

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ANTI-KIR İLE AKTİVE EDİLMİŞ NK-92 HÜCRELERİNİN MEME KANSERİ
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ÖLDÜRÜCÜ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nil KILIÇ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2021**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

ANTİ-KIR İLE AKTİVE EDİLMİŞ NK-92 HÜCRELERİNİN MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDE ÖLDÜRÜCÜ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Nil KILIÇ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İrfan KANDEMİR
Eş-Danışman: Öğr. Gör. Dr. Mohammadreza DASTOURI

Meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen sağlık sorunudur. Her yıl binlerce kadını etkilemektedir. Meme kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel yöntemler komplikasyonlara neden olmaktadır. Bu durum yeni bir tedavi modeli arayışını zorunlu kılmaktadır. İmmün hücre alt grubu NK hücreleri sitotoksik özellikleri ile dikkat çekmektedir. Kanser hücreleriyle savaşmada çok etkilidirler. NK hücrelerinin en sitotoksik olanı NK-92'dir. Bu tezde, aktivatör reseptörü KIR2DL4 anti-KIR2DL4 mAb 33 ile sitotoksik NK-92 hücreleri uyarılarak NK-92 hücrelerinin aktivasyonu sağlanmıştır. Aktive edilmiş NK-92 hücreleri ile meme kanseri hücre hatlarına karşı sitotoksik etki artırılmaya çalışılmıştır. Ayrıca trastuzumab ve anti-KIR2DL4 mAb antikor kombinasyonunun HER2+ meme kanseri hücrelerine karşı öldürme etkinliği değerlendirilmiştir. İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri, 1:1, 1:5 ve 1:10 hücre oranlarında meme kanseri MCF-7, SK-BR-3 ve normal meme MCF-12A ile birlikte kültürlendi. Antikor ve/veya trastuzumab ile birlikte kültürlenmiş hücreler, en etkili hücre oranını belirlemek için WST-1 ile sitotoksikite analizi yapılmıştır. Etkili hücre oranı belirlendikten sonra, apoptoz yolundaki Caspase 3, Caspase 9 ve Bax proteinlerinin sentezi immün boyama ve western blot ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda indüklenen NK-92 hücreleri MCF-12A normal meme hücreleri üzerinde herhangi bir etki göstermemektedir. Bununla birlikte, MCF-7 ve SK-BR-3, meme kanseri hücreleri üzerinde önemli sitotoksik etkiler göstermektedir. HER2+ SK-BR-3 için trastuzumab ve agonistik antikor kombinasyonu sonuçlarında hücre ölümü vardır. Fakat bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Agonistik antikor anti-KIR2DL4 mAb 33 ile indüklenen tüm NK-92 hücre gruplarında etkili olmasına rağmen, en etkili sonuç meme kanseri hücre hatlarına (MCF-7 ve SK-BR-3) karşı 1:10 oranında elde edilmiştir. (Hedef: Eftör). Elde edilen immün boyama ve western blot sonuçlarına göre, indüklenmiş NK-92 hücreleri ile birlikte kültürlenmiş gruplarda apoptoz yolundaki proteinler önemli ölçüde artmıştır. Elde edilen veriler yeni bir tedavi modeli sunabilme özelliğine sahiptir ve faz çalışmaları ile klinik çalışmalara yön veren temel bilgileri içermektedir.

Kasım 2021, 91 sayfa

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, İmmünoterapi, Kanser İmmünoterapisi, NK hücreleri, KIR2DL4 reseptörü, Apoptoz

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF THE KILLER EFFECT OF ANTI-KIR ACTIVATED NK-92 CELLS ON BREAST CANCER CELLS

Nil KILIÇ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. İrfan KANDEMİR
Co-Supervisor: Öğr. Gör. Dr. Mohammadreza DASTOURI

