



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BCL-2 HEDEFLİ siRNA YÜKLÜ NK-KAYNAKLI
EKSOZOMLARIN OLUŞTURULMASI VE MEME KANSERİNDE
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

KÜBRA KABAN

DOKTORA TEZİ

FARMASÖTİK BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. AYŞE GÜLTEN KANTARCI

İSTANBUL- 2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

A large, light gray, stylized signature watermark is positioned diagonally across the middle of the page. It appears to be a calligraphic representation of the author's name, 'Kübra Kaban', rendered in a modern, geometric style.

Kübra Kaban

İmza

TEŞEKKÜR

Bana öğrettikleri ve her zaman anlayışla bana yol gösterdiği ve destek olduğu için ve de son doktora öğrencisi olarak her zaman gurur duyacağım Prof. Dr. Ayşe Gülten Kantarcı'ya çok teşekkür ediyorum.

I would like to thank the Clinical Collaboration Unit Translational Immunology, German Cancer Consortium (DKTK), German Cancer Research Center (DKFZ) in Tuebingen and specially the boss Prof. Dr. Helmut Salih for providing possibility and opportunities for me to work in his group as a member of AG Salih. I learnt and gained a lot thanks to him. Also many thanks to Dr. Melanie Maerklin for supervising effort on me and the project to proceed nicely. She always encouraged me to do more and to discover my potential. Also many thanks go to Dr. Yanjun Zhou and Dr. Clemens Hinterleitner for their help to take this project much further. I am thankful to DKFZ Core Facility Unit Electron Microscopy (Heidelberg, Germany) for their colobration for the TEM analyses.

Finally, I am always glad to meet all those nice people in Tuebingen; Kathrin, Kim and Ran.

Yüksek lisans tezimden bugüne kadar bana desteğini esirgemeyen, proje yazmak istediğimi söylediğimde benimle heyecanımı paylaşan ve aynı zamanda tez izleme komitesinin değerli üyesi hocam Doç. Dr. Emine Şalva'ya,

En zorlandığım zamanlarda sevgilerinden güç aldığım, bu yolda beni maddi manevi destekleyen sevgi dolu annem Nuran Kaban, babam Arif Kaban, ablam Tuğba İhtiyar ve kardeşim Mümin Kaban'a

Ailemize neşe, birlik ve sevgi getiren, varlığı ile içimde bin güneş doğduran canım yeğenim Begüm Narin İhtiyar'a

Ve can eşim Eren Gür'e

Çok teşekkür ederim.

Bu alışma TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) tarafından 2214-A-Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı (1059B141700626) ve 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı (217S455) kapsamında desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
RESİMLER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	xiv
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	6
4.1. Meme Kanseri.....	6
4.1.2. Meme tümörlerinin sınıflandırılması	7
4.2. Apoptozis/Programlanmış Hücre Ölümü	9
4.2.1. Apoptozun moleküler mekanizmaları.....	10
4.2.1.1. Ekstrinsik/Ölüm reseptör yolakları.....	11
4.2.1.1.1. Tip I ve tip II'nin ekstrinsik yolakları.....	11
4.2.1.2. İntrinsik/Mitokondriyal yolak.....	12
4.2.1.3. Perforin/Granzim yolağı.....	13
4.2.1.4. Yürütme yolağı.....	14
4.2.3. BCL-2 ailesi.....	15
4.3. RNAi-temelli Ajanlar için Uygun Taşıyıcı Sistemler.....	16
4.4. Eksozomlar.....	17
4.5. NK Hücreleri ve Eksozomları.....	18

5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	20
5.1. Araç ve Gereçler.....	20
5.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	20
5.1.2. Kullanılan vektörler.....	21
5.1.3. Hücre hatları.....	21
5.2. YÖNTEM.....	23
5.2.1. Stabil hücre hatlarının oluşturulması.....	23
5.2.1.1. Lentiviral partikül üretimi.....	23
5.2.1.1.1. Plasmid amplifikasyonu.....	23
5.2.1.1.2. pLenti-plazmitlerinin spektrofotometrik kontrolü.....	24
5.2.1.1.3. pLenti-plazmitlerinin elektroforetik kontrolü	24
5.2.1.1.4. Lentiviral vektör üretimi.....	25
5.2.1.2. Viral titre tayini.....	26
5.2.1.2.1. q-PCR-temelli viral titre tayini.....	26
5.2.1.2.2. Biyolojik titre tayini.....	26
5.2.1.2.3. Flow sitometri ile titre tayini.....	27
5.2.1.3. Puromisin direncinin belirlenmesi.....	29
5.2.1.4. Lentiviral partiküllerin hücrelere transdüksiyonu.....	29
5.2.2. Flow sitometri.....	30
5.2.2.1. İntraselüler flow sitometri.....	30
5.2.3. Kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR).....	31
5.2.4. NK hücre sitotoksitesinin analizi.....	31
5.2.5. Eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu.....	31
5.2.5.1. Eksozom izolasyonu.....	32
5.2.5.2. Eksozom karakterizasyonu.....	33

5.2.5.2.1. Eksozomların partikül boyut ölçümleri.....	33
5.2.5.2.2. Elektron mikroskobu ile karakterizasyon.....	33
5.2.5.2.3. Eksozom miktar tayini.....	33
5.2.6. Eksozomların hedef hücelere internalizasyonunun kontrolü.....	34
5.2.7. Canlı hücre analizleri.....	34
5.2.8. Kaspaz-9 aktivasyon tayini.....	35
5.2.9. İstatistiksel değerlendirme.....	35
6. BULGULAR.....	36
6.1. Lentiviral Partikül Üretimi ve Viral Titre Tayinine İlişkin Bulgular.....	36
6.1.1. pLenti- plazmidlerinin spektrofotometrik kontrolüne ilişkin bulgular.....	36
6.1.2. pLenti- plazmidlerinin elektroforetik kontrolüne ilişkin bulgular.....	37
6.1.3. Viral titre tayinine ilişkin bulgular.....	37
6.1.3.1. q-PCR-temelli viral titre tayini.....	37
6.1.3.2. Biyolojik titre tayini.....	38
6.1.3.3. Flow sitometri ile titre tayini.....	39
6.2. Puromisin Direncinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular.....	40
6.3. Lentiviral Partiküllerin Transdüksiyon Etkinliğine İlişkin Bulgular.....	40
6.3.1. siScr- ve siBCL-2-NK92MI hücrelerinden alt klonların oluşturulmasına ilişkin bulgular.....	41
6.3.2. LV transdüksiyon sonrası GFP ekspresyon seviyelerine ilişkin bulgular.....	41
6.3.3. NK92MI-siScr ve NK92MI-siBCL-2 hücrelerinde hedef gen BCL-2 ekspresyon seviyelerine ilişkin bulgular	43
6.3.3.1. qRT-PCR yöntemi ile BCL-2 ekspresyonu analizi.....	43
6.3.3.2. Flow sitometri ile hücre içi BCL-2 protein miktarının belirlenmesi.....	44
6.4. BCL-2 Downregülasyonunun NK Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin Tespitine İlişkin Bulgular.....	45

6.4.1. BCL-2 downregülasyonunun NK hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	45
6.4.2. BCL-2 aşağı regülasyonunun NK hücre sitotoksitesi üzerindeki etkileri.....	46
6.5. Eksozomların Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular.....	47
6.5.1. Eksozom partikül büyüklüğü değerlerinin ölçülmesine ilişkin bulgular.....	47
6.5.2. Elektron mikroskobu ile karakterizasyonuna ilişkin bulgular.....	47
6.5.3. Eksozom miktar tayini.....	48
6.5.4. Eksozom transfeksiyonun ve hücre içine eksozomların alımının kontrolü.....	50
6.6. GFP ⁺ Meme Kanseri Hücre Hattı Titrasyonuna İlişkin Bulgular.....	51
6.7. siGFP Yüklü NKExoları ile GFP Downregülasyonuna İlişkin Bulgular.....	52
6.8. siBCL-2 NKExoların Titrasyonuna İlişkin Bulgular.....	55
6.9. siBCL-2 NKExolarının Apoptotik Etkilerine İlişkin Bulgular.....	56
6.9.1. siBCL-2 NKExolarının sağlıklı ve non-malign hücreler üzerindeki etkilerine ilişkin bulgular.....	56
6.9.2. siBCL-2 NKExolarının MCF-7 hücrelerinde Annexin V aktivasyonu üzerine etkileri.....	58
6.9.3. siBCL-2 NKExolarının MCF-7 hücrelerinde Kaspaz 3/7 aktivasyonu üzerine etkileri.....	60
6.10. siBCL-2 NKExolarının Apoptozun İntrinsik Yolağı Üzerindeki Etkilerine İlişkin Bulgular.....	62
6.10.1. siBCL-2 NKExolarının BCL-2 ekspresyon seviyelerindeki etkileri.....	62
6.10.2. siBCL-2 NKExolarının mitokondriyal işlev bozukluğuna etkileri.....	63
6.10.3. siBCL-2 NKExolarının Kaspaz 9 aktivasyonu üzerine etkileri.....	64
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	65
8. KAYNAKLAR	75
9. EKLER	95
10. ÖZGEÇMİŞ.....	96

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Meme kanseri alt tiplerinin özellikleri	8
Tablo 2. İlgili genlerin dizileri.....	21
Tablo 3. Flow sitometri ile viral titre tayini için oluşturulan gruplar.....	28
Tablo 4. Lentiviral plazmidlerin spektrofotometrik ölçüm sonuçları	36



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Lentiviral paketleme plazmidleri ve hedef plazmidlerin agaroz jel elektroforez görüntüleri	37
Şekil 2. Lentivirüslerin qPCR-temelli viral titrasyonu	38
Şekil 3. Scrambled ve BCL-2 shRNA lentiviral partiküllerin biyolojik titre tayini	38
Şekil 4. Flow sitometri ile lentiviral titrasyon bulguları	39
Şekil 5. 293T ve NK92MI hücrelerinin puromisin direnci	40
Şekil 6. siScr ve siBCL-2 NK-92 hücre alt kolonilerinin BCL-2 gen ekspresyon profili.	41
Şekil 7. Lentiviral transdüksiyon sonrası meme kanseri hücrelerinin GFP ekspresyon seviyeleri	42
Şekil 8. Lentiviral transdüksiyon sonrası NK92MI hücrelerinin GFP ekspresyon seviyelerinin A-flow sitometri ile B-Floresan mikroskobu ile tespiti	43
Şekil 9. NK92MI-siBCL-2 and NK92MI-siScr hücrelerinin relatif BCL-2 gen ekspresyon seviyeleri (n = 4)	44
Şekil 10. A. NK92MI-siBCL-2 ve NK92MI-siScr hücrelerinin anti-BCL-2 antikorları veya izotip kontrol ile hücre içi boyanarak flow sitometri ile analizi B. Hücre içi BCL-2 proteini SFI seviyeleri (n = 3)	45
Şekil 11. Hücre canlılığını değerlendirmek için; 7-AAD pozitif NK92MI-siBCL-2 ve NK92MI-siScr hücrelerin flow sitometri ile analizi	46
Şekil 12. BCL-2 siRNA'nın NK92MI hücrelerinin hedef hücreleri lizis yeteneği üzerindeki etikeleri A. Farklı E:T oranlarında örneklem sonuç B. 2,5:1 E:T oranında kombine veriler (n = 6)	46
Şekil 13. siScr- ve siBCL-2 NKExoların NTA ile boyut karakterizasyonu	47
Şekil 14. Eksozomların TEM ile karakterizasyonu	48

Şekil 15. CD63 TRIFic™ kit standard eğrisi	49
Şekil 16. Eksozom konsantrasyon tayini (n = 17).....	49
Şekil 17. Floresan Dil ile işaretli NKExoların GFP ⁺ MCF-7 hücrelerine internalizasyonunun floresan mikroskobu ile tespiti	50
Şekil 18. Eksozomların MCF-7 hücrelerine internalizasyonu (n = 6)	51
Şekil 19. GFP ⁺ meme kanseri hücre hatları titrasyonu. A. MCF-7 hücre hattı, B. MDA-MB-231 hücre hattı	52
Şekil 20. shScr veya shGFP LV ile transdükte edilen GFP ⁺ MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde GFP susturulma seviyesinin flow sitometri ile analizi	53
Şekil 21. siScr veya siGFP yüklü NKExolar ile transfekte edilen GFP ⁺ MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde GFP susturulma seviyesinin canlı hücre analizi ile tespiti..	54
Şekil 22. Farklı konsantrasyonda siScr ve siBCL-2 NKExoları ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde relatif BCL-2 ekspresyonlarının qRT-PCR ile belirlenmesi.....	55
Şekil 23. siScr veya siBCL-2 NKExolar ile transfekte edilen sağlıklı donörlerden elde edilen PBMC'ler üzerinde apoptotik etkilerin flow sitometri ile incelenmesi.....	57
Şekil 24. siScr veya siBCL-2 NKExolar ile tedavi edilen non-malign MCF-10A'nın Annexin V ekspresyonunun canlı hücre görüntüleme ile incelenmesi.....	58
Şekil 25. siScr veya siBCL-2 NKExolar ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin Annexin V pozitivitesinin farklı zaman dilimlerinde flow sitometri ile incelenmesi A. 9. saat örneklem verisi B. 9. saat birleştirilmiş veri (n = 3) C. 24. saat örneklem verisi D. 24. saat birleştirilmiş veri (n = 3).....	59
Şekil 26. siScr veya siBCL-2 NKExolar ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin zaman içindeki Annexin V aktivasyonunun canlı hücre görüntüleme ile incelenmesi A. Bir örneklem veri B. Isı haritası ile gösterilen bağımsız birleştirilmiş deneyler (n = 3) C. 24. saatte elde edilen birleştirilmiş veriler (bağımsız, n = 3)	60
Şekil 27. siScr veya siBCL-2 NKExolar ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin zaman içindeki Kaspaz 3/7 aktivasyonunun canlı hücre görüntüleme ile incelenmesi A. Bir örneklem veri B. Isı haritası ile gösterilen bağımsız birleştirilmiş deneyler (n = 3) C.	

9. saatte elde edilen birleştirilmiş veriler (bağımsız, n = 3) D. 24. saatte elde edilen birleştirilmiş veriler (bağımsız, n = 3)	61
Şekil 28. siScr veya siBCL-2 NKExolar ile 48 saat tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde relatif mRNA ekspresyon seviyelerinin qRT-PCR ile belirlenmesi (n = 3)	62
Şekil 29. siScr veya siBCL-2 NKExolar ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde intraselüler BCL-2 protein seviyelerinin flow sitometri ile belirlenmesi (n = 4).....	63
Şekil 30. siBCL-2 veya siScr NKExolar ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinin TMRE negativitesi açısından flow sitometri ile analizi A. örneklem sonuç B. bağımsız deneylerin birleştirilmiş verileri (n = 3).....	63
Şekil 31. siBCL-2 veya siScr NKExolar ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde Kaspaz 9 aktivitesinin analizi (n = 3).....	64

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. NK92MI hücrelerine LV transdüksiyonun akış şeması.....	23
Resim 2. Viral dilüsyon serileri oluşum şeması.....	27
Resim 3. Eksozom izolasyonu akış şeması.....	32
Resim 4. GFP eksprese eden meme kanseri hücrelerinin LV transdüksiyonu için şematik iş akışı.....	53
Resim 5. GFP eksprese eden meme kanseri hücrelerinin siGFP yüklü NKExoları ile transfeksiyonu için şematik iş akışı.....	54

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ADCC Antikora Bağlı Hücresel Sitotoksisite

AIF Apoptozu İndükleyen Faktör

AML akut miyeloid lösemide

Apaf-1 Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1

Asp Aspartat

BCL-2 B-Hücreli Lenfoma 2

CAD Kaspaz İle Aktive Olan DNase

CAR-T Kimerik Antijen Reseptörü

CL Sitotoksik Lenfosit

Cyt c Sitokrom C

dATP Deoksiadenozin Trifosfat

DED Ölüm Efektör Domaini

DISC Ölüm-İndükleyici Sinyal Kompleksi

Dil 3H-Indolium

DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA Deoksiribonükleik Asit

DPBS Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

DR Ölüm Reseptörü

E:T Efektörün Hedefe Oranı

EMT Epitelyal-Mezenkimal Geçiş

ER Östrojen Reseptörü

FADD Fas-İlişkili Ölüm Domaini

Fas FS-7-İlişkili Yüzey Antijeni

GFP Yeşil Floresan Protein

GrA Granzim A

GrB Granzim B

HER2 İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

ICAD Kaspaz İle Aktive Olan DNase İnhibitörü

IMDM Iscove's Modified Dulbecco's Medium

KLL Kronik Lenfositik Lösemi

MFI Ortalama Floresan Değeri

MOMP Mitokondriyal Dış Membran Permeabilizasyonu

MPT Mitokondriyal Permeabilite Geçiş

NK Doğal Öldürücü Hücreler

NKExo Doğal Öldürücü Hücrelerden Kaynaklı Eksozomlar

NTA NanoTracking Analyser

NuMA Nükleer/Mitotik Aparat

PARP Poli (ADP-Riboz) Polimeraz

PBMC Periferik Kan Mononükleer Hücresi

PR Progesteron Reseptör

PS Fosfatidilserin

RNA Ribonükleik Asit

RNAi RNA İnterferans

RVG Kuduz Virüs Glikoproteininden Kaynaklanan Kısa Peptit

Scr Scrambled Dizi

SFI Spesifik Floresan İndeksi

shRNA Kısa Saç Tokası RNA

siRNA Küçük İnterferans RNA

TEM Geçirimli Elektron Mikroskobu

TNBC Üçlü Negatif Meme Kanseri

TRADD TNF Reseptör Tip-1-İlişkili Ölüm Domaini

VEGF Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ZEB Zing Finger E-Box Binding Homeobox



1. ÖZET

BCL-2 hedefli siRNA yüklü NK-kaynaklı eksozomların oluşturulması ve meme kanserinde etkinliğinin araştırılması

Öğrencinin Adı: Kübra Kaban

Danışmanın Adı: Prof. Dr. Ayşe Gülten Kantarcı

Program Adı : Farmasötik Biyoteknoloji

Amaç: Östrojen reseptörü pozitif (ER⁺) meme kanserli hastaların yaklaşık %85'i de dahil olmak üzere birçok malignitede anti-apoptotik protein BCL-2'nin aşırı ekspresyonu sıklıkla gözlenmektedir. BCL-2, prognostik bir belirteç olarak çalışılmasının yanı sıra, ER⁺ meme kanserinde terapötik bir hedef olarak araştırılmaktadır. Burada, siRNA üreticisi olarak genetiği değiştirilmiş doğal öldürücü (NK) hücreleri kullanarak BCL-2'yi hedeflemek amacıyla yeni bir eksozom temelli strateji geliştirdik.

Gereç ve Yöntem: NK92MI NK hücre hattı, BCL-2 siRNA'larını (siBCL-2) eksprese etmesi ve eksozomlarına (NKExos) yüklemesi için lentiviral olarak transdükte edildi ve ardından ER⁺ meme kanserinde tedavi etme potansiyeli açısından değerlendirildi.

Bulgular: Transdükte edilen NK92MI hücreleri, NK hücre canlılığını veya efektör işlevini önemli ölçüde etkilemeden yüksek seviyede BCL-2 siRNA'ları üretmiş ve NKExolara siBCL-2 yüklenmesini sağlamıştır. Dikkat çekici bir şekilde, siBCL-2 NKExolar aracılığıyla BCL-2'nin hedeflenmesi, malign olmayan hücreleri etkilemeden meme kanseri hücrelerinde intrinsik apoptozun artmasına yol açmıştır.

Sonuç: Bu çalışma ile meme kanserinde BCL-2 hedeflemek için elde ettiğimiz prototip sonuçlar, NKExoların onkogenlerin siRNA hedeflemesi için doğal bir dağıtım vektörü olarak kullanmaya yönelik yeni bir strateji için kanıt sağlamaktadır.

Anahtar kelimeler: NK hücreleri, Eksozom, BCL-2 siRNA, ER⁺ meme kanseri

2. SUMMARY

Generation of BCL-2 targeted siRNA-loaded NK-derived exosomes and investigation of their efficacy in breast cancer

Student Name, Surname: Kübra Kaban

Supervisor Name: Prof. Dr. Ayşe Gülten Kantarcı

Program Name: Pharmaceutical Biotechnology

Objective: BCL-2 is overexpressed in many cancers including over 80% of estrogen receptor positive (ER⁺) breast cancer. BCL-2 is used as prognostic marker and also therapeutic target in ER⁺ breast cancer. In this work, we developed novel strategy to target BCL-2 by exosomes of natural killer (NK) cells which is genetically modified to express siRNAs.

Material and Methods: As a NK cell line, NK92MI cells were genetically modified by lentivirus containing BCL-2 shRNA which is then loaded into its exosomes (NKExos) as siBCL-2 and then we evaluated its treatment effect on ER⁺ breast cancer cells.

Results: Transfected NK92MI cells produced significant levels of BCL-2 siRNAs and led to siBCL-2 loading into NKExos and this did not significantly affect NK cell viability or effector function of NK cells. Of note, siBCL-2 targeting of BCL-2 through NKExos led to increased intrinsic apoptosis in breast cancer cells without affecting non-malignant cells.

Conclusion: As a conclusion, we provided proof of concept to use NKExos as a natural delivery vector to target oncogenes by siRNA with our prototype results for targeting BCL-2 in breast cancer.

Keywords: NK cells, Exosome, BCL-2 siRNA, ER⁺ breast cancer

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser tüm dünyada ikinci önde gelen ölüm nedenidir ve meme kanseri sanayileşmiş ülkelerdeki kadınlarda en sık görülen kanserdir (Hanahan ve Weinberg, 2011; Merino ve ark., 2016; Siegel ve ark., 2020). Geliştirilmiş cerrahi teknikler (neoadjuvan) kemoterapötikler ve reseptör tirozin kinaz Her2/neu'yu hedefleyen immünoterapötik stratejiler gibi yeni tedavi seçenekleri hastaların sağkalımını önemli ölçüde iyileştirmiştir (Jain ve ark., 2020; Slamon ve ark., 2010). Bununla birlikte, hastalığın nüksetmesi ve metastaz yapması tedavi için zorlu bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu nedenle yeni tedavi stratejileri geliştirmek için çok sayıda araştırma sürdürülmektedir (Jain ve ark., 2020; Kim ve ark., 2020; Peng ve ark., 2020). Geliştirilmiş tedavinin önündeki en zorlu engeller arasında, hedef dışı yan etkiler ve çoklu ilaç direnci önemli bir rol oynamaktadır (Persidis, 1999; Slamon ve ark., 2010; Wang ve ark., 2017). Bu ihtiyaçları karşılamak için, ilaç dağıtım sistemlerinin iyileştirilmesi ve tedavi dirençlerinin üstesinden gelinmesi gibi yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Östrojen reseptörü pozitif (ER⁺) meme kanseri hastalarının %85'inde östrojene duyarlı bir gen olan antiapoptotik protein BCL-2 aşırı eksprese edilmektedir (Merino ve ark., 2016) ve bu da, meme kanseri hücrelerinin programlanmış hücre ölümünden (apoptozdan) kaçmasına izin vererek tümör hücresi sağkalımını ve hastalığın ilerlemesini desteklemektedir (Akar ve ark., 2008; Parton ve ark., 2001; Teixeira ve ark., 1995; Vaillant ve ark., 2013). BCL-2 inhibitörü olan Venetoclax gibi terapötikler aracılığıyla BCL-2 inhibisyonu, kanser hücrelerini apoptoza duyarlı hale getirir ve Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) veya Akut Miyeloid Löseminin (AML) onkolojik tedavilerinde vazgeçilmez hale gelmiştir (Delbridge ve ark., 2016; Juin ve ark., 2013; Korycka-Wolowiec ve ark., 2019; Thol ve Ganser, 2020). BCL-2'nin küçük molekül inhibitörleri ile hedeflenmesinin yanı sıra, küçük interferans RNA (siRNA) posttranskripsiyonel gen susturma için güçlü bir araçtır (Tekade ve ark., 2016). Bununla birlikte, siRNA'nın terapötik uygulaması, etkili dağıtım veya kompleman sisteminin aktivasyonu gibi birçok engelle karşı karşıyadır. Dolayısıyla, bu sorunların üstesinden gelmek için siRNA yükünü spesifik olarak tümör bölgesine ulaştıracak

uygun vektörlere ihtiyaç duyulmaktadır (Alvarez-Erviti ve ark., 2011; Hu ve ark., 2020).

Eksozomlar yaklaşık 30-150 nm çapında homojen hücre dışı (ekstraselüler) veziküllerdir ve doğal bir nano taşıyıcı olarak kullanılabilecekleri bildirilmektedir (Farooqi ve ark., 2018). Yüzeylerinde eksozomal kökenlerini temsil eden Tetraspaninler (CD9, CD63 ve CD81) veya Alix gibi proteinlerin yanı sıra köken hücrelerinden taşınan ve diğer hücrelerle iletişime izin veren membran ligandları içerirler (He ve ark., 2018). Ligand-reseptör etkileşimleri, füzyon ve spesifik ligand ve reseptör aracılı endositoz yoluyla internalizasyon, eksozomların hedef hücreleriyle etkileşimini yönetir. Son zamanlarda, eksozomların kaynaklandığı hücrenin sitozolik proteinlerini ve yanı sıra kodlamayan RNA'ları da içerdiği gösterilmiştir (He ve ark., 2018; Mulcahy ve ark., 2014). Ayrıca, kanser hücrelerine hedefli spesifik ligandları ifade etmek veya aktif terapötiklerle yüklenmek üzere modifiye edilebilirler (Andaloussi ve ark., 2013). Bu nedenlerle, hedef hücrelere taşınma, toksisite ve immünojenisite gibi sorunların üstesinden gelmek için uygun araçlardır (Batrakova ve Kim, 2015). BCL-2'yi hedefleyen moleküller için taşıyıcı olarak eksozomun kullanılmasına ilişkin sayılı çalışma bulunmaktadır. Bununla birlikte bu çalışmalarda kullanılan eksozomlara siRNA yüklemesi elektroporasyon veya sonikasyon gibi fiziksel yöntemler kullanılarak yapılmaktadır. Bu da hem yöntem için ek bir basamak, hem de her yükleme aşamasında terapötik ajanı tekrar, tekrar gerektirmesinden dolayı ek bir maliyete neden olmaktadır. Çalışmamızda NK hücrelerine BCL-2 shRNA transdüksiyonu amacıyla lentiviral partiküller kullanılmıştır. Böylece NK hücreleri stabil ve sürekli olarak BCL-2'ye spesifik siRNA'lar sentezlemekte ve bu hücrelerden elde edilen eksozomların içerisinde bu siRNA'lar yer almaktadır. Çalışmamız, BCL-2 hedefli shRNA lentiviral vektörü kullanılarak, BCL-2 siRNA'larını stabil olarak eksprese eden NK hücre hattının oluşturulması ve bu hücrelerden elde edilen eksozomların terapötik etkinliğinin araştırılması ile özgün değere sahiptir. Önceki çalışmalar, NK hücreleri tarafından doğal olarak üretilen eksozomların (NKExo) FasL ve perforin/granzim sağlayarak antitümör etkilere aracılık edebildiğini ve malign hücreleri hedeflemek için çok uygun olduğunu göstermiştir (Di Pace ve ark., 2020; Fais, 2013; Jong ve ark., 2017; Li ve ark., 2020; Neviani ve ark., 2019; Wen ve ark., 2017; Zhu ve ark., 2017). Ancak bu NKExoların taşıyıcı olarak kullanımına ilişkin

Çalışma bulunmamaktadır. Bu alışma modifiye NKExo-temelli terapötiklerin geliştirilmesine temel oluşturucu niteliktedir.

