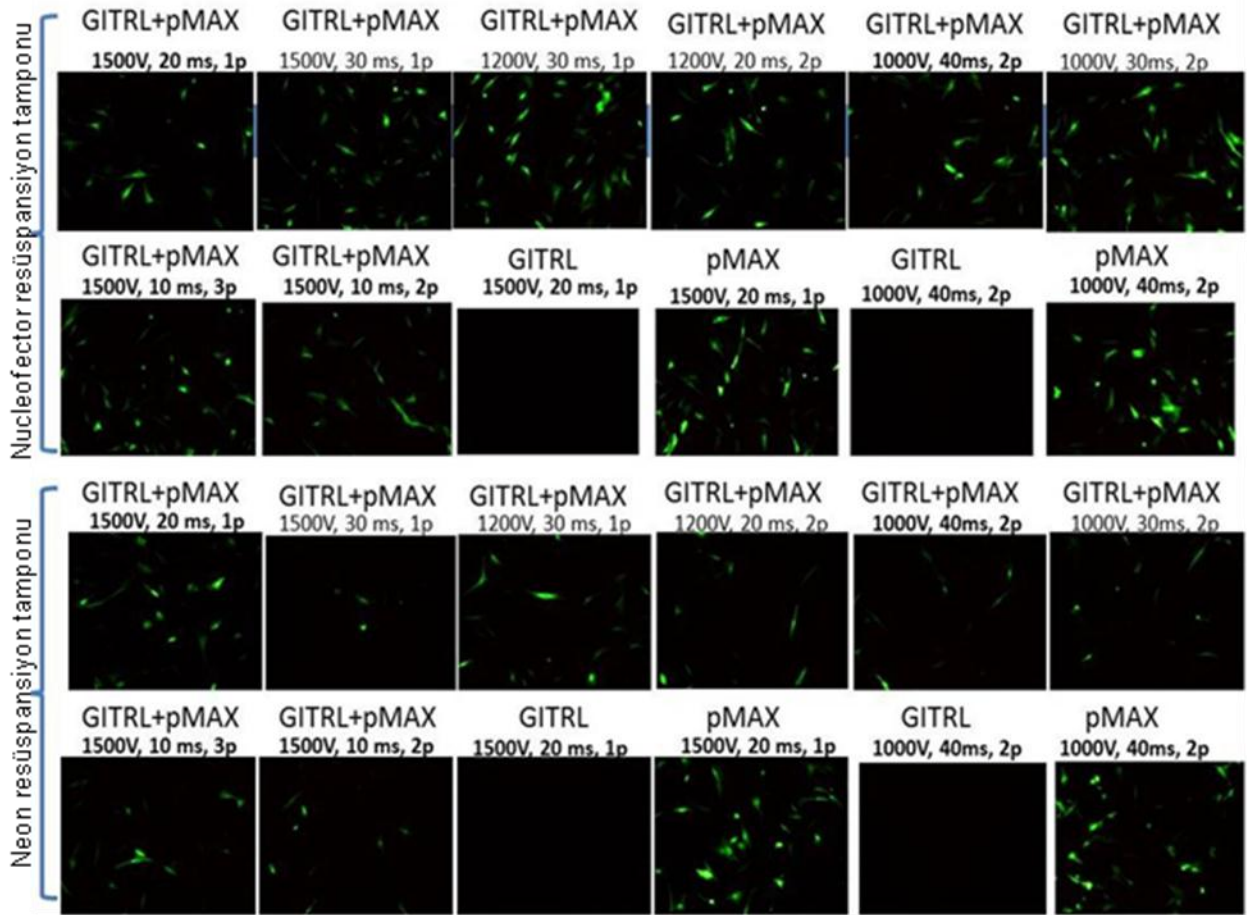
Mezenkimal kök hücrelere gen aktarımında bir lipozomal sistem olan Lipofektamin LTX kullanıldı. Farklı inkübasyon süreleri ve plazmid DNA/ lipofektamin oranları kullanılarak GITRL protein ifadeleri akım sitometrisi ile analiz edildi (Çizelge 4.1). Özetle GITRL protein ifadesi lipofektamin ile en fazla 30 dakika inkübasyonda, plazmid DNA/ lipozom oranı 1: 2,5 olduğunda %4,7 olarak saptandı.

Çizelge 4.1. Lipozomal sistem ile yapılan transfeksiyon sonucu elde edilen en yüksek GITRL ifade değerleri görülmektedir.

Plazmid	Lipozom ile inkübasyon süresi (dakika)	Plazmid DNA/lipofektamin oranı (μ l)	GITRL ifadesi (%)
pCR3-GITRL	5	1:4,5	4,7
pCR3-GITRL	15	1:2	4,1
pCR3-GITRL	15	1:4,5	4,7
pCR3-GITRL	20	1:4,5	4,6
pCR3-GITRL	25	1:3,5/1:4,5	3
pCR3-GITRL	30	1:2,5	4,7

4.3.1.2. Elektroporasyon ile Plazmid Aktarımı

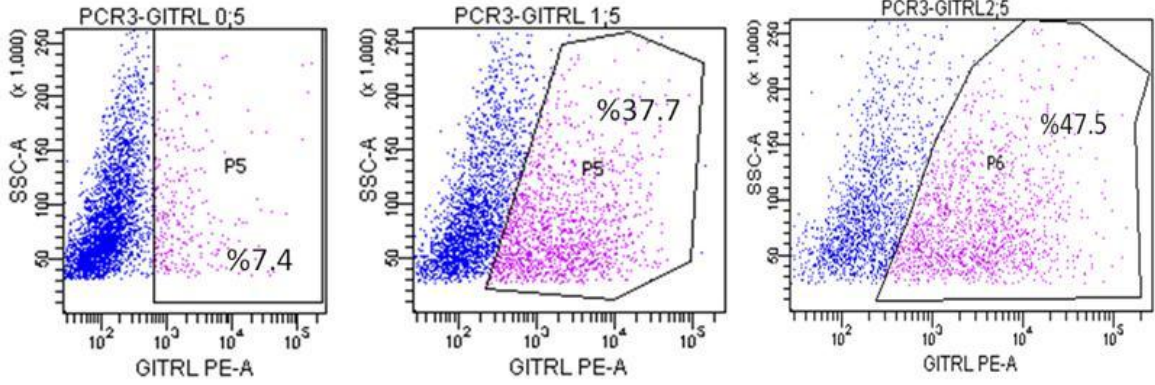
Elektroporasyon ile plazmid aktarımı yapılarak 24 kuyucuklu kültür kabında gerçekleştirilen optimizasyon sonucu akım sitometrisi analizlerinde en yüksek transfeksiyon etkinliği 1500 V, 20 ms 1 pulse koşullarında (%47,2 Nucleofector resüspansiyon tamponu ile; %31,4 Neon resüspansiyon tamponu ile) saptandı. Uygulanan optimizasyon koşullarına ait floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Elektroporasyon ile yapılan optimizasyon çalışmasının floresan mikroskop görüntüleri görülmektedir. En iyi transfeksiyon etkinliği 1500V, 20ms, 1p koşulunda ve cihazla ilgili firmanın ticari resüspansiyon tamponu kullanıldığında elde edilmiştir.

Sonuç olarak elektroporasyon ile yapılan transfeksiyon deneylerinde etkinlik lipozomal sisteme göre daha yüksek saptandı. Bu nedenle Neon transfeksiyon cihazı kullanılarak plazmid DNA miktarı da optimize edildi. 6 kuyucuklu kültür

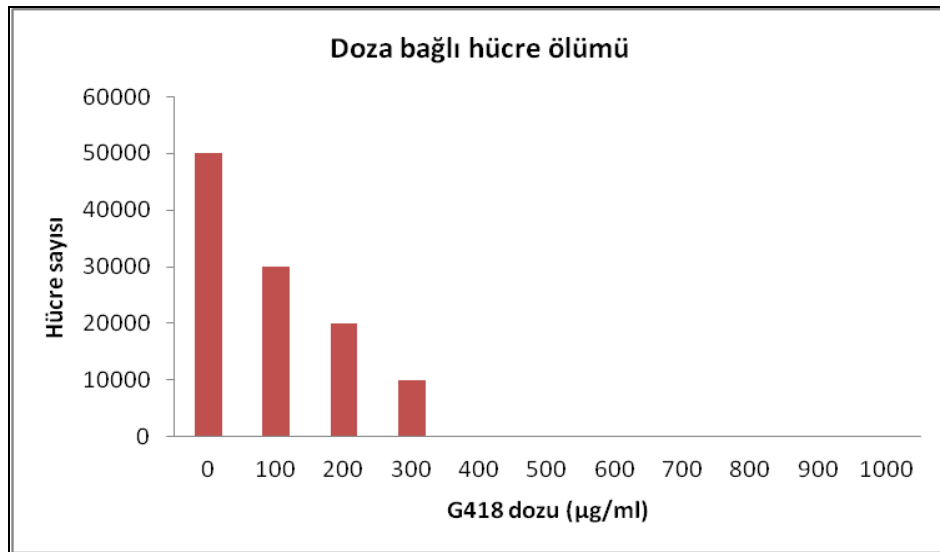
kaplarında gerçekleştirilen DNA miktarı optimizasyon çalışmasında akım sitometrisi ile GITRL ifadesi 0.5µg/ml plazmid DNA ile %7,4; 1,5µg/ml plazmid DNA ile %37,7; 2,5µg/ml plazmid DNA ile %47,5 olarak saptandı (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. DNA optimizasyon çalışması sonucu akım sitometrisi ile MKH'lerdeki GITRL protein düzeyleri görülmektedir. En iyi transfeksiyon etkinliği 2,5 µg plazmid DNA kullanıldığında saptanmıştır.

4.3.2. Kalıcı Transfektanların Elde Edilmesi

Kalıcı transfektanların seçimini sağlayabilmek için, aktarım yapılmamış MKH'lere yapılan geneticin (G418) doz saptama çalışmasında 100-1000 µg/ml aralığı denendi ve yüzde yüz öldüren doz miktarı 400µg/ml olarak saptandı (Şekil 4.8).



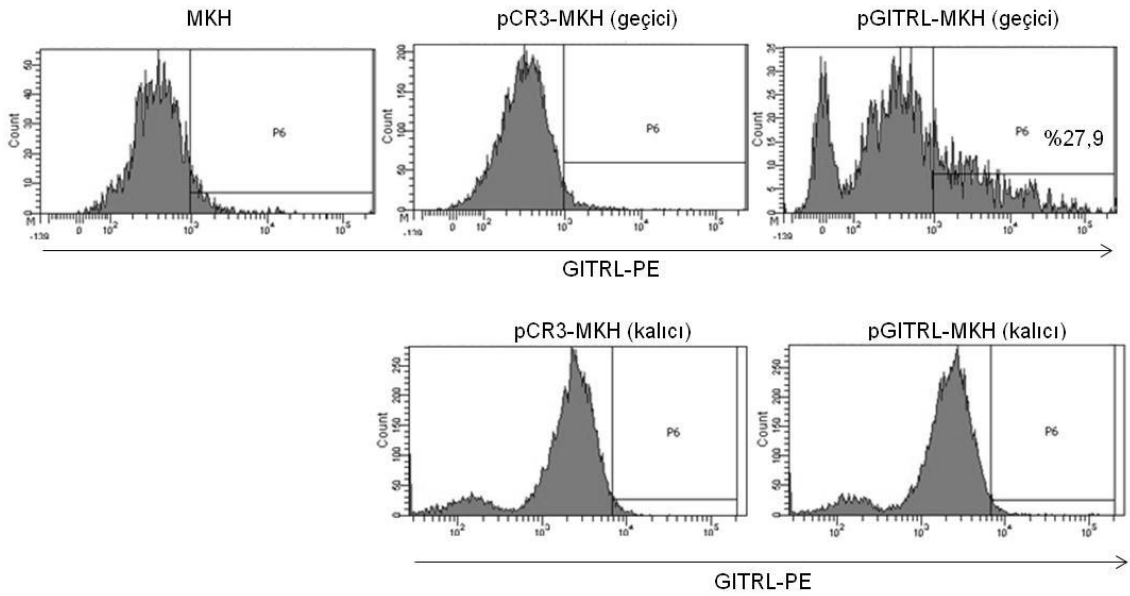
Şekil 4.8. Farklı G418 konsantrasyonlarında büyütülen mezenkimal kök hücrelerin zamana göre değişen miktarları görülmektedir.

Kalıcı transfektanların seçiminde, transfeksiyondan 48 saat sonra MKH'lerin büyüme ortamı 400µg/ml G418 içeren bazal kültür ortamı ile değiştirildi. Seçim ortamında kültür yaklaşık olarak 20 gün sürdürüldü.

4.4. GITRL Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

4.4.1. Akım sitometrisi ile GITRL İfadesinin Araştırılması

Akım sitometrisi ile geçici olarak transfekte edilen hücrelerin GITRL protein düzeyleri ortalama olarak %27,9 olarak saptandı. Boş MKH'lerde, kalıcı veya geçici boş plazmid (pCR3) taşıyan MKH'ler ile kalıcı pGITRL taşıyan MKH'lerde protein düzeyi saptanmadı.

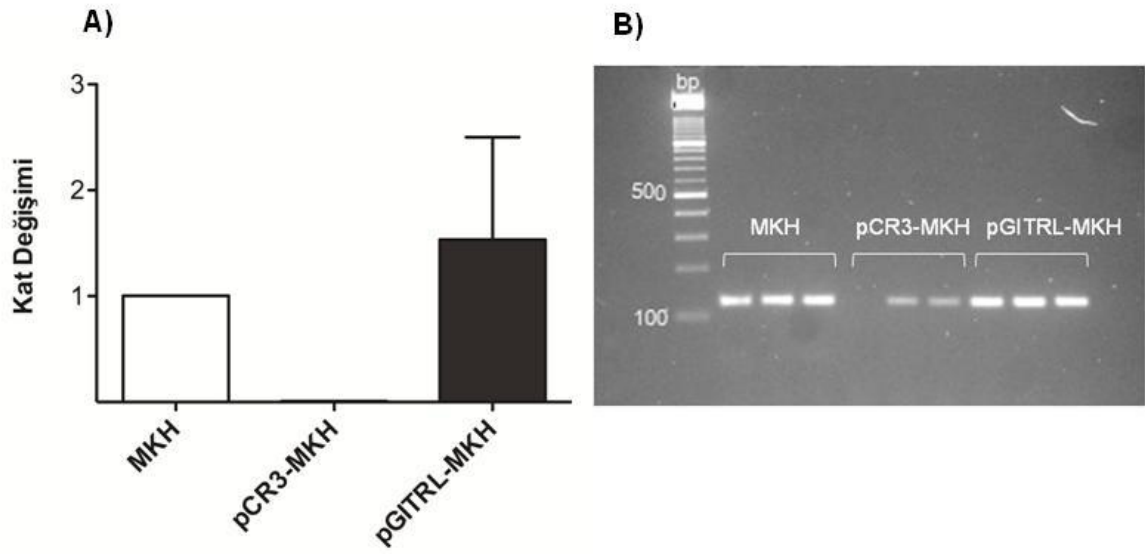


Şekil 4.9. Geçici ve kalıcı transfeksiyon sonrası GITRL protein düzeylerinin akım sitometrisi histogramlarıdır. Geçici transfeksiyon sonrası akım sitometrisi ile GITRL etkinliği %27,9 olarak saptanırken, kalıcı transfektanlarda GITRL ifadesi saptanmadı.

4.4.2. qPCR ile GITRL İfadesinin Araştırılması

Kalıcı transfektanların mRNA düzeyi qPCR ile araştırıldığında ve pCR3'e göre kalıcı pGITRL taşıyan MKH'lerde (ΔC_t : -11,01) ve boş MKH'lerde (ΔC_t : -12,34) mRNA düzeyleri saptanırken, pCR3'ü taşıyan MKH'lerde GITRL mRNA ifadesi çok

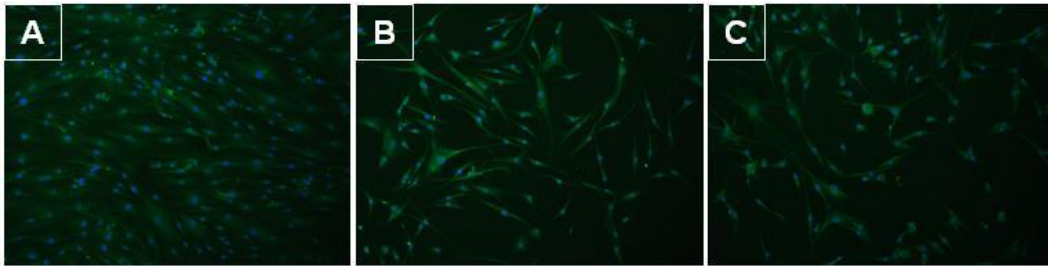
düşük (ΔCt : -19,07, C_p : 40) olarak saptandı (Şekil 4.10A) C_p değeri 40 olanlar %2'lik agaroz jelde yürütülerek ifade varlığı doğrulandı (Şekil 4.10B).



Şekil 4.10. Kalıcı transfektanlarda GITRL hedef gen ekspresyon düzeyleri. (A) Referans genler ile normalize edilmiş gen ekspresyonu düzeylerinin kat değişimi grafiği. (B) PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri.

4.4.3. İmmüno Floresan Boyama ile GITRL İfadesinin Araştırılması

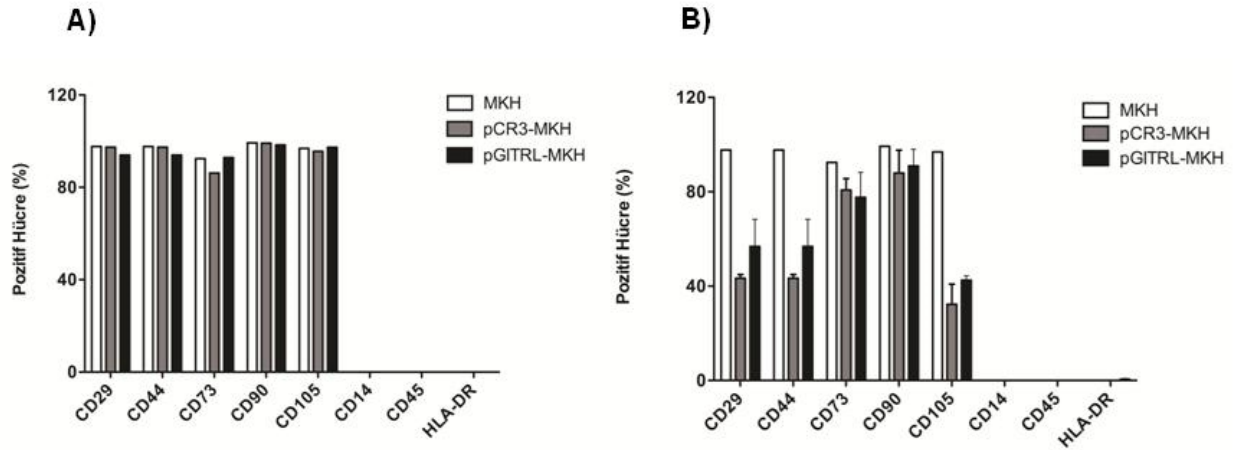
İmmüno floresan boyama ile kalıcı transgen taşıyan hücrelerde GITRL ifadesi araştırıldığında transfekte olan hücrelerde (pCR3-MKH ve pGITRL-MKH) daha belirgin olmak üzere boş MKH'lerde de ışımaya saptandı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Kalıcı transfeksiyon sonrası hücrelerin floresan mikrograflarıdır. (A) Boş MKH (B) pCR3-MKH (C) pGITRL-MKH, çekirdek boyası DAPI, x10.

4.4.4. Transfekte Hücrelerin İmmunofenotipik Karakterizasyonu

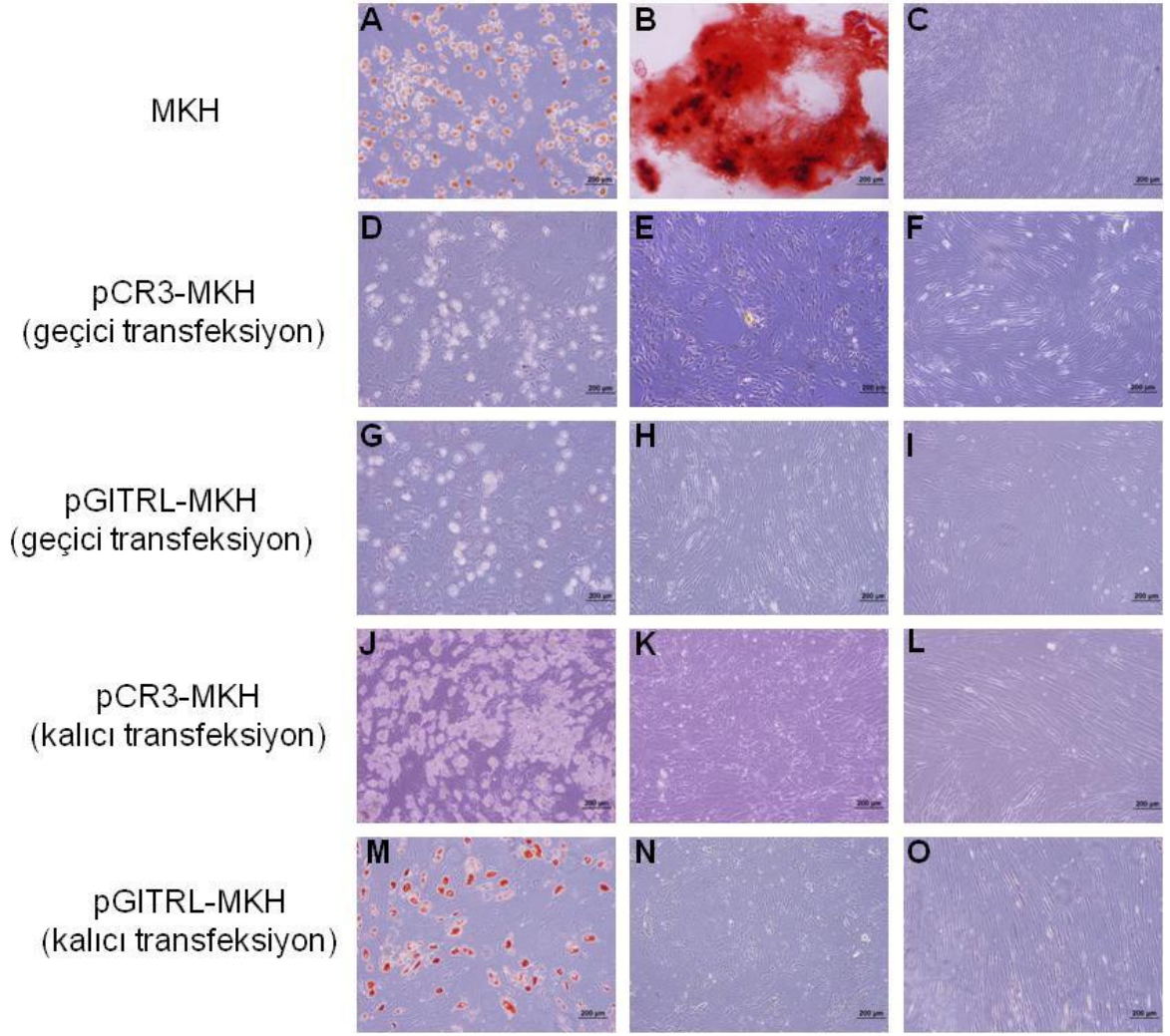
Geçici ve kalıcı transfekte MKH'lerin immunofenotiplendirilmesi sonucu hem pCR3-MKH hem de pGITRL-MKH için transfeksiyon yapılmamış MKH'lerde olduğu gibi hematopoetik belirteçler CD45, CD14, HLA-DR negatif, stromal belirteçler CD44, CD29, CD105, CD73, CD90 pozitif saptandı (CD29; %94-97, CD44; %94-97,6, CD73; %92,4-92,9, CD90; %98,4-99,2, CD105; %96,8-97). Fakat kalıcı pCR3 ve pCR3-GITRL'de CD29, CD44 ve CD105'te kontrole göre düşüş saptandı (CD29; %56,8, CD44; %56,8, CD105; %42,55) (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. GITRL aktarılmış mezenkimal kök hücrelerin akım sitometrisi ile immünofenotipik karakterizasyonunda A'da boş ve geçici transgen taşıyan hücrelerde stromal belirteçlerin bulunduğu, hematopoietik belirteçlerin bulunmadığı saptandı. B'de Kalıcı transgen taşıyan MKH'ler, boş MKH'ler ile karşılaştırıldığında bazı stromal belirteçlerin ifadelerinin azaldığı görülmektedir.

4.4.5. GITRL Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklanma Potansiyellerinin Araştırılması

Adipojenik ve osteojenik farklanma analizleri için boş MKH'lere yapıldığı gibi transfekte hücrelerin adipojenik ve osteojenik ortamlarda farklanmaları sağlanıp, boyamaları yapıldı (Şekil 4.13).