Breast cancer is the most common health problem among women. It affects thousands of women every year. Traditional methods such as chemotherapy and radiotherapy used in the treatment of breast cancer cause complications. This situation necessitates the search for a new treatment model. Immune cell subgroup NK cells attract attention with their cytotoxic properties. They are very effective in fighting cancer cells. The most cytotoxic of NK cells is NK-92. In this thesis, activation of NK-92 cells was achieved by inducing cytotoxic NK-92 cells with activator receptor KIR2DL4 anti-KIR2DL4 mAb 33. It was tried to increase the cytotoxic effect against breast cancer cell lines with activated NK-92 cells. In addition, the killing efficiency of trastuzumab and anti-KIR2DL4 mAb antibody combination against HER2+ breast cancer cells was evaluated. Induced and uninduced NK-92 cells were co-cultured with breast cancer MCF-7, SK-BR-3 and normal breast MCF-12A at cell ratios of 1:1, 1:5, and 1:10. Cells co-cultured with antibody and/or trastuzumab were performed cytotoxicity assay with WST-1 to determine the most effective cell ratio. After determining the effective cell ratio, the synthesis of Caspase 3, Caspase 9 and Bax proteins in the apoptosis pathway was analyzed by immunostaining and western blot. In the results obtained, the induced NK-92 cells do not show any effect on MCF-12A normal breast cells. However, MCF-7 and SK-BR-3 show significant cytotoxic effects on breast cancer cells. For HER2+ SK-BR-3, the combination of trastuzumab and agonistic antibody results in cell death. However, these results were not statistically significant. Although it was effective in all groups of NK-92 cells induced by agonistic antibody anti-KIR2DL4 mAb 33, the most effective result was obtained against breast cancer cell lines (MCF-7 and SK-BR-3) at a ratio of 1:10 (Target: Effector). According to the obtained immunostaining and western blot results, proteins in the apoptosis pathway were significantly increased in groups co-cultured with induced NK-92 cells. The data obtained are capable of presenting a new treatment model and contain basic information that guides phase studies and clinical studies.

November 2021, 91 pages

Key Words : Breast cancer, Immunotherapy, Cancer immunotherapy, NK cells, KIR2DL4 receptor, Apoptosis

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sürecinde desteğini ve ilgisini hiç bir zaman esirgemeyen, her konuda bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, üzerimden motivasyonu ve cesareti eksik etmeyen çok değerli hocam Prof. Dr. İrfan KANDEMİR'e

Tez sürecimde başından sonuna istediğim bir konuda şekillenmesini sağlayan, her fırsatta bilgi ve tecrübesini en püf noktasına kadar paylaşan, akademik çalışma ve ilerleyişte çok kıymetli bilgiler edindiğim, bilgi ve tecrübesine sonsuz güvendiğim, deneyimine hep ihtiyaç duyacağım eş danışmanım kıymetli hocam Öğr. Gör. Dr. Mohammadreza DASTOURI'e

Çalışmalarım süresince desteği ve bilimsel katkıları ile hep yanımda olup yönlendiren, bilgi ve tecrübesinden her daim yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Erkan YILMAZ'a

Tez çalışmalarım sürecinde tez izleme komitemde yer alan zamanından ayırıp bu teze katkı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK'a

Tez jürimde yer alan ve tezime katkılar sunan hocalarım Prof. Dr. Leyla AÇIK ve Prof. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ'e

Deneylerde kullandığım hücre hattı NK-92 ve hücrenin çoğaltılması için gerekli bilgi ve temel malzemeyi benimle içtenlikle paylaşarak tezime büyük katkı sağlayan Acıbadem Labcell Hücre Laboratuvarı direktörü değerli hocam Prof. Dr. Ercüment OVALI'ya Ercüment Hoca aracılığı ile tanıştığım hücrenin büyütülmesi sürecinde deneyiminden yararlandığım her mailime içtenlikle cevap veren değerli hocam Dr. Derya Dilek KANCAĞI'ya,

Deneylerimde kullandığım MCF-12A, MCF-7 ve SK-BR-3 hücre hatlarını bana hediye eden hocalarım Prof. Dr. Hakan GÜRDAL'a, Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU'na ve Doç. Dr. Arzu ATALAY'a

Tez çalışmamı 121S396 numaralı proje kapsamında desteklediği için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu- Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu'na

(TÜBİTAK-SBAG) ve 20L0430006 numaralı proje kapsamında destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi'ne,

Tez çalışmamı gerçekleştirdiğim ve tüm alt yapısından yararlandığım Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı ve ailesine,