Bu çalışmada, (i) NKExoların onkoproteinleri hedefleyen siRNA'lar için taşıyıcı vektör olarak kullanılıp kullanılamayacağını ve (ii) böylece solid tümörlerde öldürme yeteneklerini artırıp artıramayacağını (iii) ve son olarak hedeflenen tümör hücrelerinde intrinsik apoptoz yolunun indüklenip indüklenemeyeceğini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla, ER+ meme kanseri hücrelerinde aşırı eksprese edilen BCL-2'yi hedeflemek için NK hücrelerin lentiviral olarak BCL-2'yi hedefleyen küçük interferans RNA (siRNA) (siBCL-2) sentezlemesi için modifiye ettik ve bu hücrelerden toplanan siBCL-2 yüklü eksozomlarla terapötik bir strateji geliştirdik.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. Meme Kanseri

Tanı ve tedavilerdeki ilerlemelere rağmen, meme kanseri hala daha dünyada en yaygın üç kanserden biri olarak önemli bir morbidite ve mortalite sebebidir. Meme kanseri, kadınlarda görülen malign kanserlerin en başında gelmektedir ve kanser ölümlerinin en sık rastlanan sebeplerindendir. 2012’de, tüm dünyada 1,7 milyona yakın insan meme kanseri teşhis edilmiş ve yarım milyon insan bu hastalıktan vefat etmiştir. 2020’de ise yaklaşık 2,3 milyon kadın meme kanseri teşhis edilmiş ve küresel olarak 685,000 ölüm hastalıktan kaynaklanmış olup yıllar arasındaki teşhis ve ölüm sayılarında dramatik artış gözlenmektedir. Dünya Sağlık örgütünün epidemiyolojik tahminlerine göre, 2060 yılına kadar meme kanseri ilintili ölümler 2,35 kat artacaktır. Yaklaşık yüz kadın arasında on kadının yaşamı boyunca meme kanseri olacağı tahmin edilmektedir. Meme kanserinden ölümlerin oranı erken teşhis ve etkili sistemik tedaviler sayesinde Kuzey Amerika ve Avrupa Birliği’nde azaldığı bilinmektedir. 2016’da avrupa birliğinde meme kanserinden ölümlerin oranı yüzde sekiz düşmesi beklenmektedir. Buna rağmen, az gelişmiş ülkelerde meme kanseri halen kanser ölümlerinin en yaygın ve daha gelişmiş ülkelerde akciğer kanserinden sonraki ikinci en yaygın ölüm sebeplerindendir (Mattiuzzi ve Lippi, 2019; Shaath ve ark., 2021; Sung ve ark., 2021).

Meme kanseri tüm dünyada her yaştaki kadında görülmektedir ancak oranı ilerleyen yaşlarda artmaktadır. Meme kanseri antik zamanlardan beri teşhis edilmektedir. Batı tıpın babası Hipokrat, ilk olarak meme kanserinin sistematik bir hastalık olduğunu desteklemiştir (Lukong, 2017).

Meme kanserleri memenin epitel hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Histolojik analizler, normal meme epitelinin süt üretimi için gerekli olan iç lümenal hücrelerden oluşan nispeten basit bir çift tabakadan ve sütün dışarı atılması için gerekli olan mioepitelyal hücrelerden oluşan bir dış tabakadan oluştuğunu ortaya koymaktadır (Sopel, 2010). . Ancak görünen bu basit yapı, karsinogenez sırasında ortaya çıkan daha karmaşık bir hücresel hiyerarşiyi gizlemektedir. İmmünolojik, genetik ve gen

ekspresyon analizi yöntemleri kullanılarak meme kanserinin çeşitli histolojik ve moleküler alt tipleri tanımlanmıştır (Malhotra ve ark., 2010; Shaath ve ark., 2021).

4.1.2. Meme tümörlerinin sınıflandırılması

Meme kanseri farklı alt tipleri olan oldukça heterojen bir neoplazmdır. Bu alt tipler genellikle hormon reseptörlerinin immünohistokimyasal ekspresyonuna dayalı olarak östrojen reseptörü pozitif (ER⁺), progesteron reseptörü pozitif (PR⁺), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü pozitif (HER2⁺) ve yukarıdaki reseptörlerden herhangi birinin ekspresyonunun olmaması ile karakterize edilen triplenegatif (TNBC) olmak üzere dört kategoride gruplandırılmaktadır (Shaath ve ark., 2021). İnvaziv meme karsinomlarının yaklaşık %70-75'i önemli ölçüde yüksek östrojen reseptörü (ER) ekspresyonu ile karakterize edilmektedir. Bu nedenle ER, önemli bir tanısal belirleyicidir (Miah ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2019). Progesteron reseptörü (PR), ER-pozitif hastaların %50'sinden fazlasında ve çok nadiren ER-negatif meme kanserinde eksprese edilmektedir. PR ekspresyonu ER tarafından düzenlenmektedir; bu nedenle fizyolojik PR değerleri fonksiyonel ER yolağı hakkında bilgi vericidir. Bununla birlikte, hem ER hem de PR meme kanseri hücrelerinde bol miktarda ifade edilmekte ve her ikisi de meme kanserinin tanısal ve prognostik biyobelirteçleri olarak kabul edilmektedir (Nicolini ve ark., 2018). Yüksek PR ekspresyonu genel sağkalım, nükse kadar geçen süre ve tedavi başarısızlığı veya progresyona kadar geçen süre ile pozitif ilişkiliyken, düşük ekspresyon seviyeleri genellikle daha agresif bir hastalık seyrinin yanı sıra daha kötü nüks ve prognoz ile ilişkilidir (Purdie ve ark., 2014).

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ekspresyonu meme kanserlerinin yaklaşık %15-25'ini oluşturur. HER2 aşırı ekspresyonu meme karsinogenezi sırasındaki en erken olaylardan biridir. HER2, metastatik veya tekrarlayan meme kanserlerinin tespit oranını %50 ve hatta %80 oranında artırmaktadır. Serum HER2 seviyeleri, tümörlerin varlığı veya nüksü için gerçek zamanlı bir belirteç olarak kabul edilmektedir. HER2 amplifikasyonu, proto-onkojenik sinyal yollarının aşırı aktivasyonunun artmasına yol açarak HER2⁺ vakaların daha kötü klinik sonucu doğuran kontrolsüz kanser hücresi büyümesine neden olur (Iqbal ve Iqbal, 2014; Vaz-Luis ve ark., 2013).

Hormon tedavisi ve anti-HER2 tedavisi gibi hedefe yönelik tedaviden fayda görebilecek hastaları kategorize edebilmek için bir moleküler sınıflandırmaya da ihtiyaç duyulmaktadır (Sharma ve ark., 2021).

Luminal A, luminal B, HER2⁺ ve TNBC alt tipleri olmak üzere meme kanseri dört ana alt tipten oluşmaktadır. Bu dört alt tipin özellikleri Tablo 1’de gösterilmiştir (Ahern ve ark., 2014; Barzaman ve ark., 2020; Engel ve Kaklamani, 2007; Gao ve Swain, 2018; Higgins ve Stearns, 2009; Loibl ve Gianni, 2017; Poudel ve ark., 2019). Luminal kanserler esas olarak düşük moleküler ağırlıklı sitokeratinleri (CK7, CK8, CK18) ifade etmektedir. İmmünohistokimya bakış açısı ile üç grup ayırt edilmektedir: luminal A, luminal B ve HER2 (Gao ve Swain, 2018).

Tablo 1. Meme kanseri alt tiplerinin özellikleri

Meme Kanseri Alt tiplerinin özellikleri				
	Luminal A	Luminal B	HER2	TNBC
Görülme sıklığı (%)	50	15	20	15
ER	Var	Var	Bazı vakalarda	Yok
PR	Var	Bazı vakalarda	Bazı vakalarda	Yok
HER	Yok	Yok	Var	Yok
Prognoz	İyi	Orta	Orta/Kötü	Kötü
Tedavi	Hormonal	Hormonal/ Kemoterapi	Hormonal/ Kemoterapi/ Herceptin	Kemoterapi/ Deneysel

Meme kanseri ile ilişkili mikroRNA’ların ve spesifik genlerin tanımlanması, meme kanseri alt tiplerinin daha detaylı heterojenitesini ortaya çıkarabilir ve her alt tip için daha spesifik ilaçların geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Klinisyenler halihazırda mevcut tedavilere (örn. endokrin tedavisi, trastuzumab) yanıtı tahmin edebilmekte ve tümör özelliklerine göre prognozu belirleyebilmektedir; ancak tüm meme kanseri alt

tiplerinin kökenlerinin daha iyi anlaşılması şüphesiz tedavide yeni yaklaşımlar sağlayacaktır (Sims ve ark., 2007).

Meme tümörlerini alt tiplere ayırmanın nedeni, hem tedavi planlarını şekillendirmek hem de prognoza karar vermek için önemlidir. Alt tiplendirme yöntemleri arasında standart histopatoloji, moleküler patoloji, genetik analiz ve gen ekspresyon profili oluşturma yer almaktadır. Tümörler arasındaki en net ayrım, luminal tümörler ile bazal benzeri tümörler arasındaki ayrım gibi görünmektedir. Luminal tümörler genellikle progesteron reseptörü ile birlikte veya tek başına östrojen reseptörü eksprese etmektedir. Bazal benzeri tümörler sitokeratin (CKs) 5, 14 ve 17 ekspresyonu ve ER, PR ve HER2 ekspresyonunun olmaması ile tanımlanmaktadır (Sims ve ark., 2007). Bu 4 alt tipin arasında, en kötü prognoza sahip olan ve tüm meme kanseri vakalarının %15-20'ünü oluşturan, bazal üçlü negatif meme kanseridir (TNBC: triple negative breast cancer). Üçlü negatif meme kanserinin klinik seyri daha agresif olup, daha yüksek oranda uzak metastazla ilişkilidir (Gonçalves ve ark., 2018). Bu alt türde, 3 reseptörden hiçbirisi bulunmamaktadır ve böylece hedef tedavi molekülleri kısıtlı olup, diğer türlerde kullanabilen aromataz inhibitörleri veya HER2'ye karşı monoklonal antikorlar kullanılamamaktadır. Bu kanser alttipinde temel tedavi yaklaşımı halen cerrahi girişim ve taksan gibi kemoterapötik ajanlardır.

Apoptoz, yani programlı hücre ölümü, duktal morfogenez, gebelik, laktasyon ve involüsyon dahil olmak üzere normal meme bezi gelişiminin tüm aşamalarında önemli bir rol oynar. Apoptotik yollardaki deregülasyonlar tümörigenez, tümör ilerlemesi ve büyümesinin yanı sıra kemoterapi, radyoterapi ve endokrin tedavisine verilen regresyon yanıtının merkezinde rol oynamaktadır (Hahn ve Davidson, 1998). Bu tedaviler kısmen, kanserli hücrelerde en azından apoptozu indükleyerek etki göstermektedir (Parton ve Dowsett, 2001). Bu nedenle, sorunun nedeni olmasına rağmen, birçok tedavi stratejisinde apoptoz popüler bir hedef olduğu için kanser tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır (Wong, 2011).

4.2. Apoptozis/Programlanmış Hücre Ölümü

Apoptoz, genetik olarak programlanmış bir hücre ölümüdür. Çok hücreli organizmalarda gelişimin ve sağlığın normal bir parçasıdır. Programlı hücre ölümü

terimi 1964 yılında ortaya atılmış ve gelişim sırasında hücre ölümünün tesadüfi olmadığını, lokal ve geçici olarak kendi kendini yok etmeye yol açan yüksek derecede kontrollü bir dizi adımı izlediğini öne sürmüştür. Apoptoz (a-po-toe-sis) terimi ilk olarak 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından kontrollü hücrel kendini yok etmeye yol açan morfolojik süreçleri tanımlamak için kullanılmıştır (Elmore, 2007; Hannun, 1997; Kadam ve Abhang, 2016; Singh, 2007).

Çok hücreli biyolojik sistemlerin gelişimi ve devamlılığı organizmayı oluşturan hücreler arasındaki karmaşık bir etkileşime bağlıdır. Gelişim sırasında birçok hücre aşırı miktarda üretilir. Bunlar sonunda programlanmış hücre ölümüne uğrar ve böylece organların ve dokuların şekillenmesine katkıda bulunurlar. Apoptoz, gelişim ve yaşlanma sırasında normal olarak meydana gelmektedir. Aynı zamanda, immün reaksiyonlarda veya hücreler hastalık veya zararlı ajanlarla hasar gördüğünde bir savunma mekanizması olarak da meydana gelir (Kadam ve Abhang, 2016).

Öte yandan apoptotik yolaktaki işlev bozukluğu veya düzensizlik çeşitli patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir. Nörodejeneratif bozukluklar, AIDS ve iskemik hastalık gibi bazı durumlarda sorun, artan apoptozdan kaynaklanmaktadır. Çoğu patolojik durumda ise sorun apoptozdan kaynaklanmaktadır. Apoptozdaki kusurlar otoimmün hastalığa yol açabilir ve viral enfeksiyonun yayılmasını kolaylaştırabilir. Kanser de apoptotik mekanizmanın bozulduğu bir senaryodur ve ölmeyen yani immortalize olan malign hücrelerle sonuçlanır (Elmore, 2007; Kadam ve Abhang, 2016; Wong, 2011).

4.2.1. Apoptozun moleküler mekanizmaları

Apoptoz mekanizmaları, enerjiye bağlı bir dizi moleküler olayı içeren oldukça karmaşık süreçtir. Ekstrinsik (ölüm reseptörü) ve intrinsik (mitokondriyal) olmak üzere iki ana apoptotik yolak vardır. Ayrıca perforin/granzim bağımlı ek bir yolak daha vardır. Perforin/granzim yolağı, apoptozu granzim B veya A yoluyla indükleyebilir (Elmore, 2007; Trapani ve Smyth, 2002). Ekstrinsik, intrinsik ve granzim B (GrB) yolları kaspaz-3'ün bölünmesiyle başlayan adımda birleşmektedir ve DNA (Deoksiribonükleik asit) parçalanması, hücre iskeleti ve nükleer proteinlerin bozulması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimciklerin oluşumu, fagositik hücre reseptörleri için ligandların ekspresyonu ve son olarak fagositik hücreler

tarafından alımla sonlanmaktadır. Granzim A (GrA) ise, tek sarmallı DNA hasarı yoluyla kaspazdan bağımsız bir hücre ölüm yolağını aktive etmektedir (Elmore, 2007; Xu, 2006).

4.2.1.1. Ekstrinsik/Ölüm reseptör yolakları

Apoptozun ekstrinsik yolağı en iyi FasL/FasR ve TNF- α /TNFR-1 modelleri ile karakterize edilmektedir. TNF reseptör ailesinin üyeleri sistein bakımından zengin benzer ekstraselüler domainleri içerirler ve "ölüm domaini" olarak isimlendirilen yaklaşık 80 amino asitlik bir sitoplazmik domaine sahiplerdir. Bu ölüm domaini, ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına iletilmesinde kritik bir rol oynamaktadır (Elmore, 2007; Debatin ve Krammer, 2004). Ekstrinsik yolak, hücre yüzeyi reseptörlerinin, yani ölüm reseptörlerinin (DR) bağlanmasıyla aktive olmaktadır. FS-7-ilişkili yüzey antijeni (Fas), TNF reseptör süper ailesinin bir üyesidir ve apoptoz antijeni-1 (Apo-1) veya CD-95 olarak da isimlendirilmektedir. Diğer TNF reseptörleri; TNFR 1, DR-3, DR-4, DR-5 ve DR-6'dır (Mak ve Yeh, 2002). Fas sinyali, transforme veya virüsle enfekte olmuş hücrelerin immün sürveyansında ve kendi kendine reaktif lenfositlerin uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bir ölüm uyararı ile reseptör ligandına bağlandıktan sonra, ölüm domainlerini içeren sitoplazmik adaptör proteinler reseptörlere bağlanır. Örneğin; FasL'ın FasR'e bağlanmasını takiben adaptör proteini, Fas-ilişkili ölüm domaini (FADD), FasR'e bağlanır veya TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanmasını takiben adaptör proteini, TNF reseptör tip-1-ilişkili ölüm domaini (TRADD), TNF reseptörüne bağlanır. FADD daha sonra ölüm efektör domainin (DED) dimerizasyonu yoluyla procaspase-8 ile birleşir. Bu noktada, bir ölüm-indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşur ve procaspase-8'in otokatalitik aktivasyonu gerçekleşir. Kaspaz-8 aktive olduğunda, apoptozun yürütme aşaması tetiklenir (Bao ve Shi, 2007; Fulda ve Debatin, 2006).

4.2.1.1.1. Tip I ve tip II'nin ekstrinsik yolakları

Aktif kaspaz-8 daha sonra spesifik substratları parçalayan downstream efektör kaspazları işleyerek hücre ölümü ile sonuçlanır. Bu tür doğrudan kaspaz bağımlı

apoptoz yolağını indükleyebilen hücreler Tip I hücreler olarak sınıflandırılmıştır. Tip II hücrelerde ise, aktive edilmiş reseptörden gelen sinyal, hücre ölümünün gerçekleştirilmesi için yeterince güçlü bir kaspaz sinyal kaskadı oluşturmamaktadır. Bu durumda, sinyalin mitokondriye bağımlı apoptotik yolak aracılığıyla güçlendirilmesi gerekmektedir. Kaspaz sinyal kaskadı ile mitokondri arasındaki bağlantı B-hücreli lenfoma 2 (BCL-2) ailesi üyesi olan Bid tarafından sağlanır. Bid, kaspaz-8 tarafından parçalanır ve kesilmiş formunda (tBid) mitokondriye transloke olur ve burada proapoptotik BCL-2 ailesi üyeleri Bax ve Bak ile birlikte hareket ederek sitokrom c (Cyt c) ve mitokondriyal proapoptotik faktörlerin sitozole salınmasına neden olur. Sitozolik Cyt c, monomerik apoptotik proteaz aktive edici faktör-1'e (Apaf-1) bağlanır ve daha sonra deoksiadenozin trifosfat (dATP) bağımlı bir konformasyonel değişiklikle apoptozu oluşturmak için oligomerleşir. Tekerlek benzeri yapıdaki bu kompleks, öncü prokaspaz-9'un aktivasyonunu tetikler. Aktive olan kaspaz-9 daha sonra kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-6 gibi downstream efektör kaspazları ile bir kaspaz kaskadını başlatır ve sonuçta hücre ölümüyle sonuçlanır (Bao ve Shi, 2007; Kantari ve Walczak, 2011).

4.2.1.2. İntrinsik/Mitokondriyal yolak

İntrinsik sinyal yolağı, reseptör aracılı olmayıp doğrudan hücre içinde etkili olmaktadır ve mitokondriyal olarak başlatılan uyarı ile hücre içi sinyaller oluşturulmaktadır. Hücre içi pozitif ve negatif uyaranlar intrinsik yolağı başlatan sinyalleri oluşmasını sağlamaktadır. Negatif uyaranlar, apoptozu süprese eden büyüme faktörlerinin, hormonların ve sitokinlerin yokluğunda dahil olarak apoptozun indüklenmesine sebep olmaktadır. Başka bir deyişle, süpressör faktörlerin inhibe olması ile, apoptozun süpresyonu ortadan kaldırılır ve apoptoz aktive olur (Fulda ve Debatin, 2006).

Radyasyon, kemoterapi, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikaller gibi pozitif uyaranlar ise iç mitokondriyal membranda değişikliklere neden olarak mitokondriyal permeabilite geçiş (MPT) porunun açılmasına, mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybına ve iki ana proapoptotik grubun aktive olarak membranlar arası boşluktan sitozole salınmasına neden olmaktadır. İlk grup Cyt c, Smac/DIABLO ve serin proteaz Htr A2/Omi (high-temperature requirement protein

2)'den oluşmaktadır. Bu proteinler kaspaz bağımlı mitokondriyal yolağı aktive ederler. Cyt c, Apaf-1'in yanı sıra prokaspaz-9'u da bağlayarak apoptozu oluşturur. Prokaspaz-9'un bu şekilde kümelenmesi kaspaz-9 aktivasyonuna yol açar (Chipuk ve ark., 2006; Indran ve ark., 2011).

İkinci grup proapoptotik proteinler AIF (apoptozu indükleyen faktör), endonükleaz G ve CAD (kaspaz ile aktive olan DNase), apoptoz sırasında mitokondriden salınır, ancak bu hücre ölüm komutu alındıktan sonra meydana gelen geç bir olaydır. Bu apoptotik mitokondriyal olayların kontrolü ve düzenlenmesi BCL-2 protein ailesinin üyeleri aracılığıyla gerçekleşir. BCL-2 protein ailesinin ana etki mekanizması, mitokondriyal membran geçirgenliğinin değiştirilmesi yoluyla mitokondriden Cyt c salınımının düzenlenmesidir (Delbridge ve Strasse, 2015; Elmore, 2007; Hengartner, 2000).

4.2.1.3. Perforin/Granzim yolağı

Perforin/granzim apoptoz yolağı virüsle enfekte olmuş ve/veya dönüştürülmüş hücreleri ortadan kaldırmak için, sitotoksik lenfositler tarafından kullanılan birincil sinyal yolağıdır. Perforin gözenek oluşturan bir proteindir ve sitoplazmik granül toksinleri olarak da bilinir. Granzim, sitotoksik lenfositlerin (CL'ler) sitotoksik granüllerinde depolanan yapısal olarak serin proteaz ilişkili bir ailedir. Perforin ve granzim birlikte hedef hücre apoptozunu indüklemektedir (Trapani ve Smyth, 2002).

Sitotoksik lenfositler tarafından salgılanan granzimler hedef hücrelerin içine girdikten sonra iş görürken, perforin granzimlerin hücreler tarafından internalizasyonunu kolaylaştıran por oluşturuucu proteindir. Başka bir deyişle granzimlerin apoptotik işlevleri perforin tarafından uygun şekilde iletilmelerine bağlıdır. GrA ve GrB, en önemli granül bileşenidir. GrB, proteinleri aspartat (Asp) kalıntılarından parçalar ve prokaspaz-10'u aktive eder ve ICAD (kaspaz ile aktive olan DNA inhibitörü) gibi faktörleri parçalayabilir. GrB kaspaz aktivasyonunu dolaylı olarak da tetiklemektedir. Bu dolaylı mitokondriyal yol, Bid'in parçalanarak kesilmiş tBid formu aracılığıyla gerçekleşir. tBid daha sonra mitokondriyona translokasyon yapar ve pro-apoptotik proteinler Bax ve/veya Bak ile etkileşim yoluyla mitokondriyal membran bütünlüğünü bozar. Bu durumda, pro-apoptotik proteinler Bax veya Bak mitokondriyal dış

membran permeabilizasyonuna (MOMP) ve Cyt c, Smac, HtrA2/Omi serin proteazı, AIF ve endonükleaz G gibi çeşitli pro-apoptotik intermembran mitokondriyal proteinlerin salınmasına aracılık etmektedir. Cyt c salınımı, apoptozom oluşumunu uyarır, bu da kaspaz-9'un aktivasyonu ve ardından kaspaz-3,6,7'nin aktivasyonu ile sonuçlanır (Metkar ve ark., 2003; Trapani ve Smyth, 2002).

4.2.1.4. Yürütme yolağı

Ekstrinsik ve intrinsik yolların her ikisi de apoptozun son fazı olan yürütme fazında sona erer. Yürütme kaspazları, nükleer materyali parçalayan sitoplazmik endonükleazları ve nükleer ve hücre iskeleti proteinlerini parçalayan proteazları aktive ederek apoptozun yürütme fazını başlatır. Kaspaz-3, -6 ve -7 efektör veya yürütücü kaspazlar olarak işlev görür ve sitokeratinler, PARP [poli (ADP-riboz) polimeraz], plazma membranı hücre iskeleti proteini alfa fodrin ve nükleer protein NuMA (nükleer/mitotik aparat) gibi çeşitli substratları parçalayarak apoptotik hücrelerde görülen morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olur (El-Khattouti ve ark., 2013; Elmore, 2007). Kaspaz-3, yürütücü kaspazların en önemlisi olarak kabul edilir ve herhangi bir başlatıcı kaspaz (kaspaz-8, -9 ve -10) tarafından aktive edilir. Kaspaz-3 spesifik olarak endonükleaz CAD'yi aktive eder. Çoğalan hücrelerde CAD, inhibitörü ICAD ile kompleks oluşturur. Apoptotik hücrelerde, aktive kaspaz-3, CAD'yi serbest bırakmak için ICAD'yi parçalar. CAD daha sonra çekirdek içindeki kromozomal DNA'yı degrade ederek kondansasyonuna neden olur. Kaspaz-3 ayrıca hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine ve apoptotik cisimlerde hücre bütünlüğün bozulmasına neden olur. Apoptotik hücrelerin fagositik alımı apoptozun son aşamasıdır. Fosfolipid asimetrisi ve apoptotik hücrelerin ve parçalarının yüzeyinde fosfatidilserinin eksternalizasyonu bu fazın ayırt edici özelliğidir. Apoptotik hücrelerde fosfatidilserinin ekstraselüler membrana transloke olması, fagositik tanımayı kolaylaştırır. Bu süreç, yani hücre bileşenlerin salınımı olmaksızın erken ve etkili fagositoz, esasen hiçbir enflamatuvar yanıtla sonuçlanmaz (El-Khattouti ve ark., 2013; Elmore, 2007; Kantari ve Walczak, 2011).