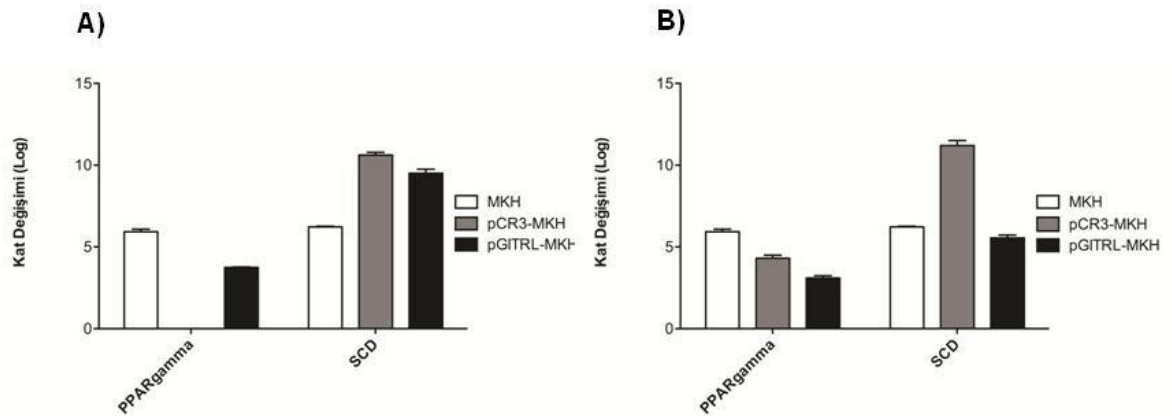
Şekil 4.13. Boş ve transfekte olmuş mezenkimal kök hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklanma potansiyelini gösteren mikrograflardır. Soldaki kolon adipojenik (Oil Red O), ortadaki kolon osteojenik (Alizarin Red S) farklanma ve sağdaki kolonda kontrol besiyerini (Oil Red O) göstermektedir, x10. Boş MKH'ler Alizarin Red S ve Oil Red O ile boyanırken, transfekte hücrelerde boyanma görülmedi. Sadece kalıcı pGITRL-MKH'lerde adipojenik farklanma saptandı.

Boş MKH'ler adipojenik farklanma besiyeri ile indüklendikten sonra Oil Red O boyası ile pozitif boyanan hücrelerde nötral lipid oluşumu gözlemlenirken, osteojenik farklanma besiyeri ile indüklendiğinde Alizarin Red S boyası ile pozitif boyanan hücrelerde kalsiyum depozitleri gözlemlendi (Şekil 4.13 A, B). Transfekte hücreler adipojenik farklanma besiyeri ile indüklendikten sonra Oil Red O boyası ile boyandığı zaman hem pCR3 ile hem de pCR3-GITRL'in geçici transfeksiyonunda nötral lipid oluşumu gözlenmedi, osteojenik farklanma besiyeri ile indüklendiğinde de Alizarin Red S boyası ile kalsiyum depozitleri gözlenmedi

(Şekil 4.13 D, E, G, H). pCR3 kalıcı transfekte hücreler adipojenik farklanma besiyeri ile indüklendikten sonra nötral lipid oluşumu gözlenmezken, GITRL ile kalıcı transfekte hücrelerde kontrole göre lipid oluşumu gözlendi (Şekil 4.13 J, M). Kalıcı transfektanların hem pCR3 ile hem de GITRL taşıyan plazmid ile osteojenik farklanma besiyerinde indüksiyonu sonucu Alizarin Red S boyası ile kalsiyum depozitleri gözlenmedi (Şekil 4.13 K, N).

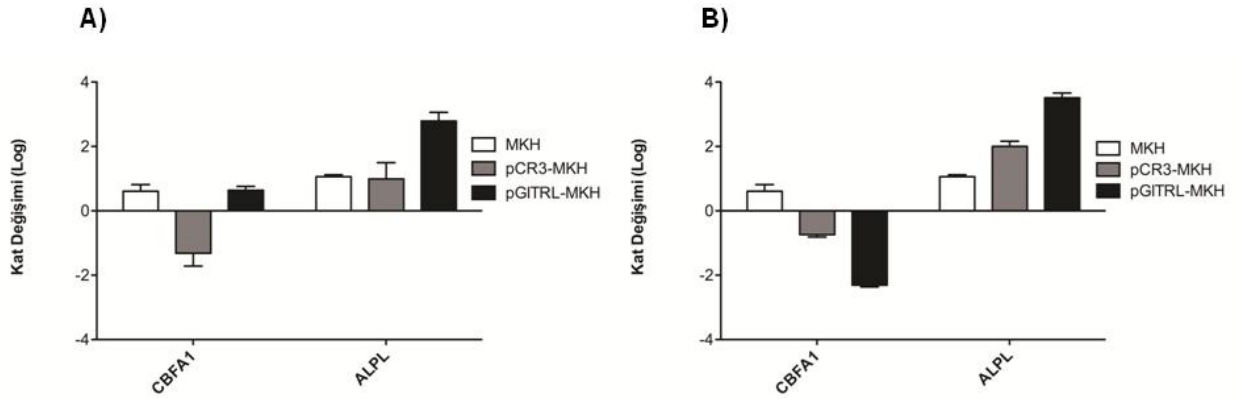
Osteojenik ve adipojenik farklanma belirteçlerinin gen ifadelerine farklanma indüksiyonun 21. gününde hücrelerden total RNA izolasyonu yapılarak, gerçek zamanlı qPCR ile bakıldı. Elde edilen gen ifadeleri boş MKH'ler ile karşılaştırıldığında geçici pGITRL transgenini taşıyan MKH'lerde *PPARgamma* ifadesinin azaldığı (log kat değişimi: 3,74) saptandı. pCR3 ile transfekte MKH'lerde indüksiyon sonrası *PPARgamma* ifadesi saptanamadı. *SCD* ifadesi hem boş pCR3 ile hem de pGITRL ile transfekte hücrelerde boş MKH'lere göre arttı (sırasıyla log kat değişimi: 10,61; 9,68) (Şekil 4.14A).

Kalıcı transgen taşıyan MKH'lerde *PPARgamma* ifadesi geçici transgeni taşıyan MKH'lerde olduğu gibi düştü (log kat değişimi: pCR3: 4,31; pGITRL: 3,09). *SCD* ifadesi ise pGITRL'i kalıcı taşıyan hücrelerde düşerken (log kat değişimi: 5,55), pCR3'ü kalıcı taşıyan hücrelerde arttı (log kat değişimi: 11,03) (Şekil 4.14B).



Şekil 4.14. Adipojenik farklanma genlerinin ifade düzeylerinin kat değişimi grafikleri görülmektedir. (A) Geçici transgen taşıyan hücreler boş MKH'ler ile karşılaştırıldığında *PPARgamma* ifadesi düşmüş, *SCD* ifadesi artmıştır. (B) Kalıcı transgen taşıyan hücreler boş MKH'ler ile karşılaştırıldığında *PPARgamma* ifadesi düşmüş, *SCD* ifadesi ise pCR3-MKH'de artmıştır.

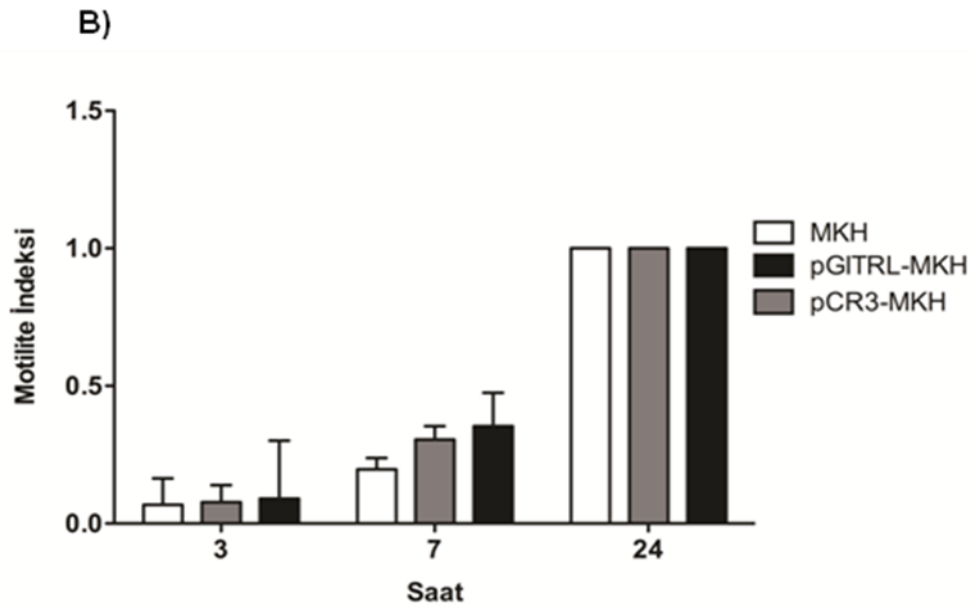
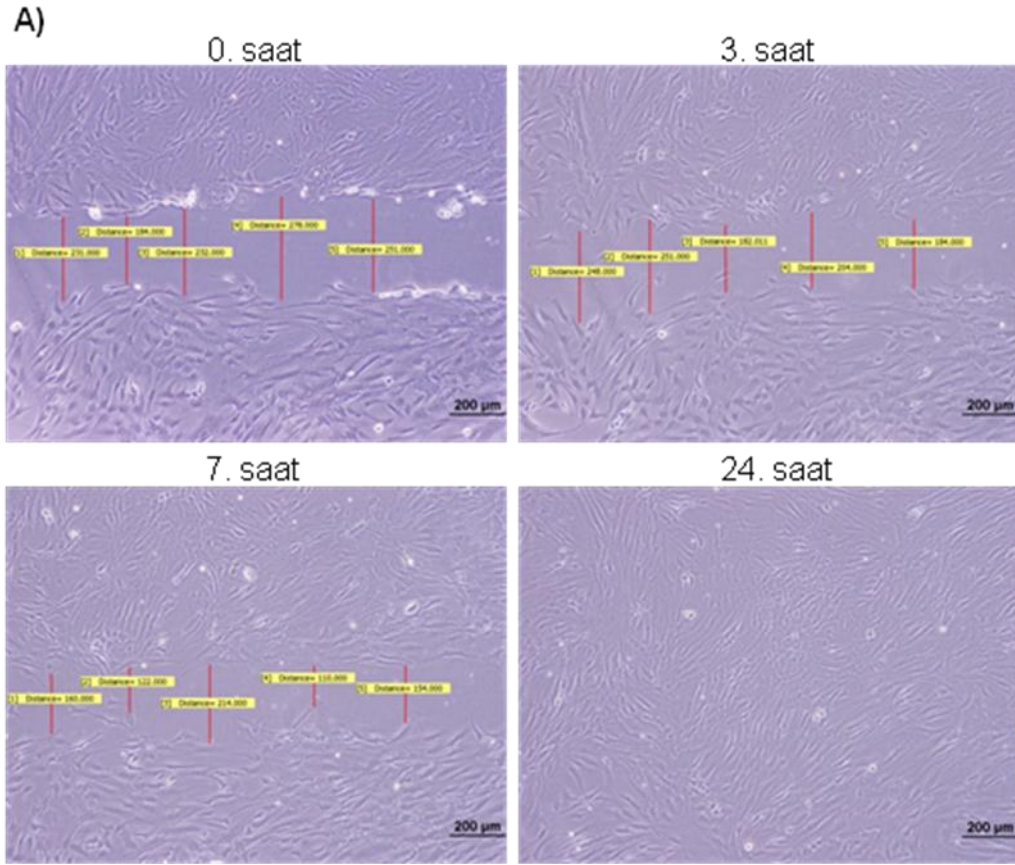
Osteojenik farklanma besiyeri ile indüklenme sonrası osteojenik farklanmaya spesifik genlerden *CFBA1* ve *ALPL* genlerine bakıldı. Geçici ve kalıcı transfektanlarla, boş MKH'ler karşılaştırıldı. Boş MKH'ler ve geçici pCR3 ile transfekte hücreler karşılaştırıldığında *CBFA1* ifadesinde önemli bir değişim olmazken, *ALPL* ifadesinin pGITRL ile transfekte hücrelerde boş MKH'lere ve pCR3 transfekte hücrelere göre arttığı (log kat değişimi: 2,79) saptandı (Şekil 4.15A). Kalıcı transgeni taşıyan MKH'lerde *ALPL* ifadesi artarken (log kat değişimi: 3,51), *CFBA1* ifadesinin pCR3 (log kat değişimi: -0,74) ve pGITRL transfekte hücrelerde (log kat değişimi: -2,31) düştüğü saptandı. (Şekil 4.15B).



Şekil 4.15. Osteojenik farklanma genlerinin ifade düzeylerinin kat değişimi grafiği. (A) Geçici transgen taşıyan hücreler boş MKH'ler ile karşılaştırıldığında pGITRL-MKH'de *CBFA1* ifadesi düşmüş, *ALPL* ifadesi pGITRL-MKH'de artmıştır. (B) Kalıcı transgen taşıyan hücreler boş MKH'ler ile karşılaştırıldığında *CBFA1* ifadesi düşmüş, *ALPL* ifadesi artmıştır.

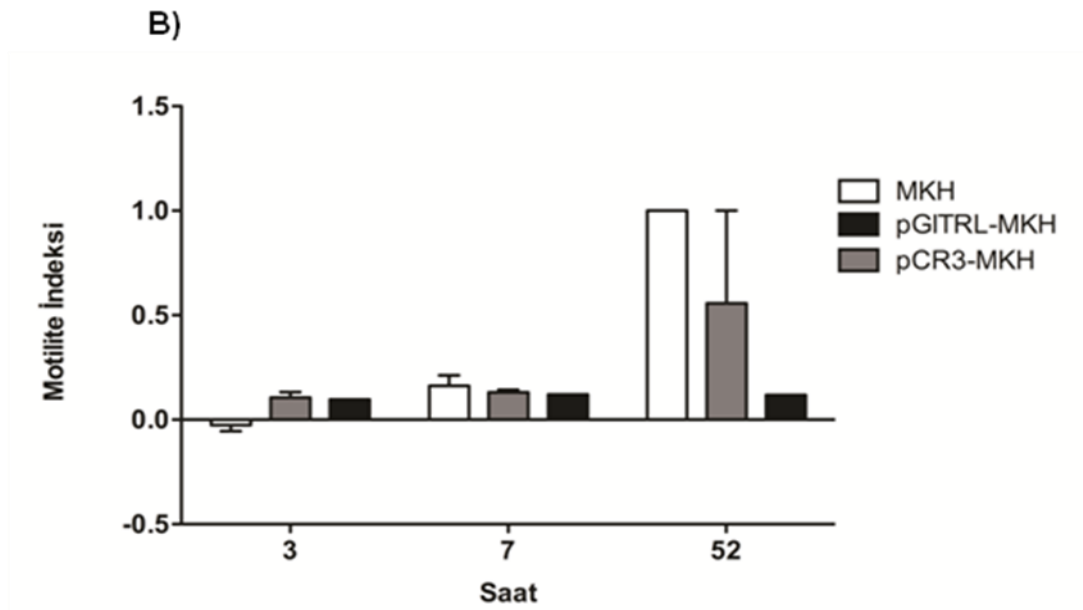
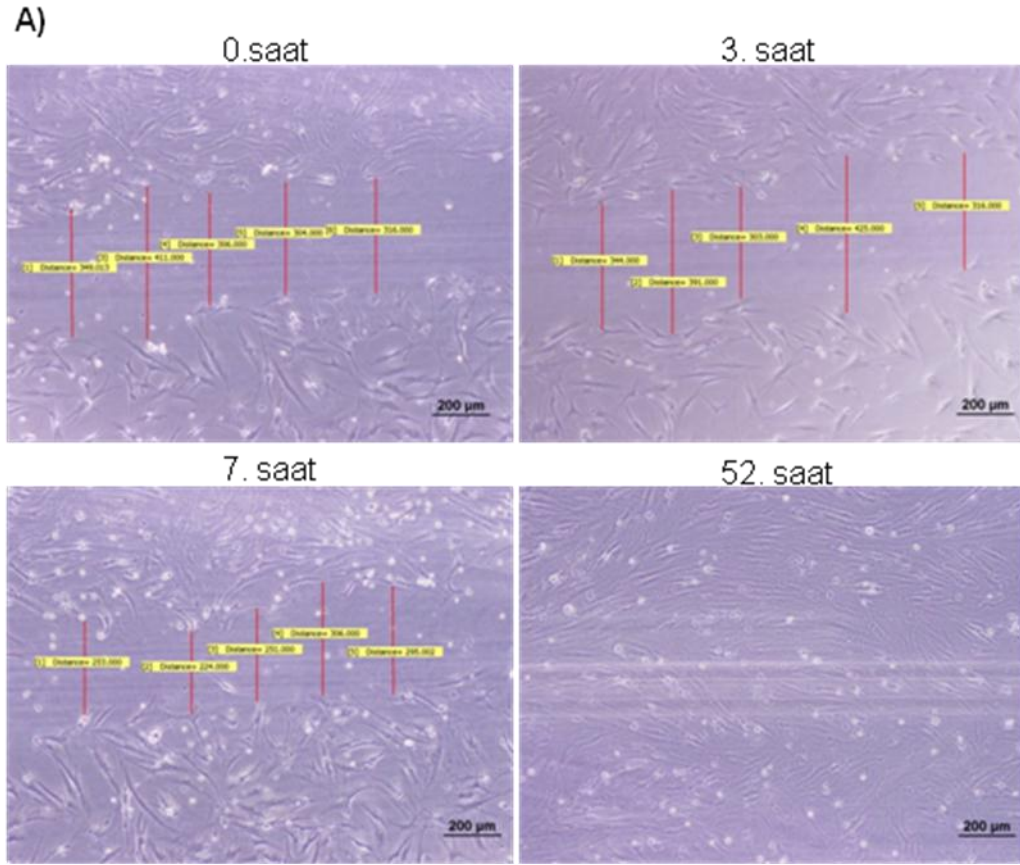
4.4.6. Transfekte Hücrelerin Göç Etme Özelliklerinin Araştırılması

Transgeni geçici ve kalıcı taşıyan MKH'lerde motilite indeksi ölçüldü. Motilite indeksi kültür kabındaki hücreler üzerine yapılan çizimin kapanma hızı (W) beş alanda ölçülerek ($MI=1-Wt/W0$) hesaplandı. Şekil 4.16 A'da çizik sonrası yapılan ölçümler fotoğraflandırıldı. Geçici transfektanlarda 3. saatte motilite indeksi düşük ve boş MKH'lerle benzerdi. Fakat 7 saatte transfekte hücrelerin motilite indeksi boş MKH'lere göre arttı. 24 saat sonunda aradaki boşluk tamamen kapandı (Şekil 4.16 A, B).



Şekil 4.16. *In vitro* yara iyileşmesi modelinde çizik sonrası geçici transgen taşıyan mezenkimal kök hücrelerin göç etme özelliklerine ait mikrograflar (A) ve motilite indeksi grafiği (B) görülmektedir. Yirmidört saatin sonunda tüm gruplarda motilite indeksi eşittir ve yara kapanmıştır.

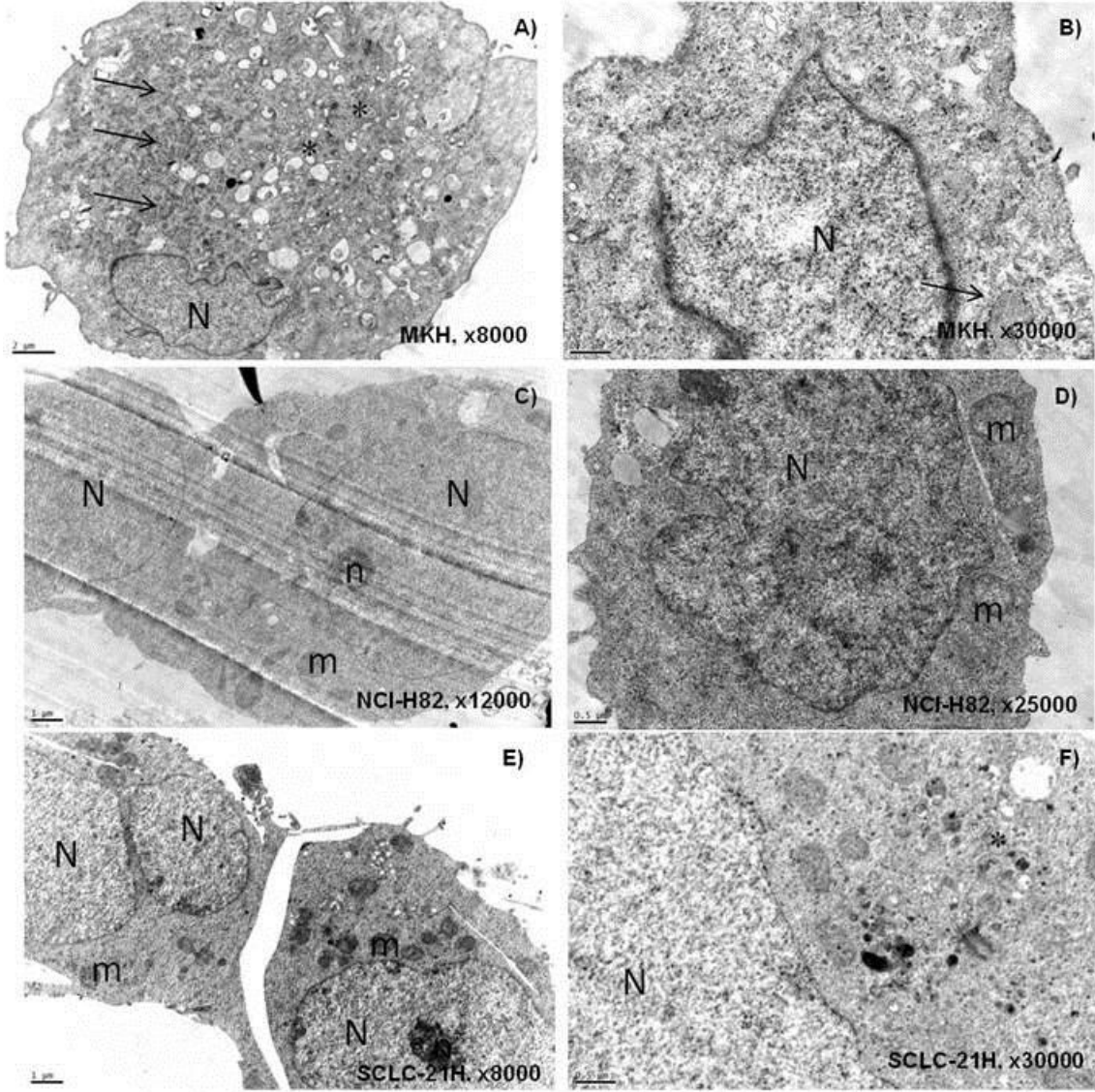
Kalıcı transgen taşıyan hücrelerin çizik sonrası yapılan ölçümleri fotoğraflandırıldı (Şekil 4.17 A). İlk 3 saatte MKH'lerin boşluğu kapatma hızı kalıcı transgen taşıyan hücrelere göre daha yavaşken, 7. saatte lateral hareket hızının artmış olduğu ve hatta transfekte MKH'leri geçtiği saptandı. Yedinci saatte lateral kayma hareketinde pCR3 ve pGITRL transfekte hücreler arasında belirgin bir fark saptanmadı. Ancak 52. saatte MKH'lerdeki çizik bölgesi tamamen kapanırken, pGITRL ve pCR3 taşıyan MKH'lerde çizik kapanmadı (Şekil 4.17 A, B).



Şekil 4.17. *In vitro* yara iyileşmesi modelinde çizik sonrası kalıcı transgen taşıyan mezenkimal kök hücrelerin göç etme özelliklerine ait mikrograflar (A) ve motilite indeksi grafiği (B) görülmektedir. Elli iki saatin sonunda boş MKH'lere göre transfekte hücrelerde motilite indeksi düşüktür ve yara kapanmamıştır.