Birçok süreçte beraber olduğumuz ve keyifli vakit geçirdiğimiz Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsündeki tüm arkadaşlarıma,

Kendisi olmayıp bana kattığı manevi değeri ve sevgisiyle yüreğimde hep kalacak olanım, benimle daima gururlanacağını düşündüğüm ve motive olduğum çok özlediğim melek babam Ömer KURNAZ'a, hayatım da olduğu gibi tezimin yapılabilmesinde en büyük destekçim, her koşulda her süreçte hep yanımda olanım, güçlülüğü ile en büyük idolüm canımdan öte bitanecik annem Asiye KURNAZ'a, her koşulda en büyük destekçim canım kardeşim Zekai KURNAZ'a,

Hayatımda olduğu günden itibaren her durumda ve her koşulda en büyük destekçim, sabrı ve içtenliği ile her konu ve her kararında arkamda duranım, fikrine ve düşüncelerine hep sığındığım ve değer verdiğim, en büyük şansım canım eşim Dalokay KILIÇ'a

Benim en değerlim, kelimelere sığdırılamayacak kadar çok sevdiğim, canım kızım, bitanecik küçük meleğim Lena KILIÇ'a

Sonsuz kez teşekkür ederim...

Bu tez çalışması her zaman bilimin ışığında ilerlemesi dileği ile bitanecik kızım Lena KILIÇ'a

Hayatım boyunca olduğu gibi bu zorlu süreçtede tüm fedakarlığını gösteren, canım annem Asiye KURNAZ'a ithaf edilmiştir.

Nil KILIÇ
Ankara, Kasım 2021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Kanser	3
2.2 Meme Kanseri.....	4
2.2.1 Meme kanseri tedavisi	6
2.3 İmmünoterapi.....	6
2.4 Kanser İmmünoterapisi.....	7
2.4.1 Kanser immünoterapisinin tarihi	7
2.4.2 İmmün sistem ve kanser	8
2.4.3 Kanser hücrelerine karşı immün yanıtta rol alan hücreler	11
2.5 Kanser İmmünoterapisinde Son Gelişmeler.....	12
2.6 Meme Kanseri İmmünoterapisi.....	14
2.7 Doğal Öldürücü (Natural Killer, NK) Hücreler.....	15
2.7.1 NK hücrelerinde bulunan inhibitör ve aktivatör reseptörleri	19
2.8 NK Hücrelerinin Kanser Hücrelerini Tanıma Mekanizması	21
2.9 NK Hücreleri Üzerindeki KIR2DL4 Aktivatör Reseptörü	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	28
3.1 Materyal	28
3.1.1 Kullanılan hücre hatları	28
3.1.2 Kullanılan reaktifler ve kimyasallar	28
3.1.3 Kullanılan sarf malzemeler	29
3.1.4 Kullanılan kit ve antikorlar	29
3.1.5 Kullanılan cihazlar.....	29

3.2 Yöntem	31
3.2.1 Hücre kültürü besiyerinin hazırlanması.....	31
3.2.2 Hücre kültürü	32
3.2.3 Kullanılan hücre sayısının optimizasyonu ve plate yerleşimi	33
3.2.4 Hücre sayımı	33
3.3 NK-92 Hücrelerinin İndüklenmesi için Gerekli Etkin Antikor Konsantrasyonu ve İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu.....	34
3.4 Anti-KIR2DL4 mAb 33 Antikorumun NK-92 Hücrelerinin KIR2DL4 Reseptörlerine Tutunması	34
3.4.1 İmmün boyama öncesi yuvarlak lamellerin poly-L-lisin kaplaması.....	35
3.4.2 İmmün boyama için fiksasyon işlemi	35
3.4.3 NK-92 hücrelerinin immün boyaması.....	35
3.5 Sitotoksik Deneyler için Kanser Hücreleri ile NK-92 Hücrelerinin Ko-Kültürü.....	36
3.6 Hücre Canlılık Deneyleri (WST-1).....	37
3.7 Ko-kültür Edilmiş Hücrelerin İmmün Boyaması	40
3.8 Apoptozda Rol Oynayan Proteinlerin İmmün Boyama Analizi.....	41
3.8.1 Hücre fiksasyonu.....	42
3.8.2 İmmün boyama ve görüntüleme.....	42
3.9 Western Blot Yöntemi.....	42
3.9.1 Örneklerin hazırlanması	42
3.9.2 Toplam protein tayini	43
3.9.3 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE).....	43
3.9.4 Jelin membrana transferi.....	45
3.9.5 Membran bloklanması.....	45
3.9.6 Membranların primer antikor ile inkübasyonu.....	45
3.9.7 Membranların sekonder antikor ile inkübasyonu	46
3.10 İstatistiksel Analiz	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	47
4.1 Hücrelerin Kültür Edilmesi ve İnvert Mikroskopta Görüntülenmesi.....	47
4.2 Anti-KIR2DL4 Antikorumun NK-92 Hücreleri Üzerindeki KIR2DL4 Reseptörüne Tutunmasının İmmün Boyama ile Validasyonu	48
4.3 Ko-kültür Sonrasında Hücre Canlılık Deney Sonuçları.....	49
4.3.1 İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin MCF-12A (normal meme) hücreleri üzerindeki canlılık etkisinin sonuçları	49