4.2.2. BCL-2 ailesi

Apoptozun intrinsik yolunun en önemli düzenleyicilerinden biri BCL-2 protein ailesidir. BCL-2 geni ilk olarak foliküler B hücre lenfomada t(14;18) kromozomunun translokasyonunun kromozomal kırılma noktasında tanımlanmıştır. Bu keşif malign ve non-malign hücrelerin temel hücre biyolojisini anlamak için çok önemli bir etkiye sahiptir. Çünkü, lenfomada BCL-2 geni 18q21'deki normal kromozomal konumundan, kromozom 14'teki immünoglobulin ağır zincir lokusuna ve dolayısıyla bu genin transkripsiyon hızlandırıcısının yakınına transloke olmaktadır. Bu durum, BCL-2 geninin transkripsiyonel olarak aktive olup ve aynı zamanda protein ürününün aşırı üretilmesi ile sonuçlanmış ve böylece hücre sağkalımını artırmış ve apoptozu engellemiştir. BCL-2 ailesi, t(14;18) kromozomal translokasyonu olmasa bile birçok malignitede aşırı eksprese edilir. BCL-2'nin artan ekspresyonu kemoterapötiklere ve radyoterapiye karşı dirençe neden olurken, ekspresyonlarının azalması antikanser ilaçlara apoptotik yanıtları desteklemektedir (Elmore, 2007; Ghobrial ve ark., 2005; Kirkin ve ark., 2004).

BCL-2 ailesinin; Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk gibi proapoptotik üyeleri ve BCL-2, BCL-XL, BCL-W, Bfl-1 ve Mcl-1 gibi antiapoptotik üyeleri vardır. Antiapoptotik BCL-2 üyeleri, Cyt c salınımını bloke ederek apoptozun baskılanmasına sebep olurken, proapoptotik üyeler indükleyici rol oynamaktadır. Bu etkiler tek başına BCL-2'den ziyade BCL-2 ve Bax arasındaki dengeye de bağlıdır (Ghobrial ve ark., 2005; Kirkin ve ark., 2004).

Bir apoptotik sinyal alındığında, proapoptotik proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonlara uğrayarak mitokondriye translokasyonu ile apoptoz başlatılır. Apoptotik uyarılara yanıt olarak, dış mitokondriyal membran geçirgen hale gelir ve Cyt c salınmasına yol açar. Cyt c, sitozole salındıktan sonra Apaf-1 ile etkileşime girerek kaspaz-9 proenzimlerinin aktivasyonuna yol açar. Aktif kaspaz-9 daha sonra kaspaz-3'ü aktive eder, bu da kaspaz kaskadının geri kalanını aktive eder ve apoptoza yol açar. Aktive kaspazlar nükleer laminanın parçalanmasına ve kaspaz-3 aracılığıyla çekirdeğin parçalanmasına yol açar (Ghobrial ve ark., 2005; McIlwain ve ark., 2013).

Kanserde ise BCL-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin overekprese olduğu bilinmektedir (Burz ve ark., 2009; Carneiro ve El-Deiry, 2020; Russo ve ark., 2006). Bu nedenle

anti-apoptotik proteinlerin inhibisyonu kanser gen tedavisinde ilgi çekici hedeflerdir ve geniş ölçüde çalışılmıştır (Bedikian ve ark., 2006; Gardner, 2004; Huang ve ark., 2007; Jagani ve ark., 2016; Trudel ve ark., 2007). Örneğin bir antisens oblimer olan oblimersen klinik denemeleri devam eden BCL-2'ye hedefli ilk ilaçtır. Oblimersen'in geleneksel tedavi ile kombinasyonu kemoterapiyle sonuçlanmıştır. Özetle, antiapoptotik BCL-2 proteinlerine spesifik küçük inhibitör moleküllerin geliştirilmesi, var olan ilaçların etkinliğini güçlendirmek için değerlendirilmektedir ve gerekli kemo-/radyo-terapi dozunu azaltarak hastaya ilaç yüklenmesini azaltabilecek potansiyele sahiptir. Ancak, daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Delou ve ark., 2016).

4.3. RNAi-temelli Ajanlar için Uygun Taşıyıcı Sistemler

Gen tedavisi, hücrelere dışarıdan verilen genetik materyaller aracılığıyla protein ekspresyonunun tedavi amaçlı değiştirilmesini tanımlar. Gen terapisi çalışmalarının yoğunlukla gerçekleştirildiği hastalıklardan biri de kanserdir. Gen terapisi yaklaşımlarından biri olan RNA interferans (RNAi) mekanizmalarını terapötik amaçlı kullanımı sonucunda kanser destekleyici proteinlerin ekspresyonunu mRNA seviyesinde durdurulması hedeflenmektedir. Genelde RNAi aracılı terapötik teknikler, sentetik siRNA'ların kullanılıp protein ekspresyonunun seçici bir şekilde engellemesini içerir (gen knockdown) (Videira ve ark., 2014).

siRNA gibi RNAi temelli ajanlar, hastalıkların spesifik gen regülasyonu için geniş ölçüde çalışılmaktadır. Ancak biyolojik ortamda sınırlı stabilitesinden dolayı nükleik asit ilaçlarının hedef hücrelere taşınmasına yardımcı olması için çeşitli nanoteknolojiler kullanılmaktadır. Buna rağmen sınırlı hücre alım ve istenmeyen off-target etkiler klinikte kullanılmalarını büyük ölçüde sınırlandırmaktadır. Bu nedenle etkin ve güvenli RNAi tedavisi için yeni taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Okamoto ve Murawaki, 2012). siRNA ve miRNA'lar için viral (AV, AAV, RV ve LV) ve non-viral (PEG, kitozan ve lipozom) taşıyıcı sistemler kullanılarak tedavi etkinlikleri araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak viral ve non-viral taşıyıcı sistemlerden her birinin avantajı olduğu gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda iki farklı taşıyıcının üstünlüklerinden yararlanmak amacıyla hibrit vektörlerin kullanımı da önem kazanmıştır (Enomoto ve

ark., 2016; Kaban ve ark., 2017; Okamoto ve Murawaki, 2012; Shao ve ark., 2012). Ancak viral ve non viral taşıyıcılarla RNAi moleküllerinin istenilen hedefe ulaşmalarını sınırlayan bariyerlerin olmasından dolayı, küçük RNA terapötiklerinin tam potansiyelini gösterebilmesi için sistem biyodağılımının kontrol edilebileceği yeni taşıyıcı sistemlere ihtiyaç vardır (Lamichhane ve ark., 2016). Eksozomların küçük RNA'ların doğal taşıyıcıları olması ve oluştuğu hücreye spesifik yüzey markerları taşıması, terapötik RNA taşıyıcısı olarak kullanımını avantajlı ve ilgi çekici kılmaktadır. Ayrıca oluştuğu hücreye spesifik yüzey markerlarının olması hedeflenebilme potansiyeli de sağlamaktadır (Lamichhane ve ark., 2016; Pitt ve ark., 2016).

4.4. Eksozomlar

Eksozomlar, nükleik asit ve protein kargosu içeren küçük (30-150 nm) veziküllerdir. Sadece kültürdeki tüm hücre tipleri tarafından salgılanmakla kalmazlar, aynı zamanda kan, tükürük, idrar ve süt gibi diğer vücut sıvılarında da doğal olarak bulunurlar. Başlangıçta sadece hücrelerin gereksiz proteinlerden kurtulmasını sağlayan "çöp torbaları" olarak düşünülen eksozomlar, artık hücreler arası iletişimi sağlayan özel olarak salgılanmış veziküller olarak da bilinmektedir (Duan ve ark., 2021; Zhang ve ark., 2015).

Eksozomlar, organizmanın hem fizyolojik hem de patolojik durumlarında neredeyse tüm hücreler tarafından salınan ve protein, lipid ve nükleik asit gibi birçok molekülü hedef hücrelere taşıyan nanoveziküllerdir. Eksozomlar tarafından protein taşınması araştırma topluluğu tarafından kabul edilmiş olsa da, RNA'nın taşınması çok daha sonraya kadar gösterilmemiştir. Valadi ve ark. (2007), RNA'nın da eksozomlarda taşındığını kesin olarak gösteren ilk yayındır. Eksozomlar hedef hücre sitoplazmasına içeriklerinin transferini sağlayan ligand-reseptör etkileşimi veya plazma membran füzyonu gibi farklı mekanizmalar kullanarak yakın veya uzakta lokalize olan hedef hücrelerle etkileşebilmektedir (Munson ve Shukla, 2015). Böylece eksozomlar donör hücrenin sitoplazması ile ya hedef hücrenin ekstraselüler kompartmanı ya da tüm internal kompartmanları arasında yönlendirilmiş sinyalizasyon sistemi olarak iş görmektedir. Bu görüşler eksozomları translayonel araştırmalarda mevcut ilgi

alanlarının merkezine yerleştirmektedir ve gelecekte nanotıp uygulamaları için eksozomların potansiyel self-nanovektörler olacağını işaret etmektedir (Fais, 2013).

Bugüne kadar eksozomların diagnostik ve terapötik amaçlarla kullanıldığını bildiren birçok derleme vardır (Kugeratski ve Kalluri, 2021; Xia ve ark., 2020; Zhou ve ark., 2016). Özellikle kanser tedavisinde dendritik hücre kaynaklı eksozomlar oldukça fazla araştırılmıştır (Lu ve ark., 2017; Pitt ve ark., 2016). Ancak NK-kaynaklı eksozomlara ilişkin yayın sayısı yok denecek kadar azdır (Batista ve ark., 2021).

4.5. NK Hücreleri ve Eksozomları

İmmünoterapinin amacı, bağışıklık yanıtını uyarmak veya bağışıklık sisteminin kanser hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli patojenik faktörleri tanımasına ve ortadan kaldırmasına yardımcı olmaktır. Meme kanseri de dahil olmak üzere solid tümörleri hedef alan mevcut potansiyel immünoterapötik stratejiler, yaygın kanser aşıları ve monoklonal antikorlardır. Adoptif immünoterapi, lösemide kimerik antijen reseptörü (CAR-T) veya TCR-T hücre tedavisi olarak başarıyla uygulanmıştır; bu nedenle meme kanserinde her iki tedavi de düşünülmelidir (Zeng ve ark., 2021)..

NK hücreleri hem viral, bakteriyel ve diğer enfeksiyonlara karşı hem de kansere karşı erken konak savunmasında kritik bir rol oynayan doğal bağışık fonksiyonu ile büyük granüler lenfositlerdir. NK hücreleri duyarlı hale gelmeden önce de viral olarak enfekte hücreleri ve tümör hücrelerini öldürerek ve immunregülatör sitokin ve kemokinleri sentezleyerek efektör işlevini yerine getirirler (Corral Sánchez ve ark., 2020). Yaklaşık 20 yıl önce, NK hücre aracılı immunoterapi ileri evre lösemili hastalarda güvenli ve etkin bir tedavi uygulaması olarak ortaya çıkmıştır. Ardından, NK-hücre temelli kanser tedavisi araştırma alanı eksponensiyel olarak büyümüştür ve şu anda immünoterapi inovasyonunun önemli bir alanını oluşturmaktadır. Genel olarak, NK hücreye yönelik tedavilerin geliştirilmesinin iki ana odak noktası vardır. Bunlardan biri terapötik NK hücrelerinin kaynağını adaptif transfer için optimize etmek iken diğeri NK hücre sitotoksitesini ve in vivo kalıcılığını arttırmaktır.

Son yıllarda insan NK hücrelerinin de hem aktive hem de aktive olmamış durumlarda eksozom saldıkları gösterilmiştir. Ayrıca NK hücre kaynaklı eksozomların hem NK

markerları (CD56 gibi) ve öldürücü proteinleri (FasL ve perforin gibi) eksprese ettiği hem de antitümör ve immün homeostatik aktivitelerini NK hücrelerine benzer şekilde kullandığı tespit edilmiştir. NK hücrelerinin aktivasyonundan bağımsız olarak eksozom sekresyonu NK eksozomlarının spesifik stimulusa ihtiyaç duymadan immün cevabın kontrolüne katıldıklarını desteklemektedir (Fais, 2013; Lugini ve ark., 2012).

Lugini ve ark. (2012) çalışmasında, NK hücre markerlarını eksprese eden sağlıklı insan plazmasından eksozomları saflaştırarak, bu eksozomların farklı insan tümör hücrelerine karşı sitotoksik aktivite gösterdiğini ve immün hücreleri aktifleştirdiğini saptamışlardır. Bu çalışma NK hücre kaynaklı eksozomların farklı tümörlere karşı terapötik potansiyelini göstermektedir. Ancak NK hücre kaynaklı eksozomlarının gen taşıyıcısı olarak kullanıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Araç ve Gereçler

5.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

BCL-2 antikor	Novus Biologicals, ABD
Kaspaz-3 antikor	Novus Biologicals, ABD
HRP/DAB polimer kit	Abcam, ABD
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, ABD
Exo-spin™ Eksozom izolasyon kiti	CELL guidance system, ABD
IMDM besiyeri	Gibco, ABD
DMEM besiyeri	Gibco, ABD
Trypsin/EDTA	Gibco, ABD
Fetal bovine serum	Gibco, ABD
OptiMEM	Gibco, ABD
TransIT	MirusBio, ABD
Fikol	Sigma Aldrich, ABD
Amicon Ultra Santrifüj Tüpleri	Millipore, Almanya
Metiltiyazoliltetrazolyum (MTT)	Promega, ABD
CellTiter-Glo® 2.0 Assay	Promega, ABD
Acrodisc® 0,45 um filtre	Pall, ABD
NucBlue™ Live Cell Stain ReadyProbes	Thermo, ABD
anti-human Bcl-2 primer antikor	Abcam, ABD
anti-human Caspase-3 primer antikor	Abcam, ABD

5.1.2. Kullanılan vektörler

Tablo 2. İlgili genlerin dizileri (Sancak ve ark., 2008; Sarbassov ve ark., 2005; Stewart ve ark., 2003)

shRNA	Raportör	Vektör ID	Hedef Diziler (5'-3')
shScrambled	None	Addgene #1864	CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG
shGFP	None	Addgene #30323	GCAAGCTGACCCTGAAGTTCAT
shScrambled	eGFP	VB190131- 1072gtc	CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG
shBCL-2	eGFP	VB190131-1073stf	CGGGAGATAGTGATGAAGTACA TCCATTA
Ekspresyon Vektörleri	Raportör	Vektör ID	
Stuffer	eGFP	VB181209- 1075efx	
pCMV- dR8.2 dvpr	-	Addgene #8455	
pCMV- VSV-G	-	Addgene #8454	

5.1.3. Hücre hatları

İnsan NK hücre hattı NK92MI ATCC'den (Manassas, VA, ABD) satın alındı. HeLa, HEK293T, K562, MCF-7, MCF-10A ve MDA-MB-231 hücre hatları DSMZ-Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürleri Koleksiyonundan (Braunschweig, Almanya)

temin edildi. NK92MI hücreleri IMDM besiyerinde (LifeTech, Paisley, Birleşik Krallık) kültüre edildi. K562 ve HeLa hücrelerinin RPMI 1640 besiyeride (LifeTech) devamlılığı sağlandı. HEK293T, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri DMEM besiyerinde (LifeTech) kültürlendi. MCF-10A hücreleri, %5 at serumu, 20 ng/mL EGF, 0,5 µg/mL hidrokortizon, 100 ng/mL kolera toksini, 10 µg/mL insülin, 100 µg/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin ile desteklenmiş DMEM/F12 (LifeTech) besiyerinde kültüre edildi. Aksi belirtilmedikçe, her besiyeri %10 FBS, 100 µg/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin ile desteklendi ve hücreler %5 CO₂ ile 37°C' de kültüre edildi.

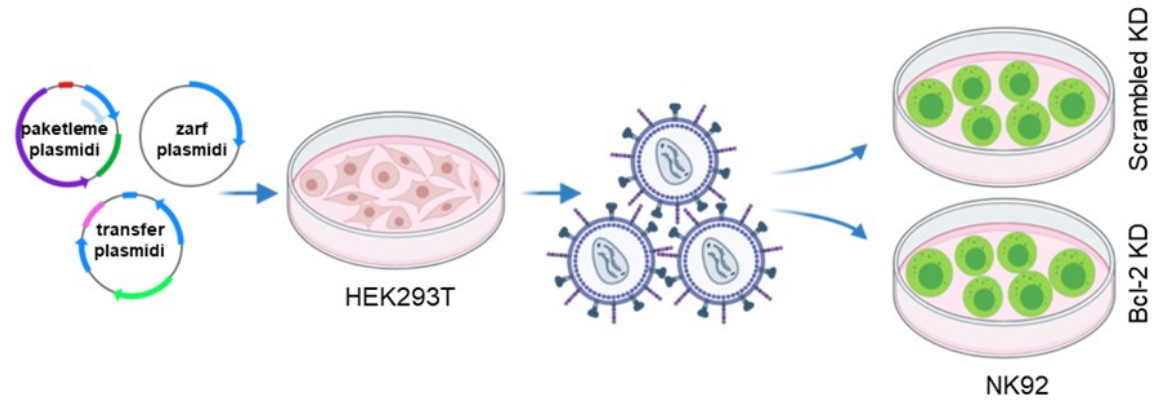


5.2. YÖNTEM

5.2.1. Stabil hücre hatlarının oluşturulması

5.2.1.1. Lentiviral partikül üretimi

Viral vektör üretimi için, insan embriyonik böbrek hücre hattı HEK293T kullanıldı. HEK293T hücreleri zarf (pCMV-VSV-G), paketleme (pCMV delta R8.2) ve transfer vektörleri ile TransIT (Mirus Bio, Madison, WI, ABD) transfeksiyon reaktifi ile üretici protokolüne göre transfekte edildi. Transfer vektörü olarak BCL-2, GFP (yeşil floresan proteini) (pLKO.1) hedefleyen, GFP eksprese eden Stuffer veya kontrol (Scrambled sequence, Scr) olarak hedefi olmayan shRNA içeren transfer vektörleri kullanıldı. GFP ekspresyon vektörü olarak Stuffer-GFP vektörü kullanıldı. İlgili genlerin hedef dizileri Tablo 2’de gösterildi.



Resim 1. NK92MI hücrelerine LV transdüksiyonun akış şeması

5.2.1.1.1. Plasmid amplifikasyonu

BCL-2 shRNA, Stuffer-GFP, GFP shRNA ve Scrambled shRNA pLenti-yapısı, plazmid amplifikasyonu için kompetent E.Coli Dh5alfa suşuna transforme edildi. Kompetent hücreler -80°C’den çıkarıldı ve buz üzerinde (yaklaşık 20-30 dakika) çözüldü. 1-5µl DNA (genellikle 10pg-100ng) ve 20-50µl (40µl) DH5alfa bir mikrosantrifüj veya falkon tüp içinde birleştirildi ve tüpün alt kısmına parmakla birkaç

kez hafifçe vurarak karıştırıldı. Kompetent hücre / DNA karışımı, 20-30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi. Her bir transformasyon tüpü, tüpün 2/3'ü su içerisinde olacak şekilde 30-60 saniye 42°C su banyosunda bekletildi. Kompetent hücre/DNA karışımı 2 dakika tekrar buz üzerine konuldu ve ardından 250-1000 µl LB besiyeri eklendi ve 37°C çalkalayıcılı inkübatörde 45 dakika inkübe edildi. Daha sonra oda sıcaklığında olan Ampisilin/Kanamisin içeren agar plate'e transformasyonun bir kısmı ekildi ve 37°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plate üzerinde tek koloni oluşumu gözlemlendi ve seçilen tek bir koloni antibiyotik içeren 10ml LB besiyerine inoküle edildi ve 8 saat çalkalayıcılı inkübatörde 37°C'de inkübe edildi. Ardından 300µl başlangıç kültürü antibiyotik içeren 300ml LB besiyerine inoküle edildi ve bir gece çalkalayıcılı inkübatörde inkübe edildi ve QIAGEN® Plasmid Maxi Kit kullanılarak üretici protokolüne uygun olarak plasmid izolasyonu yapıldı.

5.2.1.1.2. pLenti-plazmitlerinin spektrofotometrik kontrolü

İzole edilen plasmidin UV spektrofotometrede maksimum absorbands gösterdikleri 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbands değerleri ölçüldü. DNA miktarı ve saflığı spektrofotometrik olarak incelendi.

5.2.1.1.3. pLenti-plazmitlerinin elektroforetik kontrolü

Çalışmada izole edilen plazmidlerin yapısı agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi. Bu amaçla agaroz, %0,8 (a/h) konsantrasyonda olacak şekilde, 1xTAE içerisinde kaynatılarak çözündürüldü. Çözeltinin sıcaklığı 55-60°C'ye indiğinde 0,05µg/ml final konsantrasyonda nükleik asid boyama solüsyonu eklendi ve yatay jel kasetlerine döküldü. Agaroz jel donduktan sonra 1xTAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Plazmid örnekleri 5:1 oranında 6x yükleme tamponu ile karıştırılarak jele uygulandı. Elektroforez işlemi 80mA sabit elektrik akımı altında 60 dakikada tamamlandı. Bantlar UV transillüminatör ile görünür hale getirildi ve dijital görüntüleme sisteminde incelendi.

5.2.1.1.4. Lentiviral vektör üretimi

6 kuyucuklu plakaya 3 ml besiyeri içerisinde 1×10^6 293T hücreleri ekildi ve hücrelerin yüzeye tutunması için 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde bir gece inkübe edildi. Birinci gün; Opti-MEM®-I ve TransIT oda sıcaklığına getirildi. Bir gece inkübe edilen 293T hücrelerinin besiyeri atıldı ve 5ml/kuyucuk FBS ve P/S içermeyen DMEM-GlutaMAX™-I besiyeri eklendi ve 1 saat 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sırasında transfeksiyon solüsyonu aşağıdaki gibi hazırlandı.

Her bir kuyucuk için transfeksiyon karışımı;

----- μl →3,5 μg vector (Transfer vektörler)

----- μl →1,2 μg VSV-g

----- μl →2,3 μg $\Delta\text{R8.9}$ (gag, pol, rev)

540 μl →Opti-MEM

Reaksiyon solüsyonunu pipetleyerek iyice karışması sağlandı. Daha sonra 16 μl TransIT transfeksiyon ajanı eklendi ve fiskeleme ile karışması sağlandı ve 20-30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonunda reaksiyon solüsyonları kuyucuklara 1000 μl pipet kullanılarak damlatma yöntemi ile verildi ve 16 saat 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde inkübe edildi.

İkinci gün; virüs içeren süpernatant atıldı ve %10 FBS ve %1 P/S içeren 2ml DMEM-GlutaMAX™-I eklenerek 24 saat inkübe edildi. Transfeksiyonu takip eden 3. ve 4. günlerde, virüs içeren süpernatantlar toplanarak hücre debrisini ayırmak için 0,45 μm düşük protein bağlama kapasiteli membran filtreden (Acrodisc® Syringe Filters with Supor® Membrane, PALL) geçirilerek 15ml'lik falkonlara her 24 saatte bir toplandı ve virüs üretimi ve hücrelerin devamlılığı için taze besiyeri eklendi. Dördüncü günün sonunda 293T hücreleri atıldı.

5.2.1.2. Viral titre tayini

5.2.1.2.1. q-PCR-temelli viral titre tayini

qPCR ile titre belirleme işlemi için -80°C’de saklanan 150µl viral süpernatant çözündürüldü. Tayin için revers transkripsiyon için gerekli reaktifleri ve primerleri içeren karışımı sağlayan qPCR Lentivirus Titration Kit kullanıldı. 18µl Virüs lizis tampona 2µl viral supernatant eklendi ve 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübe edilen viral lizatin Ct değeri viral titreyi belirlemek için kullanıldı. Yöntem üretici protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Her reaksiyon n = 3 olacak şekilde çalışıldı. Reaksiyon LightCycler 480 (kantitatif PCR (Roche)) cihazında çalışıldı. Kit standartlarından elde edilen kopya sayısına göre örneğimizdeki kopya sayısı kit protokolünde verilen aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\text{Viral lizatin titres} = 5 \times 10^7 / 2^{3(C_{tx} - C_{t1}) / (C_{t2} - C_{t1})} \times \text{dilüsyon oranı}$$

C_{tx} = Örneğin 3 Ct değerinin ortalaması

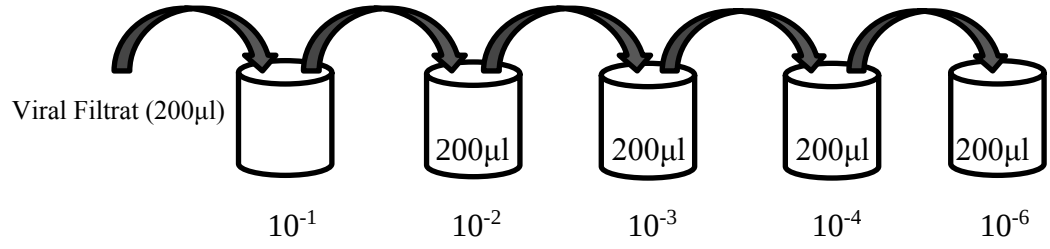
C_{t1} = STD1’in 3 Ct değerinin ortalaması

C_{t2} = STD2’nin 3 Ct değerinin ortalaması

RT-PCR yöntemi ile örnekteki genin kopya sayısı belirlenmektedir. Ancak bu lentivirüsün biyolojik enfektivitesini göstermemektedir. Bu nedenle enfektivite katsayısının ek bir biyolojik titreleme yöntemi ile qPCR titre ve biyolojik titre arasındaki oranı elde edebilmek için belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla biyolojik viral titre belirlendi.

5.2.1.2.2. Biyolojik titre tayini

Biyolojik viral titre belirlemek için, insan serviks adenokarsinom hücre hattı, HeLa kullanıldı. Tayinin birinci gününde 6 kuyucuklu plakaya 2x10⁵ HeLa hücreleri ekildi ve hücrelerin yüzeye tutunmaları için 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde bir gece inkübe edildi. Tayinin ikinci gününde %10 FBS içeren DMEM besiyerinde 10⁻¹’den 10⁻⁵’e 10-kat viral dilüsyon serisi aşağıda şematize edildiği gibi hazırlandı. Her tüpe 1800µl besiyeri eklenerek toplam hacim 2000µl olarak ayarlandı.