4.4.7. Transfekte Hücreslerin Transmisyon Elektron Mikroskobunda İncelenmesi

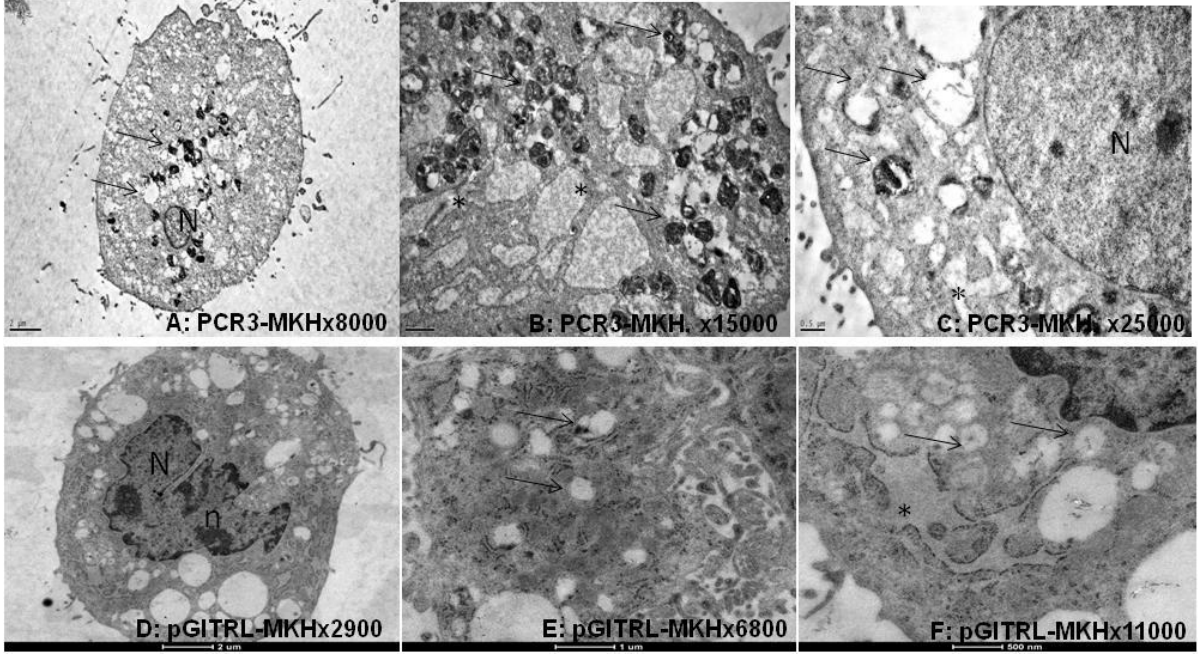
Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde MKH'lerin yer yer birbirleriyle bağlantılı homojen kümeler oluşturdukları izlendi (Şekil 4.18 A, B). NCI-H82 ve SCLC-21H hücre hatlarının elektron mikroskobu düzeyinde heterojen agregatlar oluşturduğu gözlemlendi. Özellikle SCLC-21H hücre dizisinde daha belirgin olmak üzere tümör hücrelerinin birbirleriyle gevşek fokal adezyon birimleriyle bağlantılar gösterdiği, sitoplazmalarında vezikül trafiğine ait organellerin ileri derecede gelişmiş olduğu saptandı (Şekil 4.18 C, D, E, F).



Şekil 4.18. Mezenkimal kök hücre (A ve B), ve NCI-H82 (C ve D) ve SCLC-21H akciğer tümör hücre hatlarına (E ve F) ait elektronmikrograflar. Sol kolonda daha küçük, sağ kolonda daha büyük büyütmede MKH'ler ve akciğer kanseri hücreleri görülmektedir. N: Çekirdek, n: Çekirdekçik, m: Mitokondriyon, asterisk: vezikül ve vakuoller, oklar: endoplazma retikulumu sisternalarını göstermektedir. A'da dilate endoplazma retikulumu sisternaları ve artmış hücre içi vakuollere, E'de hücreler arası fokal temas noktalarına, D, E ve F'de belirgin çekirdekçik yapısına dikkat ediniz. Uranil asetat, kurşun sitrat.

pCR3 ve pGITRL ile MKH'lerin geçici transfeksiyonu sonrası elektron mikroskop görüntülerinde ileri derecede dilate endoplazma retikulumu sisternaları boş MKH'lere göre daha belirgin olarak izlendi. Hücrelerde endozomal keseler ve

vezikül trafiğine ait organellerin ileri derecede gelişmiş olduğu saptandı. Hücre zarının girintili çıkıntılı olduğu, yalancı ayaklar yaparak çevre hücrelerle temas ettiği izlendi (Şekil 4.19).

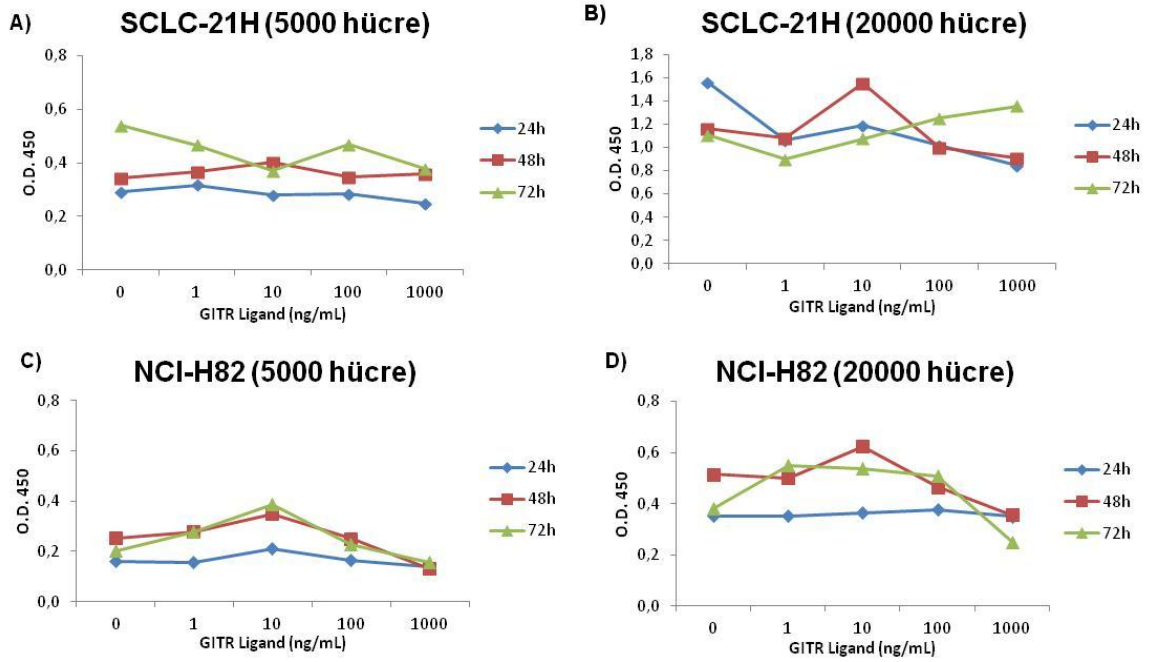


Şekil 4.19. Sağa doğru artan büyütmelelerde pCR3 ve pGITRL ile transfekte mezenkimal kök hücre elektronmikrograflarıdır. N: Çekirdek, n: Çekirdekçik, oklar: vezikül ve vakuoller, asterisk: endoplazma retikulumu sisternalarını göstermektedir. Tüm elektronmikrograflarda artmış hücre içi vakuollere, B ve F’de ileri derecede genişlemiş endoplazmik retikulum sisternalarına dikkat ediniz. Uranil asetat, kurşun sitrat.

4.5 Kanser Hücre Hatlarının Rekombinant GITRL Proteinini ile Kültürü

Rekombinant GITRL proteinin iki farklı yoğunluktaki KHAK üzerine etkisi incelendi. Kanser hücre hatlarının kültürü sonucunda gerek GTR ifade eden SCLC-21H hücrelerinde gerekse GTR negatif NCI-H82 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyonda 5000 hücre yoğunluğunda rekombinant GITRL proteinin denenen tüm dozlarında önemli bir değişim gözlemlenmedi (Şekil 4.20). Ancak SCLC-21H 20.000 hücre yoğunluğunda tüm dozlarda 24 saatlik inkübasyon inhibisyona yol açtı (Şekil 4.20B). SCLC-21H 5000 hücre yoğunluğunda rekombinant GITRL’in 48. saatlik

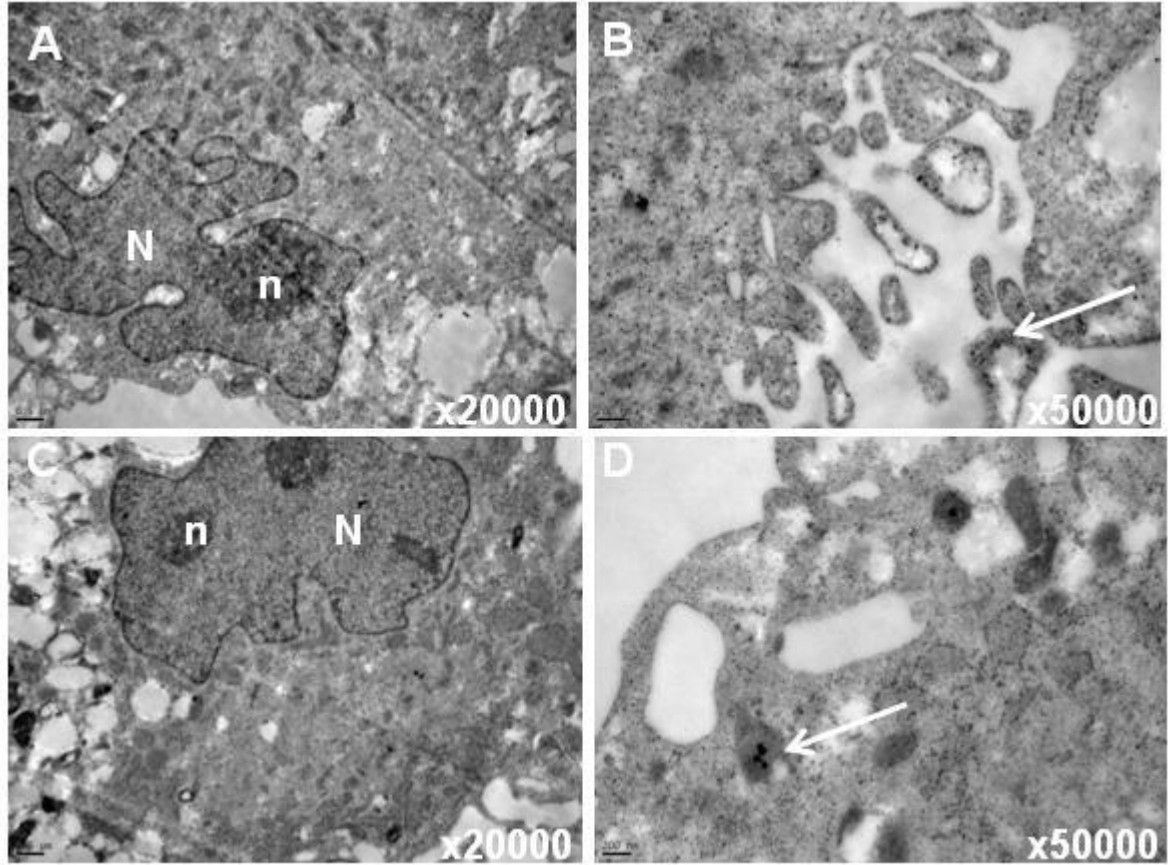
inkübasyon ile özellikle 10ng/ml'lik dozda proliferatif etki gözlemlendi. 72. saatlik inkübasyon ile ise inhibisyon görüldü ve inhibisyon özellikle 10ng/ml ve 1000ng/ml dozlarda daha belirgindi (Şekil 4.20A). SCLC-21H 20000 hücre yoğunluğunda ise, 48. saatlik inkübasyon rekombinant GITRL 10ng/ml'lik dozda proliferatif etkiye yol açarken, 100 ve 1000ng/ml'lik dozlarda inhibisyon yaptığı saptandı. 72. saatlik inkübasyon ise bu hücre yoğunluğunda özellikle 1000ng/ml'lik dozda proliferatif etki gösterirken 1ng/ml'de hafif inhibisyon gösterdi (Şekil 4.20B). 10ng/ml'lik rekombinant GITRL'in NCI-H82 5000 hücre yoğunluğunda etkisi hem 48 hem 72 saatlik inkübasyonda proliferatiftir (Şekil 4.20C). NCI-H82 hücre sayısı arttığında ise (20.000) 48. saatlerde sadece 10ng/ml'lik dozda proliferasyon olurken, 72. saatte 1, 10 ve 100ng/ml'lik dozlarda proliferasyon saptandı. 1000ng/ml/ml'lik dozda ise hem 48 saatlik hem 72 saatlik inkübasyonda inhibisyon olmaktadır (Şekil 4.20D).



Şekil 4.20. SCLC-21H ve NCI-H82 kanser hücre hatlarının artan rekombinant GITRL ile uyarımı sonucu çoğalma eğrileri. Kanser hücreleri (SCLC-21H ve NCI-H82) 10ng/ml rekombinant GITRL ile uyarıldığında 48 saat sonunda hücre proliferasyonu artmıştır.

4.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Altın ve Demir Nanopartikülleri ile İşaretlenmesi

Tez çalışmasının amaçlarından birisi MKH'lere biyoyumlu olduğu kanıtlanan ve inkübasyon süresi ile dozu biyoyumluluk açısından standardize edilen altın NP'ler ile işaretlenerek kanser hücrelerinden ayırt edilebilmeleriydi. Bunun için 10 ve 30 nm büyüklüğündeki altın NP'ler 35 nm büyüklüğündeki demir NP'ler ile karşılaştırmalı olarak MKH'leri işaretleme kapasiteleri için ışık ve/veya elektron mikroskobu düzeyinde analiz edildi. Altın NP'ler ile işaretli MKH'ler ince yapı düzeyinde incelendiklerinde; partiküllerin hücre içerisinde çeşitli endozomal kompartmanlarda dağılım gösterdiği saptandı (Şekil 4.21 A, B, C, D). 10 nm'lik NP'ler hücre içerisinde genellikle diffüz dağılım gösterirken, 30 nm'lik partiküllerin sitoplazmik uzantıların içinde yerleştiği ve de sınırlı olarak endozomların içerisinde buldukları gözlemlendi.

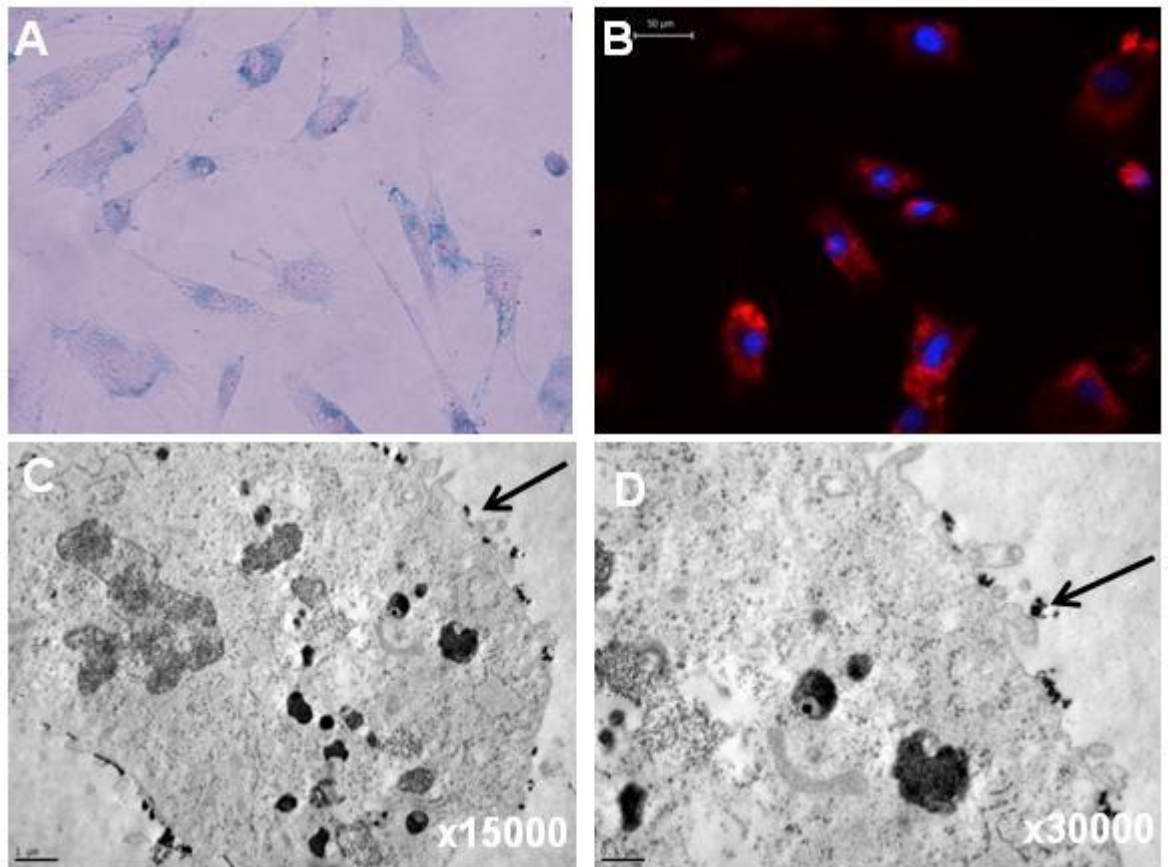


Şekil 4.21. Altın nanopartiküller ile işaretli hücrelerin elektronmikrografları. A ve B'de 10 nm büyüklüğünde, C ve D'de 30 nm büyüklüğünde altın NP'ler ile işaretli hücrelerin elektronmikrografları izlenmektedir. Altın taneciklerinin hücrelerin

sitoplazmik uzantılarından endozomal keseciklere alındığına (beyaz ok) dikkate ediniz. N: Çekirdek, n: Çekirdekçik, beyaz ok: altın NP'ler.

Rodaminle işaretli demir NP'leri ışık mikroskopunda MKH'lerin sitoplazmalarının içinde prusya mavisi ile boyalı alanlarla tam örtüşen görüntüler verdiler (Şekil 4.22 A). Bu da bize adı geçen ürünün optimizasyonunun geçerli ve güvenilir olarak yapıldığını gösterdi. MKH'lerin ince yapı düzeyinde hücre zarlarında belirgin bir biçimde dağılan Rodamin-demir NP'ler ile işaretli oldukları saptandı (Şekil 4.22C, D).

Kullanılan altın ve demir MKH'leri işaretleme performansları açısından karşılaştırıldıklarında demir ile olan görüntülemenin altına göre daha başarılı olduğu izlendi. Diğer yandan demir NP'ler ile yaklaşık aynı boyutta olan 30nm'lik altın NP'lerin hücre içi kompartmanlarda yer değiştirmesine rağmen hücreleri başarıyla görüntüleyebildiği izlendi.

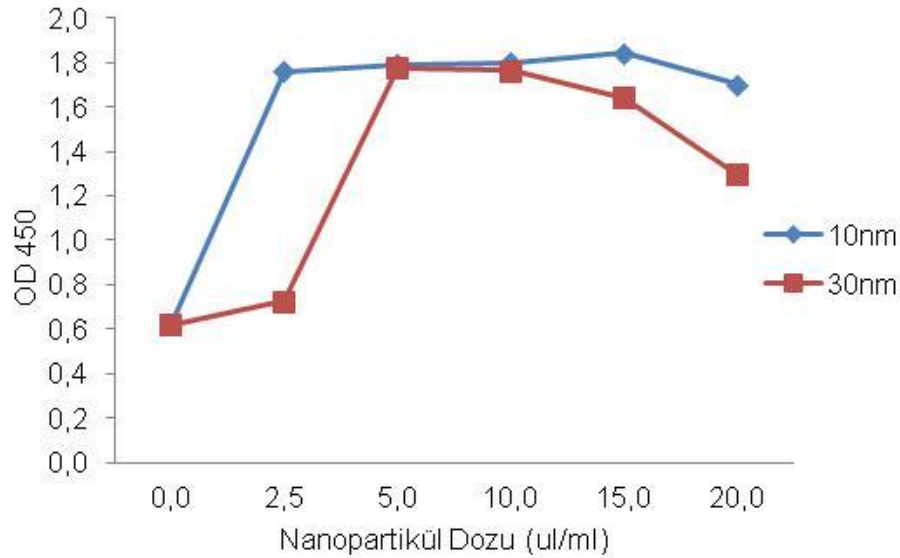


Şekil 4.22. Demir nanopartiküller ile işaretli mezenkimal kök hücrelere ait mikrograflar/elektronmikrograflar. Sırasıyla A ve B'de demir NP'ler ile işaretli mezenkimal kök hücrelere ait mikrograflar, C ve D'de elektronmikrograflar izlenmektedir. A'da demir NP'ler Prusya mavisi ile hücrelerin sitoplazmasında mavi

renkte boyanmıştır, x50. B'deki floresanmikrografta rodaminle işaretli NP'lerin, çekirdekleri DAPI ile mavi boyalı MKH'lerin sitoplazmalarındaki kırmızı renkli görüntüsü izlenmektedir, x40. C ve D'de demir taneciklerinin ultrastrüktürel olarak hücrelerin yüzeyinde dizildiği (siyah ok) görülmektedir. N: Çekirdek, n: Çekirdekçik, siyah ok: demir NP'leri göstermektedir.

4.6.1. Altın ile İşaretli Mezenkimal Kök Hücrelerin Proliferasyonu

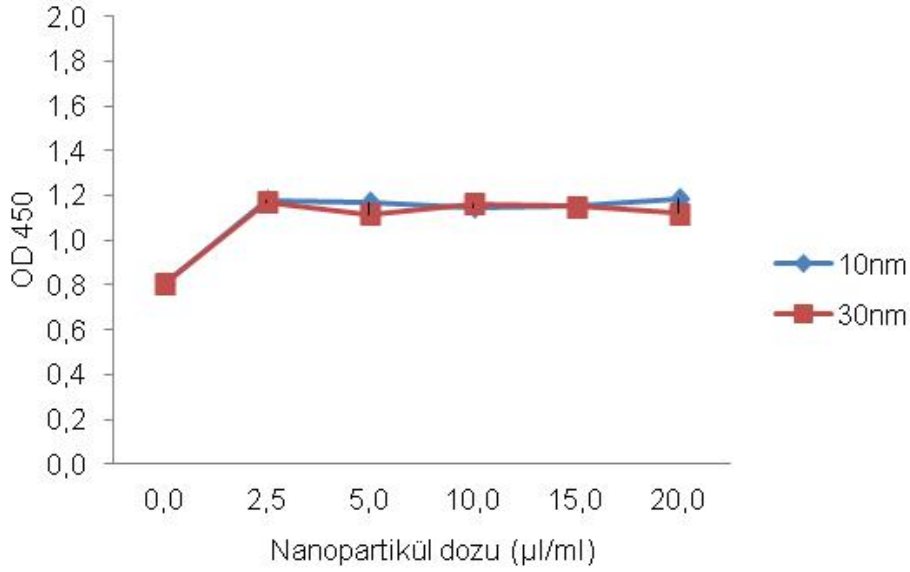
Altın NP'lerin MKH'lerin proliferasyonuna olan etkisinin araştırılması için her iki büyüklükteki partikülle işaretleme yapıldıktan sonra hücrelere WST-1 testi uygulandı. Yapılan ölçüm sonucunda çapı 10nm olan nanopartiküllerin 2,5µl/ml'lik dozunda maksimum proliferatif etki gözlemlendi. 5 ve 10 µl/ml'lik dozlarda bu etki sabit olarak devam etti. 15 µl/ml'lik dozda hafif bir artış gözlemlendi. Fakat bu artışın 20 µl/ml'lik dozda azaldığı saptandı. Çapı 30 nm olan nanopartiküllerde ise 10nm'lik nanopartiküllerin aksine 2,5 µl/ml'lik dozdaki artış minimum düzeydeydi. 30 nm'lik nanopartiküllerde maksimum proliferatif etkinin gözlemlendiği doz 5 µl/ml'lik dozdu. 10 µl/ml'de proliferasyon sabit kaldı. Fakat 15 ve 20 µl/ml'de proliferasyon etkisinin düşmeye başladığı saptandı (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. WST-1 yöntemiyle altın nanopartiküllerin mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonuna etkisi görülmektedir. 10nm'lik nanopartiküllerde hücre proliferasyonu en fazla 2,5 µl/ml'lik dozda, 30 nm'lik nanopartiküllerde 5 µl/ml'lik dozda saptanmıştır.

4.6.2. Altın ile İşaretli pGITRL Taşıyan Mezenkimal Kök Hücrelerin Proliferasyonu

Kalıcı pGITRL transgeni taşıyan ve altın NP'ler ile işaretli MKH'lerin proliferatif etkilerinin olup olmadığının belirlenmesi için WST-1 Testi uygulandı. Yapılan ölçüm sonucunda çapları 10 ve 30 nm olan partiküllerin proliferasyonu 2,5 µl/ml'lik dozda artış gösterdi. Doz arttıkça proliferasyonun değişmediği saptandı (Şekil 4.24).