4.3.2 İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin MCF-7 (meme kanser hücresi) hücreleri üzerindeki canlılık etkisinin sonuçları	50
4.3.3 İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin SK-BR-3 (meme kanser hücresi) hücreleri üzerindeki canlılık etkisinin sonuçları	51
4.3.4 İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin Trastuzumab kombinasyonu ile SK-BR-3 (meme kanser hücresi) hücreleri üzerindeki canlılık etkisinin sonuçları	52
4.4 İmmün Boyama ile Apoptoz Yolağına Ait Proteinlerin İfadesinin Belirlenmesi.....	53
4.4.1 Ko-kültür sonrası MCF-12A hücre hattının immün boyama ile apoptoz yolağına ait proteinlerin sentezinin belirlenmesi	54
4.4.1.1 Ko-kültür sonrası MCF-12A hücrelerinde Bax protein sentezinin immün boyama yöntemi ile belirlenmesi	54
4.4.1.2 Ko-kültür sonrası MCF-12A hücrelerinde Kaspaz 3 protein sentezinin immün boyama yöntemi ile belirlenmesi	55
4.4.1.3 Ko-kültür sonrası MCF-12A hücrelerinde Kaspaz 9 protein sentezinin immün boyama yöntemi ile belirlenmesi	56
4.4.2 MCF-7 hücre hattının immün boyama ile apoptoz yolağına ait proteinlerin sentezinin belirlenmesi	57
4.4.2.1 Ko-kültür sonrası MCF-7 hücrelerinde Bax protein sentezinin immün boyama yöntemi ile belirlenmesi	57
4.4.2.2 Ko-kültür sonrası MCF-7 hücrelerinde Kaspaz 3 protein sentezinin immün boyama yöntemi ile belirlenmesi	58
4.4.2.3 Ko-kültür sonrası MCF-7 hücrelerinde Kaspaz 9 protein sentezinin immün boyama yöntemi ile belirlenmesi	59
4.4.3 SK-BR-3 hücre hattının immün boyama ile apoptoz yolağına ait proteinlerin sentezinin belirlenmesi	60
4.4.3.1 Ko-kültür sonrası SK-BR-3 hücrelerinde Bax protein sentezinin immün boyama yöntemi ile belirlenmesi	60
4.4.3.2 Ko-kültür sonrası SK-BR-3 hücrelerinde Kaspaz 3 protein sentezinin immün boyama yöntemi ile belirlenmesi	61
4.4.3.3 Ko-kültür sonrası SK-BR-3 hücrelerinde Kaspaz 9 protein sentezinin immün boyama yöntemi ile belirlenmesi	62
4.5 Western Blot Analiz Sonuçları.....	63
4.5.1 MCF-12A'nın NK-92 ve iNK-92 ile ko-kültürü sonrası apoptoz yolağındaki protein sentezinin western blot ile analiz sonuçları.....	63
4.5.2 SK-BR-3'ün NK-92 ve iNK-92 ile ko-kültürü sonrası apoptoz yolağındaki protein sentezinin western blot ile analiz sonuçları.....	64
4.5.3 MCF-7'nin NK-92 ve iNK-92 ile ko-kültürü sonrası apoptoz yolağındaki protein sentezinin western blot ile analiz sonuçları.....	65