Resim 2. Viral dilüsyon serileri oluşum şeması

Hücreler 1xPBS ile dikkatlice yıkandı ve 1 kuyucuk kontrol olarak belirlendi ve 1'er ml dilüe edilmiş virüs içeren besiyeri kontrol dışında belirlenen diğer kuyucuklara eklendi. Her kuyucuğa 8µg/ml olacak şekilde Polybren eklendi ve bir gece inkübe edildi. Üçüncü gün virüs içeren besiyeri atıldı ve 2'şer ml %10 FBS ve 1% Penisilin-Streptomisin içeren RPMI 1640 besiyeri eklendi. Dördüncü gün besiyeri tekrar atıldı ve transdükte olan hücreleri seçmek için 2,5µg/ml puromisin içeren besiyeri eklendi. Tayinin dördüncü gününü takip eden her 3-4 günde bir besiyeri, 2,5µg/ml puromisin içeren taze besiyeri ile yer değiştirildi. Seleksiyon besiyerindeki 10. günde, kontrol kuyucuğunda hücre olması beklenmezken, örnek kuyularında puromisin dirençli koloniler beklenmektedir. Kuyucuklardan besiyeri kaldırıldı ve kuyucuklar 2 defa PBS ile yıkandı. 1ml Kristal Viyole solüsyonu (%10 etanol içerisinde %1 a/h) eklendi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra Kristal Viyole solüsyonu alınarak 2 defa PBS ile yıkandı. Dilüsyon oranına göre kuyucuklarda gözlenen mavi koloni sayıları not alınarak, aşağıdaki eşitliğe göre titre hesaplandı: (TU; Transducing unit)

$TU/ml = (\text{mavi koloni sayısı} / \text{dilüsyon faktörü}) / \text{kullanılan enfeksiyon besiyerinin hacmi}$

5.2.1.2.3. Flow sitometri ile titre tayini

Flow sitometri ile viral titre belirlemek için insan serviks adenokarsinom hücre hattı, HeLa kullanıldı. 10^5 /kuyucuk HeLa hücresi 6 kuyucuklu plate'e ekildi ve hücrelerin tutunması için 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde bir gece inkübe edildi. Ertesi gün besiyeri kaldırıldı ve hücreler 1xPBS ile bir kez yıkandı. Tablo 3'de verildiği gibi %2 FBS veya OptiMEM içeren RPMI besiyerinde karışımlar hazırlandı. Kuyucuklara

numaralar verildi ve hazırlanan karışımlar kuyucuklara eklendi. Transdüksiyon için polybren transfeksiyon ajanı kullanıldı.

Tablo 3. Flow sitometri ile viral titre tayini için oluşturulan gruplar

10 ⁵ HeLa hücresi 8µg/ml Polybrene 500µl virüs (Bcl-2 shRNA LV) Besiyeri	10 ⁵ HeLa hücresi 8µg/ml Polybrene 100µl virüs (Bcl-2 shRNA LV) Besiyeri	10 ⁵ HeLa hücresi 8µg/ml Polybrene 50µl virüs (Bcl-2 shRNA LV) Besiyeri
10 ⁵ HeLa hücresi 8µg/ml Polybrene 20µl virüs (Bcl-2 shRNA LV) Besiyeri	10 ⁵ HeLa hücresi 8µg/ml Polybrene 5µl virüs (Bcl-2 shRNA LV) Besiyeri	10 ⁵ HeLa hücresi Besiyeri
10 ⁵ HeLa hücresi 8µg/ml Polybrene 500µl virüs (Scr-shRNA LV) Besiyeri	10 ⁵ HeLa hücresi 8µg/ml Polybrene 50µl virüs (Scr-shRNA LV) Besiyeri	10 ⁵ HeLa hücresi 8µg/ml Polybrene 5µl virüs (Scr-shRNA LV) Besiyeri
10 ⁵ HeLa hücresi 8µg/ml Polybrene 20µl virüs (Scr-shRNA LV) Besiyeri	10 ⁵ HeLa hücresi 8µg/ml Polybrene 5µl virüs (Scr-shRNA LV) Besiyeri	10 ⁵ HeLa hücresi Besiyeri

İkinci gün, besiyeri 2ml taze besiyeri ile değiştirildi. Dördüncü gün, hücreler 2ml PBS ile yıkandı ve 37°C’de 1 dakika boyunca 250ml Trypsin / EDTA ile hücreler kaldırıldı. Ardından tripsin ve EDTA’yı inaktive etmek için 250µl besiyeri eklendi ve hücreleri tekrar süspanse etmek için iyice karıştırıldı.

Hücreler, 200g’de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Hücreler iki kez PBS ile yıkandı ve sonra hücreleri fikse etmek amacı ile %4 paraformaldehit eklendi ve -20°C’de 2 saat inkübe edildi. Daha sonra hacmi 1 ml’ye tamamlamak için PBS ilave edildi ve

fiksativin çıkarılması için 11,000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Fiksativ/PBS karışımı atıldı ve yeniden PBS ile süspanse edildi ve FACS tüplerinde GFP-pozitif hücrelerin yüzdesi flow sitometri ile belirlendi. Titre hesaplamak için aşağıdaki formülasyon kullanıldı:

$$((1 \times 10^5 \text{ hücre} \times \% \text{ GFP-pozitif hücre}) \times 1000) / \text{Vektör hacmi } (\mu\text{l})$$

5.2.1.3. Puromisin direncinin belirlenmesi

Puromisin direncinin belirlenmesi, transdüksiyon sonrasında etkili bir seleksiyon yapabilmek için oldukça önemlidir. NK9MI ve assay kontrolü için 293T hücrelerini kullanarak, hücreleri öldürmek için gerekli puromisin konsantrasyonunu tayin etmek amacıyla, hücreler farklı puromisin konsantrasyonları ile 72 saat boyunca muamele edildi ve daha sonra hücre canlılığı CellTiter-Glo® ile belirlendi. Yöntem üretici protokolüne uygun olarak yapıldı.

5.2.1.4. Lentiviral partiküllerin hücrelere transdüksiyonu

qPCR titrasyon analizi sonuçlarına göre, 20-100 MOI viral partikülleri kullanıldı. Viral süpernatantın ml başına 1µl polibren eklendi ve vorteks ile karışması sağlandı. Süspansiyon, hücrelere damlatma yöntemi ile eklendi ve 6 saat boyunca 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, süpernatant atıldı ve 2ml besiyeri eklendi ve inkübatörde gece boyunca inkübe edildi.

Dördüncü günde, hücreler 15ml falkonlara toplandı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant aspire edildi. 0,5x10⁶/ml hücre, 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Yedinci ve dokuzuncu günde transdükte olan hücrelerin seleksiyonunu yapabilmek için transdükte edilen hücrelere 2µg/ml puromisin ilavesi yapıldı.

Puromisin seleksiyon aşaması sonrasında transdükte edilen NK92MI hücrelerinden en az 5 klon seçildi ve BCL-2 mRNA ekspresyon seviyeleri belirlendikten sonra istenilen ekspresyon seviyesindeki klon seçilerek, çalışmalara seçilen klon ile devam edildi.

5.2.2. Flow sitometri

Lentiviral transdüksiyon sonrasında hücrelerin GFP seviyelerinin tespiti, ve MCF-7 hücrelerinin NKExolar ile transfeksiyonu sonrasında tedavi etkinliğinin araştırılması flow sitometri ile yapıldı. Assay için 96 kuyucuklu hücre kültür plakası kullanıldı. Hücre dansitesi kuyucuk başına $0,2-0,5 \times 10^6$ hücre olarak ayarlandı. Hücre plakası santrifüj edildi ve supernatant atıldı. Hücre peletini yıkamak için 2 defa 100µl/kuyucuk Facs tamponu ile resüspande edildi ve 2000 rpm’de 2 dakika tekrar santrifüj edilerek supernatant atıldı. Ardından hücre peleti 100µl Facs tamponu ile tekrar resüspande edilerek Facs tüplerine transfer edildi. Ölçümden önce, ölü hücreleri dışlamak için 7-AAD (1:100; 7-AAD: FACS Tamponu) Facs tüplerine eklendi. TMRE (200 nM) (Sigma, St. Louis, ABD) ve Annexin V-PE (1:25) (BD Biosciences) üreticilerin talimatlarına göre kullanıldı. Ölçümler, FACS Canto (BD Biosciences) cihazında yapıldı ve FlowJo_V10.5.3 yazılımı (FlowJo LCC, BD, Ashland, OR, ABD) kullanılarak analiz yapıldı.

5.2.2.1. İntraselüler flow sitometri

İntraselüler flow sitometri için hücreler transdüksiyon sonra doğrudan veya 24 saat boyunca belirtilen konsantrasyonlarda siScr veya siBCL-2 yüklü NKExos ile muamele edildi. Hücrelerde BCL-2 protein miktarındaki değişikliği tespit etmek için hücre içi antikor ile işaretleme yapıldı. Bu amaçla, Anti-BCL-2 Ab (#15071, 1:100) (Cell Signaling, Danvers, MA, ABD) kullanıldı. Fiksasyon tamponu ile inkübe edilmiş hücreler, Cytfix/Cytoperm Fiksasyon/Permeabilizasyon Solüsyon Kiti (BD Biosciences, Heidelberg, Almanya) solüsyonu kullanılarak üretici protokolüne uygun olarak fikse ve permabilize edildikten sonra primer antikor ile 40 dakika inkübe edildi. Ardından goat anti-mouse PE konjugatı (1:100) (Agilent, Santa Clara, CA, ABD) ile 15 dakika inkübe edilerek işaretleme yapıldı. Kontrol olarak mIgG1 kullanıldı. Ölçüm BD FACSCanto™ II cihazında yapıldı. FlowJo programı kullanılarak analiz edildi. SFI (Spesifik floresan indeksi) değeri BCL-2 ile elde edilen ortalama floresanın (MFI; ortalama floresan yoğunluğu), IgG isotip kontrolünden elde edilen MFI’ya bölünmesi ile elde edilmiştir.

5.2.3. Kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR)

Öncelikle shScrambled ve shBCL-2 LV ile transdükte edilen hücrelerin ve siScrambled ve siBCL-2 NKExolar ile transfekte edilen hücrelerin BCL-2 gen ekspresyon seviyeleri, qRT-PCR metodu ile belirlendi. RNA izolasyonu için High Pure RNA isolation kit (Roche, Germany) kullanıldı ve yöntem üretici protokolüne göre yapıldı. İzole edilen RNA'lerden cDNA sentezlemek için Fast Gene Scriptase II cDNA Synthesis 5x ready mix (Nippon, EU) kullanıldı. GAPDH, housekeeping gen olarak kullanıldı. Ardından qRT-PCR, hedef ve GAPDH genleri, PerfeCta SYBR Green FastMix mix (Quantabio, US) ve spesifik primerler ile LightCycler 480 (Roche, Germany) kullanılarak üretici protokolüne uygun olarak yapıldı.

5.2.4. NK hücre sitotoksitesinin analizi

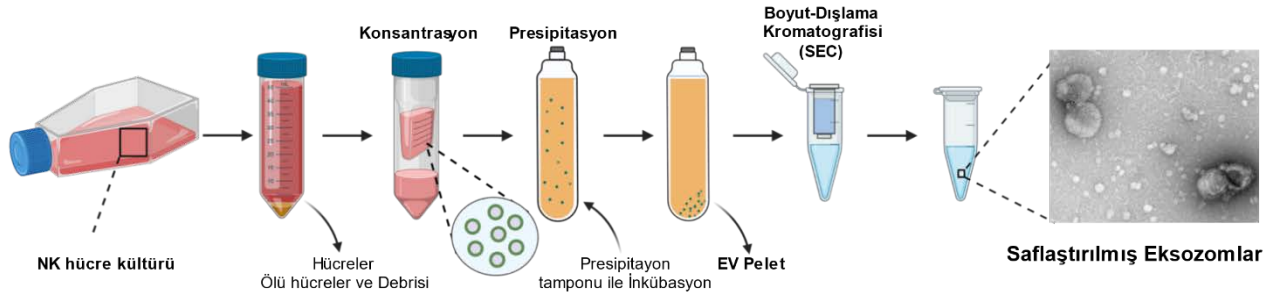
İnsan lösemi hücre hattı, K562 hücrelerinin NK92MI hücreleri tarafından parçalanması Schmied ve ark. (2019) tarafından tarif edildiği gibi 2 saatlik Europium bazlı sitotoksite deneyleri ile değerlendirilmiştir (Schmied ve ark., 2019).

Spesifik lizis aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$100 \times (\text{deneysel salım-spontan salım})/(\text{maksimum salım-spontan salım})$$

5.2.5 Eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu

Eksozom izolasyonu aşamalarında, hücreler eksozomlardan arındırılmış FBS içeren taze besiyeri ile kültüre edilmiştir. Burada amaç; FBS'nin içerdiği eksozomların, bu çalışmada elde edilen eksozomlarla girişim yapmasının ve hatalı sonuç vermesinin önlenmesidir. Eksozom izolasyonu akış şeması Resim 3'de şematize edilmiştir.



Resim 3. Eksozom izolasyonu akış şeması

5.2.5.1 Eksozom izolasyonu

NKExo elde etmek için, NK92MI hücreleri 48 saat boyunca %10 eksozomdan arındırılmış FBS (Biowest, Nuaille, Fransa) içeren ortamda kültüre edildi. Ardından ilk olarak hücreleri ayırmak için 300 g'de 4°C'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. İkinci adım olarak, kalan hücre artıkları ve büyük vezikülleri ortadan kaldırmak için 16,000 g'de 30 dakika boyunca 4°C'de bir Type 60 Ti sabit açılı rotor içinde ultrasantrifüj ile santrifüjlendi. Ardından, eksozomlar 100K Amicon® Ultra-15 santrifüj filtreleri (Merck Millipore, Co cork, İrlanda) kullanılarak konsantre edildi. Konsantrasyon işleminden sonra, üst faz toplandı ve 1:2 oranda Exo-spin™ tamponu eklendi. Tüpü ters düz ederek iyice karışması sağlandı ve en az 1 saat veya gece boyunca silindir çalkalayıcı üzerinde 4°C'de inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda karışım 16,000 g'de 1 saat boyunca santrifüj edildi. Daha sonra üst faz aspire edilerek atıldı ve peletin kurumasına mücadele etmeden 100µl PBS ile resüspande edildi. Ardından kit tarafından sağlanan boyut dışlama kolonları kullanılarak izolasyon işlemi üreticinin talimatlarına göre Exo-spin™ Eksozom Saflaştırma kiti (Cell Guidance Systems, Cambridge, İngiltere) kullanılarak tamamlandı. Saflaştırılan eksozomlar bir sonraki kullanıma kadar 80°C'de saklanmıştır.

5.2.5.2 Eksozom karakterizasyonu

5.2.5.2.1 Eksozomların partikül boyut ölçümleri

Eksozomların partikül büyüklükleri NTA (NanoTracking Analyser) (Malvern, U.K.) kullanılarak belirlendi. Bu amaçla, eksozom solüsyonları pH 7.4 PBS tamponu içerisinde dilüe edilerek ölçüldü. Her bir formülasyon için, n = 3 olacak şekilde ölçüm alındı ve ölçüm sonuçlarının ortalaması alındı. Analiz ZetaView yazılımı kullanılarak yapıldı.

5.2.5.2.2 Elektron mikroskobu ile karakterizasyon

İzole edilen eksozomların yüzey özelliklerinin belirlenebilmesi ve büyüklük kontrolü için geçirimli elektron mikroskobu (TEM; Transmission Electron Microcopy) kullanıldı. İmmünogold boyama ve TEM ile fotoğrafların çekilmesi DKFZ Core Facility Unit Electron Microscopy (Heidelberg, Almanya) tarafından gerçekleştirilmiştir. İmmün boyama için CD56 (klon: MEM-188, Biolegend), CD63 (klon: H5C6, BD Biosciences) ve izotip kontrolleri kullanılmış, ardından 5 nm altın partiküllere konjuge edilmiş bir tavşan-anti-fare antikoru kullanılmıştır. Örnekler 63.000x büyütmede EM910 (Zeiss, Oberkochen, Almanya) transmisyon elektron mikroskobu kullanılarak analiz edilmiştir.

5.2.5.2.3 Eksozom miktar tayini

Eksozom miktar tayini için eksozom spesifik CD63 TRIFic™ kiti kullanıldı. Protokol kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Negatif kontrolde eksozom dilüenti olarak PBS kullanıldı. Kitin sağladığı streptavidin kaplı deney plakası biotinlenmiş-CD63 antikoru ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Yıkama adımları sonrasında ikinci adım olarak izole edilen eksozomlar deney kuyucuklarına eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu adımda eksozom solüsyonu içerisindeki eksozomlar veya serbest antijenler antikor tarafından yakalanmaktadır. Bir sonraki adımda kuyucuklara Europium-işaretli antikor eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu adımda eklenen Europium-işaretli antikorlar, biotinlenmiş antikor ile aynı epitopu yakaladığı

için serbest antijenlere bağlanmamakta ve spesifik olarak eksozomlar tayin edilmektedir. Europium okuyucu (Perkin Elmer, USA) kullanılarak floresan ölçülmüştür. Kit içerisinde bulunan eksozom kullanılarak standart eğri oluşturuldu. Eğride ölçütler yerine konularak konsantrasyon belirlendi.

5.2.6 Eksozomların hedef hücelere internalizasyonunun kontrolü

GFP pozitif MCF-7 hücre hattı 6 kuyucuklu plakalarda ekildi ve gece boyunca yüzeye tutanmaları için inkübe edildi. Eksozomlar Dil (3H-Indolium) ile Liang ve arkadaşlarının (2016) çalışmasında belirtildiği yöntemle uygun şekilde renklendirildi ve boyanın fazlasını gidermek için PBS ile yıkandı (Liang ve ark., 2016). Ardından Dil ile renklendirilmiş eksozomlar, MCF-7 hücrelerine transfekte edildi ve 6 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından nükleusu boyamak için NucBlue™ Live Cell Stain ReadyProbes (Hoechst 33342) solüsyonu kullandı. Yöntem üretici firmanın protokolüne uygun şekilde yapıldı. Renklendirilmiş eksozomların internalizasyonunu gözlemlemek için floresan mikroskop ile fotoğrafları çekildi.

5.2.7 Canlı hücre analizleri

GFP⁺ MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin çalışmaların yürütüleceği hücre plakalarındaki uygun hücre yoğunluğunu tayin edebilmek için IncuCyte® S3 canlı hücre analiz sistemi (Essen BioScience, UK) kullanıldı. 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarına farklı miktarlarda hücrelerin (2,5, 5, 10, 20 ve 40x10³) ekimi yapıldı ve 72 saat boyunca her 4 saatte 1 fotoğrafları çekildi. Ardından yüzde hücre doluluk oranı IncuCyte® S3 canlı hücre analiz sistem (Essen BioScience, UK) yazılımı kullanılarak analiz edildi. 48 saat sonra %50 doluluk oranına ulaşan hücre sayısı devam eden deneylerde kullanıldı.

Apoptotik özellik kazandıran FasL, Perforin proteinlerini taşıyan NK hücrelerinden BCL-2 shRNA lentiviral transdüksiyonu sonrasında elde edilen eksozomların meme kanser hücrelerinde apoptozu indükleyeceği öngörülmüştür. Apoptozun 3 farklı yolağında görevli proteinlerin (BCL-2, FasL ve Perforin) varlığından dolayı BCL-2

siRNA NKExoları ile tedavi edilen hücrelerde apoptozun indüksiyonunun kaçınılmaz olması beklenmektedir. Bu amaçla izole edilen eksozomların hücrelere uygulanmasından sonra, Annexin V ve Kaspaz-3/7 aktivasyon tayini MCF-7 hücrelerinde, sırasıyla Incucyte® Annexin V Red Dye ve Incucyte® Caspase-3/7 Red Reagent (Essen BioScience, UK) kullanılarak üretici protokolüne uygun olarak yapıldı. Pozitif kontrol olarak Staurosporin (2,5µm) (Abcam, Cambridge, İngiltere) kullanıldı. Görüntüleme ve analiz IncuCyte® S3 canlı hücre analiz sistemi (Essen BioScience, UK) kullanılarak yapıldı.

5.2.8 Kaspaz-9 aktivasyon tayini

Hücreler (kuyu başına 1×10^4) 96 kuyulu bir plakaya (Nunclon™ Delta Surface, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) ekildi ve siScr, siBCL-2 NKExolar veya pozitif kontrol olarak Staurosporin (2,5µm) (Abcam, Cambridge, İngiltere) ile inkübe edildi. 24 saat sonra, CaspaseGlo® 9 Assay (Promega, Madison, WI, ABD) kullanılarak üreticinin talimatlarına göre Caspase 9 aktivitesi ölçüldü.

5.2.9. İstatistiksel değerlendirme

Proje kapsamında elde edilen değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her bir deney, en az 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Veriler, uygun istatistiksel analizler (ANOVA, Ki-kare ve/veya Student's t gibi) ve Graphpad Prism 9 Version 9.4.1 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. $P < 0,05$ olduğu durumlar, anlamlı bir fark olarak değerlendirilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Lentiviral Partikül Üretimi ve Viral Titre Tayinine İlişkin Bulgular

Lentiviral partiküller yöntem 5.2.1.1’de belirtildiği şekilde hazırlandı. Virüs üretiminden sonra, süpernatantlarda ki lentivirüslerin titrasyonu yöntem 5.2.1.2’de belirtildiği gibi tayin edildi.

6.1.1. pLenti- plazmidlerinin spektrofotometrik kontrolüne ilişkin bulgular

Plasmid DNA konsantrasyonu spektrofotometrik olarak yöntem 5.2.1.1.2’de belirtildiği gibi tayin edildi. Lentiviral plazmidlerin spektrofotometrik ölçüm değerleri Tablo 4’de verilmiştir.

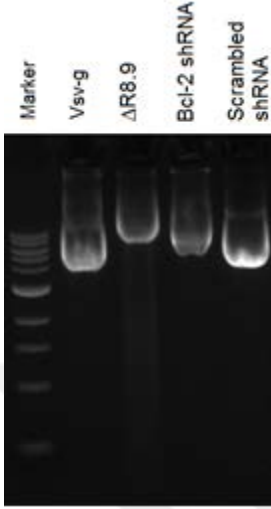
Tablo 4. Lentiviral plazmidlerin spektrofotometrik ölçüm sonuçları

	Addgene				Vectorbuilder
	Vsv-g	Δ R8.9	Scrambled p-Lenti shRNA	GFP p-Lenti shRNA	pLV-Exp-Stuffer
OD ₂₆₀	10,953	5,044	18751	7,383	16,797
OD ₂₈₀	5,794	2,696	9,912	3,873	8,946
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	1,89	1,87	1,89	1,91	1,88
DNA Konsantrasyonu (ng/ul)	547,7	252,2	938,5	369,1	839,8

Hesaplanan pDNA konsantrasyonu [pDNA konsantrasyonu (μ g) = OD₂₆₀ x katsayı (50) x dilüsyon oranı] ve spektrofotometrik ölçümlere bağlı sonuçlar birbirini doğrulamaktadır.

6.1.2. pLenti- plazmidlerinin elektroforetik kontrolüne ilişkin bulgular

İzole edilen lentiviral plazmid elektroforetik olarak yöntem 5.2.1.1.3’de belirtildiği gibi kontrol edildi ve agaroz jel fotoğrafı Şekil 1’de verildi.



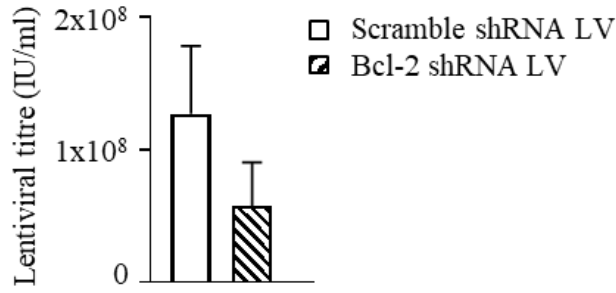
Şekil 1. Lentiviral paketleme plazmidleri ve hedef plazmidlerin agaroz jel elektroforez görüntüleri

6.1.3. Viral titre tayinine ilişkin bulgular

Viral vektörler yöntem 5.2.1.1.4’de belirtildiği gibi üretildi ve elde edilen viral süpernatantların viral titrasyonu belirlendi.

6.1.3.1. q-PCR-temelli viral titre tayini

Lentiviral titre tayini, yöntem 5.2.1.2.1’de belirtildiği şekilde RT-PCR titrasyon yöntemi kullanılarak yapıldı. Veriler formülde yerine koyulduğunda, yaklaşık olarak ml’de $30-300 \times 10^7$ IU (Enfeksiyöz Birimi; Infectious Units) elde edildi (Şekil 2).



Şekil 2. Lentivirüslerin qPCR-temelli viral titrasyonu

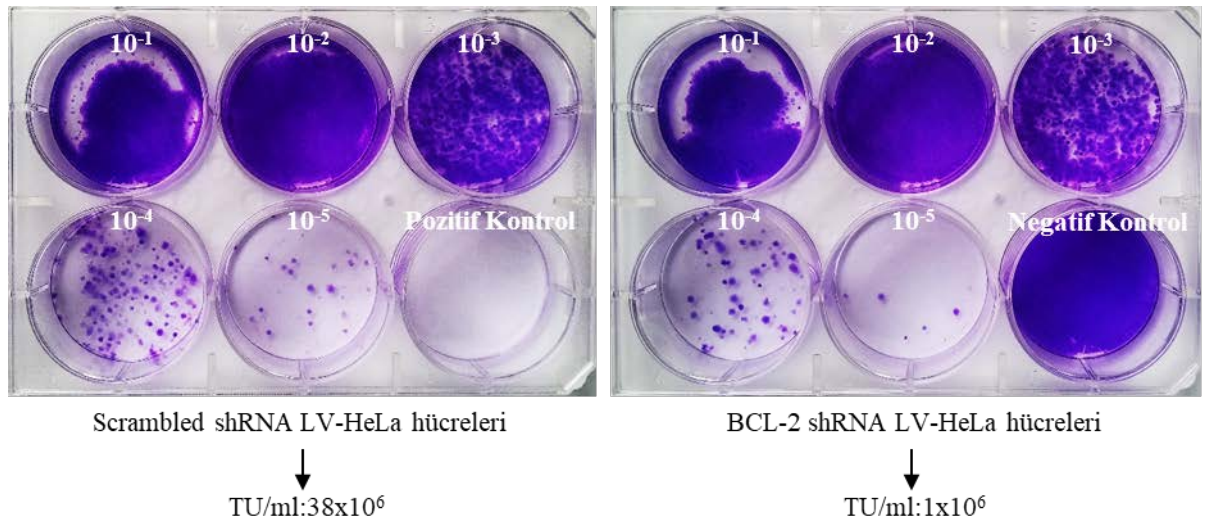
q-PCR-temelli titrasyon sonuçlarına göre, MOI (Enfeksiyon derecesi; Multiplicity of Infection) aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{MOI} = (\text{Ürün titresi (IU/ml)} \times \text{Virüs Volümü (ml)}) / \text{Toplam hücre sayısı}$$

Ardından, NK92MI hücrelerini transdükte etmek için, 20-100 MOI kullanıldı.

6.1.3.2. Biyolojik titre tayini

Biyolojik viral titre, lentiviral süpernatant kullanılarak yöntem 5.2.1.2.2’de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 3’de verilmiştir.