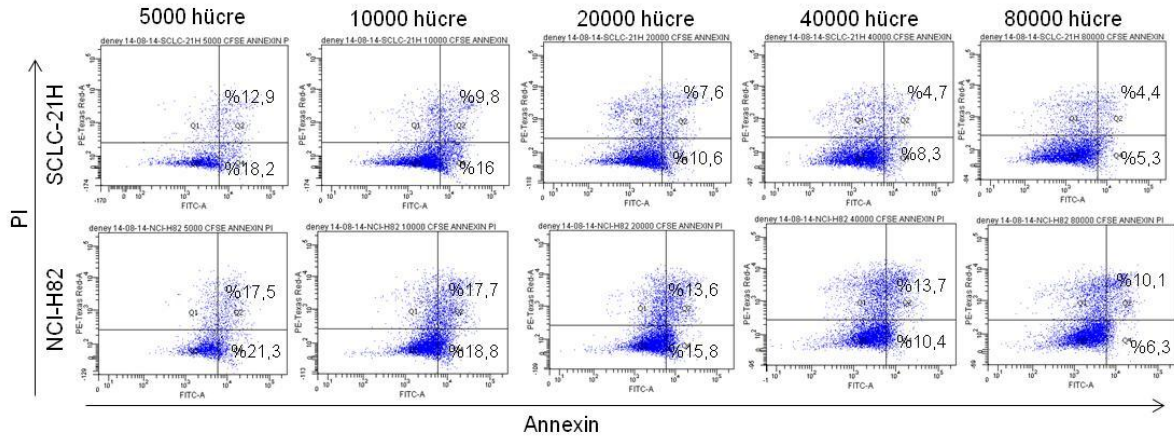


Şekil 4.24. WST-1 yöntemiyle altın nanopartiküllerin kalıcı pGITRL taşıyan mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonuna etkisi. Hücre proliferasyonu her iki büyüklükteki (10 ve 30 nm) NP'de de 2,5 µl/ml'lik dozda en fazla görülmüştür.

4.7. Ko-kültür Çalışmasının Sonuçları

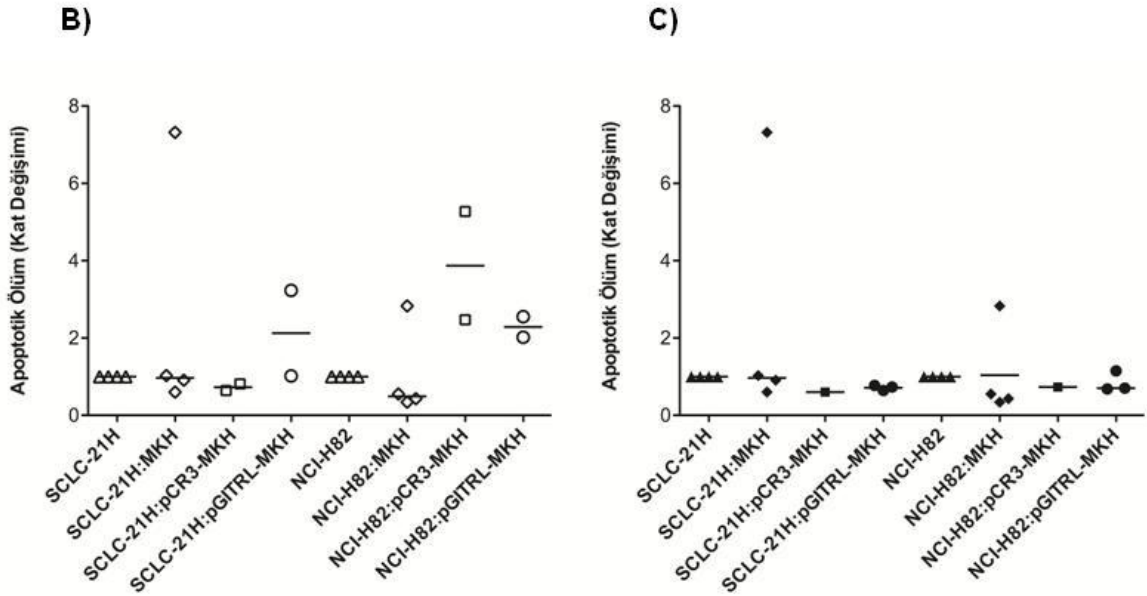
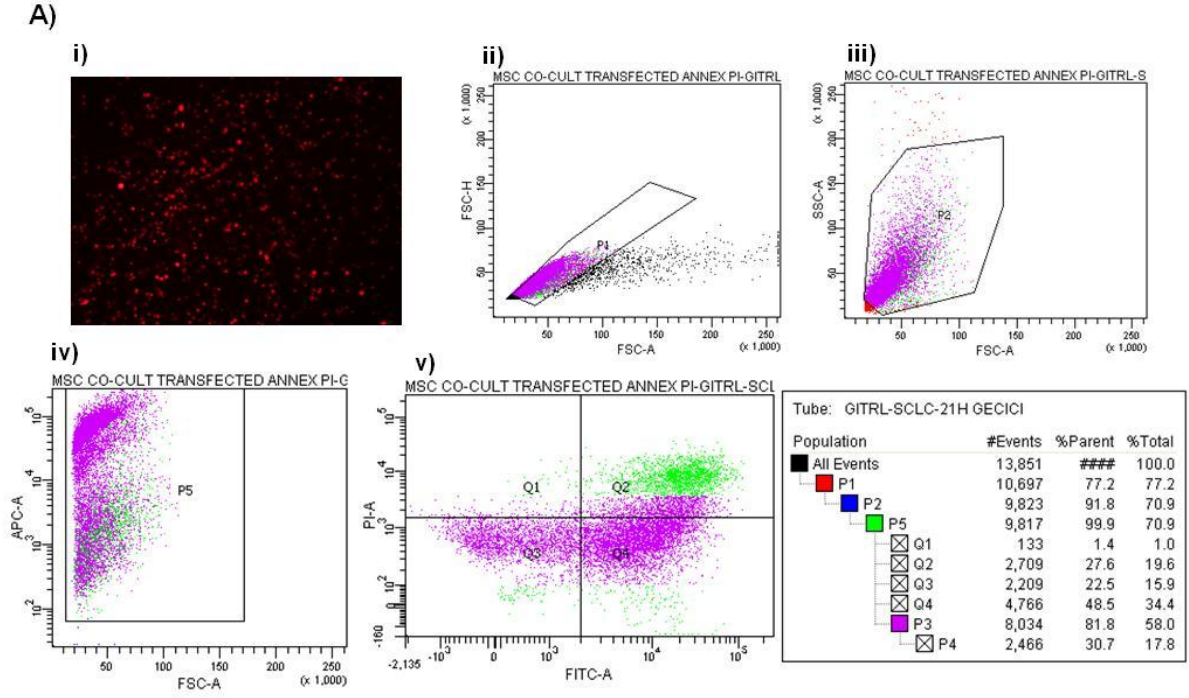
4.7.1. Ko-kültüre Edilen Kanser Hücrelerinin Annexin/PI ile Apoptozunun Araştırılması

Geçici ve kalıcı transgen taşıyan (pGITRL ve pCR3) ve boş MKH'ler, SCLC-21H ve NCI-H82 hücreleri ile ko-kültüre edilmeden önce kanser hücrelerinin spontan ölüm yüzdeleri akım sitometrisi ile araştırıldı. 48 saat sonunda yapılan Annexin-PI boyaması sonucunda en az hücre ölümü 2:1 (kanser: MKH= 80.000: 40.000) oranında (SCLC-21H için; %9,7; NCI-H82 için %16,4) saptandı (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Kanser hücrelerinin akım sitometrisinde spontan ölüm yüzdeleri verilmiştir. Her iki hücre hattı için de (SCLC-21H ve NCI-H82) spontan ölüm yüzdesinin en az olduğu hücre miktarı 80000 hücre olarak belirlenmiştir.

24 kuyucuklu kültür kaplarında 2:1 oranında kanser hücresi: MKH ko-kültürü için kırmızı CFSE ile boyalı 80.000 kanser hücresi kullanıldı ve ölü hücreler Annexin-PI boyaması yapılarak akım sitometrisi ile analiz edildi (Şekil 4.25). SCLC-21H için spontan ölüm yüzdesi $44,63 \pm 32,73$, NCI-H82 için ise $36,13 \pm 19,22$ idi. Spontan ölüm oranları ile karşılaştırıldığında, boş MKH'ler SCLC-21H ve NCI-H82 hücrelerinde önemli bir apoptotik hücre ölümüne yol açmadı. Sadece her iki grup için de bağımsız yapılan birer deneyde spontan hücre ölümüne göre, boş MKH'ler SCLC-21H için 7,32; NCI-H82 için 2,83 kat hücre ölümüne neden oldu (Şekil 4.26 B ve C). pCR3'ü geçici ya da kalıcı taşıyan hücrelerin SCLC-21H hücrelerinin ölümü üzerine etkisi olmadı. pGITRL'i kalıcı taşıyan MKH'ler SCLC-21H hücrelerinde önemli bir değişime neden olmazken, geçici taşıyan hücrelerin bir deney grubunda 3,23 katlık bir artışa neden oldu. NCI-H82 üzerinde en yüksek apoptotik etkiyi ilginç olarak pCR3'ü geçici taşıyan MKH'ler gösterdi (kat değişimi: 5,27 ve 2,47) ve pGITRL'i geçici taşıyan MKH'lerin etkisi ise daha düşüktü (kat değişimi: 2,55 ve 2,02). pGITRL'i kalıcı taşıyan MKH'lerin her iki hücre kanser hattı üzerinde apoptotik hücre ölüm etkisi geçici pGITRL taşıyan MKH'lere göre azaldı. (Şekil 4.26 B ve C).

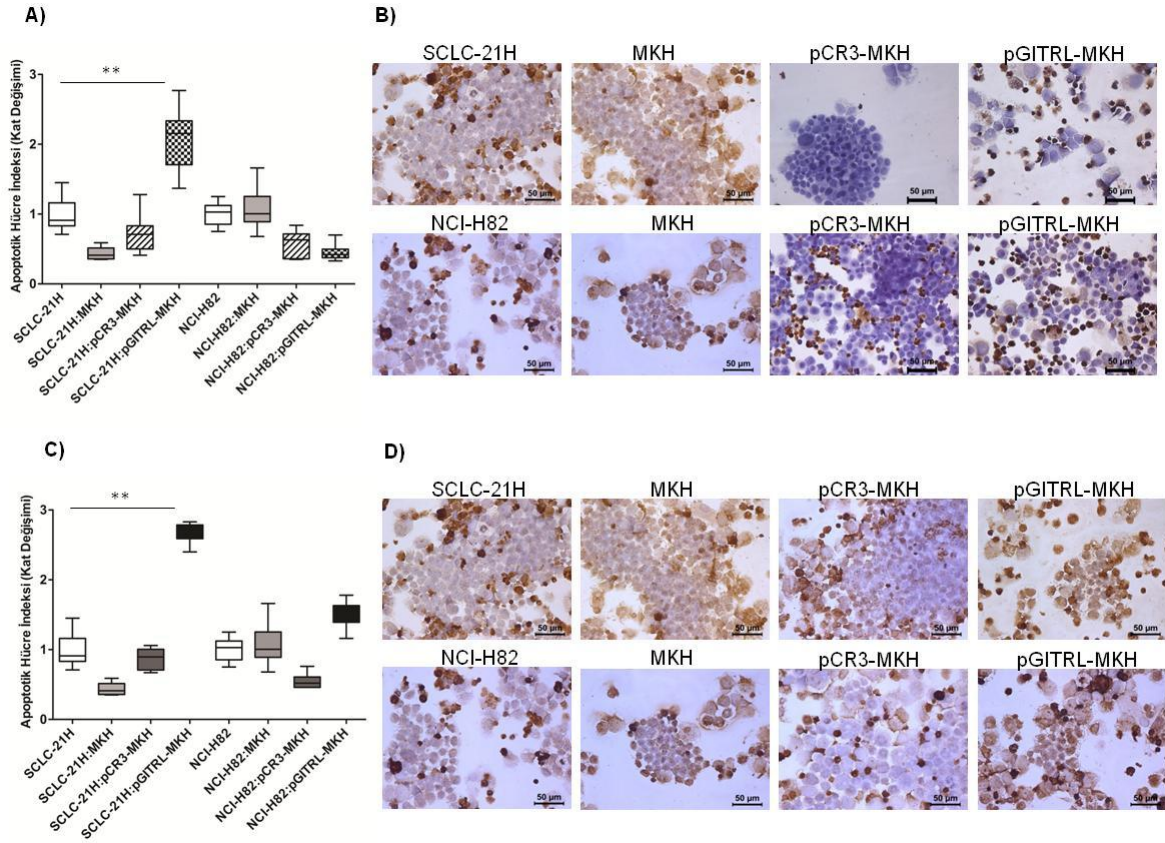


Şekil 4.26. Ko-kültür sonucu SCLC-21H ve NCI-H82 hücrelerinde saptanan hücre ölümü akım sitometrisi yöntemiyle verilmiştir. A'da (i) Kırmızı CFSE ile kanser hücrelerinin çekirdek boyamasını gösteren floresanmikrograf görülmektedir, x50. (ii) Kanser hücrelerinin yapışma özelliğinden dolayı P1 kapısı ile duplike hücreler elimine edildi. (iii) Hücreler P2 kapısı ile granülite ve boyuta göre seçildi. (iv) P5 kapısı ile tüm CFSE pozitif hücreler seçildi. (v) P5 kapısının altından açılan Q2 ve Q4 kapıları Annexin-PI pozitif hücreleri göstermektedir.

(B) Geçici transgen taşıyan MKH'ler üzerindeki kanser hücrelerinin Annexin-PI ile işaretlenmesi sonrası ölüm en çok pCR3-MKH ile NCI-H82 hücreleri ko-kültüre edildiğinde saptanmıştır. (C) Kalıcı transgen taşıyan MKH'ler üzerindeki kanser hücrelerinin Annexin-PI ile işaretlenmesi sonrası ölüm en çok boş MKH'er NCI-H82 hücreleri ile ko-kültüre edildiğinde saptanmıştır.

4.7.2. Ko-kültüre Edilen Kanser Hücrelerinin TUNEL Yöntemi ile Apoptozunun Araştırılması

TUNEL analizlerine göre SCLC-21H ve NCI-H82 hücrelerinin spontan apoptotik ölüm indeksleri arasında önemli bir farklılık yoktu. Boş MKH'ler ise SCLC-21H'ı spontan hücre ölümüne göre 0,44 kat daha az öldürüyordu. pCR3'ü geçici ya da kalıcı taşıyan MKH'lerin SCLC-21H ve NCI-H82 hücreleri üzerinde önemli bir etkisi saptanmadı. pGITRL'i geçici taşıyan hücreler, SCLC-21H'ın spontan hücre ölümüne göre 2,07 katlık bir artış gösterirken, kalıcı taşıyan hücreler 2,68 katlık bir artışa neden oldu ($p < 0,001$). NCI-H82 hücreleri pGITRL taşıyan hücreler ile ko-kültüre edildiğinde geçicilerde 0,45 katlık bir azalmaya, kalıcılarda 1,52 katlık bir artışa neden oldu. Boş MKH'lerin NCI-H82 hücrelerinin ölümüne etkisi olmadı (Şekil 4.27).

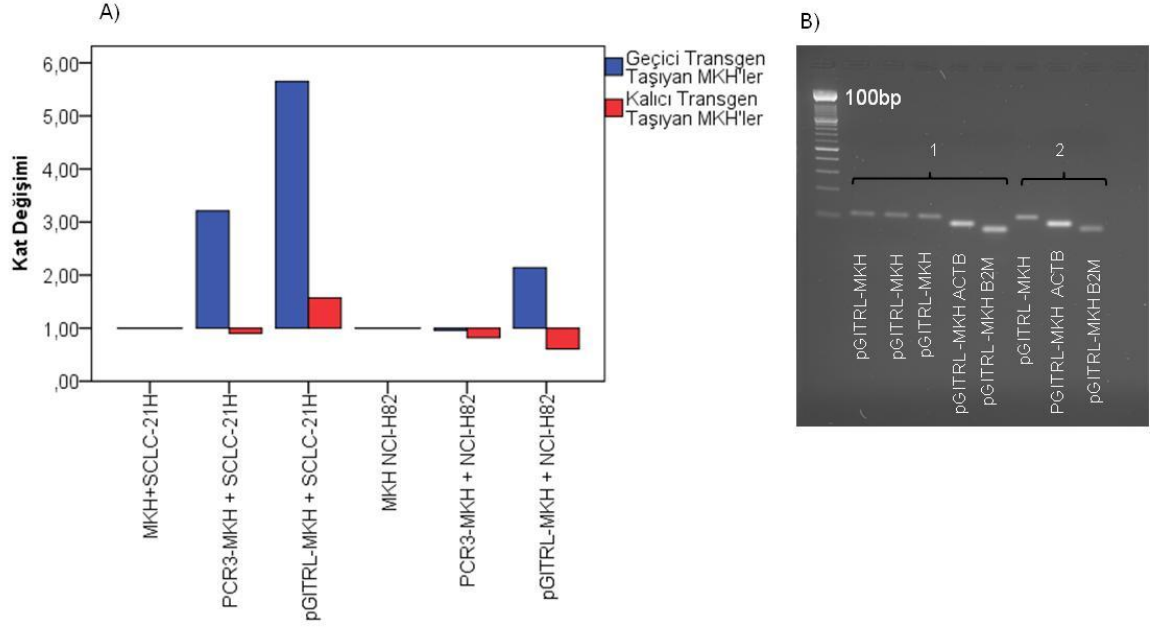


Şekil 4.27. TUNEL yöntemiyle mezenkimal kök hücrelerle ko-kültür sonucu kanser hücrelerindeki apoptotik indeks kat değişimi grafikleri ve mikrograflar. (A) Geçici transgen taşıyan MKH'ler ile kanser hücrelerinin ko-kültürü. (B) TUNEL boyaması sonucu ışık mikroskobu görüntüleri (geçici, x10). (C) Kalıcı transgen taşıyan MKH'ler ile kanser hücrelerinin ko-kültürü. (D) TUNEL işaretlemesine ait ışık mikrograflarda çekirdek hematoksilenle mor renktedir. Apoptotik hücreler kahverengi işaretlidir.(kalıcı, x10). * spontan apoptotik hücre indeksine göre anlamlı olarak artışa neden olan örnekleri göstermektedir ($p < 0,001$).

4.7.3. Ko-kültürlerdeki Kanser Hücrelerinde SIVA Ekspresyon Düzeyleri

pGITRL'i geçici taşıyan MKH'ler üzerinde ko-kültürü yapılan SCLC-21H hücrelerinde *SIVA1* ifadesinin boş MKH üzerindeki SCLC-21H'ye göre 5,65 kat daha fazla ifade edildiği saptandı. pCR3'ü geçici taşıyan MKH üzerindeki SCLC-21H hücrelerinde de *SIVA1* ifadesinin boş MKH üzerindeki göre daha az olmakla birlikte artış vardı (3,21 kat). Kat değişimi pGITRL'i geçici taşıyan MKH'ler üzerindeki NCI-H82 hücrelerinde de az olmakla birlikte saptandı (2,14 kat). Ancak pCR3'ü geçici taşıyan MKH'ler üzerindeki NCI-H82'in *SIVA1*

ifadesi boş MKH'ler üzerindeki göre farklı değildi. pCR3 ve pGITRL kalıcı taşıyan MKH'ler üzerindeki gerek SCLC-21H gerekse NCI-H82 hücrelerinin *SIVA1* ifadeleri de boş MKH'ler üzerindeki farklı değildi. (Şekil 4.28).



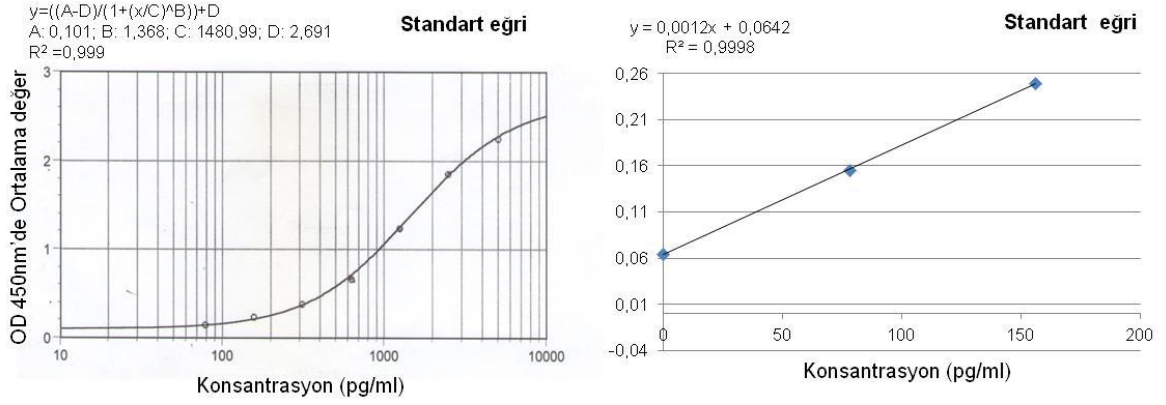
Şekil 4.28. Geçici ve kalıcı transfekte mezzenkimal kök hücreler üzerindeki kanser hücrelerinin *SIVA1* ifadesi kat değişimi grafiği ve jel görüntüsü izlenmektedir.

(A) *SIVA1* gen ifadesinin en fazla geçici transgen taşıyan MKH'ler üzerindeki SCLC-21H hücrelerinde olduğu saptanmıştır. (B) qPCR ile *SIVA1* Ct değeri 40 olanlar %2'lik agaroz jelde görüldüğü takdirde pozitif kabul edilmiştir. Örnek 1: üçlü tekrarda *SIVA1* Cp değeri 40; *ACTB*: 29,53; *B2M*: 33,12 Örnek 2: pGITRL-MKH'de *SIVA1* C_T değeri 36,9; *ACTB*: 25,76; *B2M*: 26,34'tür.

4.7.4. Ko-kültürlerdeki Kanser Hücrelerinde ELISA ile Siva Protein Düzeyleri

Kit içeriğinde bulunan ve apoptoz düzenleyici protein olan Siva'ya spesifik antikor ile kaplı olan plakaya standartlar ya da örneklerin eklenmesi sonucunda Siva proteinini içeren kuyularda enzimatik reaksiyon sonucu renk değişimi olmaktadır. Oluşan renk değişimi spektrofotometrik olarak 450nm dalga boyunda ölçüldü. Kit içeriğinde 5000 pg/ml olarak verilen standart yüksek standarttır. Bu standarttan seri dilüsyonlar (5000, 2500, 1250, 625, 312, 156, 78 ve 0 pg/ml) hazırlandı. Sıfır standart olarak dilüsyon yapılan ortam (kit içeriğinde bulunan örnek dilüsyon solüsyonu) kullanıldı (Şekil 4.29). Kontrol olarak boş kanser besiyerleri (DMEM-

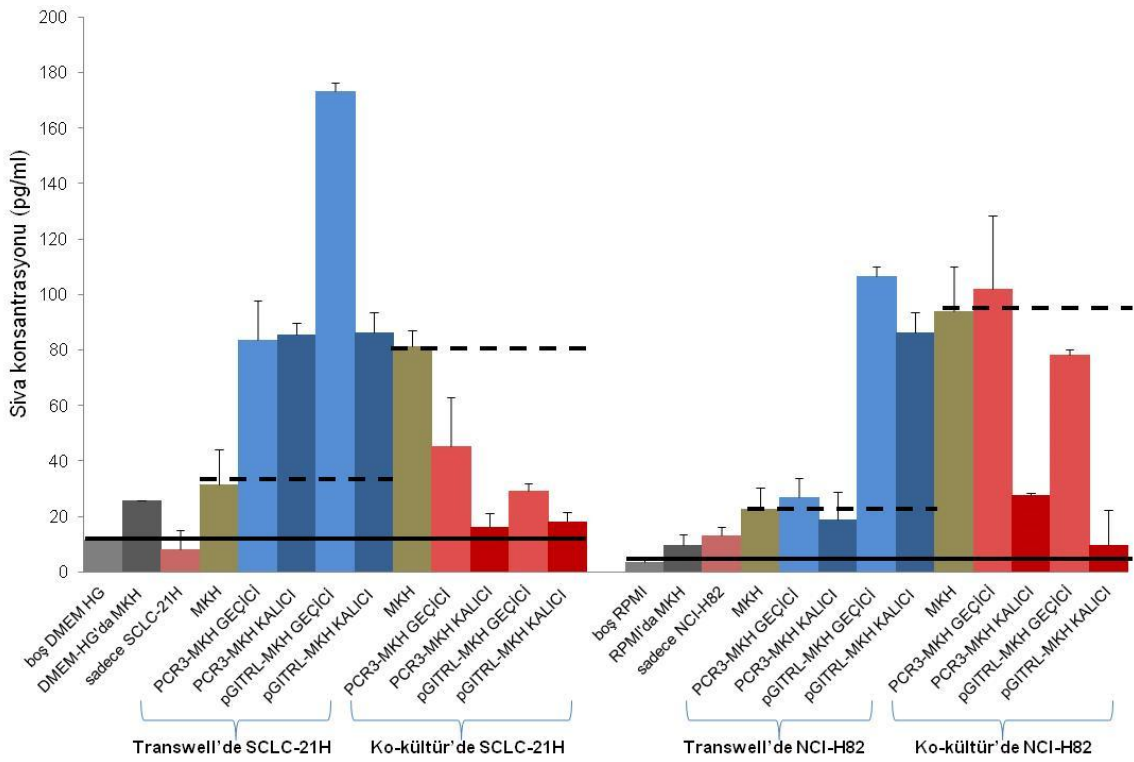
HG ve RPMI1640) ve MKH'lerin kanser besiyerindeki kültürlerinin süpernatantları kullanıldı. Cihaz 10 pg/ml-80 pg/ml arasındaki değerler arasını standart eğri üzerinden hesaplayamadı. Bu değerler arası Excell programında hesaplandı (Şekil 4.29'da ikinci grafik).