5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	67
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ.....	89



SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
°C	Santigrat Derece
γ	Gamma
β	Beta

Kısaltmalar

nm	Nanometre
7-AAD	7-Aminoactinomycin
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
ADCC	Antikor Bağımlı Hücre Aracılı Sitotoksosite
Anti	Antikor
CD	Cluster of Differentiation
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffer Saline
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ER2	Progesteron
FADD	Fas ile ilişkili ölüm alanı
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Floresan İzotiyosiyanat
FCS	Fetal Sığır Serumumu (Fetal Calf Serum)
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2

HLA	Human Leucocyte Antigen
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
ITAM	İmmünoresptör Tirozin Bazlı Aktivasyon Reseptörü
ITIM	İmmünoresptör Tirozin Bazlı İnhibisyon Reseptörü
KIR	Katil İnhibitör Reseptör
KIR2DL4	Killer Cell Immunoglobulin Like Reseptor
mAb	Monoklonal Antikor
MCF-7	İnsan meme kanseri hücre hattı
MCF-12A	İnsan normal meme hücre hattı
MHC	Majör Histokompabilite Kompleksi
ml	Mililitre
NK	Doğal Öldürücü Hücre
NK-92	Doğal Öldürücü Hücre Hattı
P	İstatistiksel Anlam
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Death Ligand 1
PFA	Paraformaldehit
PR	Östrojen
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
TGF	Tümör Büyüme Faktörü
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TRADD	Reseptör ile ilişkili ölüm alanı
WST-1	2-(4-Iodofenil)- 3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H- ıfntetrazolium, monosodyum tuzu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Meme kanserinin moleküler alt tipleri.....	4
Şekil 2.2 Uluslararası Kanser Ajansı kanser yeni tanı ve ölüm vakaları dağılım grafiği	5
Şekil 2.3 İmmün sistemde rol alan elemanlar	9
Şekil 2.4 NK hücrelerinin kanser hücrelerine etki etme mekanizmaları	16
Şekil 2.5 Apoptozun içsel ve dışsal yolağı	18
Şekil 2.6 NK hücreleri üzerinde bulunan aktive edici ve inhibe edici reseptörler.....	20
Şekil 2.7 NK hücrelerin tanıma mekanizması.....	22
Şekil 2.8 KIR protein yapıları	25
Şekil 3.1 İş akış şeması	31
Şekil 3.2 Sitotoksikite deneyi plaka yerleşimi MCF-12A, MCF-7, SK-BR-3'nin NK-92 hücreleri ile ko-kültür ve WST-1 için 96 kuyucuklu plaka yerleşimi ve SK-BR-3'nin Trastuzumab kombinasyonlu NK-92 hücreleri ile ko-kültür ve WST-1 için 96 kuyucuklu plaka yerleşimi	39
Şekil 3.3 İndüklenmiş NK-92 hücrelerinin WST-1 sonucunda elde edilen etkili hücre oranının 24 kuyucuklu plak üzerinde deney düzeneği.....	41
Şekil 4.1 Kültür edilen NK-92, MCF-12A, SK-BR-3 ve MCF-7 hücrelerinin invert mikroskopta 10X mercekle altında görüntüsü	47
Şekil 4.2 NK-92: anti-KIR2DL4 bağlanması. Çekirdek boyası (DNA boyası,) 7-AAD ve sekonder olarak FITC kullanılmıştır. Alınan yeşil sinyal antikorun membran üzerinde lokalize olduğunu, kırmızı sinyal ise çekirdek lokalizasyonunu göstermektedir (Büyütme: 64 X)	48
Şekil 4.3 Farklı oranlarda indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin, MCF-12A normal meme hücrelerinin üzerindeki sitotoksik etkisi (ns=anlamlı değil)	50
Şekil 4.4 Farklı oranlarda indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin, MCF-7 (meme kanser hücresi) hücrelerinin üzerindeki sitotoksik etkisi (* p<0.05, ** p<0.01 **** p<0.0001).....	51
Şekil 4.5 Farklı oranlarda indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin, SK-BR-3 (meme kanser hücresi) hücrelerinin üzerindeki sitotoksik etkisi (**** p<0.0001, ns=anlamlı değil)	52