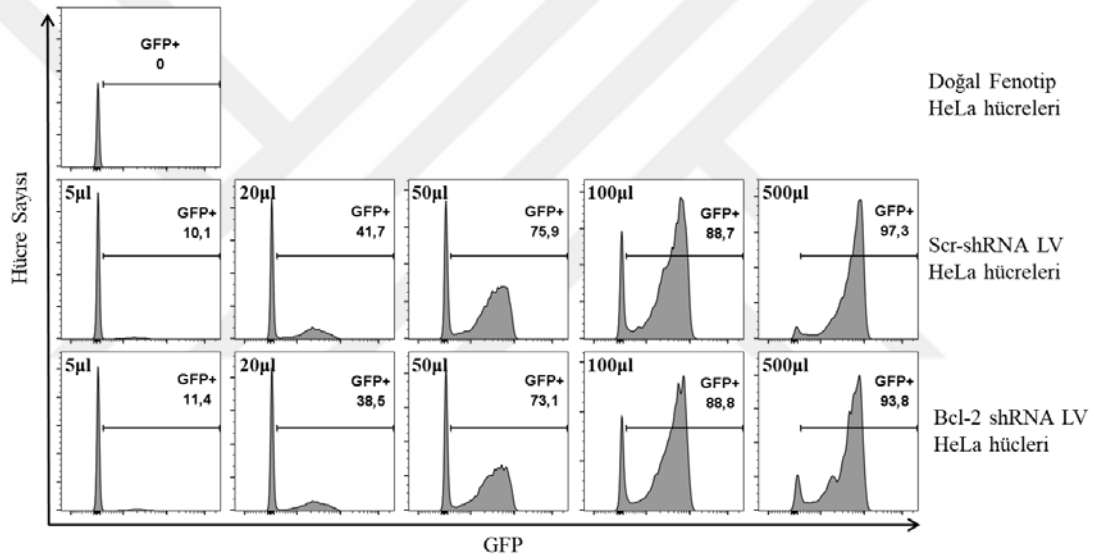
Şekil 3. Scrambled ve BCL-2 shRNA lentiviral partiküllerin biyolojik titre tayini

Buna göre her iki vektörün de biyolojik olarak infektif olduğu tespit edildi ve viral süpernatantın 10⁻⁵ dilüsyon serilerinde tek koloniler izlendi. Yöntem 5.2.1.2.2’de

belirtildiği gibi TU hesaplamak için tek kolonilerin gözlemlendiği 10^{-5} dilüsyon serileri kullanıldı. Buna göre scrambled shRNA LV ve BCL-2 shRNA LV'lerin biyolojik titrasyonu sırasıyla; 38×10^6 TU/ml ve 1×10^6 TU/ml olarak belirlendi.

6.1.3.3. Flow sitometri ile titre tayini

HeLa hücreleri yöntem 5.2.1.2.3'de belirtildiği şekilde farklı miktarlarda viral süpernatant ile muamele edildi ve transdüksiyonun 3. Gününde, Scr- ve BCL-2 shRNA LV verilen ve negatif kontrol olarak doğal fenotip HeLa hücrelerinde ki GFP ekspresyon oranları Şekil 4'de verilmiştir.



Şekil 4. Flow sitometri ile lentiviral titrasyon bulguları

Şekil 4'de gösterildiği gibi, en yüksek dilüsyon oranında Scr-shRNA LV verilen hücrelerin %97,3'ü, BCL-2 shRNA LV verilen hücrelerin %93,8'i transdükte olmuştur. Ayrıca, azalan viral süpernatant miktarı ile doğru orantılı olarak GFP eksprese eden hücre popülasyonunda da azalma gözlenmiştir. Tipik bir titrasyon deneyinde, titre hesaplamaları için yalnızca %1 ila 20 GFP-pozitif hücrelerin olduğu dilüsyon serileri dikkate alınmalıdır. %1'in altında, FACS GFP-pozitif hücrelerin sayısını güvenilir bir şekilde belirleyecek kadar doğru olmayabilir. Diğer yandan, %20'nin üzerinde, her GFP-pozitif hücrenin iki kez transdüklenme ihtimali önemli

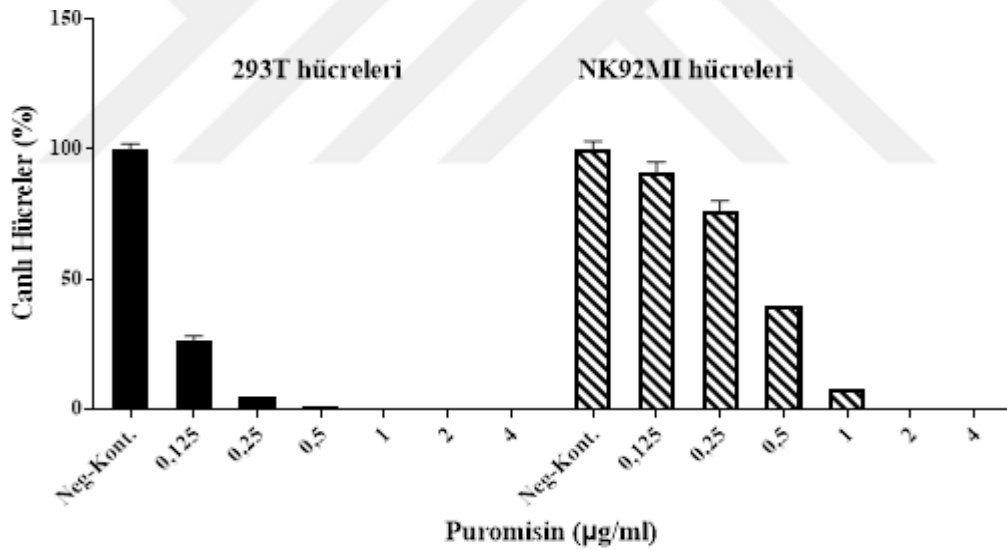
ölçüde artar ve bu da transdükte eden partikül sayısının olduğundan düşük tahmin edilmesine neden olur. Bu bilgiler ışığında uygun dilüsyon oranı olarak 5µl viral süpernatant içeren seri seçildikten sonra titrasyon hesabı aşağıda verildiği gibi tespit edildi.

Scrambled shRNA LV=20,2x10⁷

BCL-2 shRNA LV=22,8x10⁷

6.2. Puromisin Direncinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

Puromisin direnci yöntem 5.2.1.3’de belirtildiği gibi yapıldı. NK92MI ve 293T hücrelerinin antibiyotik seleksiyonu için belirlenen en düşük puromisin konsantrasyonu NK92MI için 2µg/ml ve 293T için 0,25µg/ml olarak tespit edildi (Şekil 5). Bu konsantrasyonlar ileriki deneylerde kullanılmıştır.



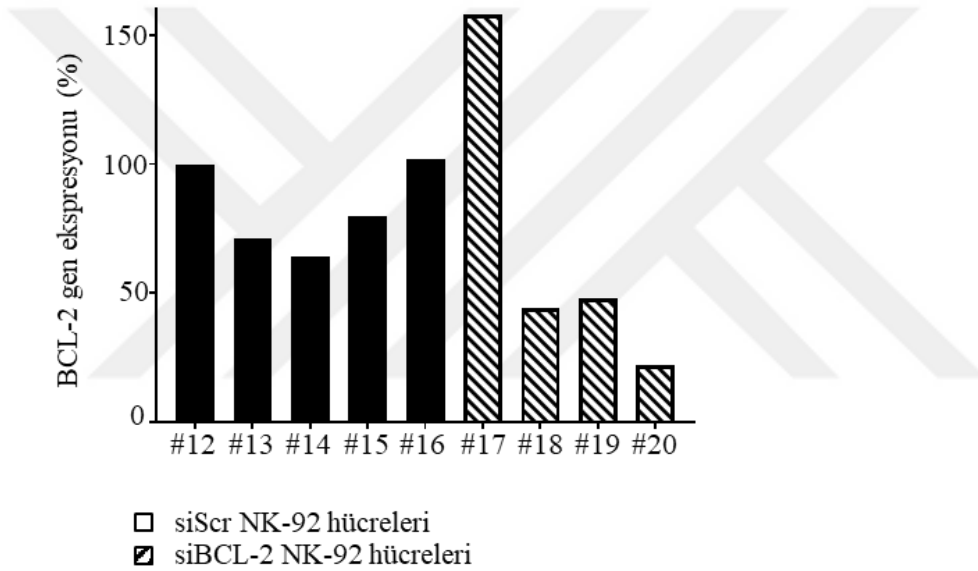
Şekil 5. 293T ve NK92MI hücrelerinin puromisin direnci

6.3. Lentiviral Partiküllerin Transdüksiyon Etkinliğine İlişkin Bulgular

Lentiviral transdüksiyon yöntem 5.2.1.4’de belirtildiği gibi yapıldı.

6.3.1. siScr- ve siBCL-2-NK92MI hücrelerinden alt klonların oluşturulmasına ilişkin bulgular

LV transdükte edilmiş hücrelerin puromisin ile seleksiyon aşamasından sonra tek hücrelerden alt klonlar çoğaltıldı ve 5 alt klon seçilerek klonların BCL-2 ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile yöntem 5.2.3’de belirtildiği gibi tayin edildi. Yüzde (%) oran doğal fenotip NK92MI hücrelerin BCL-2 gen ekspresyon seviyelerine göre hesaplandı. Alt klonlar; #12, #13, #14, #15, #16 (shScrambled alt klonları) ve #17, #18, #19, #20 (shBCL-2 alt klonları) şeklinde numaralandırıldı. Sonuçlar Şekil 6’de verilmiştir



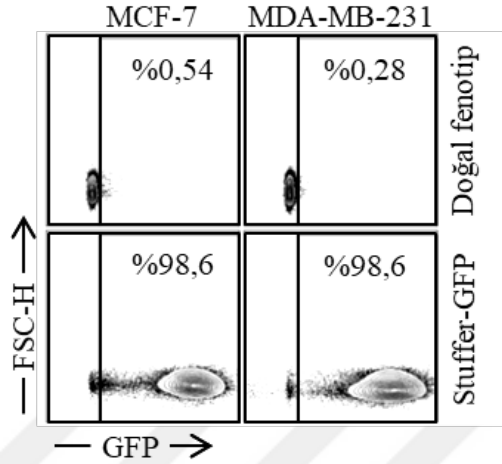
Şekil 6. siScr ve siBCL-2 NK-92 hücre alt klonlarının BCL-2 gen ekspresyon profili

Buna göre, siScr-NK92 hücre altklonlarından #16 numaralı altklon, doğal fenotipe en yakın BCL-2 ekspresyonunu (%100) gösterirken, siBCL-2-NK92MI hücre altklonlarından #20 numaralı altklonun en düşük BCL-2 ekspresyonuna (%20) sahip olduğu tespit edildi. Devam eden deneylerde bu iki alt klon (#16 ve #20) kullanıldı.

6.3.2. LV transdüksiyon sonrası GFP ekspresyon seviyelerine ilişkin bulgular

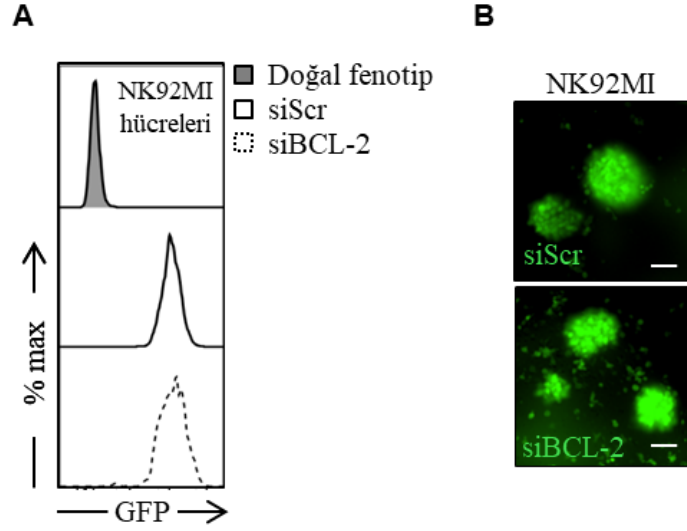
Stuffer-GFP lentivirüsleri ile stabil olarak GFP eksprese eden MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları yöntem 5.2.1.4’de belirtildiği gibi oluşturuldu.

Puromisin seleksiyonu ardından GFP ekspresyon seviyeleri flow sitometri ile yöntem 5.2.2’de belirtildiği gibi tespit edildi. Şekil 7’de gösterildiği gibi, her iki hücre hattının da %100’e yakını GFP pozitif olarak tespit edildi. Doğal fenotip hücreler negatif kontrol olarak kullanıldı.



Şekil 7. Lentiviral transdüksiyon sonrası meme kanseri hücrelerinin GFP ekspresyon seviyeleri

Scrambled shRNA ve BCL-2 shRNA lentivirüsleri ile NK92MI hücrelerinin transdüksiyonu yöntem 5.2.1.4’de belirtildiği gibi oluşturuldu. Puromisin seleksiyonu ardından GFP ekspresyon seviyeleri flow sitometri ile %100’e yakın olduğu tespit edildi (Şekil 8A) ve bu sonuçlar floresan mikroskobu altında hücrelerin GFP ışımaya göstermesi ile teyit edildi (Şekil 8B). Doğal fenotip hücreler negatif kontrol olarak kullanıldı.

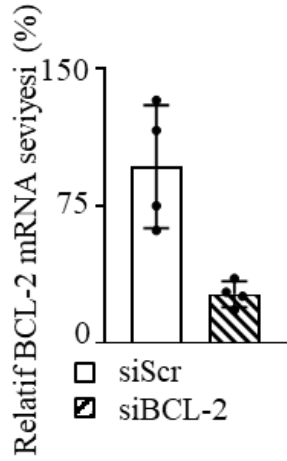


Şekil 8. Lentiviral transdüksiyon sonrası NK92MI hücrelerinin GFP ekspresyon seviyelerinin **A**-flow sitometri ile **B**-Floresan mikroskobu ile tespiti

6.3.3. NK92MI-siScr ve NK92MI-siBCL-2 hücrelerinde hedef gen BCL-2 ekspresyon seviyelerine ilişkin bulgular

6.3.3.1. qRT-PCR yöntemi ile BCL-2 ekspresyonu analizi

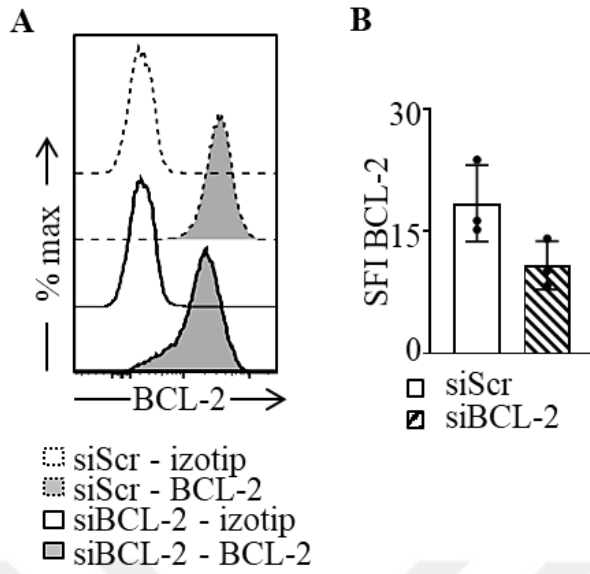
NK92MI-siScr ve NK92MI siBCL-2 hücrelerinde BCL-2 gen ekspresyon seviyeleri yöntem 5.2.3’de belirtildiği şekilde yapıldı. qRT-PCR ile gen ekspresyon analizi, NK92MI-siScr hücrelerine kıyasla NK92MI siBCL-2 hücrelerinin BCL-2 mRNA seviyelerinde yaklaşık olarak %70 gibi önemli ölçüde azalma olduğunu ortaya çıkardı ($p = 0.016$) (Şekil 9).



Şekil 9. NK92MI-siBCL-2 and NK92MI-siScr hücrelerinin relatif BCL-2 gen ekspresyon seviyeleri (n = 4).

6.3.3.2. Flow sitometri ile hücre içi BCL-2 protein miktarının belirlenmesi

NK92MI transfektanları anti-BCL-2 antikorları veya izotip kontrol ile hücre içi boyanarak flow sitometri ile yöntem 5.2.2.1’de belirtildiği gibi analiz edildi (Şekil 10A). NK92MI-siBCL-2 ve NK92MI-siScr hücrelerinde BCL-2 ekspresyon seviyesi SFI (Spesifik floresan indeksi = specific fluorescence indices) seviyeleri olarak gösterildi. SFI seviyeleri, BCL-2 MFI (Medyan floresan yoğunluğu = median fluorescence intensity) değerinin izotip kontrolleri MFI değerine bölünmesi ile hesaplanmıştır. NK92MI-siBCL-2 ve NK92MI-siScr hücrelerinde flow sitometri analizi ile belirlenen hücre içi BCL-2 protein seviyelerinin gen ekspresyon analizi ile aynı doğrultuda önemli ölçüde azaldığı tespit edildi ($p = 0.019$) (Şekil 10B).



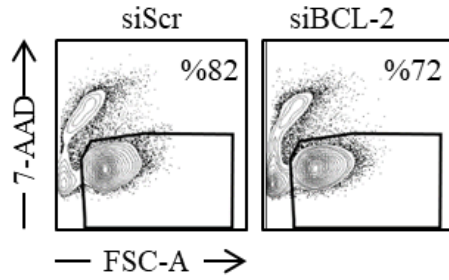
Şekil 10. A. NK92MI-siBCL-2 ve NK92MI-siScr hücrelerinin anti-BCL-2 antikorları veya izotip kontrol ile hücre içi boyanarak flow sitometri ile analizi **B.** Hücre içi BCL-2 proteini SFI seviyeleri (n = 3)

6.4. BCL-2 Downregülasyonunun NK Hücreleri Üzerindeki Etkilerinin Tespitine İlişkin Bulgular

NK92MI-siBCL-2 hücrelerinde BCL-2 seviyesinin azalmasının hücre canlılığı ve hedef hücre reaktivitesi üzerindeki etkileri araştırıldı.

6.4.1. BCL-2 downregülasyonunun NK hücre canlılığı üzerindeki etkileri

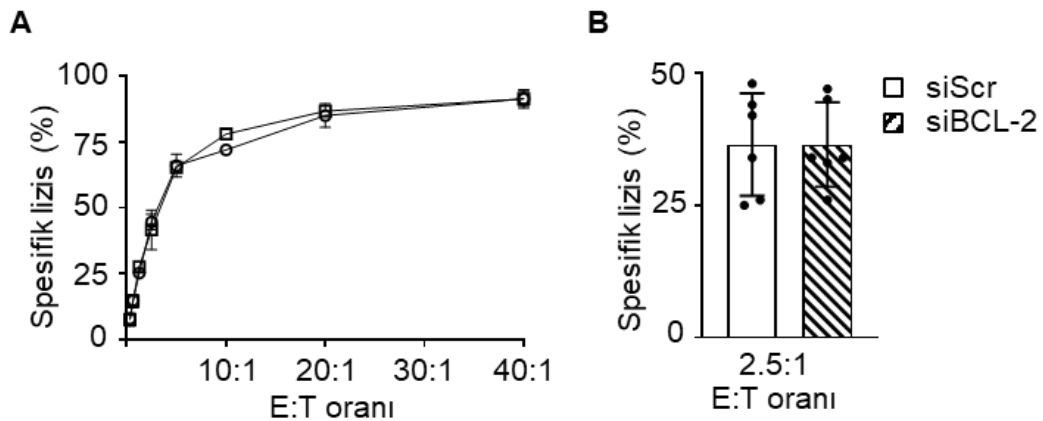
Hücre canlılığını değerlendirmek amacıyla, NK92MI-siBCL-2 ve NK92MI-siScr hücreleri flow sitometri ile yöntem 5.2.2’de belirtildiği gibi analiz edildi. Canlı hücre popülasyonu, 7-AAD pozitif hücrelerin dışlanması ile gösterilmiştir. Sonuçlar, NK92MI-siBCL-2 hücrelerinin NK92MI-siScr hücrelerinden %10 gibi küçük oranda daha düşük hücre canlılığı gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (Şekil 11).



Şekil 11. Hücre canlılığını değerlendirmek için; 7-AAD pozitif NK92MI-siBCL-2 ve NK92MI-siScr hücrelerin flow sitometri ile analizi

6.4.2. BCL-2 aşağı regülasyonunun NK hücre sitotoksitesisi üzerindeki etkileri

NK92MI hücrelerindeki BCL-2 aşağı regülasyonunun insan lösemi hücre hattı K562'yi kullanarak, NK hücrelerinin hedef hücrelerine karşı reaktivitelerinin etkilenip etkilenmediğini yöntem 5.2.4'de belirtildiği gibi tespit edildi. NK92MI-siBCL-2 ve NK92MI-siScr hücreleri K562 hücreleri ile farklı E:T (Efektörün Hedefe oranı = Effector to Target ratio) oranlarında inkübe edildi. K562 hücrelerinin lizisi 2 saat sitotoksite deneyi ile belirlendi. Sitotoksite deneyleri, BCL-2 siRNA'nın NK92MI hücrelerinin hedef hücreleri parçalama yeteneği üzerinde önemli bir etkisi olmadığını ortaya koydu ($p > 0.999$) (Şekil 12).



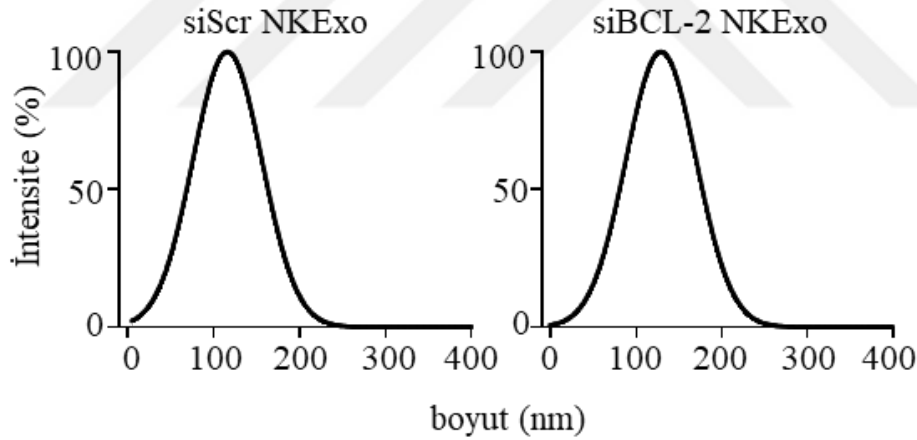
Şekil 12. BCL-2 siRNA'nın NK92MI hücrelerinin hedef hücreleri lizis yeteneği üzerindeki etkileri **A.** Farklı E:T oranlarında örneklem sonuç **B.** 2,5:1 E:T oranında kombine veriler (n = 6)

6.5. Eksozomların Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

Eksozomların üretimi için, NK92MI-siBCL-2 ve NK92MI-siScr hücreleri yöntem 5.2.5.1’de belirtildiği gibi 48 saat kültüre edildi ve ardından eksozom izolasyonu için süpernatant toplandı. NKExoların izolasyon adımları Resim 3 şematize edilmiştir. Ardından yöntem 5.2.5’te belirtildiği şekilde karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

6.5.1. Eksozom partikül büyüklüğü değerlerinin ölçülmesine ilişkin bulgular

İzolasyonun ardından, yöntem 5.2.5.2.1’de belirtildiği gibi eksozomların NTA (Nanoparticle Tracking Analysis) ZetaView® ile boyut değerlendirmeleri yapıldı. Bu amaçla, eksozom solüsyonları pH 7,4 PBS tamponu içerisinde dilüe edilerek ölçüldü. Her bir formülasyon için, n = 3 olacak şekilde ölçüm alındı ve ölçüm sonuçlarının ortalaması alındı. siScr ve siBCL-2 NKExoların boyutlarının ortalama 115.8–128.9nm arasında değiştiği tespit edildi (Figure 13).

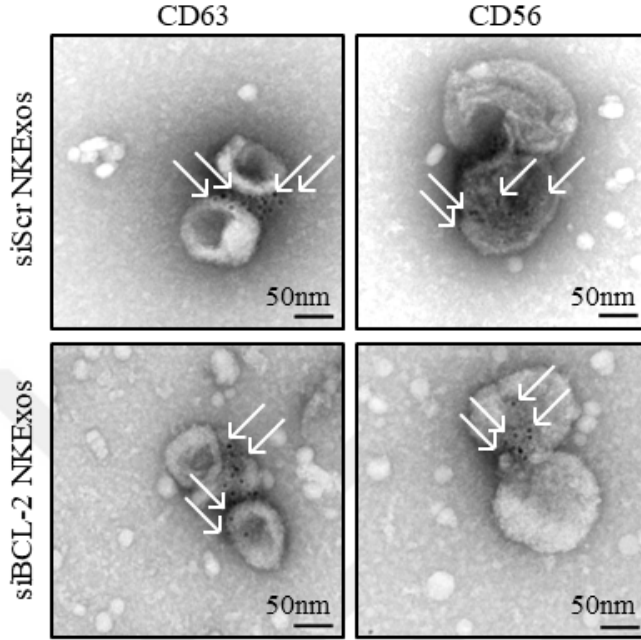


Şekil 13. siScr- ve siBCL-2 NKExoların NTA ile boyut karakterizasyonu

6.5.2. Elektron mikroskobu ile karakterizasyonuna ilişkin bulgular

İzole edilen eksozomların eksozomların boyut ve şekillerinin beklenen aralıkta ve bütünlüğünü kaybetmiş olup olmadığını tayin edebilmek için yöntem 5.2.5.2.2’de belirtildiği gibi TEM kullanıldı. Fenotipik karakterizasyon, şekil üzerinde beyaz oklarla gösterilen eksozomlara (CD63) ve NK hücrelerine (CD56) özgü yüzey

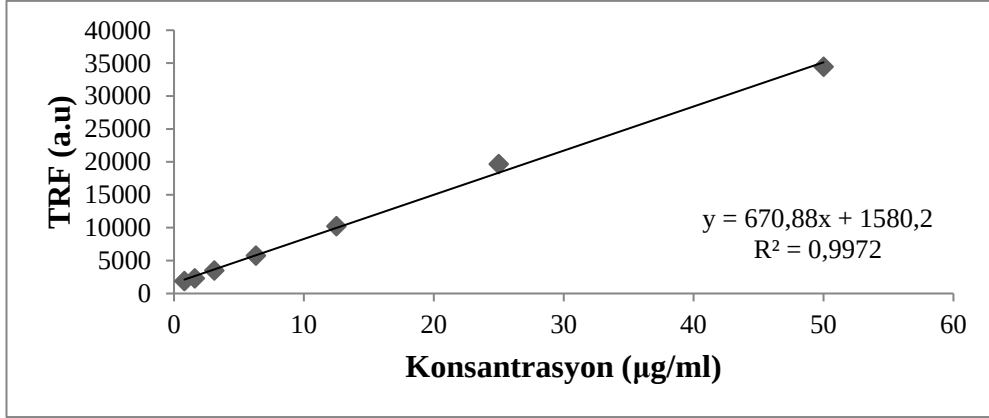
işaretleyicileri için immünogold boyama kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 14). Şekil 14’de görüldüğü üzere, izole edilen nanopartiküllerin ilgili özellikleri ifade ettiği doğrulandı ve morfolojik bütünlüğünü kaybetmediği tespit edildi.