Şekil 4.29. ELISA'da Siva analizi için OD450nm'de ortalama abzorban değerleri hesaplanarak oluşturulan standart eğri grafiği verilmiştir.

ELISA çalışması için yapılan deneylerde hem direk ko-kültür sonucu hem de transwell ile yapılan ko-kültürlerinde kanser hücrelerinin süpernatantları analiz edildi. SCLC-21H ve NCI-H82 hücrelerinin boş kültür ortamları (sırasıyla DMEM-HG ve RPMI1640) ve bu kültür ortamlarında sadece MKH'lerin bulunduğu kültürlerin süpernatantları kontrol olarak kullanıldı. Arkaplan Siva protein ışınması ve kanser hücre kültür ortamındaki MKH'lerin Siva protein düzeyleri saptandı. DMEM-HG'de daha fazla olmak üzere hem DMEM-HG hem de RPMI'da büyütülen MKH'lerin Siva salgıladığı saptandı. Direk ko-kültürlerde boş MKH'ler üzerindeki SCLC-21H ve NCI-H82 Siva protein düzeylerinin transwelldekilere göre daha fazlaydı. Geçici transfektanlar ile transwellde yapılan ko-kültürlerde pGITRL taşıyan MKH hücreleri üzerindeki SCLC-21H hücrelerinin Siva protein düzeyinin, boş MKH ve pCR3 transfekte MKH'ler üzerindeki transwelldekilere göre daha fazla olduğu ancak pGITRL'i kalıcı taşıyan MKH'ler üzerindeki transwell ko-kültüründeki SCLC-21H'de azaldığı saptandı. Direk ko-kültürlerde ise boş MKH'ler üzerindeki SCLC-21H hücrelerinin Siva protein düzeyi, hem pCR3 ile hem de pGITRL ile geçici ve kalıcı transfekte MKH üzerindeki SCLC-21H'deki protein düzeyine göre daha fazla idi (Şekil 4.30).

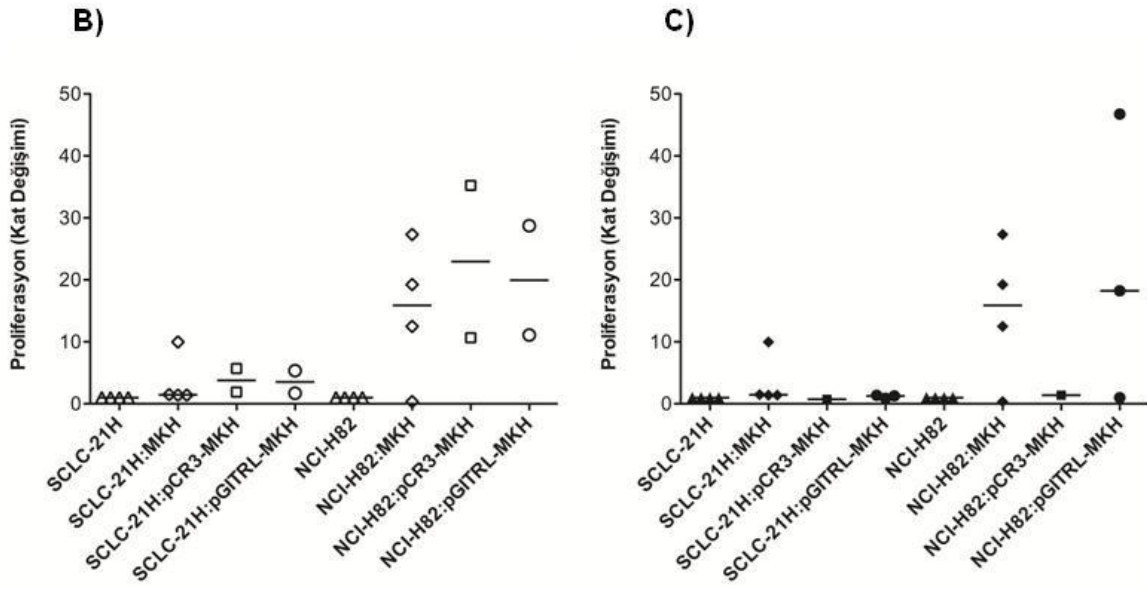
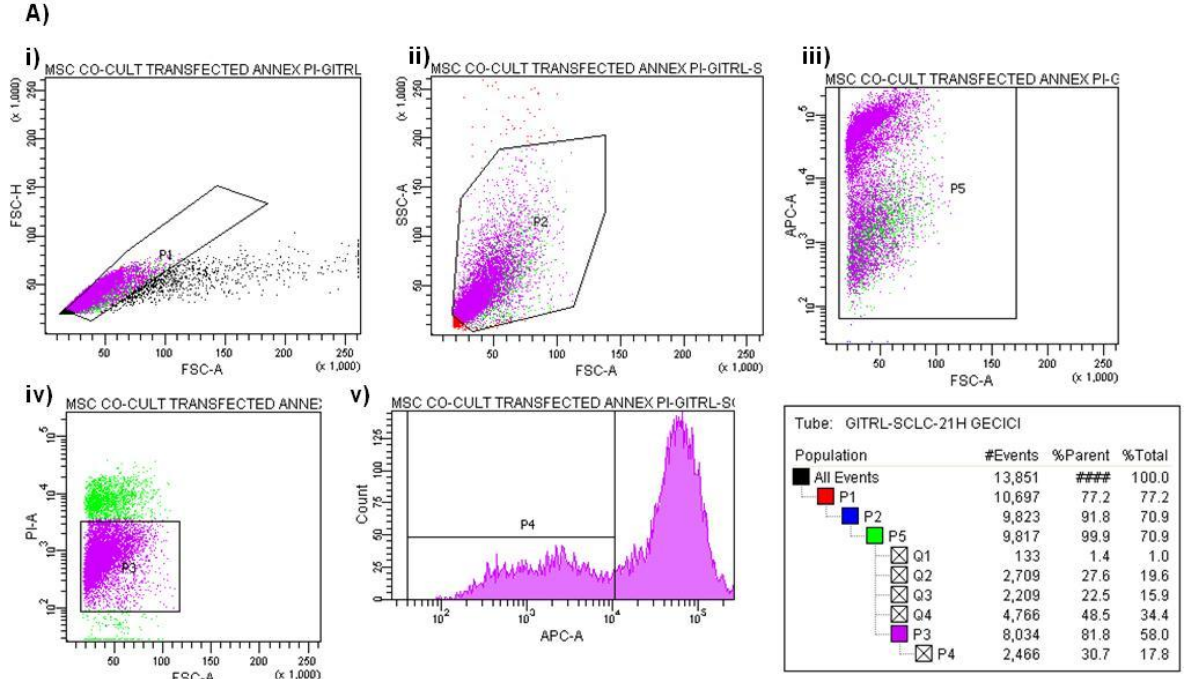
NCI-H82 hücrelerinin transwellde yapılan ko-kültürlerinde; geçicilerde daha fazla olmak üzere geçici ve kalıcı pGITRL taşıyan MKH'ler, pCR3 taşıyan MKH'ler ve boş MKH'lere göre daha fazla NCI-H82 Siva protein düzeyine yol açtı ancak bu düzey SCLC-21H'nin geçici pGITRL taşıyan MKH'ler üzerindeki transwell sonuçlarından düşük, kalıcılarından yüksekti. NCI-H82 hücrelerinin direk ko-kültüründe ise geçici pGITRL transfekte MKH'ler üzerinde, pGITRL'i kalıcı taşıyan MKH'lere göre daha fazla Siva salgılandığı saptandı ancak bu düzey direk ko-kültürde geçici pCR3 transfekte MKH'lerin üzerindeki NCI-H82 Siva protein düzeyinden daha düşüktü. Ayrıca direk ko-kültürde geçici ile kalıcı transfektan taşıyan MKH'lerin NCI-H82 üzerindeki Siva açısından etki farkı SCLC-21H üzerine olan etki farkından daha belirgin bulundu (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. ELISA yöntemiyle SCLC-21H ve NCI-H82 hücrelerinde Siva protein düzeyleri. Düz siyah çizgi arkaplan Siva protein ışımaya düzeyini, kesikli siyah çizgi boş MKH üzerinde kanser hücrelerinden salgılanan Siva protein düzeylerine işaret etmektedir. En yüksek Siva protein düzeyi transwellde geçici pGITRL taşıyan MKH'lerde saptanmıştır.

4.7.5. *GITRL* Transgenini Taşıyan MKH'lerin Kanser Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Etkisi

Ko-kültür çalışmalarında proliferen olan hücreler kırmızı CFSE ile akım sitometrisinde analiz edildi. Proliferasyonun saptanmasında tüm hücrelerden önce CFSE pozitif hücreler seçildi, daha sonra bu hücrelerden PI negatif yani nekroza gitmeyen hücreler seçilerek proliferasyon yüzdesi hesaplandı (Şekil 4.31 A). Spontan SCLC-21H proliferasyon kapasitesinin (%10,47±6,85) spontan NCI-H82 proliferasyon kapasitesinden (%3,37±3,35) daha fazla olduğu saptandı. SCLC-21H hücreleri boş MKH'ler ya da geçici/kalıcı transfektanlar (pCR3 ve pGITRL) ile ko-kültüre edildiğinde proliferasyonlarında bir değişim saptanmadı ($p>0,001$). NCI-H82 hücreleri ise boş MKH'ler ile ko-kültüre edildiğinde proliferasyonda 14,86 kat artış saptandı. Yine NCI-H82'nin geçici pGITRL transgen taşıyan hücreler ile ko-kültüründe 19,93 kat, kalıcı pGITRL transgen taşıyan hücreler ile ko-kültüründe ise 22 kat proliferasyonda artış saptandı (Şekil 4.31 C).

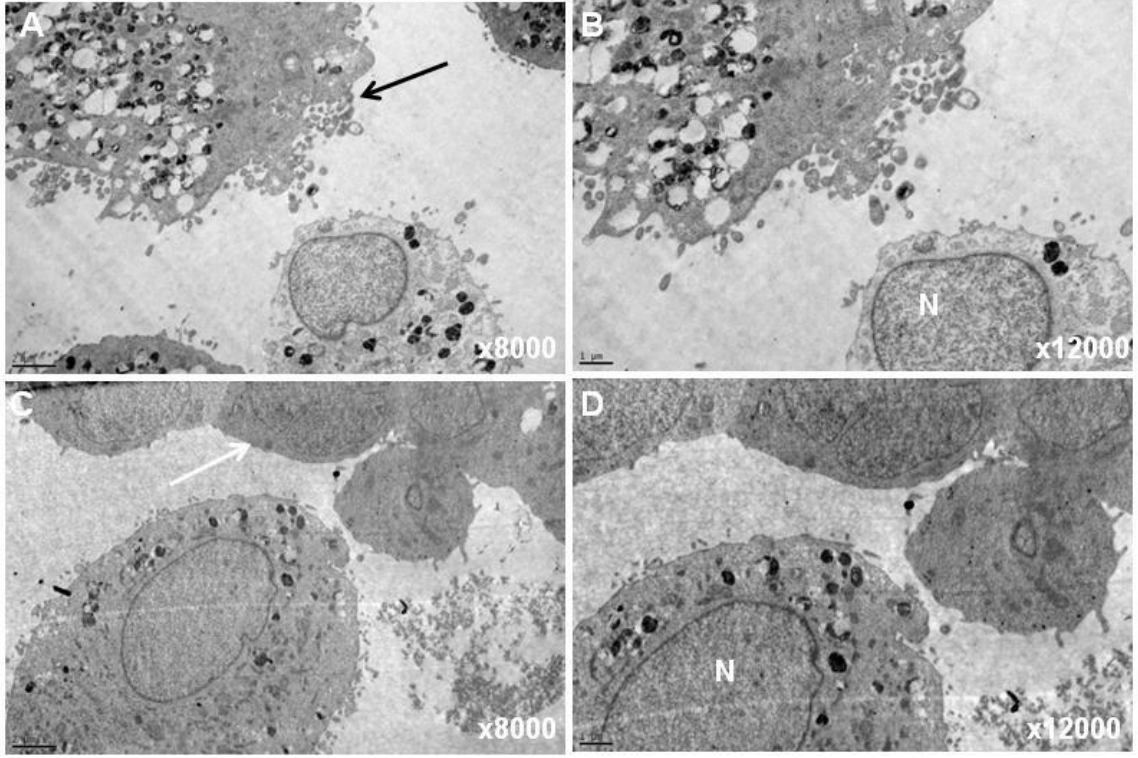


Şekil 4.31. Ko-kültür sonucu SCLC-21H ve NCI-H82 hücrelerinde saptanan hücre proliferasyonu akım sitometrisi yöntemiyle verilmiştir. A'da (i) kanser hücrelerinin yapışma özelliğinden dolayı tek tek düşmeyen (çiftler halinde süspansiyonda bulunan *doublet*) hücrelerin elimine edildiği P1 kapısı (ii) granülarite ve boyuta göre hücrelerin seçildiği P2 kapısı (iii) tüm CFSE pozitif hücrelerin seçildiği P5 kapısı (iv) PI negatif hücrelerin seçildiği P3 kapısı (v) CFSE pozitif hücreler. (B) Geçici transgen taşıyan MKH'ler üzerindeki kanser hücrelerinin kırmızı CFSE ile işaretlenmesi sonrası proliferasyon en çok pCR3-MKH ile ko-kültüre edilen NCI-

H82 hücrelerinde saptanmıştır. (C) Kalıcı transgen taşıyan MKH'ler üzerindeki kanser hücrelerinin kırmızı CFSE ile işaretlenmesi sonrası proliferasyon en çok pGITRL-MKH ile ko-kültüre edilen NCI-H82 hücrelerinde saptanmıştır.

4.7.6. Altın ile İşaretli pGITRL Taşıyan Mezenkimal Kök Hücrelerin Kanser Hücreleri ile Ko-kültürü

10 ve 30 nm büyüklüğündeki altın nanopartiküller, pGITRL transfekte MKH'ler ile işaretlendikten sonra kanser hücreleri ile ko-kültüre edilerek ince yapı düzeyinde her iki hücrenin birbiriyle ilişkisi araştırıldı. Hem 10 nm hem de 30 nm büyüklüğündeki altın NP'ler, MKH'lerin sitoplazmik kompartmanlarında dağılım gösterdi. Altın NP'ler ile işaretli MKH'ler iri görüntüleri, çentikli ökromatik çekirdekleri, dilate endoplazma retikulum sisternaları, artmış veziküler trafikleri ve belirgin sitoplazmik uzantıları ile kanser hücrelerinden kolaylıkla ayrıldı. KHAK hücreleri genellikle daha küçük ancak heterojen büyüklükte, yuvarlak ya da oval biçimli hücre grupları olarak karşımıza çıktı. MKH'lerin kanser hücreleriyle yakın temasta olduğu ancak genellikle fokal bağlantı oluşturmadığı izlendi (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Altın ile işaretli pGITRL ile transfekte mezenkimal kök hücrelerin SCLC-21H hücreleri ile ko-kültürüne ait elektronmikrograflar. A ve B'de 10 nm büyüklüğünde altın NP'ler, C ve D'de 30 nm büyüklüğünde altın NP'ler ile işaretli MKH'lerin sitoplazmik uzantılar yaptığı, genellikle yuvarlak şekilli SCLC-21H kanser hücreleriyle yakın temasta olduğu ancak fokal bağlantı oluşturmadığı izlendi. N: Çekirdek, siyah ok: MKH, beyaz ok: SCLC-21H hücrelerini göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Kanserden ölüm olgularının önlenmesi için Ulusal Kanser Enstitüsü'nün 2015 planlarına göre yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi gerekmektedir [1]. Son beş yıllık yaşam oranlarına bakıldığında, akciğer kanseri; %15, karaciğer kanseri; %7, glioblastoma; %5 ve pankreas kanseri; %4 şeklindedir [174]. Var olan tedavi seçenekleri hem ölümü önleyememekte hem de pek çok yan etkileri bulundurmaktadır. Bunlardan en önemlisi kemoterapi ajanlarının neden olduğu yan etkilerdir. Kemoterapi kaynaklı yan etkiler uzun dönemde farklı kanserlerin de gelişme riskini arttırabilir [174, 175]. Bu nedenle yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır [174]. Genetik malzemenin modifiye edilerek kullanıldığı gen tedavisi son yıllarda kanser için umut vaat etmektedir. Akciğer kanseri modellerinde kanser aşılı geliştirilmekte [176], kanser hücrelerinin öldürülmesinde virüsler hedeflenmekte, tümörün kan ihtiyacının azaltılması sağlanmakta ve kanser hücrelerine hücre ölümü sağlayan genlerin aktarılması ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır [174, 177-179]

Tez çalışması kapsamında kanser mikroçevresinde etkileri olduğu bilinen GITR ve ligandı; GITRL'in etkileşiminin KHAK üzerindeki direk etkisini araştırdık. Bu nedenle GITRL ile transfekte edilen MKH'ler KHAK hücreleri ile ko-kültüre edilerek apoptotik ve proliferatif etkileri incelendi. GITRL ile transfekte edilen MKH'ler altın nanopartiküller ile de işaretlenerek ko-kültür ortamında görüntülenmeleri sağlandı. Çalışmamızda ilk olarak dokuz farklı donörde, daha sonra da ticari olarak satın alınan başka bir donör MKH'sinde GITR/GITRL protein ve mRNA düzeyleri araştırıldı. Hem protein hem de mRNA düzeyinde ifade saptanmadı. Daha sonra bu MKH'lere, GITRL transgenini taşımak üzere CMV promotoru altında *GITRL* klonlanmış olan ve neomisin dirençlilik geni taşıyan pCR3-GITRL plazmidi aktarıldı. pCR3-GITRL aktarımının gerçekleştirilmesinde öncelikle etkinliğin düşük olduğu fakat daha az toksik ve immünojen olduğu belirtilen [180] lipozom sistemleri kullanıldı. Optimizasyon çalışmaları sonucunda, literatür ile benzer olarak, MKH'lere plazmid transfer etkinliğinde en fazla %4,7 'e ulaşılabildi [181, 182]. Bu nedenle aktarım etkinliği daha yüksek olan elektroporasyon sistemine geçildi ve Neon marka elektroporator ile optimizasyon çalışmaları sonucu en yüksek transfeksiyon etkinliği (%47,5) 1500 V, 20 ms 1 *pulse* koşullarında ve 2,5 µg plazmid DNA'sı kullanılarak elde edildi. Transfeksiyon sonrası plazmidi geçici

olarak taşıyan MKH'ler arasından rekombinasyon sonucu MKH genomuna entegre olmuş kalıcı transfektanları seçebilmek için 400µg/ml G418 (neomisin) ortamında seleksiyon yapıldı.

Transgeni hem geçici hem kalıcı taşıyan MKH'lerin akım sitometrisi ile yapılan immunofenotipik karakterizasyon çalışmaları sonucunda, geçici transfektanların karakterizasyonunda bir değişiklik olmadığı saptandı. Kalıcı transfektanlarda ise CD29, CD44 ve CD105'te düşüş saptandı. Bu bulgular, MKH'lere elektroporasyon sonrası stromal belirteçlerin düşmediğini gösteren çalışmalardan farklılık göstermektedir [181, 183]. Sprangers ve arkadaşları [183] elektroporasyon sonrası CD73 protein ve RNA ifadesinin değişmediğini göstermiştir. Aluigi ve arkadaşları [181] elektroporasyon sonrası üçüncü günde CD29 ve CD105 protein ifadesini aynı bulmuştur. CD29 ve CD44, MKH'lerin proliferasyon, farklanma ve göç kabiliyetleri ile bağlantılı olduğu düşünülen stromal belirteçlerdir [184, 185]. pGITRL'in MKH'lerin motilitesi üzerine etkisini incelemek için kültürdeki hücrelerin lateral kayma hareketinin ölçüldüğü çalışmada geçici transgen taşıyan MKH'lerde 7. saatte motilite hızının arttığı ve aradaki boşluğun 24 saat sonunda kapandığı saptanmıştır; fakat kalıcı transgen taşıyan hücrelerde boşluk 52. saatte dahi kapanmamıştı. Bu bulgular bize CD29 ve CD44 gibi belirteç düzeylerinin düşmesinin özellikle kalıcı transgen taşıyan MKH'lerin motilite hızı ile bağlantılı olabileceğini göstermektedir. MKH'ler üzerindeki CD105 ise TGF-beta yolağını uyararak kondrojenik farklanmayı sağlar [186]. Çalışmamızda transfekte olan ya da boş MKH'lerin kondrojenik farklanması incelenmemiştir. Bu nedenle transfekte hücrelerdeki bu düşüşün kondrojenik farklanma ile ilişkisi gelecek çalışmalarda araştırılmalıdır.

Transfekte edilen MKH'lerin farklanma potansiyelleri histokimyasal boyama ile morfolojik olarak incelendiğinde kontrollere göre hem adipojenik hem de osteojenik farklanma oranının azaldığı saptandı. Bu bulgular da MKH'lerin transfeksiyon sonrası farklanma potansiyellerinin korunduğunun rapor edildiği Aluigi ve Sprangers'ın çalışmalarına göre farklılık göstermektedir [181, 183]. Bu çalışmalarda osteojenik ve adipojenik farklanmanın korunduğu gösterilmiştir. Adipojenik indüksiyonun 21. gününde yapılan qPCR analizi sonucunda *PPARgamma*'nın pGITRL taşıyan MKH'lerde daha belirgin olmak üzere tüm kalıcı transfektanlarda boş MKH'lere göre düştüğü saptandı. Buna göre transfekte edilen MKH'lerde transgenden *PPARgamma* gen ifadesi etkilenmektedir. *SCD* ifadesinin

boş plazmidi taşıyan MKH'lerde boş MKH'lere göre dramatik bir artış göstermiş ve GITRL'i taşıyan plazmidlerde ise biraz düşüş dışında fazla değişim olmamıştır. Osteojenik indüksiyonun 21. gününde özellikle pGITRL transgenini taşıyan MKH'lerde *ALPL* ifadesi artarken, *CFBA1* ifadesinin düştüğü saptandı. Sonuç olarak morfolojik ve gen ifadesi düzeyinde MKH'lerin adipojenik ve osteojenik potansiyelleri transfeksiyonla ve özellikle pGITRL transgenini taşımasıyla bozuldu. Gerek immunofenotip gerekse farklılaşma potansiyelinde saptadığımız bu değişiklikler deneylerde kullanılan plazmid ve transgen kaynaklı olabilir. Elektron mikroskopu incelemelerinde ise MKH'lerde endozomal keseler ve vezikül trafiğine ait organellerin ileri derecede gelişmiş olduğu saptandı. Transfeksiyon yapılan hücrelerde ileri derecede dilate endoplazma retikulumu sisternaları boş MKH'lere göre daha belirgindi. Bu hücrelerdeki aktif protein trafiğinin göstergesi olabilir. Raimondo ve diğerleri yaptıkları çalışmada yeşil florasan protein (GFP) ile transfekte edilmiş sıçan MKH'lerinde çalışmamız ile benzer olarak dilate endoplazma retikulum sisternaları saptanmış ve bunun artmış vakuol sayısı ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir [187].

Transfeksiyon yapılan MKH'lerin GITRL düzeylerini saptamak için yapılan akım sitometrisi ve qPCR sonucu pGITRL ile geçici olarak transfekte edilen hücrelerin protein düzeyi %47,5 olarak belirlendi fakat kalıcı olarak transfekte edilen hücrelerde GITRL proteini saptanamadı. Kalıcı transfektanlarda ise *GITRL* ifadesi mRNA düzeyinde qPCR ile saptanabildi. Akım sitometrisi ile kalıcı transfektanlarda GITRL saptanamaması pGITRL'in genoma entegrasyonu ile GITRL'in protein düzeyinde baskılandığına işaret etmektedir. Ancak qPCR sonuçları bu baskılanmanın mRNA düzeyinde olmadığını göstermektedir. GITRL yüzey ekspresyonu regüle edilebilir ya da mutasyona neden olan faktörler tarafından engellenmiş olabilir [188]. Yapılan bir çalışmada diğer bir TNF ailesi üyesi CD137'nin de GITRL gibi protein düzeyi düşük bulunmuştur. Araştırmacılar bu düşüklüğün, hücre-hücre etkileşimi ile tetiklenen kostimulatuvar yanıtları engelleyebileceğini belirtmiştir [189].