Şekil 4.6 Farklı oranlarda indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin Trastuzumab kombinasyonlu SK-BR-3 (meme kanser hücresi) hücrelerinin üzerindeki sitotoksik etkisi ($p<0.0001$, ns= anlamlı değil).....	53
Şekil 4.7 MCF-12A (Normal meme hücresi)'ne ait Bax proteininin sentezinin florasan mikroskopundaki görüntüsü. Çekirdek boyası (DNA) 7-AAD (Kırmızı sinyal) ve FITC işaretli sekonder antikor (Yeşil sinyal) kullanılmıştır (100X).....	55
Şekil 4.8 MCF-12A (Normal meme hücresi)'ne ait kaspaz 3 proteininin sentezinin florasan mikroskopundaki görüntüsü. Çekirdek boyası (DNA) 7-AAD (Kırmızı sinyal) ve FITC işaretli sekonder antikor (Yeşil sinyal) kullanılmıştır (100X).....	56
Şekil 4.9 MCF-12A (Normal meme hücresi)'ne ait kaspaz 9 protein sentezinin florasan mikroskopundaki görüntüsü. Çekirdek boyası (DNA) 7-AAD (Kırmızı sinyal) ve FITC işaretli sekonder antikor (Yeşil sinyal) kullanılmıştır (100X).....	57
Şekil 4.10 MCF-7 (Meme kanser hücresi)'ne ait Bax protein sentezi florasan mikroskopundaki görüntüsü. Çekirdek boyası (DNA boyası) 7-AAD ve sekonder olarak FITC kullanılmıştır (100X).	58
Şekil 4.11 MCF-7 (Meme kanser hücresi)'ne ait Kaspaz 3 protein sentezinin florasan mikroskopundaki görüntüsü. Çekirdek boyası (DNA boyası) 7-AAD ve sekonder olarak FITC kullanılmıştır (100X)	59
Şekil 4.12 MCF-7 (Meme kanser hücresi)'ne ait kaspaz 9 proteininin florasan mikroskopundaki görüntüsü. Çekirdek boyası (DNA boyası) 7-AAD ve sekonder olarak FITC kullanılmıştır (100X)	60
Şekil 4.13 SK-BR-3 (Meme kanser hücresi)'ne ait Bax protein sentezinin florasan mikroskopundaki görüntüsü. Çekirdek boyası (DNA boyası) 7-AAD ve sekonder olarak FITC kullanılmıştır (100X)	61
Şekil 4.14 SK-BR-3 (Meme kanser hücresi)'ne ait Kaspaz 3 protein sentezinin florasan mikroskopundaki görüntüsü. Çekirdek boyası (DNA boyası) 7-AAD ve sekonder olarak FITC kullanılmıştır (100X)	62
Şekil 4.15 SK-BR-3 (Meme kanser hücresi)'ne ait Kaspaz 9 protein sentezinin florasan mikroskopundaki görüntüsü. Çekirdek boyası (DNA boyası) 7-AAD ve sekonder olarak FITC kullanılmıştır (100X)	63
Şekil 4.16 NK-92 ve iNK-92 hücreleri ile ko-kültür edilen MCF-12A hücrelerinde apoptoz yolağındaki Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 protein sentezi üzerine etkinin gösterilmesi	64
Şekil 4.17 NK-92 ve iNK-92 hücreleri ile ko-kültür edilen SK-BR-3 hücrelerinde apoptoz yolağındaki Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 protein sentezi üzerine etkinin gösterilmesi (* $p<0,05$ ** $p<0,01$)	65

Şekil 4.18 NK-92 ve iNK-92 hücreleri ile ko-kültür edilen MCF-7 hücrelerinde apoptoz yolağındaki Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 protein sentezi üzerine etkinin gösterilmesi (*p<0,05 ** p<0,01 ***p<0,001)..... 66