Şekil 14. Eksozomların TEM ile karakterizasyonu

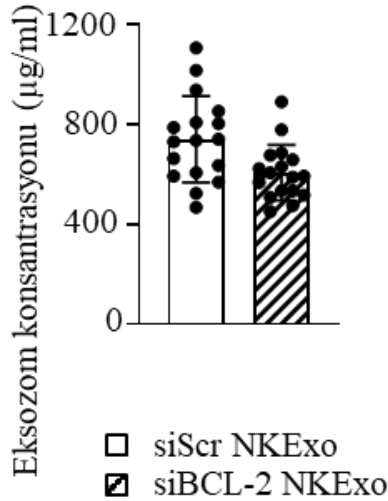
6.5.3. Eksozom miktar tayini

İzole edilen siScr ve siBCL-2 NKExolarının konsantrasyonu; yöntem 5.2.5.2.3’de belirtildiği gibi eksozom spesifik antigen CD63’ü belirlemek için Europium zaman çözünürlüklü immüno-floresan testi ile hesaplanmıştır. Öncelikle kit tarafından sağlanan konsantrasyonu bilinen eksozom ile standart eğri oluşturuldu (Şekil 15).

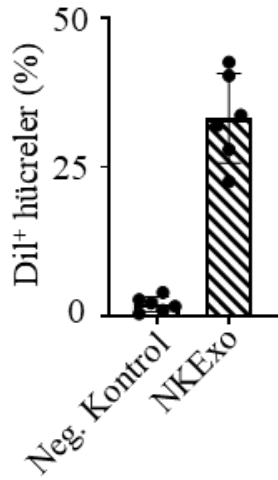


Şekil 15. CD63 TRIFic™ kit standard eğrisi

Ardından izole edilmiş eksozomların ölçüm değerleri eğim grafiğinde yerine konularak siScr ve siBCL-2 NKExolarının gerçek konsantrasyonu hesap edildi. Buna göre, siScr NKExolar; 467-1107µg/mL arasında, siBCL-2 NKExolar ise; 450-890µg/mL arasındaki konsantrasyonlarda elde edildi (Şekil 16). Konsantrasyon tayini yapılan eksozomlar kullanıma kadar -80°C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 16. Eksozom konsantrasyon tayini (n = 17)

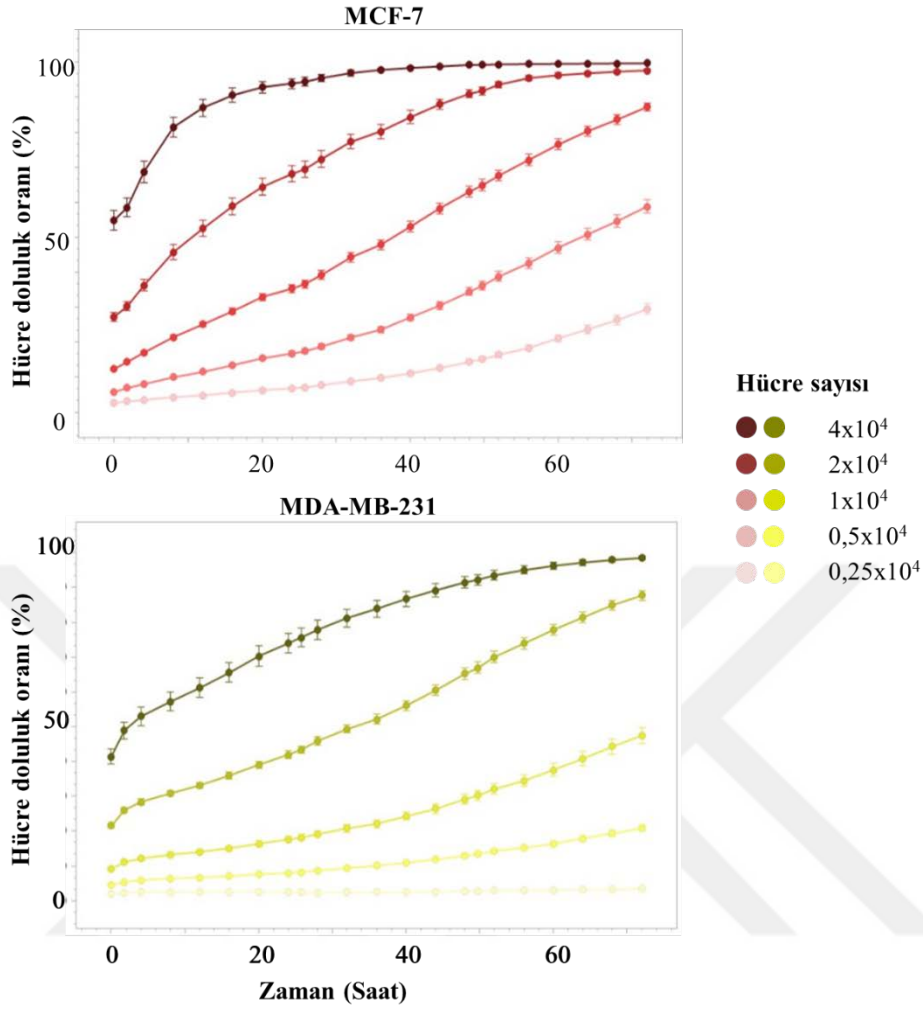


Şekil 18. Eksozomların MCF-7 hücrelerine internalizasyonu (n = 6)

6.6. GFP⁺ Meme Kanseri Hücre Hattı Titrasyonuna İlişkin Bulgular

Eksozom transfeksiyon çalışmalarında kullanılacak hücre yoğunluğunu belirlemek amacıyla meme kanseri hücre hatlarının titrasyonu yöntem 5.2.7’de belirtildiği gibi yapıldı.

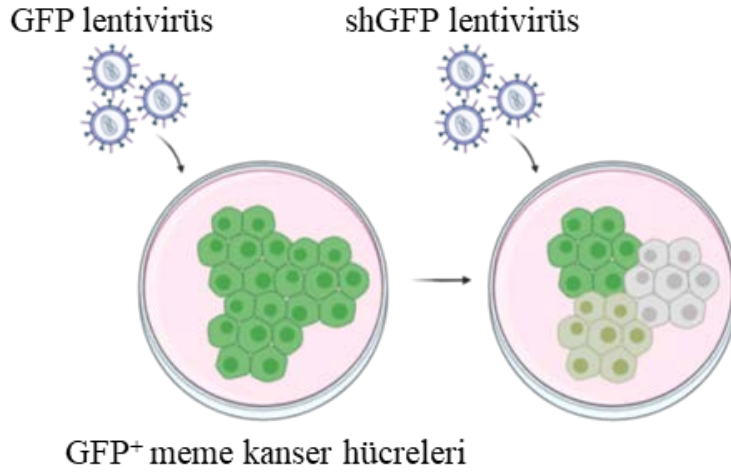
Bu sonuçlara göre; başlangıçta 96 kuyucuklu hücre kültür plakasının her bir kuyucuğuna 10×10^3 MCF-7 hücreleri ekildiğinde, Şekil 19’de gösterildiği gibi 48 saat sonra %50 yoğunluğa ulaştığı tespit edilmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında ise 48 saat sonra %50 hücre yoğunluğu başlangıçta ekilen 10 ile 20×10^3 arasında olduğu tespit edilmiş olup, 15×10^3 olarak seçilmiş (Şekil 19) ve devam eden çalışmalar belirlenen sayılarda hücre kullanılarak sürdürülmüştür.



Şekil 19. GFP⁺ meme kanseri hücre hatları titrasyonu. **A.** MCF-7 hücre hattı, **B.** MDA-MB-231 hücre hattı

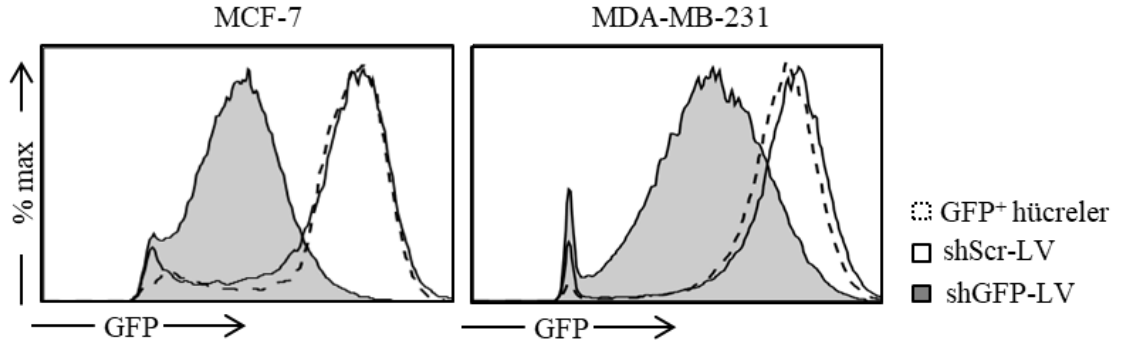
6.7. siGFP Yüklü NKExoları ile GFP Downregülasyonuna İlişkin Bulgular

siRNA'ların etkin bir şekilde NKExolara yüklenip yüklenmediğini ve yüklense bile ilgili geni susturma kapasitesinin olup olmadığını test etmek amacıyla GFP susturma sistemini geliştirdik. Öncelikle Resim 4' de şematize edildiği gibi, GFP eksprese eden meme kanser hücreleri yöntem 5.2.1.4' de belirtildiği gibi oluşturuldu ve ardından bu GFP⁺ hücreleri shGFP veya kontrol olarak shScr taşıyan lentivirüslerle (shGFP-LV veya shScr-LV) transdükte edildi.



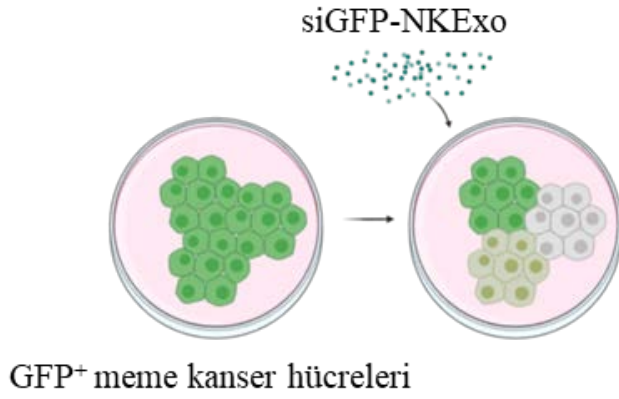
Resim 4. GFP eksprese eden meme kanseri hücrelerinin LV transdüksiyonu için şematik iş akışı

Ardından, GFP ekspresyon seviyeleri flow sitometri ile yöntem 5.2.2’de belirtildiği gibi analiz edildi. Buna göre, MCF-7 hücrelerinin ortalama GFP ekspresyonu shGFP-LV transdükte edilen hücrelerde shScr-LV ile karşılaştırıldığında %88 azalırken, MDA-MB-231 hücrelerinde %76 oranında azaldığı tespit edildi (Şekil 20).



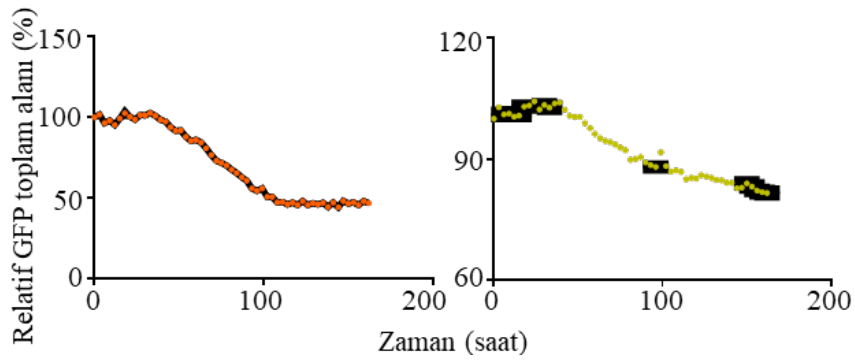
Şekil 20. shScr veya shGFP LV ile transdükte edilen GFP⁺ MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde GFP susturulma seviyesinin flow sitometri ile analizi

Böylece shGFP LV’lerinin etkin bir şekilde çalıştığı gösterildi. Daha sonra, siGFP NKExolarının GFP⁺ MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin GFP ekspresyon susturulmasında LV ile karşılaştırılabilir ölçüde etkin olup olmadıkları yöntem 5.2.7’de belirtildiği gibi canlı hücre analizi ile tespit edildi (Resim 5).



Resim 5. GFP eksprese eden meme kanseri hücrelerinin siGFP yüklü NKExoları ile transfeksiyonu için şematik iş akışı

siGFP-NKExo ile muamele edilen hücrelerin GFP toplam alanı siScr-NKExo ile muamele edilen hücrelerin GFP toplam alanına bölünerek hücrelerdeki relatif GFP alanı tespit edilmiştir. Canlı hücre analizleri ile GFP seviyelerinde azalmanın GFP⁺ MCF-7 hücrelerinde yaklaşık olarak %50 ve GFP⁺ MDA-MB-231 hücrelerinde yaklaşık olarak %20 olduğu tayin edildi (Şekil 21).

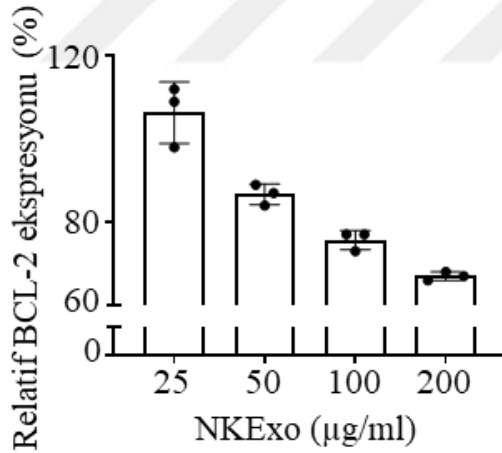


Şekil 21. siScr veya siGFP yüklü NKExolar ile transfekte edilen GFP⁺ MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde GFP susturulma seviyesinin canlı hücre analizi ile tespiti

Bu sonuçlar siRNA'ların doğal olarak NKExolarına yüklendiğini ve böylece ideal bir siRNA taşıyıcı vektörü temsil ettiğini doğrulamıştır.

6.8. siBCL-2 NKExoların Titrasyonuna İlişkin Bulgular

Meme kanser hücrelerinin BCL-2 susturulmasında etkin olabilecek siBCL-2 NKExo konsantrasyonunu tayin edebilmek amacıyla, MCF-7 hücreleri farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100, ve 200 µg/mL) siBCL-2 veya kontrol olarak siScr NKExoları ile tedavi edildi ve 24 saat sonra relatif BCL-2 ekspresyonları qRT-PCR ile yöntem 5.2.3'de belirtildiği gibi belirlendi. siBCL-2 NKExoları ile tedavi edilen hücrelerin relatif BCL-2 ekspresyon seviyeleri, konsantrasyona karşılık gelen siScr NKExoları ile tedavi edilen hücrelerin relatif BCL-2 ekspresyon seviyeleri ile normalize edildi. Buna göre, 24 saat içinde artan konsantrasyonla orantılı şekilde, BCL-2 ekspresyonunda azalma gözlemlendi ve 200µg/mL siBCL-2-NKExoların normalize BCL-2 mRNA seviyesini %40 oranında azalttığı tespit edildi (Şekil 22).



Şekil 22. Farklı konsantrasyonda siScr ve siBCL-2 NKExoları ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde relatif BCL-2 ekspresyonlarının qRT-PCR ile belirlenmesi

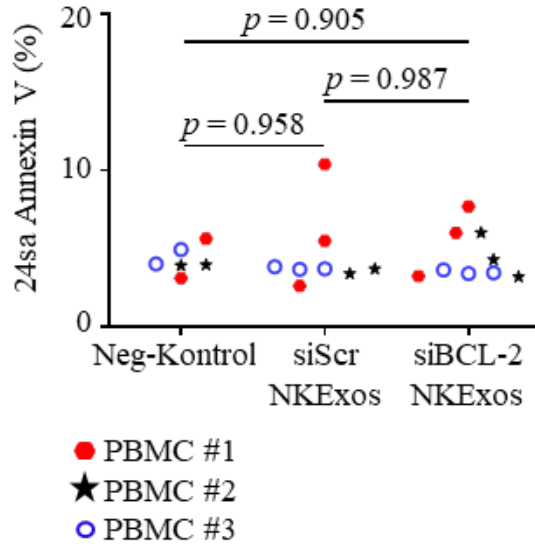
Devam eden çalışmalarda 200µg/ml konsantrasyonda siRNA yüklü NKExolar kullanılmıştır.

6.9. siBCL-2 NKExolarının Apoptotik Etkilerine İlişkin Bulgular

Daha önce birçok çalışma NKExoların FasL ve perforin/granzim gibi eksozomal içeriklerini tümör hücrelerine transfer ederek tümör hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Dahası, NKExoların doğal sitotoksik özelliklerinin katı tümörlerle kıyaslandığında hematolojik tümörlerde daha etkin oldukları ve de sağlıklı hücreleri daha az veya hiç etkilemedikleri gösterilmiştir. Bu amaçla, siBCL-2 NKExoları ile sağlıklı, non-malign veya malign hücrelerin tedavisinde apoptozu indükleme yeteneklerinin olup olmadıkları ve varsa nasıl olduğu ve hangi yollardan etkilendiği belirlendi.

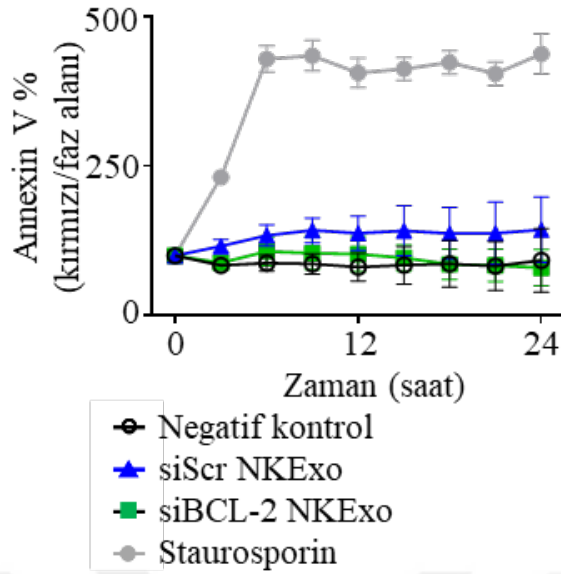
6.9.1. siBCL-2 NKExolarının sağlıklı ve non-malign hücreler üzerindeki etkilerine ilişkin bulgular

Sağlıklı donörlerden elde edilen PBMC (Periferik kan mononükleer hücresi; Peripheral blood mononuclear cells) ve malign olmayan meme hücre hattı olarak MCF-10A kullanıldı. Sağlıklı 3 farklı donörden elde edilen PBMC'ler siScr veya siBCL-2 NKExoları ile belirlenen konsantrasyonda (200µg/ml) muamele edildi ve 24. saat apoptoz indüksiyonu Annexin V ve 7-AAD boyama kullanılarak yöntem 5.2.2'de belirtildiği gibi flow sitometri ile analiz edildi. Negatif kontrol olarak tedavi edilmeyen PBMC'ler kullanıldı. siScr veya siBCL-2 uygulanan PBMC'lerde erken apoptoz belirteci olan Annexin V aktivasyonu gözlenmedi ve bu sağlıklı hücrelerde apoptozun indüklenmediği istatistiksel olarak da doğrulandı (Şekil 23) (n = 3).



Şekil 23. siScr veya siBCL-2 NKExolar ile transfekte edilen sağlıklı donörlerden elde edilen PBMC'ler üzerinde apoptotik etkilerin flow sitometri ile incelenmesi

Sağlıklı donör PBMC'lerine ek olarak, malign olmayan meme hücre hattı, MCF-10A kullanıldı. Hücreler, 200µg/ml siScr veya siBCL-2 NKExoları ile muamele edildi ve apoptoz; zaman içindeki Annexin V aktivasyonu için yöntem 5.2.7'de belirtildiği gibi canlı hücre görüntüleme ile değerlendirildi. MCF-10A hücreleri negatif kontrol ve 2,5µM Staurosporin verilen MCF-10A hücreleri ise pozitif kontrol olarak kullanıldı. Sonuçlar malign olmayan meme hücresi hattı MCF-10A'nın siScr veya siBCL-2 NKExos ile muamelesi bu hücrelerin öldürülmesini hiç tetiklemediğini ortaya çıkarmıştır (Şekil 24).



Şekil 24. siScr veya siBCL-2 NKExolar ile tedavi edilen non-malign MCF-10A'nın Annexin V ekspresyonunun canlı hücre görüntüleme ile incelenmesi

Böylece NKExolarında olduğu gibi modifiye sistemimizin sağlıklı hücreleri etkilemedikleri gösterilmiştir.

6.9.2. siBCL-2 NKExolarının MCF-7 hücrelerinde Annexin V aktivasyonu üzerine etkileri

Apoptozun erken aşamalarında plasma membranı yeniden düzenlenir. Normal sağlıklı hücrelerde membranın sitoplazmik yüzeyinde bulunan fosfatidilserin (PS), apoptozun erken aşamalarında plazma membranının ekstraselüler yüzeyine taşınır. Annexin V ise PS'ye yüksek afiniteli fosfolipit bağlanma proteinidir ve erken apoptoz tayininde floresan konjugatları flow sitometri ve/veya canlı hücre görüntüleme sistemleri ile kullanılmaktadır.

siBCL-2 veya siScr NKExolar (200µg/mL) ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde apoptotik hücreleri belirleyebilmek için hücreler Annexin V ve 7-AAD kullanılarak yöntem 5.2.2'de belirtildiği gibi 9. ve 24. saatlerde flow sitometri ile analiz edildi. MCF-7 hücrelerinin siBCL-2 NKExoları ile tedavisinde siScr NKExoları ile

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir ve yaşam tarzı değişiklikleri ve ortalama yaşam süresinin artması gibi birden fazla faktörlerden dolayı meme kanseri insidansının gelecek yıllarda daha da artacağı öngörülmektedir (Sung ve ark., 2021). Bu yüzden de önemli bir kadın sağlığı problemi olan bu kanser tipinde etkili yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç vardır. Yeni konvensiyonel sistemik tedavi bileşiklerinin ötesinde, sitotoksik lenfositlerin malign hücrelere karşı reaktivitesini uymayı amaçlayan immünoterapötik yaklaşımlar, tedavi sonuçlarını iyileştirmeye yönelik yaklaşımlardır (Radosa ve ark., 2020). Kontrol noktası inhibisyonu, (Polk ve ark., 2018) kimerik antijen reseptörleri (CAR'lar) ile transfeksiyon (Yılmaz ve ark., 2020) veya adaptif bağışıklık sistem hücresi olan T hücrelerini kansere karşı harekete geçirmek için bispesifik antikorların uygulanması (Krishnamurthy ve Jimeno, 2018; Zekri ve ark., 2021) mevcut stratejilerdir. Doğal bağışıklık sistemi sitotoksik lenfositleri olarak NK hücrelerinin uyarılması da bu stratejilere bir alternatif oluşturmaktadır. Arnould ve ark., (2006) NK hücrelerinin Her2/neu antikoru Trastuzumab'ın etkinliğine güçlü antikora bağlı hücrel sitotoksositeye (ADCC) aracılık ederek katkı sağladığını göstermiştir.

Kanser biyolojisi alanındaki gelişmeler, kanser hücrelerinin apoptoza direnç geliştirmesinde rol oynayan moleküler mekanizmaları gün yüzüne çıkarmıştır. Kanser hücreleri apoptotik hücre ölümüne direnç için kaspaz aktivite kaybı, anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler arasındaki dengenin bozulması, p53 fonksiyonunun bozulması ve ölüm reseptör sinyalinin bozulması gibi farklı mekanizmaları kullanırlar (Pistritto ve ark., 2016). Kanser hücreleri, büyük oranda Bax proteini gibi pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu azaltarak ya da ve BCL-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu çoğaltarak apoptozdan kaçmayı başarır (Mohammad ve ark., 2015). Özetle, kanserin ilerlemesi sadece kontrolsüz hücre çoğalması değil, aynı zamanda BCL-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin aşırı eksprese olması gibi çeşitli mekanizmalarla deregülasıyona uğrayan malign hücrelerin apoptoza duyarlılığının azalmasına da bağlıdır (Kumar ve ark., 2000; Parton ve ark., 2001). Tümörlerde apoptoz kaçışını tersine çevirmek için bu çalışmada olduğu gibi bahsedilen

molekülleri (örn. BCL-2) hedeflemek, tümör büyümesini kısıtlayabilir ve terapi direncini tersine çevirebilir.

KLL ve AML gibi diğer malignitelerde, hastalık patofizyolojisi için ve ayrıca tedaviye duyarlılığı açısından BCL-2'nin önemi bilinmektedir ve bu mekanizma BCL-2 inhibitörü Venetoclax gibi terapötikler kullanılarak başarıyla hedeflenmektedir (Korycka-Wolowiec ve ark., 2019; Thol ve Ganser, 2020). Meme kanserinde de aynı şekilde BCL-2 apoptozun önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca BCL-2'nin meme kanserinde aşırı eksprese edilmesinin ER pozitifliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Merino ve ark., 2016; Parton ve ark., 2001; Teixeira ve ark., 1995; Vaillant ve ark., 2013). Bunun dışında, BCL-2 aşırı ekspresyonunun agresif bir tümör fenotipi ve kötü sağkalım ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Du ve ark., 2018; Vaillant ve ark., 2013). Bu nedenle, tez araştırma konusu olarak BCL-2 gibi onkoproteinleri hedefleyen siRNA'lar için bir taşıyıcı vektör olarak kullanılabilecek NKExoları kullanarak siRNA temelli bir gen susturma sistemi geliştirildi. NKExoların avantajlarından biri, sağlıklı hücreleri etkilemeden tümöre özgü olmalarıdır (Lugini ve ark., 2012; Zhu ve ark., 2017). NK hücreleriyle karşılaştırıldığında NKExolar, tümör özgüllüğü, perforin/granzime ile tümör hücrelerinin parçalanması ve/veya Fas/FasL aracılığı ile apoptozun indüklenmesi gibi özellikleri ile NK hücreleri ile aynı faydalı etkilere sahiptirler. Çalışmamızda, siBCL-2 ve siScr NKExoların sağlıklı donörlerden elde edilen PBMC ve non-malign meme hücre hattı MCF-10A üzerinde kanser hücrelerinde tespit edilen etkinin aksine herhangi bir apoptotik etki göstermediği kanıtlanmış ve böylece kansere hedefli bir sistem olarak kullanılabileceği görüşü bu verilerle desteklenmiştir.