Çalışmalarımızda kullandığımız iki farklı KHAK hücre hattı SCLC-21H'in GTR ekspresyonu ettiğini, NCI-H82'nin ise GTR ekspresyonu etmediği bilinmektedir [7]. Biz de akım sitometrisi ile GTR ve GITRL protein düzeyleri incelediğimizde SCLC-21H hücrelerinde GTR ifadesini %24,3 oranında, NCI-H82 hücrelerinde ise çok düşük düzeyde (%6,4) saptadık. GITRL protein düzeyi ise her iki kanser hücre hattında

da çok az miktarda idi (%4,7 ve %3,9). Bu sonuç protein atlas verileri ile uyumluydu [7].

İlerleyen basamakta *solubl* GITRL'in kanser hücreleri üzerindeki etkisini araştırmak için kanser hücre hatları rekombinant GITRL (rGITRL) proteini ile kültüre edildi. Sonuç olarak, rGITRL'in kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin proteinin dozuna, proteine maruz kalınan zamana ve hücre yüküne göre değiştiği saptandı. SCLC-21H'de düşük hücre yoğunluğunda aynı doz (10ng/ml) rGITRL 48 saatte inhibisyona yol açarken, 72 saatte proliferasyona yol açabilmektedir. Yüksek hücre yoğunluğunda ise bu doz 48 saatte proliferasyona yol açmaktadır. Yüksek dozlardaki inhibisyon etkisinin özellikle GTR ifade etmeyen NCI-H82'de daha istikrarlı çizgi izlemesi inhibisyonun hücre-hücre kontakt inhibisyonundan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Kontakt inhibisyon riskine rağmen 10ng/ml'lik rekombinant GITRL dozununun hem GTR eksprese eden (SCLC-21H) hem GTR eksprese etmeyen (NCI-H82) hücrelerde 48 inkübasyonda inhibisyona yol açması dikkate değerdir. Uzun süreli inkübasyonda inhibisyon etkisi (özellikle kısa süreli inkübasyonlarda proliferasyon görülen dozlarda) zamanla artan hücre yoğunluğuna bağlı kontakt inhibisyondan etkileniyor olabilir. Yüksek hücre yoğunluğuna (20000 hücre) ve uzun inkübasyon süresine (72 saat) rağmen rGITRL'in SCLC-21H'i 1000ng/ml dozunda proliferere ederken, 1ng/ml dozda inhibe etmektedir. NCI-H82 yüksek yoğunlukta ve 72 saatte rGITRL'in doza bağlı etkisi SCLC-21H'nin üzerindeki etkisinin tam tersidir: düşük dozlarda proliferasyon yüksek dozda (1000ng/ml) inhibisyondur.

Amin ile modifiye edilmiş ve PEG ile kaplı altın NP'ler, MKH'ler ile işaretlendiğinde ince yapı düzeyinde, partiküllerin endozomal ve lizozomal veziküllerde toplandığı saptandı. Çalışmamız ile benzer olarak başka çalışmalarda da PEG ile kaplı altın NP'lerin de endozom ve lizozomlarda biriktiği gözlenmiştir [152, 190, 191]. Fakat başka bir çalışmada 3,7 nm'lik altın NP'ler Hela hücrelerinde çekirdekte birikmiştir [192].

Altın ile işaretli NP'lerin MKH'lerin proliferasyonları üzerine etkisi araştırıldığında, 10 nm boyutundaki NP'lerde 2,5 µl/ml'lik dozda, 30 nm'lik partiküllerde 5 µl/ml'lik dozda maksimum proliferatif etki gözlemlendi. Hücre proliferasyonunun 10 nm boyutundaki NP'lerde 20 µl/ml'lik dozda, 30 nm'lik partiküllerde 15 ve 20 µl/ml'lik dozlarda azalması, yüksek dozlarda partiküllerin negatif etki gösterebileceğini düşündürdü. Yapılan çalışmalarda altın NP'ler ile işaretli hücrelerin toksik

etkilerinin hücre boyutuna göre değişebildiği gösterilmiştir. Örneğin 1-2 nm büyüklüğündeki altın NP'lerin 15 nm büyüklüğündekilere göre daha toksik olduğu belirtilmiştir [193]. PEG ile kaplı ve farklı büyüklüklerde altın NP'lerin toksisitesinin araştırıldığı diğer bir çalışmada 10 ve 60 nm büyüklüğündeki partiküller, 5 ve 30 nm büyüklüğündeki partiküllerden daha toksik bulunmuştur [194]. Bu sebeple araştırmacılar daha küçük partiküller daha toksiktir sonucuna varamamıştır. Altın ile işaretli ve pGITRL ile transfekte hücrelerin çoğalma davranışları incelendiğinde ise 2,5 µl/ml'lik dozda proliferatif etki gözlemlendi ve bu doz arttıkça proliferasyon sabit kaldı. Bu da bize pGITRL taşıyan MKH'lerin altın NP'ler ile işaretlendiğinde boş MKH'lere göre farklı dozlarda kullanılmaları gerektiğini göstermiştir.

GITRL transgeni taşıyan MKH ve boş MKH'lerin SCLC-21H ve NCI-H82 kanser hücre hatlarına etkisini incelemek için akım sitometrisi ile yapılan ilk ko-kültür çalışmalarında SCLC-21H'nin spontan apoptotik ölüm yüzdesinin farklı günlerde yapılan deneylerde oldukça değişken ve NCI-H82'den daha yüksek olduğunu ortaya koydu. pGITRL'i geçici taşıyan MKH'lerin her iki hücre kanser hattı üzerindeki apoptotik etkisi de yüksek değildi. NCI-H82 üzerinde en yüksek apoptotik etkiyi ilginç olarak pCR3'ü geçici taşıyan MKH'ler gösterdi. Kalıcı ve geçici pGITRL'i taşıyan MKH'ler karşılaştırıldığında her iki kanser hücre hattı için de apoptotik hücre ölüm etkisi kalıcılarda geçici pGITRL taşıyan MKH'lere göre azalmıştır. Bunun sebebi pGITRL taşıyan hücrelerin gen ifadelerinin kalıcı transfektanlarda baskılanması olabilir. Buna karşın ko-kültürlerde kanser hücrelerinin apoptozu TUNEL yöntemi ile analiz edildiğinde de elde edilen sonuçların Annexin-PI sonuçlarından farklı olduğu saptanmıştır. TUNEL'de MKH'ler üzerindeki SCLC-21H hücre ölümünün spontan SCLC-21H hücre ölümüne göre daha düşük olması MKH'lerin SCLC-21H'nin ölümüne neden olmak yerine canlılığını artırdığına işaret etmektedir. Farklı günlerde yapılan deney kurgularında kanser hücrelerinin spontan ölümlerinin fazla varyasyon göstermesi karşılaştırmayı zorlaştırmaktadır. TUNEL testi ile *GITRL* transgenini taşıyan MKH'ler üzerindeki hücre apoptotik ölümü değerlendirildiğinde ise kalıcı transgen taşıyan hücrelerin ko-kültüründe daha fazla olmak üzere ölümün arttığı saptandı. Bunun sebebi kalıcı olarak *GITRL* transgeni taşıyan hücrelerin daha homojen bir hücre popülasyonu olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu sonuç, geçici transfektanların SCLC-21H'yi kalıcılardan daha fazla öldürdüğünü gösteren ve *GITRL* ifadesinin kalıcılarda baskılanması ile örtüşen Annexin-PI boyaması ile

apoptotik kanser hücre ölümünün gösterildiği sonuçların tam tersidir. Ancak TUNEL değerlendirmesi tek bir deneyde 10 farklı saha sayılarak yapılmış olup Annexin-PI gibi birbirinden farklı günlerde tekrarlayan deneylerin varyasyonunu taşımamaktadır. MKH'ler üzerindeki NCI-H82 hücre ölümü spontan hücre ölümü ile karşılaştırıldığında ise MKH'lerin NCI-H82 kanser hücre canlılığına önemli bir etkisi olmamaktadır. Boş MKH'nin SCLC-21H hücrelerinin canlılığı lehinde özellik göstermesi ve NCI-H82'a etki etmemesi bu hücrelerin 'turn-over'ı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ramasamy ve diğ. MKH'lerin *in vitro* olarak tümör hücrelerini G1 fazında tuttuğunu ve bunun da apoptotik ölümü azalttığını göstermiştir [195]. Geçici veya kalıcı pGITRL taşıyan MKH'ler üzerinde SCLC-21H'lerin ölümünün fazla olması ise pGITRL'in GTR etkileşimi ile GTR pozitif küçük hücreli akciğer kanser hücrelerini doğrudan ölüme yönlendirdiği hipotezimizi doğrulamıştır. NCI-H82 hücrelerinde boş MKH'ler ile ko-kültüre edilen hücrelerde boş plazmid taşıyan MKH ile ko-kültüre edilen hücrelerden daha fazla ölüm görülmesinin sebebi boş MKH'lerin bozulmamış immunofenotipik özelliklerine bağlı olabilir. Bunun yanısıra NCI-H82 hücrelerinin yaşamını kalıcı pGITRL taşıyan MKH'ler dışındaki diğer transfektanların (geçici pGITRL, geçici/kalıcı pCR3) destekliyor olması, yine MKH'nin değişen immunofenotipik özelliklerine bağlı olabilir.

Çalışmamızda apoptozis sürecinde birçok hücrede eksprese olduğu bilinen *SIVA1* [196] ifadesi mRNA düzeyinde incelendi. GTR'nün yapısında ölüm motifi bulunmamaktadır. Ancak GTR ligandına bağlandığında hücrede *SIVA* üzerinden apoptotik ölüm sürecine yol açabilmektedir [197]. Ayrıca Siva proteininin tümör metastazını baskılama etkisi de vardır [198]. Çalışmamızda ilk kez, *GITRL* transgenini taşıyan MKH'ler üzerindeki SCLC-21H hücrelerinde *SIVA1*'in, pCR3 taşıyan MKH'ler ve boş MKH'lere üzerindeki kanser hücrelerine göre daha fazla ifade edildiği gösterildi. Bu ifade özellikle geçici *GITRL* transgenini taşıyan MKH'ler ile ko-kültüre edilen SCLC-21H hücrelerinde, kalıcı *GITRL* transgenini taşıyan hücrelere göre artmaktadır. Kalıcı transgen taşıyan MKH'ler ile ko-kültürdeki SCLC-21H *SIVA1* ifadesinin düşük olması, apoptotik uyarımı Siva üzerinden yapan GITRL'in, transgeni kalıcı taşıyan MKH'lerde baskılanması nedeniyle beklenen bir durumdur ve bu akım sitometrisindeki Annexin/PI apoptotik değerlendirmeleri ile uyumludur.

Ko-kültürlerde kanser hücrelerinin salgıladığı Siva protein düzeylerinin saptandığı ELISA çalışmalarında arka planda MKH hücrelerinden salgılanabilecek Siva ifadesi olabileceğinden kanser hücre hattı ortamında büyütülen MKH'lerin süpernatantlarında da Siva düzeyleri belirlendi. Buna göre; kanser hücrelerinin DMEM-HG'da daha fazla olmak üzere hem DMEM-HG hem de RPMI'da büyütülen MKH'lerin Siva salgıladığı saptandı. Boş MKH'ler ile doğrudan ko-kültürlerde gerek SCLC21-H gerek NCI-H82 Siva düzeylerinin yüksek olması ama transwell ko-kültürlerinde yüksek olmaması MKH'lerin kanser hücreleri ile doğrudan etkileşiminde Siva yolağının tetiklendiğini ortaya koymaktadır ancak kalıcı transfeksiyon bilinmeyen nedenlerle MKH'lerin bu etkisini bozmaktadır ve bu bozulma GITRL'den bağımsızdır. Çünkü hem pCR3'ü hem kalıcı *GITRL* transgenini taşıyan plazmidin kalıcı olduğu MKH'ler üzerindeki kanser hücre Siva ifadeleri benzer düzeyde düşüktür. Hem pCR3 hem de *GITRL* transgeni geçici taşıyan MKH'ler ile yapılan SCLC-21H ko-kültürleri boş MKH'ler ile yapılan ko-kültürlere göre karşılaştırıldığında; özellikle plazmidleri geçici taşıyan MKH'ler için Siva protein düzeyleri ve qPCR *SIVA1* düzeyleri uyumlu değildir (Siva mRNA düzeyi artarken, protein düzeyi azalmaktadır). Doğrudan ko-kültürde SCLC-21H'de Siva protein düzeylerinin düşük olması ve apoptotik ölüm testlerinde (özellikle geçici transfektanlar ile yapılanlarda) ölümün yüksek olması birlikte değerlendirildiğinde; hücre hücre kontağı sonucu başka apoptotik yolların da aktive olduğunu düşündürmektedir. Kalıcı transfektanlarda *GITRL* protein düzeylerinin saptanamaması da göz önünde bulundurulduğunda kalıcı plazmid taşıyan MKH'ler üzerindeki SCLC-21H'deki Siva protein düzeyini sağlayan *GITRL* dışı faktörlerin olduğuna işaret ediyor olabilir. *GITR* negatif NCI-H82 direk ko-kültür sonuçları da Siva protein salgılanmasına *GITRL* dışında başka faktörlerin de yol açtığını düşüncemizi desteklemektedir. *GITRL* transgeni geçici taşıyan MKH ko-kültürlerinde NCI-H82 Siva protein düzeyi boş MKH ko-kültürdekilerine göre düşmekte ancak bu sonucun artmış apoptotik hücre ölümü ile uyumlu olmaması *GITR* eksprese etmeyen hücrenin Siva dışı apoptotik yolları ile ölümüne işaret etmektedir. Ayrıca NCI-H82 Siva proteini saptanırken qPCR ile *SIVA1* saptanmaması posttranslasyonel baskılanmayı da düşündürmektedir. NCI-H82 hücrelerinin boş MKH'ler ile direk ko-kültüründe NCI-H82'de mRNA düzeyinde *SIVA1* ifadesi görülmezken, süpernatanda protein saptanmış olması proteinin NCI-H82 tarafından değil de MKH tarafından salgılanmış olabileceğini

düşündürmektedir. Boş MKH'lerle karşılaştırma yapıldığında ise kalıcı olarak hem pCR3 hem de *GITRL* transgeni taşıyan MKH'ler ile ko-kültürlerde NCI-H82 Siva mRNA ve protein düzeyi artmaktadır. Fakat bu artış protein düzeyinde daha fazla olması yine arka planda MKH tarafından salgılanan Siva proteinin olabileceğini düşündürmektedir. Geçici olarak pCR3 taşıyan MKH ko-kültürlerinde, boş MKH ko-kültürlerine göre Siva mRNA ve protein düzeyinde belirgin bir farklılık görülmemiştir. Transwell ile yapılan ko-kültürde boş MKH'ler ve boş plazmid taşıyan MKH'ler ile NCI-H82 hücre ko-kültüre edildiğinde düşük miktarda Siva proteini saptanırken, *GITRL* transgeni geçici taşıyan MKH ko-kültüründe Siva protein düzeyleri artmıştır. Ancak GTR ekspres etmeyen NCI-H82 hücrelerinin aslında negatif olmadığı, düşük düzeyde de olsa (%6,4) GTR ifade ettiği hatırlandığında bu sonuç sürpriz değildir.

Ko-kültür deneylerinde kanser hücrelerinin proliferasyon kapasitesi CFSE ile işaretli kanser hücrelerinde proliferasyon sonucu boyanın azalmasının (akım sitometrisi histogramlarında sola kayma) analizi ile incelenmiştir ve tek başına (spontan) SCLC-21H proliferasyon kapasitesinin, spontan NCI-H82 proliferasyon kapasitesinden daha fazla olduğu saptanmıştır. SCLC-21H hücrelerinin Annexin-PI analizleri ile spontan apoptotik ölüm yüzdesi de NCI-H82 hücrelerinin apoptotik ölüm yüzdesinden daha fazladır. SCLC-21H, NCI-H82 hücrelerine göre daha hızlı çoğalıp daha hızlı ölmekte, yani daha hızlı '*turn-over*'a sahiptir. pGITRL'i veya boş vektörü taşıyan MKH'lerin her iki kanser hücre hattının proliferasyonu üzerine etkisi önemli bir farklılık göstermemiştir ancak SCLC-21H hücrelerindeki proliferasyon etkisi NCI-H82 hücrelerine göre daha düşüktür. Boş MKH üzerindeki SCLC-21H hücrelerinin, geçici transgen taşıyan MKH üzerindeki SCLC-21H hücrelerine göre proliferasyonu daha fazla olduğu görülmektedir. Bu sonuç boş MKH üzerindeki SCLC-21H apoptotik ölümünün geçici transgen taşıyan MKH üzerindeki göre daha düşük olduğu TUNEL sonucu ile uyum göstermektedir. Yani boş MKH kanser hücre proliferasyonunu ve yaşamını daha çok desteklemektedir. Ayrıca, gerek SCLC-21H hücrelerinin gerekse NCI-H82 spontan proliferasyon kapasitelerinin de ko-kültürlere (doğrudan) göre daha düşük olduğu saptandı. Plazmidleri kalıcı taşıyan MKH'ler üzerinde kanser hücre proliferasyonu geçicilere göre daha düşüktü ve boş MKH'lerden pek farklı değildi. İlginç olarak pGITRL'i taşıyan değil de pCR3'ü kalıcı taşıyan MKH'lerin SCLC-21H'nin proliferasyonunu düşürdüğü saptandı. Ancak bu sonuç, kalıcı olarak pCR3'ü

taşıyan MKH'lerdeki apoptotik hücre ölümün spontan ölümden daha düşük olduğu proliferasyon desteğini işaret eden TUNEL analizi ile uyumlu değildir. pGITRL'i kalıcı taşıyan MKH'lerin her iki hücre hattı ile ko-kültürü sonucu spontan ölüm ve çoğalma kapasiteleri birlikte değerlendirildiğinde ise sonuçlar uyumludur, proliferasyon artarken apoptotik hücre ölümü azalmaktadır. MKH'lerin çeşitli kanser hücrelerine apoptotik ya da proliferatif etki gösterebildiğine dair yapılan literatürdeki çalışmalar MKH miktarı, pasajı ve kökeninin etkinin niteliğini değiştirdiğini ve MKH uygulamalarının iki ucu keskin olabileceğini ortaya koymaktadır [195, 199, 200]. Bizim bu çalışmamızdaki tekrarlayan deneylerdeki varyasyonlar da MKH'in bu özelliğini açıkça göstermektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin işaretlenmesi amacıyla iki farklı nanopartikül kullandığımız çalışmamızda, ko-kültür deneylerinde altın NP'ler kullanıldı. Her ne kadar Rodamin B ile işaretli demir nanopartiküller avantajlı olarak görünse de, toksisite açısından demir NP'lerin dezavantajlı olduğu bilinmektedir [128]. Altın NP'ler için ise toksisitenin minimum olduğu doz seçilerek işaretleme yapılabilir [167]. Yapılan çalışmalarda kanser hücrelerini hedefleyen çeşitli moleküller ile fonksiyonelize edilerek kanser hücrelerinin öldürülmesi ve görüntülemesinde altın NP'lerin önemi vurgulanmıştır [166]. Demir NP'ler ise manyetik özelliklerinin onlara getirdiği avantajla altın nanokabuklar ile kaplanarak tümör hücrelerinin hedeflenmesinde kullanılabilir [128].

Sonuç olarak çalışmamızda; pGITRL transgenini taşıyan MKH'ler GTR eksprese eden küçük hücreli akciğer kanser hücreleriyle ko-kültüre edildiğinde tümör hücrelerinin canlılık, proliferasyon ve apoptoz davranışlarını etkilediği ortaya konmuştur. pGITRL transgenini taşıyan MKH'ler altın nanopartiküller ile işaretlenerek tümör dokusunda izlenebilir.

6. SONUÇLAR

Tez çalışması kapsamında aşağıda sıralanan sonuçlara varıldı;

1. Arşivden elde edilen insan MKH'lerinde qPCR ve akım sitometrisi yöntemi ile GATR ve GATRL protein ve mRNA ifadelerinin çok düşük ya da hiç olmadığı saptandı.
2. Ticari olarak alınan MKH'lerde GATR ve GATRL ifadeleri donör örnekleri ile benzer olarak protein ve mRNA düzeyinde saptanmadı. KHAK'den SCLC-21H hücrelerinin hem protein hem mRNA düzeyinde GATR ifade ettiği görüldü. GATRL ifadesinin ise MKH'ler, SCLC-21H ve NCI-H82 hücrelerinde düşük düzeyde ifade olduğu saptandı.
3. Mezenkimal kök hücrelere GATRL geni transfekte edildiğinde elektroporasyonun (47,5%) lipozomal sistemlere (4,7%) göre daha etkili olduğu bulundu. Optimum transfeksiyon etkinliği 2,5µg/ml plazmid DNA kullanıldığında ve 1500V, 20ms ve 1p koşulunda gerçekleşti.
4. Transfeksiyon sonrası GATRL etkinliği akım sitometrisi ile geçici transfektanlarda saptanırken, kalıcı transfektanlarda etkinlik qPCR ile saptanabildi.
5. Transfekte hücrelerin immünofenotipik karakterizasyonu yapıldığında geçici transfektanların boş MKH'lerde olduğu gibi stromal belirteçleri ifade ettiği, hematopoietik belirteçleri ifade etmediği saptandı. Kalıcı transfektanlarda ise bazı stromal belirteçlerde (CD29, CD44, CD105) düşüş saptandı. Transfekte hücrelerde adipojenik ve osteojenik farklanma görülmedi. Sadece kalıcı pGATRL-MKH'lerde adipojenik farklanma saptandı. Geçici ve kalıcı transfekte hücrelerde adipojenik (*PPAR γ* ifadesi düştü, *SCD* gen ifadesi arttı) ve osteojenik farklanma belirteçlerinin (*CBFA1* ifadesi geçici pGATRL taşıyan MKH'ler haricinde düştü, *ALPL* ifadesi gen ifadesi arttı) ifadeleri değişti.
6. Geçici transfekte edilen MKH'lerin boş MKH'lere göre motilite indeksi 24. saatte yüksekken, kalıcı transfekte hücrelerde 52. saatte dahi düşüktü.
7. Transfekte edilen MKH'lerin elektron mikroskobu görüntüleri boş MKH'ler ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak benzer görünümde oldukları gözlemlendi.

8. Kanser hücre hatlarının rekombinant GITRL proteini ile kültürü sonucu kanser hücrelerindeki etkinin protein dozuna, proteine maruz kalınan zamana ve hücre yoğunluğuna göre değiştiği saptandı.
9. Altın NP'ler ile MKH'lerin belli bir dozla işaretlendiği zaman hücre proliferasyonunu arttırdığı sonraki dozlarda sabit olduğu ancak sitotoksisite göstermediği saptandı (boş MKH'lerde 10nm'de 2,5µl/ml; 30nm'de 5µl/ml, transfekte MKH'lerde ise 10nm ve 30nm'de 2,5µl/ml).
10. Kanser hücrelerinde meydana gelen nekrotik ve apoptotik ölüm farklı yöntemlerle karşılaştırıldığında farklı sonuçlar elde edildi. Hem SCLC-21H hem de NCI-H82 hücreleri pGITRL taşıyan MKH'ler ko-kültüre edildiğinde kanser hücrelerinin değişen oranlarda ölüme gittiği saptandı. Ko-kültür sonucu Annexin-PI yöntemi ile pGITRL taşıyan MKH'ler SCLC-21H hücrelerini ölüme götürmezken, TUNEL yöntemi ile özellikle kalıcı transfektanlarla ko-kültür sonucu daha fazla ölüme götürdü.
11. Hücre proliferasyonu ise hem boş MKH hem de transgenleri taşıyan (pCR3 ve pGITRL) MKH'ler ile ko-kültüre edilen NCI-H82 hücrelerinde SCLC-21H hücrelerine göre daha fazlaydı.
12. Ko-kültüre edilen kanser hücrelerinde *SIVA1* ekspresyonu en fazla geçici pGITRL taşıyan MKH'ler ile ko-kültüre edilen SCLC-21H hücrelerinde saptandı. Ko-kültürlerdeki kanser hücrelerinde Siva protein düzeyinin geçici pGITRL taşıyan MKH'ler ile transwellde ko-kültüre edilen SCLC-21H hücrelerinde en fazla olduğu saptandı.
13. Altın NP'ler ile işaretli ve pGITRL taşıyan MKH'lerin SCLC-21H hücreleri ile ko-kültüründe iki hücrenin kolaylıkla ayrılabilirdiği ve yakın temasta olduğu saptandı.