Bununla birlikte, tümör hücreleri tarafından alındıkları ve hedefe yönelik tedaviyi geliştirebilecek siRNA'lar gibi eksozomal içerikler sağladıkları için daha fazla avantaja sahiptirler. Tümör hücreleri sıklıkla perforin/granzim veya Fas/FasL kaynaklı apoptoza karşı direnç geliştirdiğinden veya inhibitör moleküllerin (örn. MHC I) ekspresyonuyla NK hücre reaktivitesini engellediğinden NKExoların taşıyıcı konumundaki özellikleri büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, heterojen antijen ekspresyonu, immünsüpresif tümör mikroçevresi ve immün hücrelerin penetrasyonunu engelleyen doğal bariyerler solid tümörlerin tedavisini zorlaştırmaktadır (Wagner ve ark., 2020). Eksozomlar, sitotoksik içeriklerinin yanı

sıra siRNA'yı membran füzyonu veya reseptör aracılı giriş yoluyla ilettikleri için bu bariyerlerden daha az etkilenecektir (Yoon ve ark., 2014). Sonuçlarımız NKExoların siRNA gibi gen tedavisi ajanlarının etkin kullanımı önündeki önemli bir problem olan nükleik asitlerin hücreye taşınma problemini çözerek, biyouyumlu ve etkin taşıyıcılar olduğunu göstermektedir. İlk defa, gen mühendisliği ile üretilen transdükte NK hücrelerinden siRNA'ların başarılı bir şekilde eksozomlara yüklenebileceği ve bu eksozomların etkin bir siRNA taşıyıcısı olduğu, siBCL-2 ile yüklenmiş NKExoların ER⁺ meme kanseri hücrelerinde umut verici bir öldürme kabiliyetini gösterdiği ve zamanla apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yollarının aktive olduğunun işaretleri olarak Annexin V, Kaspaz 3/7 ve Kaspaz 9 indüklenmesine yol açtığı kanıtlanmıştır. Böylece siRNA yüklenmiş NKExoların meme kanseri tedavisi için etkin olduğu bildirilmiştir (Kaban ve ark., 2021).

Gen tedavisi, hücelere dışarıdan verilen genetik materyaller aracılığıyla protein ekspresyonunun tedavi amaçlı değiştirilmesini tanımlar. Gen tedavisinin büyük oranda çalışıldığı hastalıklardan biri de kanserdir. Gen tedavisi yaklaşımlarından biri olan RNA interferans (RNAi) mekanizmasının terapötik amaçlı kullanımı sonucunda, kanser destekleyici proteinlerin ekspresyonunu mRNA seviyesinde durdurulması hedeflenmektedir. Genelde RNAi aracılı terapötik uygulamalar ile sentetik siRNA'lar kullanılarak protein ekspresyonunun seçici bir şekilde engellemesi (knockdown) hedeflenmektedir. RNAi dışında, mRNA degradasyonuna yol açabilecek diğer stratejilerden biri de hedef mRNA'yla hibridize olan tek sarmallı oligodeoksiribonukleotidler ve ribozimler aracılığıyla mRNA'nın kesilmesidir (Videira ve ark., 2014). Fakat RNAi moleküllerinin sentezlenmesi daha kolay olup, daha efektif oldukları ve spesifik oldukları için de daha az toksik ve de nükleaz degradasyonuna karşı daha dirençli olduklarından, mRNA degradasyonunda tercih edilen yöntemlerdendir (Zhang ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda da, meme kanserinde apoptozu tetiklemek ve apoptoz direncini tersine çevirmek için anti-apoptotik BCL-2 geninin siRNA mekanizması ile posttranskripsiyonel olarak susturulması hedeflenmiştir.

Meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli malignitelerde siRNA ile BCL-2'nin spesifik olarak hedeflenmesi, in vitro ve preliminere in vivo çalışmalarda büyüme inhibisyonunu, apoptoz indüksiyonunu ve kemoterapiye karşı artan duyarlılığı

sağlamıştır (Akar ve ark., 2008; Jiang ve Miller, 2003; Li ve ark., 2016; Ocker ve ark., 2005; Reddy ve ark., 2016; Sun ve ark., 2020; Tekedereli ve ark., 2013; Wu ve ark., 2019). Bugüne kadar, kompleman aktivasyonu ve sitokin salınımının indüklenmesi gibi spesifik olmayan etkileri nedeniyle siRNA temelli tedavilerin klinik uygulanması engellenmiştir. Ayrıca çıplak RNAi molekülleri hücre membranlarından geçemezler (Zhang ve ark., 2012). Çıplak RNAi'nin hücrelerden geçememesinin yanı sıra, hem sistemik dolaşımdaki hem de hücre içindeki nükleazlar tarafından degradasyona açık olmaları, fagositik hücreler tarafından temizlenmeleri, hızlı renal klirans ve spesifikite gerekliliği gibi sorunların üstesinden gelmek için, siRNA üzerinde kimyasal modifikasyonların yapılması veya siRNA'nın taşıyıcı vektörlerine yüklenmesi gibi yaklaşımlar geliştirilmiştir (Hu ve ark., 2020; Rossi ve Rossi, 2021; Videira ve ark., 2014).

Rekombinant lentivirüsler medikal alanda gen taşınmasında yaygın olarak kullanılırlar. Lentivirüsler genetik materyali taşımak ve amplifiye etmek için konağın hücresel mekanizmasını kullanırlar ve paketledikleri transgeni, membran füzyonu aracılığıyla hedef hücreye taşırlar. Bu çalışmada lentivirüslerin seçilmesinin en önemli nedeni, memeli hücrelerini etkin bir şekilde transdükte edebilmeleri ve transdüksiyonları sonrasında genoma entegrasyonları nedeniyle stabil hücre dizilerinin oluşturulup sürekli gen ekspresyonunun sağlanabilmesidir. Böylece tekrarlayan gen transferlerinin önüne geçilmiştir. Lentiviral partiküllerin yeterli titrede elde edilmesi etkin LV transdüksiyonu için ön şarttır. Lentiviral partiküllerin titrasyonunu belirlemek için 3 farklı metod kullanılır. Bunlar; RNA titresi, DNA titresi ve fonksiyonel (biyolojik) titredir (Zhang ve Wang, 2018). Biyolojik titre tayini LV partiküllerin hedef hücrelere infektivitesi ya da transdüksiyon kapasitesini göstermektedir. RNA düzeyinde titre tayini viral partiküllerin fonksiyonel olup olmadığını göstermediğinden, çalışmamızda RNA titresine paralel olarak biyolojik titre tayinleri de yapıldı. RNA düzeyinde viral titre tayini ile yüksek viral titre elde edildiği tespit edildi. Biyolojik titre tayini çalışmamızda ise azalan konsantrasyonlarda hücre kolonilerini belirgin olarak gözlemlendi. Ayrıca BCL-2 ve scrambled siRNA taşıyan lentiviral partiküllerde reporter gen olarak bulunan GFP'ye yönelik yapılan flow sitometri çalışmasında da partiküllerin HeLa hücrelerine transdükte edildiği gösterilmiştir.

Micucci ve ark. (2006) insan NK hücrelerine gen transfer etkinliğini artırmak için lentiviral vektör temelli teknikler kullanmışlardır. Kandan izole edilen NK hücreleri ve aynı zamanda kültüre edilen primer NK hücrelerine yüksek etkinlikte gen transdüksiyonunu başarmışlardır (Micucci ve ark., 2006). Çalışmamızda NK hücreleri olarak, NK92MI hücre hattı kullanıldı ve bu hücrelerin LV transdüksiyon etkinliği raportör gen olarak bulunan GFP seviyesinin %100'e yakın olması ve siRNA hedef geni BCL-2 ekspresyon seviyelerinde yaklaşık %50 oranında azalma ile tespit edildi.

Viral olmayan vektörler arasında siRNA taşınması için genelde lipozomlar kullanılmaktadır, fakat bu vektörler de hem toksisite hem de etkinlik açısından problemlere sahiptir (Ozpolat ve ark., 2014). Yüksek lisans tez çalışmalarımda, VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) ve ZEB (Zing finger E-box binding homeobox) ekspresyonlarını transkripsiyon sonrası baskılamak amacıyla taşıyıcı vektör olarak kitozanı kullandık ve meme kanseri hücrelerinin tümör anjiyogenezini ve epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) inhibisyonunu sağladığını gösterdik (Kaban ve ark., 2016; Kaban ve ark., 2017; Kaban ve ark., 2019). Ancak kitozan düşük sitotoksisite, düşük biyolojik persistans ve mukoadhezif özelliklere sahip olsa da, hücre içi disosiyasyon ve tümör hücresine özgü hedeflemedeki problemler zayıf yanlarıdır ve bu da gelişmiş taşıyıcı sistemlerin gerekliliğini göstermektedir (Cao ve ark., 2019). siRNA'ların bir lipid kompleksi olarak formüle edilmesi veya spesifik ligandlara kovalent olarak bağlanması, kalıtsal transtiretin aracılı amiloidoz hastalarında polinöropati tedavisi için ONPATRO® (patisiran) ve akut hepatik porfiri (AHP) tedavisinde kullanılan GIVLAARI™ (givosiran)'nin FDA tarafından onaylanmasını sağlamıştır (Setten ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2021). Bununla birlikte, siRNA'ların malign hücrelere spesifik dağıtımının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Eksozomlar, protein, lipid ve nükleik asit içeren ekstrasellüler veziküllerdir. Eksozomlar biyoyumlu yapıları, düşük immunojeniteleri, nanoboyutları ve taşıdıkları kargoyu kolayca hücrenin içine iletebilmeleri sebebiyle son dönemde taşıyıcı vektör olarak da gen tedavi çalışmalarında denenmektedir (Stremersch ve ark., 2016). RNA'ları endojen olarak taşıyan eksozomlar, optimum siRNA taşıyıcıları olarak hizmet etmek üzere kolayca modifiye edilebilmektedir (El Andaloussi ve ark., 2013). Diğer gen taşıyıcı sistemlerle karşılaştırıldığında, hedef bölgelere taşınmak üzere terapötiklerle aktif olarak yüklenebilmeleri ve periferik kanda stabil olmaları

eksozomlara avantaj sağlayan özelliklerindendir (Chen ve ark., 2019; Li ve ark., 2018; Morishita ve ark., 2017; O'Brien ve ark., 2020; Sancho-Albero ve ark., 2019). Çalışmamızda, siBCL-2 ve kontrol siScr-NKExoların karakterizasyonu yapıldı. İzole edilen eksozomların konsantrasyonu eksozom markeri olan CD63'e özgü TRIFic™ ile tayin edilmiştir. NK hücrelerinden elde edilen eksozomların morfolojisi ve fenotipik özellikleri TEM ile tayin edilen eksozomların yuvarlak olduğu ve şekil bütünlüğü koruduğu ve ayrıca NK hücre ve eksozom markeri olarak sırasıyla CD56 ve CD63 ifade ettiği gösterildi. Nükleik asitleri taşıyan viral olmayan vektörlerin membrana bağlanıp hücreye girebilmesinde partikül büyüklüğünü önemli bir etkisi vardır. Yapılan araştırmalar arasında etkin partikül boyutu farklılık göstermesi ile transfeksiyon etkinliği için ideal boyutun taşıyıcı sistem, kargo ve hücre tipi gibi faktörlere bağlı olduğu öne çıkmıştır (Zu ve Gao, 2021). Eksozomlar 30-150nm boyutundaki veziküller olduğundan, elde edilen eksozomların partikül boyutu beklenen aralıkta olduğu tespit edildi. Elde edilen eksozomlar gibi küçük partikül boyutundaki taşıyıcılar, klatrin-aracılı endositoz ile hücreye kolayca giriş yapabilmektedir. Eksozomların hücrelere internalizasyonunu doğrudan göstermek için eksozomlar Dil ile renklendirildi ve GFP⁺ MCF-7 hücrelerine transfekte edildi. Floresan mikroskop görüntüleri, eksozomların başarıyla hücre içine girebildiğini göstermiştir. Bu sonuçlar ışığında NK eksozomlarının siRNA taşınması için kullanılabileceği gösterilmiştir. MDA-MB-231 hücreleri insan üçlü negatif meme kanseri hattı olduğundan dolayı, çalışmamızda kullanılan sistemin hem ER⁺ hem de üçlü negatif meme kanseri üzerinde test edilmiştir. Böylece elde edilen eksozomların siRNA'yı başarılı bir şekilde hücrelere taşıması için gerekli karakteristiklere sahip olduğu ve kolayca hedef hücrelere internalize olabildiği gösterildi.

Eksozomların vektör olarak kullanımı önündeki en büyük bariyerlerden biri, nükleik asitlerin eksozomlara etkin şekilde yüklenebilmesidir (Stremersch ve ark., 2016). siRNA gibi nükleik asitlerin eksozomlara yüklenmesinde sıklıkla elektroporasyon yöntemi kullanılmaktadır (Kamerkar ve ark., 2017). Pankreas kanseri tedavisi için KRAS genindeki mutasyonu hedefleyen siRNA'nın mezenkimal stroma hücrelerinden izole edilen eksozomlarla taşınması, klinik deneylerde Faz 1 (NCT03608631) aşamasındadır. Bahsi geçen çalışmada, siRNA'lar izole edilen eksozomlara elektroporasyonla yüklenmiştir. Ancak bu yöntemle üretim sürecindeki basamaklar

artmaktadır. Eksozomlar üretildikleri hücrenin genetik ve protein içeriğini yansıttıkları için siRNA içeren hücrelerden türetilen eksozomlar, siRNA'ları da hedef hücrelere yüksek etkinlikle ve güvenli bir şekilde taşıyabilmektedir (Zhou ve ark., 2016). Çalışmamızda eksozomların üretildiği NK hücrelerinin siRNA dizisi içeren lentiviral partiküllerle transdükte edilerek hücrelerin stabil olarak siRNA sentezlemesi sağlandı ve böylece siRNA taşıyan eksozomları üreten NK hücre hattı oluşturularak, hızlı ve etkin bir eksozom üretim akışı elde edildi. NK hücrelerinden üretilen BCL-2 hedefli siRNA'ların NK hücre canlılığı ve hedef hücrelerdeki reaktivitesini az oranda veya hiç etkilemezken, GFP hedefli siRNA'ların NK hücrelerinden salınan eksozomlara yüklenmesi ve uygulanan hücrelerde GFP ekspresyonlarında büyük oranda azalma geliştirdiğimiz GFP susturma sistemi ile kanıtlandı. Bu amaçla stabil GFP⁺ MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları oluşturulduktan sonra GFP ışıması flow sitometri ile kontrol edildiğinde, hücrelerin %98'den fazlasının GFP eksprese ettiği gözlemlendi. Daha sonra ilk olarak GFP hedefli siRNA dizisi taşıyan lentivirüslerin etkinliği bu hücreler üzerinde tespit edildiğinde kontrol scrambled shRNA taşıyan lentivirüslerle yapılan transdüksiyona kıyasla, GFP ekspresyonunun azaldığı gözlemlendi. Kullanılan LV sistemin GFP susturma etkisi gösterildikten sonra, bu sistemle transdükte edilen NK hücrelerinden izole edilen eksozomların da benzer bir susturma etkisi olup olmadığı test edildi. Bu çalışmada kullanılan insan NK hücre hattı olarak FDA onaylı bir hücre hattı olan NK92MI seçilmiştir. Böylece, bu prelinik çalışmada kullanılan sisteminin kliniğe uygulanabilirliği artırılmıştır. Transdükte NK hücrelerinden izole edilen eksozomlar, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde GFP ekspresyonunu başarıyla azalttığı belirlendi. Böylece, NK hücrelerinde üretilen siRNA'ların, NKExolara da yüklendiği başarıyla gösterilmiştir.

ER⁺ meme kanserinde, BCL-2 inhibitörü Venetoclax'ın aromataz/siklin bağımlı kinaz inhibitörleri ile kombine kullanımını araştıran klinik faz I ve Venetoclax'ın hormon tedavisi ile birlikte kullanımını araştıran klinik faz II çalışmalarında (sırasıyla; NCT03900884 & NCT03584009) BCL-2'nin hedeflenmesi ve etkileri değerlendirilmektedir (Ngoi ve ark., 2020). Bu çalışmalarda etkinliğin önemli ölçüde olmasına rağmen, genel olarak sistemik BCL-2 inhibisyonu lenfopeni, nötropeni ve trombositopeniye neden olmuş ve bu durum hastaların önemli bir kısmında Venetoclax uygulanmasının durdurulmasını gerektirmiştir (Mato ve ark., 2018). Bu

alışmalar, kanser hücrelerinin spesifik olarak hedeflenmesine yönelik stratejiler arasında ER⁺ meme kanserinde BCL-2 susturulmasının umut verici bir yaklaşımla olacağını düşünmemize yol açmıştır. Transdüksiyon sonrası siRNA'nın NK eksozomlarına başarıyla yüklendiğini ve sistemin meme kanseri hücre hattı üzerindeki susturma özelliğinin aktif olduğunu GFP susturma ile kanıtlanmasının ardından kontrol olarak hedefi olmayan Scrambled ve BCL-2 spesifik siRNA taşıyan lentiviral partiküller benzer şekilde üretildi. NK92MI-siBCL-2 alt klonlarından BCL-2 ekspresyonu en düşük olan alt klon seçildi (normal seviyeye göre %80 azalma) ve böylece siRNA sisteminin en etkin çalıştığı klon ile çalışmalara devam edildi. BCL-2 normal fizyolojide görev yapan bir molekül olduğu için NK hücreleri de BCL-2'yi doğal olarak ifade etmektedir. NK hücrelerine eksozomlara yüklenmesi için transdükte edilen BCL-2 shRNA'nın, hücrelerin kendisinde bulunan BCL-2'yi susturması durumunda hücre canlılığının ve hücre sitotoksitesinin etkilenip etkilenmeyeceği tayin edilmiştir. Bu amaçla, Bcl-2 susturulmasının NK hücre canlılığı üzerindeki etkisi kontrole göre %10 oranında azalmış olmasına rağmen NK hücre efektörü olan K562 üzerindeki sitotoksitesinde anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

İzole edilen NKExolar farklı konsantrasyonlarda meme kanseri hücre hatlarına transfekte edilerek MCF-7 hücrelerindeki BCL-2 ekspresyonunun artan eksozom konsantrasyonuna bağımlı olarak azaldığı tespit edildi. Ardından 200µg/ml NKExo konsantrasyonu kullanılarak transfekte edilen MCF-7 hücrelerinde BCL-2 ekspresyonu; qRT-PCR ile mRNA düzeyinde ve flow sitometri ile hücreiçi BCL-2 seviyesi incelendiğinde siScrambled NKExolara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (%50) tespit edildi. Virüsler, oğalabilmek için başka bir hücreye ihtiyaç duydukları için, hücre içerisine genetik materyallerini taşımak biyolojik özellikleri arasındadır. Dolayısıyla bir gen taşıyıcı sistemde olması gereken mekanizmalar, virüslerde doğal olarak bulunur. Bu sebeple viral vektörler genelde nonviral vektörlere kıyasla daha etkin gen taşıyıcı sistemlerdir. Fakat bu vektörlerin uygulamalarında güvenlik, maliyet ve immün yanıtı tetikleme açısından aşılması gereken problemler vardır (Follenzi ve ark., 2007). Bu yüzden de güvenli ve biyoyumlu eksozomlarla araştırmamızda görülen susturma etkinliği başarılıdır. Eksozomların transfeksiyon için transfeksiyon ajanı gibi kimyasallara da ihtiyaç olmaması hem maliyet hem toksisite açısından avantajlıdır. Farelerdeki omuriliği hasarı modelinde mezenkimal kök hücrelerden izole

edilen eksozomlara elektroporasyonla yüklenen CTGF'e özgül siRNA'larda, bu proteinin ekspresyonunu benzer miktarda susturmuştur (Huang ve ark., 2021). Başka bir çalışmada ise mide kanserinde sisplatin direncini tersine çevirmek amacıyla, c-MET'le transfekte HEK-293T hücrelerinden izole edilen eksozomlar, kullanılan dirençli mide kanseri hücre hattında c-met ekspresyonunu %60 azalttığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2020). Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada başarı ile üretilen eksozom sistemi ile yüksek etkinlikte ve literatürle örtüşen şekilde susturma etkinliği görüldüğü sonucuna varılabilmektedir.

siRNA taşıyan eksozomlarla muamele edilen meme kanseri hücrelerinin hücre canlılığındaki azalmanın, artan apoptozla ilişkili olup olmadığı apoptoz yolağındaki kaspaz proteinlerinin seviyeleri incelenerek çalışılmıştır. Scrambled siRNA yüklü NK kaynaklı eksozom ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerine nazaran BCL-2 siRNA yüklü eksozom ile tedavi edilen hücrelerde tedavi sonrasında 12. saatten itibaren Annexin V ve Kaspaz 3/7 aktivasyonunda önemli derecede artış gözlemlendi. Kaspaz 3/7 hem intrinsik hem ekstrinsik apoptotik yolda aktive olmaktadır ve bu veriler ışığında BCL-2 susturulmasının, meme kanseri hücrelerinde apoptozu tetikleyerek hücre canlılığını azalttığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuç hücreler 7-AAD ve Annexin-V ile boyandığında, erken ve geç apoptozdaki hücre sayısında gözlenen artış ile de desteklenmiştir. Tekedereli ve arkadaşlarının MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri üzerindeki çalışmasında da BCL-2 siRNA bu hücrelere nanolipozomlarla verildiğinde, hücrelerin koloni oluşturma miktarının azaldığını ve hücre ölümünün arttığı gösterilmiştir (Tekedereli ve ark., 2013). Aynı çalışmada, sistemik olarak uygulanan nanolipozomal-siRNA ile BCL-2'yi in vivo terapötik hedeflemenin, hem ER(-) hem de ER(+) meme tümörlerinin büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini ve kemoterapi etkinliğini de arttırdığını göstermiştir. Bu da BCL-2'nin siRNA tarafından terapötik olarak susturulmasının meme kanserlerinde uygun bir yaklaşım olduğunu göstermektedir.

TMRE negatif olan hücreler Cyt C salınımı ve Kaspaz 9 aktivasyonu ile sonuçlanan mitokondriyal işlev bozukluğunun göstergesidir. Çalışmamızda TMRE boyama ile TMRE⁺ hücrelerinin ~%20 oranında arttığı ve siBCL-2 NKExolar ile tedavi edilen hücrelerde siScr NKExolara kıyasla mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulma eğilimi gösterdiği tespit edildi. Mekanizmayı daha ayrıntılı anlamak amacıyla Kaspaz

9 aktivitesini incelediğimizde ise %45’lik bir artış olduğu tespit edildi. Bu sayede MCF-7 hücrelerinde siBCL-2 NKExoların apoptotik olarak etkin olmasının NKExolarının sahip olduğu sitotoksik etkilerine ek olarak posttranskripsiyonel BCL-2 susturulması ve bunun sonucu olarak apoptozun intrinsik yolağının da aktive olması sayesinde olduğu kanıtlandı.

Bazı çalışmalar eksozomları doğrudan tümörü hedeflemek kullanmaktadır. Alvarez-Erviti ve ark. (2011); kan beyin bariyerinde ve nöronlarda eksprese edilen asetilkolin reseptörüne spesifik olarak RVG (kuduz virüs glikoproteininden kaynaklanan kısa peptit) peptitleri kullanılmıştır. RVG ile füzyon halinde Lamp2b ifade etmesi için dendritik hücreler genetik mühendisliği ile modifiye edilmiştir. Bu sayede Lamp2b, RVG peptiflerini eksozomların dış yüzeyine getirmektedir ve bu eksozomların spesifik olarak kan beyin bariyerinde ve nöronlarda eksprese edilen asetilkolin reseptörünü tanıması sağlayarak hedeflemeye aracılık ettiği belgelenmiştir. Bizim çalışmamızda da stabil NK hücre hatlarımız hali hazırda üretilmiş olduğundan, bu tür gen mühendisliği çalışmalarını yapmak için platform sağlayacaktır.

Özetle, bu çalışmada lentiviral olarak modifiye edilen NK hücrelerinin siRNA’yı eksozomlarına yüklediği gösterilmiştir. Sonuçlarımız siBCL-2 yüklü NKExoların ER⁺ meme kanserinde umut verici bir apoptoz kabiliyeti sergilediğini ve zaman içinde Annexin V, Caspase 3/7 ve Caspase 9 indüksiyonuna yol açtığını göstermiştir. Bu da siRNA NKExoların meme kanseri tedavisindeki etkinliğini açıkça ortaya koymaktadır. Böylece literatürde ilk defa, NKExolarının anti tümör etkileri, gen taşıyıcı sistem olarak kullanılmasıyla birleştirilmiş ve meme kanseri hücrelerinde BCL-2 hedefli gen tedavisi için başarıyla kullanılmıştır.

8. KAYNAKLAR

Ahern TP, Lash TL, Damkier P, Christiansen PM, Cronin-Fenton DP. Statins and breast cancer prognosis: evidence and opportunities. *Lancet Oncol* 2014;15:e461-468.

Akar U, Chaves-Reyez A, Barria M, Tari A, Sanguino A, Kondo Y, Kondo S, et al. Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy* 2008;4:669-679.

Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhal S, Wood MJ. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* 2011;29:341-345.

Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, Benoit L, Bonnetain F, Migeon C, Cabaret V, et al. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer* 2006;94:259-267.

Bao Q, Shi Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* 2007;14:56-65.

Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S, Safari E, et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol* 2020;84:106535.

Batista IA, Quintas ST, Melo SA. The Interplay of Exosomes and NK Cells in Cancer Biology. *Cancers (Basel)* 2021;13.

Batrakova EV, Kim MS. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release* 2015;219:396-405.

Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, Trefzer U, Pavlick AC, et al. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol* 2006;24:4738-4745.

Burz C, Berindan-Neagoe I, Balacescu O, Irimie A. Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol* 2009;48:811-821.

Cao Y, Tan YF, Wong YS, Liew MWJ, Venkatraman S. Recent Advances in Chitosan-Based Carriers for Gene Delivery. *Mar Drugs* 2019;17.

Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2020;17:395-417.

Chen S, Tang Y, Liu Y, Zhang P, Lv L, Zhang X, Jia L, et al. Exosomes derived from miR-375-overexpressing human adipose mesenchymal stem cells promote bone regeneration. *Cell Prolif* 2019;52:e12669.

Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, Tabi Z. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol* 2008;180:7249-7258.

Corral Sanchez MD, Fernandez Casanova L, Perez-Martinez A. Beyond CAR-T cells: Natural killer cells immunotherapy. *Med Clin (Barc)* 2020;154:134-141.

Debatin KM, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 2004;23:2950-2966.

Delbridge AR, Grabow S, Strasser A, Vaux DL. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 2016;16:99-109.

Delbridge AR, Strasser A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ* 2015;22:1071-1080.

Delou JM, Biasoli D, Borges HL. The Complex Link between Apoptosis and Autophagy: a Promising New Role for RB. *An Acad Bras Cienc* 2016;88:2257-2275.

Di Pace AL, Tumino N, Besi F, Alicata C, Conti LA, Munari E, Maggi E, et al. Characterization of Human NK Cell-Derived Exosomes: Role of DNAM1 Receptor In Exosome-Mediated Cytotoxicity Against Tumor. *Cancers (Basel)* 2020;12.