Bu sonuçlar doğrultusunda MKH'ler KHAK tümörlerinin GITRL ile hedeflenmesinde tedaviye yönelik bir strateji olarak düşünülebilir. Fakat *in vivo* çalışmalar yapılarak tümör modellerinde denenmesi gerekmektedir. Yapılacak *in vivo* çalışmalarda görüntüleme amacıyla toksik olmayan altın NP'ler kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (Haziran, 2015).
- [2] http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2009kanseraporu.pdf (Haziran, 2015)
- [3] Sarvi, S., Mackinnon, A. C., Avlonitis, N., Bradley, M., Rintoul, R. C., Rassl, D. M., Wang, W., Forbes, S. J., Gregory, C. D., Sethi, T., CD133+ cancer stem-like cells in small cell lung cancer are highly tumorigenic and chemoresistant but sensitive to a novel neuropeptide antagonist, *Cancer Research*, 74, 1554-1565, 2014.
- [4] Riaz, S. P., Luchtenborg, M., Coupland, V. H., Spicer, J., Peake, M. D., Moller, H., Trends in incidence of small cell lung cancer and all lung cancer, *Lung Cancer*, 75, 280-284, 2012.
- [5] <http://www.nhs.uk/Conditions/Cancer-of-the-lung/Pages/Introduction.aspx> (Haziran, 2015).
- [6] Christensen, C. L., Zandi, R., Gjetting, T., Cramer, F., Poulsen, H. S., Specifically targeted gene therapy for small-cell lung cancer, *Expert Rev Anticancer Therapy*, 9, 437-452, 2009.
- [7] <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000186891-TNFRSF18/cell> (Haziran, 2015).
- [8] Liu, Z., Tian, S., Faló, L. D., Jr., Sakaguchi, S., You, Z., Therapeutic immunity by adoptive tumor-primed CD4(+) T-cell transfer in combination with in vivo GITR ligation, *Molecular Therapy*, 17, 1274-1281, 2009.
- [9] Cho, J. S., Hsu, J. V., Morrison, S. L., Localized expression of GITR-L in the tumor microenvironment promotes CD8+ T cell dependent anti-tumor immunity, *Cancer Immunology and Immunotherapy*, 58, 1057-1069, 2009.
- [10] Piao, J., Kamimura, Y., Iwai, H., Cao, Y., Kikuchi, K., Hashiguchi, M., Masunaga, T., Jiang, H., Tamura, K., Sakaguchi, S., Azuma, M., Enhancement of T-cell-mediated anti-tumour immunity via the ectopically expressed glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor-related receptor ligand (GITRL) on tumours, *Immunology*, 127, 489-499, 2009.
- [11] Nishikawa, H., Kato, T., Hirayama, M., Orito, Y., Sato, E., Harada, N., Gnjatic, S., Old, L. J., Shiku, H., Regulatory T cell-resistant CD8+ T cells

- induced by glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor signaling, *Cancer Research*, 68, 5948-5954, **2008**.
- [12] Turk, M. J., Guevara-Patiño, J. A., Rizzuto, G. A., Engelhorn, M. E., Houghton, A. N., Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells, *The Journal of experimental medicine*, 200, 771-782, **2004**.
- [13] Ko, K., Yamazaki, S., Nakamura, K., Nishioka, T., Hirota, K., Yamaguchi, T., Shimizu, J., Nomura, T., Chiba, T., Sakaguchi, S., Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells, *The Journal of Experimental Medicine*, 202, 885-891, **2005**.
- [14] Zhou, P., L'Italien, L., Hodges, D., Schebye, X. M., Pivotal roles of CD4+ effector T cells in mediating agonistic anti-GITR mAb-induced-immune activation and tumor immunity in CT26 tumors, *The Journal of Immunology*, 179, 7365-7375, **2007**.
- [15] Calmels, B., Paul, S., Futin, N., Ledoux, C., Stoeckel, F., Acres, B., Bypassing tumor-associated immune suppression with recombinant adenovirus constructs expressing membrane bound or secreted GITR-L, *Cancer Gene Therapy*, 12, 198-205, **2005**.
- [16] Hu, P., Arias, R. S., Sadun, R. E., Nien, Y. C., Zhang, N., Sabzevari, H., Lutsiak, M. E., Khawli, L. A., Epstein, A. L., Construction and preclinical characterization of Fc-mGITRL for the immunotherapy of cancer, *Clin Cancer Research*, 14, 579-588, **2008**.
- [17] Baltz, K. M., Krusch, M., Bringmann, A., Brossart, P., Mayer, F., Kloss, M., Baessler, T., Kumbier, I., Peterfi, A., Kupka, S., Kroeber, S., Menzel, D., Radsak, M. P., Rammensee, H. G., Salih, H. R., Cancer immunoediting by GITR (glucocorticoid-induced TNF-related protein) ligand in humans: NK cell/tumor cell interactions, *FASEB Journal*, 21, 2442-2454, **2007**.
- [18] Kim, Y. S., Jung, H. W., Choi, J., Kwon, B. S., Ham, S. Y., Jung, A. K., Ko, B. K., Expression of AITR and AITR ligand in breast cancer patients, *Oncology Reports*, 18, 1189-1194, **2007**.
- [19] Purshouse, K. R., Missing the Target?—Targeted Therapy in Small Cell Lung Cancer, *Advances in Lung Cancer*, 2014, **2014**.

- [20] Ding, X., Cao, H., Chen, X., Jin, H., Liu, Z., Wang, G., Cai, L., Li, D., Niu, C., Tian, H., Cellular immunotherapy as maintenance therapy prolongs the survival of the patients with small cell lung cancer, *Journal of Translational Medicine*, 13, 158, **2015**.
- [21] Hu, Y.-L., Fu, Y.-H., Tabata, Y., Gao, J.-Q., Mesenchymal stem cells: a promising targeted-delivery vehicle in cancer gene therapy, *Journal of Controlled Release*, 147, 154-162, **2010**.
- [22] Wei, X., Yang, X., Han, Z. P., Qu, F. F., Shao, L., Shi, Y. F., Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy, *Acta Pharmacologica Sinica*, 34, 747-754, **2013**.
- [23] Dennis, J. E., Cohen, N., Goldberg, V. M., Caplan, A. I., Targeted delivery of progenitor cells for cartilage repair, *Journal of orthopaedic research*, 22, 735-741, **2004**.
- [24] Nakamizo, A., Marini, F., Amano, T., Khan, A., Studeny, M., Gumin, J., Chen, J., Hentschel, S., Vecil, G., Dembinski, J., Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas, *Cancer Research*, 65, 3307-3318, **2005**.
- [25] Xin, H., Kanehira, M., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Kikuchi, T., Nukiwa, T., Saijo, Y., Targeted delivery of CX3CL1 to multiple lung tumors by mesenchymal stem cells, *Stem Cells*, 25, 1618-1626, **2007**.
- [26] Bao, Q., Zhao, Y., Niess, H., Conrad, C., Schwarz, B., Jauch, K. W., Huss, R., Nelson, P. J., Bruns, C. J., Mesenchymal stem cell-based tumor-targeted gene therapy in gastrointestinal cancer, *Stem Cells Development*, 21, 2355-2363, **2012**.
- [27] Nakamura, K., Ito, Y., Kawano, Y., Kurozumi, K., Kobune, M., Tsuda, H., Bizen, A., Honmou, O., Niitsu, Y., Hamada, H., Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model, *Gene therapy*, 11, 1155-1164, **2004**.
- [28] Studeny, M., Marini, F. C., Dembinski, J. L., Zompetta, C., Cabreira-Hansen, M., Bekele, B. N., Champlin, R. E., Andreeff, M., Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents, *Journal of the National Cancer Institute*, 96, 1593-1603, **2004**.

- [29] Kucerova, L., Altanerova, V., Matuskova, M., Tyciakova, S., Altaner, C., Adipose tissue–derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy, *Cancer Research*, 67, 6304-6313, **2007**.
- [30] Hodgkinson, C. P., Gomez, J. A., Mirotsov, M., Dzau, V. J., Genetic engineering of mesenchymal stem cells and its application in human disease therapy, *Hum Gene Therapy*, 21, 1513-1526, **2010**.
- [31] Whiteside, T. L., The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth, *Oncogene*, 27, 5904-5912, **2008**.
- [32] Ariztia, E. V., Lee, C. J., Gogoi, R., Fishman, D. A., The tumor microenvironment: key to early detection, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 43, 393-425, **2006**.
- [33] Upreti, M., Jyoti, A., Sethi, P., Tumor microenvironment and nanotherapeutics, *Translational Cancer Research*, 2, 309-319, **2013**.
- [34] Balkwill, F. R., Capasso, M., Hagemann, T., The tumor microenvironment at a glance, *Journal of Cell Science*, 125, 5591-5596, **2012**.
- [35] Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., Schreiber, R. D., Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape, *Nature Immunology*, 3, 991-998, **2002**.
- [36] Shevach, E. M., Regulatory T cells in autoimmunity, *Annual Review of Immunology*, 18, 423-449, **2000**.
- [37] Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., Levings, M. K., Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans, *Immunology Reviews*, 212, 28-50, **2006**.
- [38] Bacchetta, R., Gambineri, E., Roncarolo, M. G., Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120, 227-235; quiz 236-227, **2007**.
- [39] Parkin, D. M., Pisani, P., Ferlay, J., Global cancer statistics, *CA Cancer Journal for Clinicians*, 49, 33-64, 31, **1999**.
- [40] www.saglik.gov.tr/TR/dosya/1-44481/h/kanser-istatistikleri.xls (Haziran, **2015**).
- [41] Sommer, P., Cowen, R. L., Berry, A., Cookson, A., Telfer, B. A., Williams, K. J., Stratford, I. J., Kay, P., White, A., Ray, D. W., Glucocorticoid receptor over-expression promotes human small cell lung cancer apoptosis in vivo

- and thereby slows tumor growth, *Endocrine Related Cancer*, 17, 203-213, **2010**.
- [42] Hopkins-Donaldson, S., Ziegler, A., Kurtz, S., Bigosch, C., Kandioler, D., Ludwig, C., Zangemeister-Wittke, U., Stahel, R., Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation, *Cell Death & Differentiation*, 10, 356-364, **2003**.
- [43] Kalemkerian, G. P., Advances in the treatment of small-cell lung cancer, *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 32, 94-101, **2011**.
- [44] Puglisi, M., Dolly, S., Faria, A., Myerson, J. S., Popat, S., O'Brien, M. E., Treatment options for small cell lung cancer - do we have more choice?, *British Journal of Cancer*, 102, 629-638, **2010**.
- [45] D'Angelo, S. P. Pietanza, M. C., The molecular pathogenesis of small cell lung cancer, *Cancer Biology and Therapy*, 10, 1-10, **2010**.
- [46] Antonia, S. J., Mirza, N., Fricke, I., Chiappori, A., Thompson, P., Williams, N., Bepler, G., Simon, G., Janssen, W., Lee, J. H., Menander, K., Chada, S., Gabrilovich, D. I., Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer, *Clin Cancer Research*, 12, 878-887, **2006**.
- [47] Doyle, A., Martin, W. J., Funa, K., Gazdar, A., Carney, D., Martin, S. E., Linnoila, I., Cuttitta, F., Mulshine, J., Bunn, P., et al., Markedly decreased expression of class I histocompatibility antigens, protein, and mRNA in human small-cell lung cancer, *Journal of Experimental Medicine*, 161, 1135-1151, **1985**.
- [48] Esendagli, G., Bruderek, K., Goldmann, T., Busche, A., Branscheid, D., Vollmer, E., Brandau, S., Malignant and non-malignant lung tissue areas are differentially populated by natural killer cells and regulatory T cells in non-small cell lung cancer, *Lung Cancer*, 59, 32-40, **2008**.
- [49] McCulloch, E. A. Till, J. E., Perspectives on the properties of stem cells, *Nature Medicine*, 11, 1026-1028, **2005**.
- [50] Morrison, S. J. Kimble, J., Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer, *Nature*, 441, 1068-1074, **2006**.
- [51] Can, A., A concise review on the classification and nomenclature of stem cells, *Turkish Journal of Hematology*, 25, 57-59, **2008**.

- [52] Takahashi, K. Yamanaka, S., Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, 126, 663-676, **2006**.
- [53] Svendsen, C. N., Back to the future: how human induced pluripotent stem cells will transform regenerative medicine, *Human Molecular Genetics*, 22, R32-38, **2013**.
- [54] Katti, K. S., Use of Adult Stem Cells in Biomaterials Research, *Journal of Biotechnology and Biomaterials*, 3, e121, **2013**.
- [55] Rastegar, F., Shenaq, D., Huang, J., Zhang, W., Zhang, B. Q., He, B. C., Chen, L., Zuo, G. W., Luo, Q., Shi, Q., Wagner, E. R., Huang, E., Gao, Y., Gao, J. L., Kim, S. H., Zhou, J. Z., Bi, Y., Su, Y., Zhu, G., Luo, J., Luo, X., Qin, J., Reid, R. R., Luu, H. H., Haydon, R. C., Deng, Z. L., He, T. C., Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications, *World Journal of Stem Cells*, 2, 67-80, **2010**.
- [56] Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., Frolova, G. P., Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues, *Transplantation*, 6, 230-247, **1968**.
- [57] Deng, Z. L., Sharff, K. A., Tang, N., Song, W. X., Luo, J., Luo, X., Chen, J., Bennett, E., Reid, R., Manning, D., Xue, A., Montag, A. G., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C., Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development, *Frontiers in Bioscience*, 13, 2001-2021, **2008**.
- [58] Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 8, 315-317, **2006**.
- [59] Patel, A. N. Genovese, J., Potential clinical applications of adult human mesenchymal stem cell (Prochymal(R)) therapy, *Stem Cells Cloning*, 4, 61-72, **2011**.
- [60] Uccelli, A., Moretta, L., Pistoia, V., Mesenchymal stem cells in health and disease, *Nature Reviews Immunology*, 8, 726-736, **2008**.
- [61] Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., Middleton, J., Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity,

- immunological features, and potential for homing, *Stem Cells*, 25, 2739-2749, **2007**.
- [62] Wang, S., Qu, X., Zhao, R. C., Clinical applications of mesenchymal stem cells, *Journal of Hematology and Oncology*, 5, 19, **2012**.
- [63] Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G. M., Claas, F. H., Fibbe, W. E., Kanhai, H. H., Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta, *Stem Cells*, 22, 1338-1345, **2004**.
- [64] Ortiz, L. A., Gambelli, F., McBride, C., Gaupp, D., Baddoo, M., Kaminski, N., Phinney, D. G., Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 8407-8411, **2003**.
- [65] Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M., Marini, F., Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells, *Gene Therapy*, 15, 730-738, **2008**.
- [66] Yagi, H., Soto-Gutierrez, A., Parekkadan, B., Kitagawa, Y., Tompkins, R. G., Kobayashi, N., Yarmush, M. L., Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing, *Cell Transplantation*, 19, 667-679, **2010**.
- [67] Bouffi, C., Bony, C., Courties, G., Jorgensen, C., Noel, D., IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis, *PLoS One*, 5, e14247, **2010**.
- [68] Foraker, J. E., Oh, J. Y., Ylostalo, J. H., Lee, R. H., Watanabe, J., Prockop, D. J., Cross-talk between human mesenchymal stem/progenitor cells (MSCs) and rat hippocampal slices in LPS-stimulated cocultures: the MSCs are activated to secrete prostaglandin E2, *Journal of Neurochemistry*, 119, 1052-1063, **2011**.
- [69] Nemeth, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P. G., Leelahavanichkul, K., Koller, B. H., Brown, J. M., Hu, X., Jelinek, I., Star, R. A., Mezey, E., Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production, *Nature Medicine*, 15, 42-49, **2009**.
- [70] Gupta, N., Su, X., Popov, B., Lee, J. W., Serikov, V., Matthay, M. A., Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells

- improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice, *Journal of Immunology*, 179, 1855-1863, **2007**.
- [71] Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S., Gianni, A. M., Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli, *Blood*, 99, 3838-3843, **2002**.
- [72] Ortiz, L. A., Dutreil, M., Fattman, C., Pandey, A. C., Torres, G., Go, K., Phinney, D. G., Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury, *Proceedings of National Academy of Sciences*, 104, 11002-11007, **2007**.
- [73] Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., Borg, C., Saas, P., Tiberghien, P., Rouas-Freiss, N., Carosella, E. D., Deschaseaux, F., Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells, *Stem Cells*, 26, 212-222, **2008**.
- [74] Krasnodembskaya, A., Song, Y., Fang, X., Gupta, N., Serikov, V., Lee, J. W., Matthay, M. A., Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37, *Stem Cells*, 28, 2229-2238, **2010**.
- [75] Fang, X., Neyrinck, A. P., Matthay, M. A., Lee, J. W., Allogeneic human mesenchymal stem cells restore epithelial protein permeability in cultured human alveolar type II cells by secretion of angiopoietin-1, *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 26211-26222, **2010**.
- [76] Kim, Y., Kim, H., Cho, H., Bae, Y., Suh, K., Jung, J., Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 20, 867-876, **2007**.
- [77] Lee, J. W., Fang, X., Gupta, N., Serikov, V., Matthay, M. A., Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung, *Proceedings of National Academy of Sciences*, 106, 16357-16362, **2009**.

- [78] Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Lee, C. W., Barr, S., Fuchs, S., Epstein, S. E., Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms, *Circulation Research*, 94, 678-685, **2004**.
- [79] Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Shou, M., Lee, C. W., Barr, S., Fuchs, S., Epstein, S. E., Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms, *Circulation*, 109, 1543-1549, **2004**.
- [80] Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A., Hoffman, R., Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo, *Experimental Hematology*, 30, 42-48, **2002**.
- [81] Birnbaum, T., Roider, J., Schankin, C. J., Padovan, C. S., Schichor, C., Goldbrunner, R., Straube, A., Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines, *Journal of Neurooncology*, 83, 241-247, **2007**.
- [82] Dwyer, R. M., Khan, S., Barry, F. P., O'Brien, T., Kerin, M. J., Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer, *Stem Cell Research and Therapy*, 1, 25, **2010**.
- [83] Guan, J.Chen, J., Mesenchymal stem cells in the tumor microenvironment, *Biomedical Reports*, 1, 517-521, **2013**.
- [84] Loebinger, M. R.Janes, S. M., Stem cells as vectors for antitumour therapy, *Thorax*, 65, 362-369, **2010**.
- [85] Sun, Z., Wang, S., Zhao, R. C., The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment, *Journal of Hematology and Oncology*, 7, 14, **2014**.
- [86] Uchibori, R., Tsukahara, T., Mizuguchi, H., Saga, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K., NF-kappaB activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites, *Cancer Research*, 73, 364-372, **2013**.
- [87] Teo, G. S., Ankrum, J. A., Martinelli, R., Boetto, S. E., Simms, K., Sciuto, T. E., Dvorak, A. M., Karp, J. M., Carman, C. V., Mesenchymal stem cells transmigrate between and directly through tumor necrosis factor-alpha-

- activated endothelial cells via both leukocyte-like and novel mechanisms, *Stem Cells*, 30, 2472-2486, **2012**.
- [88] Liu, S., Ginestier, C., Ou, S. J., Clouthier, S. G., Patel, S. H., Monville, F., Korkaya, H., Heath, A., Dutcher, J., Kleer, C. G., Jung, Y., Dontu, G., Taichman, R., Wicha, M. S., Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks, *Cancer Research*, 71, 614-624, **2011**.
- [89] Rattigan, Y., Hsu, J. M., Mishra, P. J., Glod, J., Banerjee, D., Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu, *Experimental Cell Research*, 316, 3417-3424, **2010**.
- [90] Senst, C., Nazari-Shafti, T., Kruger, S., Honer Zu Bentrup, K., Dupin, C. L., Chaffin, A. E., Srivastav, S. K., Worner, P. M., Abdel-Mageed, A. B., Alt, E. U., Izadpanah, R., Prospective dual role of mesenchymal stem cells in breast tumor microenvironment, *Breast Cancer Research and Treatment*, 137, 69-79, **2013**.
- [91] Goldstein, R. H., Reagan, M. R., Anderson, K., Kaplan, D. L., Rosenblatt, M., Human bone marrow-derived MSCs can home to orthotopic breast cancer tumors and promote bone metastasis, *Cancer Research*, 70, 10044-10050, **2010**.
- [92] Chaturvedi, P., Gilkes, D. M., Wong, C. C., Kshitiz, Luo, W., Zhang, H., Wei, H., Takano, N., Schito, L., Levchenko, A., Semenza, G. L., Hypoxia-inducible factor-dependent breast cancer-mesenchymal stem cell bidirectional signaling promotes metastasis, *The Journal of Clinical Investigation*, 123, 189-205, **2013**.
- [93] Lin, G., Yang, R., Banie, L., Wang, G., Ning, H., Li, L. C., Lue, T. F., Lin, C. S., Effects of transplantation of adipose tissue-derived stem cells on prostate tumor, *Prostate*, 70, 1066-1073, **2010**.
- [94] Gao, H., Priebe, W., Glod, J., Banerjee, D., Activation of signal transducers and activators of transcription 3 and focal adhesion kinase by stromal cell-derived factor 1 is required for migration of human mesenchymal stem cells in response to tumor cell-conditioned medium, *Stem Cells*, 27, 857-865, **2009**.
- [95] Ho, I. A., Chan, K. Y., Ng, W. H., Guo, C. M., Hui, K. M., Cheang, P., Lam, P. Y., Matrix metalloproteinase 1 is necessary for the migration of human

- bone marrow-derived mesenchymal stem cells toward human glioma, *Stem Cells*, 27, 1366-1375, **2009**.
- [96] Hu, Y., Cheng, P., Xue, Y. X., Liu, Y. H., Glioma cells promote the expression of vascular cell adhesion molecule-1 on bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a possible mechanism for their tropism toward gliomas, *Journal of Molecular Neuroscience*, 48, 127-135, **2012**.
- [97] Dwyer, R. M., Potter-Beirne, S. M., Harrington, K. A., Lowery, A. J., Hennessy, E., Murphy, J. M., Barry, F. P., O'Brien, T., Kerin, M. J., Monocyte chemotactic protein-1 secreted by primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells, *Clinical Cancer Research*, 13, 5020-5027, **2007**.
- [98] Coffelt, S. B., Marini, F. C., Watson, K., Zvezdaryk, K. J., Dembinski, J. L., LaMarca, H. L., Tomchuck, S. L., Honer zu Bentrup, K., Danka, E. S., Henkle, S. L., Scandurro, A. B., The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells, *Proceedings of National Academy of Sciences*, 106, 3806-3811, **2009**.
- [99] Lazennec, G., Jorgensen, C., Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit?, *Stem Cells*, 26, 1387-1394, **2008**.
- [100] Momin, E. N., Vela, G., Zaidi, H. A., Quinones-Hinojosa, A., The Oncogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Cancer: Directions for Future Research, *Current Immunology Reviews*, 6, 137-148, **2010**.
- [101] Yang, B., Wu, X., Mao, Y., Bao, W., Gao, L., Zhou, P., Xie, R., Zhou, L., Zhu, J., Dual-targeted antitumor effects against brainstem glioma by intravenous delivery of tumor necrosis factor-related, apoptosis-inducing, ligand-engineered human mesenchymal stem cells, *Neurosurgery*, 65, 610-624; discussion 624, **2009**.
- [102] Nakamizo, A., Marini, F., Amano, T., Khan, A., Studeny, M., Gumin, J., Chen, J., Hentschel, S., Vecil, G., Dembinski, J., Andreeff, M., Lang, F. F., Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas, *Cancer Research*, 65, 3307-3318, **2005**.
- [103] Hong, X., Miller, C., Savant-Bhonsale, S., Kalkanis, S. N., Antitumor treatment using interleukin-12-secreting marrow stromal cells in an

- invasive glioma model, *Neurosurgery*, 64, 1139-1146; discussion 1146-1137, **2009**.
- [104] Mishra, P. J., Mishra, P. J., Glod, J. W., Banerjee, D., Mesenchymal stem cells: flip side of the coin, *Cancer Research*, 69, 1255-1258, **2009**.
- [105] Sakaguchi, S., Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses, *Annual Reviews of Immunology*, 22, 531-562, **2004**.
- [106] Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakaguchi, S., Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity, *Journal of Immunology*, 163, 5211-5218, **1999**.
- [107] Placke, T., Kopp, H. G., Salih, H. R., Glucocorticoid-induced TNFR-related (GITR) protein and its ligand in antitumor immunity: functional role and therapeutic modulation, *Clinical and Developmental Immunology*, 2010, 239083, **2010**.
- [108] Kim, J. I., Sonawane, S. B., Lee, M. K., Lee, S. H., Duff, P. E., Moore, D. J., O'Connor, M. R., Lian, M. M., Deng, S., Choi, Y., Yeh, H., Caton, A. J., Markmann, J. F., Blockade of GITR-GITRL interaction maintains Treg function to prolong allograft survival, *European Journal of Immunology*, 40, 1369-1374, **2010**.
- [109] McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M., Byrne, M. C., CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor, *Immunity*, 16, 311-323, **2002**.
- [110] Kim, J. D., Choi, B. K., Bae, J. S., Lee, U. H., Han, I. S., Lee, H. W., Youn, B. S., Vinay, D. S., Kwon, B. S., Cloning and characterization of GITR ligand, *Genes and Immunity*, 4, 564-569, **2003**.
- [111] Shashidharamurthy, R., Bozeman, E. N., Patel, J., Kaur, R., Meganathan, J., Selvaraj, P., Immunotherapeutic strategies for cancer treatment: a novel protein transfer approach for cancer vaccine development, *Medicinal Research Reviews*, 32, 1197-1219, **2012**.
- [112] Tone, M., Tone, Y., Adams, E., Yates, S. F., Frewin, M. R., Cobbold, S. P., Waldmann, H., Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells, *Proceedings of National Academy of Sciences*, 100, 15059-15064, **2003**.

- [113] Kanamaru, F., Youngnak, P., Hashiguchi, M., Nishioka, T., Takahashi, T., Sakaguchi, S., Ishikawa, I., Azuma, M., Costimulation via glucocorticoid-induced TNF receptor in both conventional and CD25+ regulatory CD4+ T cells, *Journal of Immunology*, 172, 7306-7314, **2004**.
- [114] Stephens, G. L., McHugh, R. S., Whitters, M. J., Young, D. A., Luxenberg, D., Carreno, B. M., Collins, M., Shevach, E. M., Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells, *Journal of Immunology*, 173, 5008-5020, **2004**.
- [115] Nocentini, G., Ronchetti, S., Petrillo, M. G., Riccardi, C., Pharmacological modulation of GITRL/GITR system: therapeutic perspectives, *British journal of pharmacology*, 165, 2089-2099, **2012**.
- [116] Schaer, D. A., Cohen, A. D., Wolchok, J. D., Anti-GITR antibodies--potential clinical applications for tumor immunotherapy, *Current Opinion in Investigating Drugs*, 11, 1378-1386, **2010**.
- [117] Coe, D., Begom, S., Addey, C., White, M., Dyson, J., Chai, J. G., Depletion of regulatory T cells by anti-GITR mAb as a novel mechanism for cancer immunotherapy, *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 59, 1367-1377, **2010**.
- [118] Cohen, A. D., Schaer, D. A., Liu, C., Li, Y., Hirschhorn-Cymerman, D., Kim, S. C., Diab, A., Rizzuto, G., Duan, F., Perales, M. A., Merghoub, T., Houghton, A. N., Wolchok, J. D., Agonist anti-GITR monoclonal antibody induces melanoma tumor immunity in mice by altering regulatory T cell stability and intra-tumor accumulation, *PLoS One*, 5, e10436, **2010**.
- [119] Cote, A. L., Zhang, P., O'Sullivan, J. A., Jacobs, V. L., Clemis, C. R., Sakaguchi, S., Guevara-Patino, J. A., Turk, M. J., Stimulation of the glucocorticoid-induced TNF receptor family-related receptor on CD8 T cells induces protective and high-avidity T cell responses to tumor-specific antigens, *Journal of Immunology*, 186, 275-283, **2011**.
- [120] Imai, N., Ikeda, H., Tawara, I., Wang, L., Wang, L., Nishikawa, H., Kato, T., Shiku, H., Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor stimulation enhances the multifunctionality of adoptively transferred tumor antigen-specific CD8+ T cells with tumor regression, *Cancer Science*, 100, 1317-1325, **2009**.

- [121] Ma, J., Wang, S., Ma, B., Mao, C., Tong, J., Yang, M., Wu, C., Jiao, Z., Lu, L., Xu, H., Dendritic cells engineered to express GITRL enhance therapeutic immunity in murine Lewis lung carcinoma, *Cancer Letters*, 301, 142-150, **2011**.
- [122] Pedroza-Gonzalez, A., Kwekkeboom, J., Sprengers, D., T-cell suppression mediated by regulatory T cells infiltrating hepatic tumors can be overcome by GITRL treatment, *Oncoimmunology*, 2, e22450, **2013**.
- [123] Patra, H. K., Banerjee, S., Chaudhuri, U., Lahiri, P., Dasgupta, A. K., Cell selective response to gold nanoparticles, *Nanomedicine*, 3, 111-119, **2007**.
- [124] Colvin, V. L., The potential environmental impact of engineered nanomaterials, *Nature Biotechnology*, 21, 1166-1170, **2003**.
- [125] Service, R. F., American Chemical Society meeting. Nanomaterials show signs of toxicity, *Science*, 300, 243, **2003**.
- [126] Möhlen, K.Beller, F., Use of radioactive gold in the treatment of pleural effusions caused by metastatic cancer, *Journal of cancer research and clinical oncology*, 94, 81-85, **1979**.
- [127] Rosenberg, S. J., Loening, S. A., Hawtrey, C. E., Narayana, A. S., Culp, D. A., Radical prostatectomy with adjuvant radioactive gold for prostatic cancer: a preliminary report, *Journal of Urology*, 133, 225-227, **1985**.
- [128] Tiwari, P. M., Vig, K., Dennis, V. A., Singh, S. R., Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications, *Nanomaterials*, 1, 31-63, **2011**.
- [129] Mustafa, T., Watanabe, F., Monroe, W., Mahmood, M., Xu, Y., Saeed, L., Karmakar, A., Casciano, D., All, S., Biris, A., Impact of gold nanoparticle concentration on their cellular uptake by MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells as analyzed by transmission electron microscopy, *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 2, 2, **2011**.
- [130] Chithrani, B. D., Ghazani, A. A., Chan, W. C., Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells, *Nano Letters*, 6, 662-668, **2006**.
- [131] Liu, D., Zhang, J., Yi, C., Yang, M., The effects of gold nanoparticles on the proliferation, differentiation, and mineralization function of MC3T3-E1 cells in vitro, *Chinese Science Bulletin*, 55, 1013-1019, **2010**.

- [132] Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J., Wyatt, M. D., Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity, *Small*, 1, 325-327, **2005**.
- [133] Sonnichsen, C., Franzl, T., Wilk, T., von Plessen, G., Feldmann, J., Wilson, O., Mulvaney, P., Drastic reduction of plasmon damping in gold nanorods, *Physical Review Letters*, 88, 077402, **2002**.
- [134] Yguerabide, J. Yguerabide, E. E., Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications, *Analytical Biochemistry*, 262, 157-176, **1998**.
- [135] Pileni, M. P., Self-assembly of inorganic nanocrystals: fabrication and collective intrinsic properties, *Accounts of Chemical Research*, 40, 685-693, **2007**.
- [136] Goubet, N., Ding, Y., Brust, M., Wang, Z. L., Pileni, M. P., A way to control the gold nanocrystals size: using seeds with different sizes and subjecting them to mild annealing, *ACS Nano*, 3, 3622-3628, **2009**.
- [137] Anker, J. N., Hall, W. P., Lyandres, O., Shah, N. C., Zhao, J., Van Duyne, R. P., Biosensing with plasmonic nanosensors, *Nature materials*, 7, 442-453, **2008**.
- [138] Alivisatos, A. P., Johnsson, K. P., Peng, X., Wilson, T. E., Loweth, C. J., Bruchez, M. P., Jr., Schultz, P. G., Organization of 'nanocrystal molecules' using DNA, *Nature*, 382, 609-611, **1996**.
- [139] Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Mucic, R. C., Storhoff, J. J., A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials, *Nature*, 382, 607-609, **1996**.
- [140] Lévy, R., Peptide-Capped Gold Nanoparticles: Towards Artificial Proteins, *ChemBioChem*, 7, 1141-1145, **2006**.
- [141] Schofield, C. L., Haines, A. H., Field, R. A., Russell, D. A., Silver and gold glyconanoparticles for colorimetric bioassays, *Langmuir*, 22, 6707-6711, **2006**.
- [142] Levy, R., Thanh, N. T., Doty, R. C., Hussain, I., Nichols, R. J., Schiffrin, D. J., Brust, M., Fernig, D. G., Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles, *Journal of American Chemical Society*, 126, 10076-10084, **2004**.

- [143] Skidmore, M. A., Patey, S. J., Thanh, N. T., Fernig, D. G., Turnbull, J. E., Yates, E. A., Attachment of glycosaminoglycan oligosaccharides to thiol-derivatised gold surfaces, *Chemical Communications (Camb)*, 2700-2701, **2004**.
- [144] Kumar, S. A., Peter, Y. A., Nadeau, J. L., Facile biosynthesis, separation and conjugation of gold nanoparticles to doxorubicin, *Nanotechnology*, 19, 495101, **2008**.
- [145] Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K., Rotello, V. M., Gold nanoparticles in delivery applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1307-1315, **2008**.
- [146] Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N., Smilowitz, H. M., The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice, *Physics in Medicine and Biology*, 49, N309-315, **2004**.
- [147] Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N., Focella, T. M., Smilowitz, H. M., Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent, *Br J Radiol*, 79, 248-253, **2006**.
- [148] Brannon-Peppas, L. Blanchette, J. O., Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1649-1659, **2004**.
- [149] Cai, W., Gao, T., Hong, H., Sun, J., Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology, *Journal of Nanotechnology, Science and Applications*, 1, 17-32, **2008**.
- [150] Seol, S. K., Kim, D., Jung, S., Chang, W. S., Kim, J. T., One-step synthesis of PEG-coated gold nanoparticles by rapid microwave heating, *Journal of Nanomaterials*, 2013, **2013**.
- [151] Brandenberger, C., Muhlfeld, C., Ali, Z., Lenz, A. G., Schmid, O., Parak, W. J., Gehr, P., Rothen-Rutishauser, B., Quantitative evaluation of cellular uptake and trafficking of plain and polyethylene glycol-coated gold nanoparticles, *Small*, 6, 1669-1678, **2010**.
- [152] Dykman, L. A. Khlebtsov, N. G., Uptake of engineered gold nanoparticles into mammalian cells, *Chemical Reviews*, 114, 1258-1288, **2014**.
- [153] Jain, R. K. Booth, M. F., What brings pericytes to tumor vessels?, *The Journal of Clinical Investigation*, 112, 1134-1136, **2003**.
- [154] Otsuka, H., Nagasaki, Y., Kataoka, K., PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 403-419, **2003**.

- [155] Zhao, F., Zhao, Y., Liu, Y., Chang, X., Chen, C., Zhao, Y., Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials, *Small*, 7, 1322-1337, **2011**.
- [156] Chithrani, B. D.Chan, W. C., Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes, *Nano Letters*, 7, 1542-1550, **2007**.
- [157] Alkilany, A. M.Murphy, C. J., Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?, *Journal of Nanoparticule Research*, 12, 2313-2333, **2010**.
- [158] Meir, R., Motiei, M., Popovtzer, R., Gold nanoparticles for in vivo cell tracking, *Nanomedicine (Lond)*, 9, 2059-2069, **2014**.
- [159] Shilo, M., Motiei, M., Hana, P., Popovtzer, R., Transport of nanoparticles through the blood-brain barrier for imaging and therapeutic applications, *Nanoscale*, 6, 2146-2152, **2014**.
- [160] Jain, S., Hirst, D. G., O'Sullivan, J. M., Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy, *The British Journal of Radiology*, 85, 101-113, **2012**.
- [161] Essig, M., Debus, J., Schlemmer, H. P., Hawighorst, H., Wannemacher, M., van Kaick, G., [Improved tumor contrast and delineation in the stereotactic radiotherapy planning of cerebral gliomas and metastases with contrast media-supported FLAIR imaging], *Strahlentherapie und Onkologie*, 176, 84-94, **2000**.
- [162] Cherukuri, P.Curley, S. A., Use of nanoparticles for targeted, noninvasive thermal destruction of malignant cells, *Methods in Molecular Biology*, 624, 359-373, **2010**.
- [163] Lal, S., Clare, S. E., Halas, N. J., Nanoshell-enabled photothermal cancer therapy: impending clinical impact, *Accounts of Chemical Research*, 41, 1842-1851, **2008**.
- [164] Hirsch, L. R., Stafford, R., Bankson, J., Sershen, S., Rivera, B., Price, R., Hazle, J., Halas, N., West, J., Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 13549-13554, **2003**.
- [165] Stern, J. M.Cadeddu, J. A., "Emerging use of nanoparticles for the therapeutic ablation of urologic malignancies," in *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 2008, pp. 93-96.

- [166] Shi, X., Wang, S., Meshinchi, S., Van Antwerp, M. E., Bi, X., Lee, I., Baker, J. R., Jr., Dendrimer-entrapped gold nanoparticles as a platform for cancer-cell targeting and imaging, *Small*, 3, 1245-1252, **2007**.
- [167] Zhang, Y. S., Wang, Y., Wang, L., Wang, Y., Cai, X., Zhang, C., Wang, L. V., Xia, Y., Labeling human mesenchymal stem cells with gold nanocages for in vitro and in vivo tracking by two-photon microscopy and photoacoustic microscopy, *Theranostics*, 3, 532-543, **2013**.
- [168] Menk, R. H., Schultke, E., Hall, C., Arfelli, F., Astolfo, A., Rigon, L., Round, A., Ataelmannan, K., MacDonald, S. R., Juurlink, B. H., Gold nanoparticle labeling of cells is a sensitive method to investigate cell distribution and migration in animal models of human disease, *Nanomedicine*, 7, 647-654, **2011**.
- [169] Reuveni, T., Motiei, M., Romman, Z., Popovtzer, A., Popovtzer, R., Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer: an in vivo study, *International Journal of Nanomedicine*, 6, 2859-2864, **2011**.
- [170] Wang, H., Zheng, L., Peng, C., Guo, R., Shen, M., Shi, X., Zhang, G., Computed tomography imaging of cancer cells using acetylated dendrimer-entrapped gold nanoparticles, *Biomaterials*, 32, 2979-2988, **2011**.
- [171] Jokerst, J. V., Cole, A. J., Van de Sompel, D., Gambhir, S. S., Gold nanorods for ovarian cancer detection with photoacoustic imaging and resection guidance via Raman imaging in living mice, *ACS Nano*, 6, 10366-10377, **2012**.
- [172] Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Bodmer, J. L., Gaide, O., Hertig, S., Ambrose, C., Tschopp, J., Schneider, P., Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human, *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 13964-13971, **2006**.
- [173] Fraser, S. P., Salvador, V., Manning, E. A., Mizal, J., Altun, S., Raza, M., Berridge, R. J., Djamgoz, M. B., Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. Lateral motility, *Journal of Cellular Physiology*, 195, 479-487, **2003**.
- [174] Cross, D. Burmester, J. K., Gene therapy for cancer treatment: past, present and future, *Clinical Medicine and Research*, 4, 218-227, **2006**.

- [175] Bassal, M., Mertens, A. C., Taylor, L., Neglia, J. P., Greffe, B. S., Hammond, S., Ronckers, C. M., Friedman, D. L., Stovall, M., Yasui, Y. Y., Robison, L. L., Meadows, A. T., Kadan-Lottick, N. S., Risk of selected subsequent carcinomas in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study, *Journal of Clinical Oncology*, 24, 476-483, **2006**.
- [176] Nemunaitis, J., Sterman, D., Jablons, D., Smith, J. W., 2nd, Fox, B., Maples, P., Hamilton, S., Borellini, F., Lin, A., Morali, S., Hege, K., Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified autologous tumor vaccines in non-small-cell lung cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 96, 326-331, **2004**.
- [177] Vattei, E. Claudio, P., Gene therapy for lung cancer: practice and promise, *Annali italiani di chirurgia*, 75, 279-289, **2003**.
- [178] Prasad, G., Wang, H., Hill, D. L., Zhang, R., Recent advances in experimental molecular therapeutics for malignant gliomas, *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 4, 347-361, **2004**.
- [179] Tseng, J. F. Mulligan, R. C., Gene therapy for pancreatic cancer, *Surgical Oncology Clinics of North America*, 11, 537-569, **2002**.
- [180] Madeira, C., Mendes, R. D., Ribeiro, S. C., Boura, J. S., Aires-Barros, M. R., da Silva, C. L., Cabral, J. M., Nonviral gene delivery to mesenchymal stem cells using cationic liposomes for gene and cell therapy, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 735349, **2010**.
- [181] Aluigi, M., Fogli, M., Curti, A., Isidori, A., Gruppioni, E., Chiodoni, C., Colombo, M. P., Versura, P., D'Errico-Grigioni, A., Ferri, E., Bacarani, M., Lemoli, R. M., Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Stem Cells*, 24, 454-461, **2006**.
- [182] Hamm, A., Krott, N., Breibach, I., Blindt, R., Bosserhoff, A. K., Efficient transfection method for primary cells, *Tissue Engineering*, 8, 235-245, **2002**.
- [183] Anthony J. Sprangers, B. F. a. B. M. O., Electroporation Can Efficiently Transfect hESC-Derived Mesenchymal Stem Cells without Inducing Differentiation, *The Open Stem Cell Journal*, 3, 62-66, **2011**.

- [184] Ode, A., Kopf, J., Kurtz, A., Schmidt-Bleek, K., Schrade, P., Kolar, P., Buttgereit, F., Lehmann, K., Hutmacher, D. W., Duda, G. N., Kasper, G., CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells, *European Cells and Materials*, 22, 26-42, **2011**.
- [185] Herrera, M. B., Bussolati, B., Bruno, S., Morando, L., Mauriello-Romanazzi, G., Sanavio, F., Stamenkovic, I., Biancone, L., Camussi, G., Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury, *Kidney International*, 72, 430-441, **2007**.
- [186] Barry, F. P. Murphy, J. M., Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36, 568-584, **2004**.
- [187] Raimondo, S., Penna, C., Pagliaro, P., Geuna, S., Morphological characterization of GFP stably transfected adult mesenchymal bone marrow stem cells, *Journal of Anatomy*, 208, 3-12, **2006**.
- [188] Baessler, T., Krusch, M., Schmiedel, B. J., Kloss, M., Baltz, K. M., Wacker, A., Schmetzer, H. M., Salih, H. R., Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein ligand subverts immunosurveillance of acute myeloid leukemia in humans, *Cancer Research*, 69, 1037-1045, **2009**.
- [189] Salih, H. R., Schmetzer, H. M., Burke, C., Starling, G. C., Dunn, R., Pelka-Fleischer, R., Nuessler, V., Kiener, P. A., Soluble CD137 (4-1BB) ligand is released following leukocyte activation and is found in sera of patients with hematological malignancies, *Journal of Immunology*, 167, 4059-4066, **2001**.
- [190] Cho, W. S., Cho, M., Jeong, J., Choi, M., Han, B. S., Shin, H. S., Hong, J., Chung, B. H., Jeong, J., Cho, M. H., Size-dependent tissue kinetics of PEG-coated gold nanoparticles, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245, 116-123, **2010**.
- [191] Liu, C. J., Wang, C. H., Chien, C. C., Yang, T. Y., Chen, S. T., Leng, W. H., Lee, C. F., Lee, K. H., Hwu, Y., Lee, Y. C., Cheng, C. L., Yang, C. S., Chen, Y. J., Je, J. H., Margaritondo, G., Enhanced x-ray irradiation-induced cancer cell damage by gold nanoparticles treated by a new synthesis method of polyethylene glycol modification, *Nanotechnology*, 19, 295104, **2008**.

- [192] Gu, Y. J., Cheng, J., Lin, C. C., Lam, Y. W., Cheng, S. H., Wong, W. T., Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 237, 196-204, **2009**.
- [193] Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., Jahnen-Dechent, W., Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles, *Small*, 3, 1941-1949, **2007**.
- [194] Zhang, X. D., Wu, D., Shen, X., Liu, P. X., Yang, N., Zhao, B., Zhang, H., Sun, Y. M., Zhang, L. A., Fan, F. Y., Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles, *Int J Nanomedicine*, 6, 2071-2081, **2011**.
- [195] Ramasamy, R., Lam, E. W., Soeiro, I., Tisato, V., Bonnet, D., Dazzi, F., Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth, *Leukemia*, 21, 304-310, **2007**.
- [196] Prasad, K. V., Ao, Z., Yoon, Y., Wu, M. X., Rizk, M., Jacquot, S., Schlossman, S. F., CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein, *Proceedings of National Academy of Sciences*, 94, 6346-6351, **1997**.
- [197] Nocentini, G., Riccardi, C., GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily, *European Journal of Immunology*, 35, 1016-1022, **2005**.
- [198] Mei, Y., Wu, M., Multifaceted functions of Siva-1: more than an Indian God of Destruction, *Protein Cell*, 3, 117-122, **2012**.
- [199] Klopp, A. H., Gupta, A., Spaeth, E., Andreeff, M., Marini, F., 3rd, Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth?, *Stem Cells*, 29, 11-19, **2011**.
- [200] Lu, Y. R., Yuan, Y., Wang, X. J., Wei, L. L., Chen, Y. N., Cong, C., Li, S. F., Long, D., Tan, W. D., Mao, Y. Q., Zhang, J., Li, Y. P., Cheng, J. Q., The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo, *Cancer Biology and Therapy*, 7, 245-251, **2008**.

EKLER

EK-1. Etik Kurul İzni



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU

Tıp Fakültesi Dekanlığı 06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
E-posta: selmak@hacettepe.edu.tr
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr














Sayı: B.30.2.HAC.0.20.05.04/ 452

19 Nisan 2011

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 24 MART 2011 PERŞEMBE
Toplantı No : 2011/3
Proje No : FON 11/20 (Değerlendirme Tarihi 24.03.2011)
Karar No : FON 11/20 -24

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Petek Korkusuz'un sorumlu araştırmacısı olduğu Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya, Doç. Dr. Ayşen Günel Özcan, Dr. Güneş Esendağlı, Çağla Zübeyde Gür ve Sevil Arslan ile birlikte çalışacakları FON 11/20 kayıt numaralı ve "Mezenkimal Kök Hücrelerde (MKH) Glukokortikoid ile İndüklenen TNFR Proteini (GITRL) Tanımlanması" başlıklı proje önerisi Komisyonumuzda değerlendirilmiş olup, uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Rüştü Onur (Başkan) 
2. Prof. Dr. Murat Yurdakök (Üye) KATILMADI
3. Prof. Dr. İbrahim Haznedaroğlu (Üye) 
4. Prof. Dr. Arzu Topeli İskit (Üye) KATILMADI
5. Prof. Dr. İnci Erdemli (Üye) KATILMADI
6. Prof. Dr. Haydar A. Demirel (Üye) 
7. Prof. Dr. Zafer Çehreli (Üye) 
8. Prof. Dr. Osman Abbasoğlu (Üye) 
9. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Üye) 
10. Prof. Dr. Nüket Örnek Büken (Üye) 
11. Prof. Dr. Alev Türker (Üye) 
12. Prof. Dr. Bilgehan Yalçın (Üye) 
13. Prof. Dr. Nilgün Sayınalp (Üye) 
14. Prof. Dr. S. Mehmet Mercanlıgil (Üye) 
15. Doç. Dr. Mutlu Hayran (Üye) 
16. Av. Meltem Onurlu (Üye) 

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik bilgileri

Adı-Soyadı : Çağla Zübeyde Köprü

Doęum Yeri : İzmit

Medeni hali : Evli

E-posta : biochayla@hotmail.com

Adresi : Çetin Emeç bulvarı Çevreyolu Metiş sitesi E blok no:8 Balgat/ANKARA

Eğitim

Lise : Milli Piyango Anadolu Lisesi

Lisans : Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : Gazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Doktora : Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce- çok iyi

İş Deneyimi

Denovo Biyoteknoloji

Deneyim Alanları

- Kök hücre
- Gen aktarımı
- Hücre görüntüleme

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

1. Mezenkimal Kök Hücrelerde (MKH) Glukokortikoid ile İndüklenen TNFR Proteini (GITR) ve Ligandının (GITRL) Tanımlanması. BAP, proje no: 011D04101013, 20.05.2011-20.05.2012, 10.000TL.

2. Glukokortikoid ile İndüklenen TNFR Protein Ligandı (GITRL) Transfekte Edilmiş Mezenkimal Kök Hücrelerin (MKH) Akciğer Kanserine Etkisi. TÜBİTAK 1001, proje no: 112T474, 15.10.2012-15.10.2014, 209.110TL.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

1. Korkusuz P., Kose S., **Kopru CZ**. Biomaterial and stem cell interactions: Histological biocompatibility. *Current Stem Cell Research and Therapy*, 2015 (basım aşamasında).

2. **Kopru CZ**., Cagnan I., Akar-Soycan I., Esendagli G., Korkusuz P., Gunel-Ozcan A. Mesenchymal stem cells transfected with pGITRL modulate small cell lung cancer cells' viability and proliferation. *Cytotechnology*, 2015 (değerlendirme aşamasında)

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

1. **Kopru CZ**, Korkusuz P, Cagnan I, Soycan Akar I, Esendagli G, Cetinkaya Uckan D, Ozcan Gunel A. Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Show Heterogeneous mRNA Levels of Glucocorticoid Induced Tumor Necrosis Factor Receptor (GITR) and Its Ligand (GITRL). ISSCR, 11 th Annual Meeting, June 12-15 2013, Boston MA, USA.

2. **Kopru CZ**, Korkusuz P, Esendagli G, Ozcan Gunel A. GITRL Expressing MSCs Affect *in vitro* Growth of Small Cell Lung Cancer. 4th World Congress on Cell Science & Stem Cell Research, June 24-26 2014, Valencia, Spain.

3. **Kopru CZ**, Korkusuz P, Soycan Akar I, Esendagli G, Cetinkaya Uckan D, Ozcan Gunel A. PCR3::GITRL Taşıyan Mezenkimal Kök Hücrelerde CD29

Düzeyleri Azalmaktadır. 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Kongresi, 20-23 Mart 2014, Kocaeli, Türkiye.