Du C, Zhang X, Yao M, Lv K, Wang J, Chen L, Chen Y, et al. Bcl-2 promotes metastasis through the epithelial-to-mesenchymal transition in the BCap37 medullary breast cancer cell line. *Oncol Lett* 2018;15:8991-8898.

Duan L, Xu L, Xu X, Qin Z, Zhou X, Xiao Y, Liang Y, et al. Exosome-mediated delivery of gene vectors for gene therapy. *Nanoscale* 2021;13:1387-1397.

El Andaloussi S, Lakhal S, Mager I, Wood MJ. Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:391-397.

El-Khattouti A, Selimovic D, Haikel Y, Hassan M. Crosstalk between apoptosis and autophagy: molecular mechanisms and therapeutic strategies in cancer. *J Cell Death* 2013;6:37-55.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495-516.

Engel RH, Kaklamani VG. HER2-positive breast cancer: current and future treatment strategies. *Drugs* 2007;67:1329-1341.

Enomoto M, Hirai T, Kaburagi H, Yokota T. Efficient Gene Suppression in Dorsal Root Ganglia and Spinal Cord Using Adeno-Associated Virus Vectors Encoding Short-Hairpin RNA. *Methods Mol Biol* 2016;1364:277-290.

Fais S. NK cell-released exosomes: Natural nanobullets against tumors. *Oncoimmunology* 2013;2:e22337.

Farooqi AA, Desai NN, Qureshi MZ, Librelotto DRN, Gasparri ML, Bishayee A, Nabavi SM, et al. Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds. *Biotechnol Adv* 2018;36:328-334.

Follenzi A, Santambrogio L, Annoni A. Immune responses to lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* 2007;7:306-315.

Fuertes MB, Domaica CI, Zwirner NW. Leveraging NKG2D Ligands in Immuno-Oncology. *Front Immunol* 2021;12:713158.

Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006;25:4798-4811.

Gao JJ, Swain SM. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. *Oncologist* 2018;23:556-565.

Gardner CR. Anticancer drug development based on modulation of the Bcl-2 family core apoptosis mechanism. *Expert Rev Anticancer Ther* 2004;4:1157-1177.

Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2005;55:178-194.

Goncalves H, Jr., Guerra MR, Duarte Cintra JR, Fayer VA, Brum IV, Bustamante Teixeira MT. Survival Study of Triple-Negative and Non-Triple-Negative Breast Cancer in a Brazilian Cohort. *Clin Med Insights Oncol* 2018;12:1179554918790563.

Hahm HA, Davidson NE. Apoptosis in the mammary gland and breast cancer. *Endocrine-Related Cancer Endocr Relat Cancer* 1998;5:199-211.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-674.

Hannun YA. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood* 1997;89:1845-1853.

He C, Zheng S, Luo Y, Wang B. Exosome Theranostics: Biology and Translational Medicine. *Theranostics* 2018;8:237-255.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-776.

Higgins MJ, Stearns V. Understanding resistance to tamoxifen in hormone receptor-positive breast cancer. *Clin Chem* 2009;55:1453-1455.

Hu B, Zhong L, Weng Y, Peng L, Huang Y, Zhao Y, Liang XJ. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduct Target Ther* 2020;5:101.

Huang W, Qu M, Li L, Liu T, Lin M, Yu X. SiRNA in MSC-derived exosomes silences CTGF gene for locomotor recovery in spinal cord injury rats. *Stem Cell Res Ther* 2021;12:334.

Huang Z, Lei X, Zhong M, Zhu B, Tang S, Liao D. Bcl-2 small interfering RNA sensitizes cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma A549/DDP cell to cisplatin and diallyl disulfide. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007;39:835-843.

Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int* 2014;2014:852748.

Jagani H, Kasinathan N, Meka SR, Josyula VR. Antiapoptotic Bcl-2 protein as a potential target for cancer therapy: A mini review. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2016;44:1212-1221.

Jain V, Kumar H, Anod HV, Chand P, Gupta NV, Dey S, Kesharwani SS. A review of nanotechnology-based approaches for breast cancer and triple-negative breast cancer. *J Control Release* 2020;326:628-647.

Jiang M, Milner J. Bcl-2 constitutively suppresses p53-dependent apoptosis in colorectal cancer cells. *Genes Dev* 2003;17:832-837.

Jong AY, Wu CH, Li J, Sun J, Fabbri M, Wayne AS, Seeger RC. Large-scale isolation and cytotoxicity of extracellular vesicles derived from activated human natural killer cells. *J Extracell Vesicles* 2017;6:1294368.

Juin P, Geneste O, Gautier F, Depil S, Campone M. Decoding and unlocking the BCL-2 dependency of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2013;13:455-465.

Kaban K, Hinterleitner C, Zhou Y, Salva E, Kantarci AG, Salih HR, Marklin M. Therapeutic Silencing of BCL-2 Using NK Cell-Derived Exosomes as a Novel Therapeutic Approach in Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2021;13.

Kaban K, Salva E, Akbuga J. In Vitro Dose Studies on Chitosan Nanoplexes for microRNA Delivery in Breast Cancer Cells. *Nucleic Acid Ther* 2017;27:45-55.

Kaban K, Salva E, Akbuga J. Modulation of the dual-faced effects of miR-141 with chitosan/miR-141 nanoplexes in breast cancer cells. *J Gene Med* 2019;21:e3116.

Kaban K, Salva E, Akbuga J. The effects of chitosan/miR-200c nanoplexes on different stages of cancers in breast cancer cell lines. *Eur J Pharm Sci* 2016;95:103-110.

Kadam CY, Abhang SA. Apoptosis Markers in Breast Cancer Therapy. *Adv Clin Chem* 2016;74:143-193.

Kamerkar S, LeBleu VS, Sugimoto H, Yang S, Ruivo CF, Melo SA, Lee JJ, et al. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature* 2017;546:498-503.

Kim J, Shim MK, Yang S, Moon Y, Song S, Choi J, Kim J, et al. Combination of cancer-specific prodrug nanoparticle with Bcl-2 inhibitor to overcome acquired drug resistance. *J Control Release* 2021;330:920-932.

Kirkin V, Joos S, Zornig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644:229-249.

Korycka-Wolowiec A, Wolowiec D, Kubiak-Mlonka A, Robak T. Venetoclax in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2019;15:353-366.

Krishnamurthy A, Jimeno A. Bispecific antibodies for cancer therapy: A review. *Pharmacol Ther* 2018;185:122-134.

Kugeratski FG, Kalluri R. Exosomes as mediators of immune regulation and immunotherapy in cancer. *FEBS J* 2021;288:10-35.

Kumar R, Vadlamudi RK, Adam L. Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocrine-related cancer Endocr Relat Cancer Endocr. Relat. Cancer* 2000;7:257-269.

Lamichhane TN, Jeyaram A, Patel DB, Parajuli B, Livingston NK, Arumugasaamy N, Schardt JS, et al. Oncogene Knockdown via Active Loading of Small RNAs into Extracellular Vesicles by Sonication. *Cell Mol Bioeng* 2016;9:315-324.

Li D, Wang Y, Jin X, Hu D, Xia C, Xu H, Hu J. NK cell-derived exosomes carry miR-207 and alleviate depression-like symptoms in mice. *J Neuroinflammation* 2020;17:126.

Li J, Wang Y, Xue S, Sun J, Zhang W, Hu P, Ji L, et al. Effective combination treatment of lung cancer cells by single vehicular delivery of siRNA and different anticancer drugs. *Int J Nanomedicine* 2016;11:4609-4624.

Li SP, Lin ZX, Jiang XY, Yu XY. Exosomal cargo-loading and synthetic exosome-mimics as potential therapeutic tools. *Acta Pharmacol Sin* 2018;39:542-551.

Liang X, Zhang L, Wang S, Han Q, Zhao RC. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a. *J Cell Sci* 2016;129:2182-2189.

Loibl S, Gianni L. HER2-positive breast cancer. *Lancet* 2017;389:2415-2429.

Lu Z, Zuo B, Jing R, Gao X, Rao Q, Liu Z, Qi H, et al. Dendritic cell-derived exosomes elicit tumor regression in autochthonous hepatocellular carcinoma mouse models. *J Hepatol* 2017;67:739-748.

Lugini L, Cecchetti S, Huber V, Luciani F, Macchia G, Spadaro F, Paris L, et al. Immune surveillance properties of human NK cell-derived exosomes. *J Immunol* 2012;189:2833-2842.

Lukong KE. Understanding breast cancer - The long and winding road. *BBA Clin* 2017;7:64-77.

Mak TW, Yeh WC. Signaling for survival and apoptosis in the immune system. *Arthritis Res* 2002;4 Suppl 3:S243-252.

Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2010;10:955-960.

Mato AR, Thompson M, Allan JN, Brander DM, Pagel JM, Ujjani CS, Hill BT, et al. Real-world outcomes and management strategies for venetoclax-treated chronic lymphocytic leukemia patients in the United States. *Haematologica* 2018;103:1511-1517.

Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *J Epidemiol Glob Health* 2019;9:217-222.

McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a008656.

Merino D, Lok SW, Visvader JE, Lindeman GJ. Targeting BCL-2 to enhance vulnerability to therapy in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene* 2016;35:1877-1887.

Metkar SS, Wang B, Ebbs ML, Kim JH, Lee YJ, Raja SM, Froelich CJ. Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *J Cell Biol* 2003;160:875-885.

Miah S, Bagu E, Goel R, Ogunbolude Y, Dai C, Ward A, Vizeacoumar FS, et al. Estrogen receptor signaling regulates the expression of the breast tumor kinase in breast cancer cells. *BMC Cancer* 2019;19:78.

Micucci F, Zingoni A, Piccoli M, Frati L, Santoni A, Galandrini R. High-efficient lentiviral vector-mediated gene transfer into primary human NK cells. *Exp Hematol* 2006;34:1344-1352.

Mohammad RM, Muqbil I, Lowe L, Yedjou C, Hsu HY, Lin LT, Siegelin MD, et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin Cancer Biol* 2015;35 Suppl:S78-S103.

Moloudizargari M, Asghari MH, Mortaz E. Inhibiting exosomal MIC-A and MIC-B shedding of cancer cells to overcome immune escape: new insight of approved drugs. *Daru* 2019;27:879-884.

Morishita M, Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Pharmacokinetics of Exosomes-An Important Factor for Elucidating the Biological Roles of Exosomes and for the Development of Exosome-Based Therapeutics. *J Pharm Sci* 2017;106:2265-2269.

Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 2014;3.

Munson P, Shukla A. Exosomes: Potential in Cancer Diagnosis and Therapy. *Medicines (Basel)* 2015;2:310-327.

Neviani P, Wise PM, Murtadha M, Liu CW, Wu CH, Jong AY, Seeger RC, et al. Natural Killer-Derived Exosomal miR-186 Inhibits Neuroblastoma Growth and Immune Escape Mechanisms. *Cancer Res* 2019;79:1151-1164.

Ngoi NYL, Choong C, Lee J, Bellot G, Wong ALA, Goh BC, Pervaiz S. Targeting Mitochondrial Apoptosis to Overcome Treatment Resistance in Cancer. *Cancers (Basel)* 2020;12.

Nicolini A, Ferrari P, Duffy MJ. Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: Past, present and future. *Semin Cancer Biol* 2018;52:56-73.

O'Brien K, Breyne K, Ughetto S, Laurent LC, Breakefield XO. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020;21:585-606.

Ocker M, Neureiter D, Lueders M, Zopf S, Ganslmayer M, Hahn EG, Herold C, et al. Variants of bcl-2 specific siRNA for silencing antiapoptotic bcl-2 in pancreatic cancer. *Gut* 2005;54:1298-1308.

Okamoto K, Murawaki Y. The therapeutic potential of RNA interference: novel approaches for cancer treatment. *Curr Pharm Biotechnol* 2012;13:2235-2247.

Ozpolat B, Sood AK, Lopez-Berestein G. Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;66:110-116.

Parton M, Dowsett M, Smith I. Studies of apoptosis in breast cancer. *BMJ* 2001;322:1528-1532.

Peng L, Jiang J, Tang B, Nice EC, Zhang YY, Xie N. Managing therapeutic resistance in breast cancer: from the lncRNAs perspective. *Theranostics* 2020;10:10360-10377.

Persidis A. Cancer multidrug resistance. *Nat Biotechnol* 1999;17:94-95.

Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)* 2016;8:603-619.

Pitt JM, Andre F, Amigorena S, Soria JC, Eggermont A, Kroemer G, Zitvogel L. Dendritic cell-derived exosomes for cancer therapy. *J Clin Invest* 2016;126:1224-1232.

Polk A, Svane IM, Andersson M, Nielsen D. Checkpoint inhibitors in breast cancer - Current status. *Cancer Treat Rev* 2018;63:122-134.

Poudel P, Nyamundanda G, Patil Y, Cheang MCU, Sadanandam A. Heterocellular gene signatures reveal luminal-A breast cancer heterogeneity and differential therapeutic responses. *NPJ Breast Cancer* 2019;5:21.

Purdie CA, Quinlan P, Jordan LB, Ashfield A, Ogston S, Dewar JA, Thompson AM. Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study. *Br J Cancer* 2014;110:565-572.

Radosa JC, Stotz L, Muller C, Kaya AC, Solomayer EF, Radosa MP. Clinical Data on Immunotherapy in Breast Cancer. *Breast Care (Basel)* 2020;15:450-469.

Reddy TL, Garikapati KR, Reddy SG, Reddy BV, Yadav JS, Bhadra U, Bhadra MP. Simultaneous delivery of Paclitaxel and Bcl-2 siRNA via pH-Sensitive liposomal nanocarrier for the synergistic treatment of melanoma. *Sci Rep* 2016;6:35223.

Rossi JJ, Rossi DJ. siRNA Drugs: Here to Stay. *Mol Ther* 2021;29:431-432.

Russo A, Terrasi M, Agnese V, Santini D, Bazan V. Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy. *Ann Oncol* 2006;17 Suppl 7:vii115-123.

Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 2008;320:1496-1501.

Sancho-Albero M, Navascues N, Mendoza G, Sebastian V, Arruebo M, Martin-Duque P, Santamaria J. Exosome origin determines cell targeting and the transfer of therapeutic nanoparticles towards target cells. *J Nanobiotechnology* 2019;17:16.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005;307:1098-1101.

Schmied BJ, Riegg F, Zekri L, Grosse-Hovest L, Buhning HJ, Jung G, Salih HR. An Fc-Optimized CD133 Antibody for Induction of Natural Killer Cell Reactivity against Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 2019;11.

Setten RL, Rossi JJ, Han SP. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2019;18:421-446.

Shaath H, Elango R, Alajez NM. Molecular Classification of Breast Cancer Utilizing Long Non-Coding RNA (lncRNA) Transcriptomes Identifies Novel Diagnostic lncRNA Panel for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel)* 2021;13.

Shao W, Paul A, Abbasi S, Chahal PS, Mena JA, Montes J, Kamen A, et al. A novel polyethyleneimine-coated adeno-associated virus-like particle formulation for efficient siRNA delivery in breast cancer therapy: preparation and in vitro analysis. *Int J Nanomedicine* 2012;7:1575-1586.

Sharma JD, Khanna S, Ramchandani S, Kakoti LM, Baruah A, Mamidala V. Prevalence of Molecular Subtypes of Breast Carcinoma and Its Comparison between Two Different Age Groups: A Retrospective Study from a Tertiary Care Center of Northeast India. *South Asian J Cancer* 2021;10:220-224.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 2020;70:7-30.

Sims AH, Howell A, Howell SJ, Clarke RB. Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;4:516-525.

Singh N. Apoptosis in health and disease and modulation of apoptosis for therapy: An overview. *Indian J Clin Biochem* 2007;22:6-16.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-792.

Sopel M. The myoepithelial cell: its role in normal mammary glands and breast cancer. *Folia Morphol (Warsz)* 2010;69:1-14.

Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, Sabatini DM, et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA* 2003;9:493-501.

Stremersch S, Vandenbroucke RE, Van Wonterghem E, Hendrix A, De Smedt SC, Raemdonck K. Comparing exosome-like vesicles with liposomes for the functional cellular delivery of small RNAs. *J Control Release* 2016;232:51-61.

Sun W, Liu XY, Ma LL, Lu ZL. Tumor Targeting Gene Vector for Visual Tracking of Bcl-2 siRNA Transfection and Anti-Tumor Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces* 2020;12:10193-10201.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209-249.

Teixeira C, Reed JC, Pratt MA. Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1995;55:3902-3907.

Tekade RK, Tekade M, Kesharwani P, D'Emanuele A. RNAi-combined nano-chemotherapeutics to tackle resistant tumors. *Drug Discov Today* 2016;21:1761-1774.

Tekedereli I, Alpay SN, Akar U, Yuca E, Ayugo-Rodriguez C, Han HD, Sood AK, et al. Therapeutic Silencing of Bcl-2 by Systemically Administered siRNA Nanotherapeutics Inhibits Tumor Growth by Autophagy and Apoptosis and Enhances the Efficacy of Chemotherapy in Orthotopic Xenograft Models of ER (-) and ER (+) Breast Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids* 2013;2:e121.

Thol F, Ganser A. Treatment of Relapsed Acute Myeloid Leukemia. *Curr Treat Options Oncol* 2020;21:66.

Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002;2:735-747.

Trudel S, Li ZH, Rauw J, Tiedemann RE, Wen XY, Stewart AK. Preclinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma. *Blood* 2007;109:5430-5438.

Vaillant F, Merino D, Lee L, Breslin K, Pal B, Ritchie ME, Smyth GK, et al. Targeting BCL-2 with the BH3 mimetic ABT-199 in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Cell* 2013;24:120-129.

Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007;9:654-659.

Vaz-Luis I, Winer EP, Lin NU. Human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer: does estrogen receptor status define two distinct subtypes? *Ann Oncol* 2013;24:283-291.

Videira M, Arranja A, Rafael D, Gaspar R. Preclinical development of siRNA therapeutics: towards the match between fundamental science and engineered systems. *Nanomedicine* 2014;10:689-702.

Videira M, Arranja A, Rafael D, Gaspar R. Preclinical development of siRNA therapeutics: towards the match between fundamental science and engineered systems. *Nanomedicine* 2014;10:689-702.

Wagner J, Wickman E, DeRenzo C, Gottschalk S. CAR T Cell Therapy for Solid Tumors: Bright Future or Dark Reality? *Mol Ther* 2020;28:2320-2339.

Wang J, Seebacher N, Shi H, Kan Q, Duan Z. Novel strategies to prevent the development of multidrug resistance (MDR) in cancer. *Oncotarget* 2017;8:84559-84571.

Wen C, Seeger RC, Fabbri M, Wang L, Wayne AS, Jong AY. Biological roles and potential applications of immune cell-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2017;6:1400370.

Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30:87.

Wu X, Zheng Y, Yang D, Chen T, Feng B, Weng J, Wang J, et al. A strategy using mesoporous polymer nanospheres as nanocarriers of Bcl-2 siRNA towards breast cancer therapy. *J Mater Chem B* 2019;7:477-487.

Xia Y, Rao L, Yao H, Wang Z, Ning P, Chen X. Engineering Macrophages for Cancer Immunotherapy and Drug Delivery. *Adv Mater* 2020;32:e2002054.

Xu Y. DNA damage: a trigger of innate immunity but a requirement for adaptive immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2006;6:261-270.

Yilmaz A, Cui H, Caligiuri MA, Yu J. Chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol* 2020;13:168.

Yoon YJ, Kim OY, Gho YS. Extracellular vesicles as emerging intercellular communicasomes. *BMB Rep* 2014;47:531-539.

Zekri L, Vogt F, Osburg L, Muller S, Kauer J, Manz T, Pflugler M, et al. An IgG-based bispecific antibody for improved dual targeting in PSMA-positive cancer. *EMBO Mol Med* 2021;13:e11902.

Zeng X, Liu C, Yao J, Wan H, Wan G, Li Y, Chen N. Breast cancer stem cells, heterogeneity, targeting therapies and therapeutic implications. *Pharmacol Res* 2021;163:105320.

Zhang G, Wang T. Efficient lentiviral transduction of different human and mouse cells. In: *bioRxiv*; 2018.

Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, Mi S. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2015;13:17-24.

Zhang MH, Man HT, Zhao XD, Dong N, Ma SL. Estrogen receptor-positive breast cancer molecular signatures and therapeutic potentials (Review). *Biomed Rep* 2014;2:41-52.

Zhang MM, Bahal R, Rasmussen TP, Manautou JE, Zhong XB. The growth of siRNA-based therapeutics: Updated clinical studies. *Biochem Pharmacol* 2021;189:114432.

Zhang Q, Zhang H, Ning T, Liu D, Deng T, Liu R, Bai M, et al. Exosome-Delivered c-Met siRNA Could Reverse Chemoresistance to Cisplatin in Gastric Cancer. *Int J Nanomedicine* 2020;15:2323-2335.

Zhang S, Zhao Y, Zhi D, Zhang S. Non-viral vectors for the mediation of RNAi. *Bioorg Chem* 2012;40:10-18.

Zhou Y, Zhou G, Tian C, Jiang W, Jin L, Zhang C, Chen X. Exosome-mediated small RNA delivery for gene therapy. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2016;7:758-771.

Zhu L, Kalimuthu S, Gangadaran P, Oh JM, Lee HW, Baek SH, Jeong SY, et al. Exosomes Derived From Natural Killer Cells Exert Therapeutic Effect in Melanoma. *Theranostics* 2017;7:2732-2745.

Zu H, Gao D. Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *AAPS J* 2021;23:78.

9. EKLER

Tüm ekler dosya halinde enstitüye teslim edilmiştir.

EK 1 - Tez Çalışmasından Üretilen Yayın

Kaban, K.; Hinterleitner, C.; Zhou, Y.; Salva, E.; Kantarci, A.G.; Salih, H.R.; Märklin, M. Therapeutic Silencing of BCL-2 Using NK Cell-Derived Exosomes as a Novel Therapeutic Approach in Breast Cancer. Cancers 2021, 13, 2397. <https://doi.org/10.3390/cancers13102397>

EK 2 – Tez Çalışmasından Üretilen Bildiriler

Yazılı bildiri (poster)

Salva, E.; **Kaban, K.;** Kantarcı, G. The inducing of lentiviral vector mediated BAX expression in NK cells. 8th BBBB International conference on Pharmaceutical Sciences. Izmir, Turkey. 14-16 October 2019.

Sözlü bildiri

Kaban, K.; Salva, E.; Kantarci, A.G. Treatment of cancer with NK cell-derived exosomes loaded with Bcl-2 siRNAs. 2nd International Pharmaceutical Biotechnology Symposium, Online Symposium, 22 Aralık 2022.

Diğer bilimsel faaliyetler

Ulusal ve uluslararası yayınlar

- Greiner SM., Märklin M., Holzmayer S., **Kaban K.**, Meyer S., Hinterleitner C., Tandler C., Hagelstein I., Jung G., Salih HR., Heitmann JS., Kauer J. Identification of CD105 (endoglin) as novel risk marker in CLL. Ann Hematol. 2022;101(4):773-780. <https://doi.org/10.1007/s00277-022-04756-4>
- **Kaban, K.**, Greiner, S.M., Holzmayer, S., Tandler, C., Meyer, S., Hinterleitner, C., Salih, H.R., Märklin, M., Heitmann, J.S. Immunoprofiling of 4-1BB Expression Predicts Outcome in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). Diagnostics. 2021; 11: 2041. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11112041>
- **Kaban, K.**; Hinterleitner, C.; Zhou, Y.; Salva, E.; Kantarci, A.G.; Salih, H.R.; Märklin, M. Therapeutic Silencing of BCL-2 Using NK Cell-Derived Exosomes as a Novel Therapeutic Approach in Breast Cancer. Cancers. 2021; 13:2397. <https://doi.org/10.3390/cancers131023977>
- Badem, M., Sener, S. O., Kanbolat, S., Korkmaz, N., Yildirmiş, S., Ozgen, U., Aliyazicioglu, R., Salva, E., **Kaban, K.**, Kandemir, A., Calıs, İ. Evaluation of biological activities of Barbarea integrifolia and isolation of a new glucosinolate derivated compound. Zeitschrift für Naturforschung C. 2021; 77(9-10):375-382. <https://doi.org/10.1515/znc-2020-0305>
- **Kaban, K.**, Salva, E., Akbuga, J. Modulation of the dual-faced effects of miR-141 with chitosan/miR-141 nanoplexes in breast cancer cells. J Gene Med. 2019;21(9):e3116. [doi: 10.1002/jgm.3116](https://doi.org/10.1002/jgm.3116)
- **Kaban, K.**, Salva, E., Akbuga, J. In vitro dose studies on chitosan nanoplexes for microrna delivery in breast cancer cells. Nucleic Acid Ther. 2017;27(1):45-55. [doi: 10.1089/nat.2016.0633](https://doi.org/10.1089/nat.2016.0633)
- **Kaban, K.**, Salva, E., Akbuga, J. The effects of chitosan/miR-200c nanoplexes on different stages of cancers in breast cancer cell lines. Eur J Pharm Sci. 2016;95:103-110. [doi: 10.1016/j.ejps.2016.05.030](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.05.030)

Uluslararası ve ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- **Kaban, K.;** Salva, E.; Kantarci, A.G. Treatment of cancer with NK cell-derived exosomes loaded with Bcl-2 siRNAs. 2nd International Pharmaceutical Biotechnology Symposium, Online Symposium, 22 December 2022.
- Märklin, M.; Holzmayer, S.; **Kaban, K.;** Müller, MR.; Salih, HR. Abstract 2104: NK cell immunosurveillance of tumors is regulated by NFAT1 and NFAT2. Cancer Res. 2022; 82 (12_Supplement): 2104. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2022-2104>
- Holzmayer, SJ.; Greiner, SM.; **Kaban, K.;** Heitmann, JS.; Salih, HR.; Maerklin, M. Abstract 2102: NFAT2 determines susceptibility of chronic lymphocytic leukemia cells to constitutive and Rituximab-induced NK cell killing. Cancer Res. 2022; 82 (12_Supplement): 2102. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2022-2102>
- Salva, E.; **Kaban, K.;** Kantarcı, G. The inducing of lentiviral vector mediated BAX expression in NK cells. 8th BBBB International conference on Pharmaceutical Sciences. 14-16 October 2019. Izmir, Turkey.
- **Kaban, K.,** Salva, E., Alan, S., Kabasakal, L., Akbuga, J. Chitosan-Mediated Co-Delivery of miR-200c and miR-141 for Breast Cancer Treatment: In vivo Studies. XXIVth Annual Meeting DG-GT. September, 2018. Freiburg, Germany.
- **Kaban, K.,** Salva, E., Akbuga, J. The effect of tumor suppressive miR-200c and miR-141 optimization in breast cancer cell lines. 11th Annual Meeting of the Oligonucleotide Society. October 2015. Leiden, Netherlands.