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Kullanılan cihazlar listesi.....	30
Çizelge 3.2 Hücre hatları ve kültür için kullanılan besiyeri içerikleri	32
Çizelge 3.3 Hücreler için ortak ko-kültür besiyeri	36
Çizelge 3.4 Gradiyent jel prosedürü.....	44
Çizelge 3.5 Western blot analiz yönteminde kullanılacak olan çözeltiler	45
Çizelge 4.1 MCF-12A ile ko-kültür edilen NK-92 ve iNK-92 hücrelerin apoptoz yolağındaki Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 protein sentezine etkisi	64
Çizelge 4.2 SK-BR-3 ile ko-kültür edilen NK-92 ve iNK-92 hücrelerin apoptoz yolağındaki Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 protein sentezine etkisi	65
Çizelge 4.3 MCF-7 ile ko-kültür edilen NK-92 ve iNK-92 hücrelerin apoptoz yolağındaki Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 protein sentezine etkisi	66

1. GİRİŞ

Kanser hücreleri yaşamsal özelliklerini kaybeden normal hücrelerin anormal bir şekilde bölünmesi ve vücutta oluşturduğu metastaz ile karakterizedir. İntrinsik veya eksojen gen mutasyonları sonucunda kanser hücreleri oluşmaktadır. Dünya çapında hala önemli bir problem olan kanser hastalığı gelecekte de etkisini sürdürmesi beklenmektedir (Zhou 2014). Kanser türleri arasında meme kanseri kadınlarda en sık görülen malignitesi yüksek kanser çeşitidir (DeSantis vd. 2014).

Geleneksel tedavi yöntemlerinden cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi ile kanser hücrelerinin yok edilmesi sağlansada, kanser hücresi kalıntıları ve metastaza bağlı hastalığın tekrarı önemli bir sorun olmaktadır. Ayrıca kemoterapi ve radyoterapinin sağlıklı hücreleride hedefliyor olması başlıca bir problem olarak görülmektedir. Bu nedenlerden dolayı günümüzde kişiye özel ve kanser hücrelerine spesifik tedavilere olan ihtiyaç ve ilgi artmaktadır (Wayteck vd. 2014). Son yıllarda geleneksel tedavilere ek olarak kanser immünolojisi ve immünoterapisi üzerine yapılan araştırmalar hız kazanmaktadır. Hedef, bağışıklık sistemi hücreleri ve molekülleri aracılığı ile kanser hücrelerinin spesifik bir şekilde yok edilmesini sağlamaktır. Vücut için yan etkisi az, daha güvenilir tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Doğal öldürücü hücreler immün sistemde sadece viral ve bakteriyel değil kanser hücrelerin yok edilmesinde de önemli görevler üstlenmiştir. Bu durumda NK hücrelerinin sitotoksik etkisi immün sistemin önemli bir parçasıdır. Kanser hücreleri ve immün sistem arasındaki ilişki oldukça ilgi konusu olmuştur ve bu yönde daha çok çalışma yapılmaya başlamıştır. İmmün sistem hücrelerinin kanser hücrelerine etkilerini inceleyen bir çok çalışma bulunmaktadır. Son yıllarda doğal öldürücü (NK) hücrelerin kanser hücrelerini kontrol altına alınmasında önemli roller aldığı yönünde çalışmalar bulunmakta ve araştırılmaya devam etmektedir (Guillerey vd. 2016).

Vücuttaki NK hücrelerinin tümü kanser hücreleri ile savaşma yeteneğinde değildir. Fakat aktivitesi yüksek olan NK hücreleri bu savaşı başlatabilir. Bu yüzden vücuttaki NK hücrelerinin sayısı kadar aktif hücreler olması da önemlidir. NK hücreleri üzerinde

çok sayıda aktive edici ve inhibe edici reseptörler bulunur (Zitvogel vd. 2016). Bu hücrelerin kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi üzerinde bulunan reseptörlerin dengesine göre belirlenmektedir. Aktivatör veya inhibitör yönünün ağır basması efektör hücrelerin davranışını belirlemektedir. Son yapılan çalışmaların çoğu NK hücreleri üzerindeki reseptör ve bunlara bağlanan kanser hücresi yüzeyindeki ligandların gösterdiği değişime dikkat çekmektedir (Pazina vd. 2017).

Meme kanserlerinin immünojenitesinde bir çok kanser çeşitinde görüldüğü gibi NK hücre ligandlarının mRNA ve protein profillerinin sağlıklı hücreye göre farklı olduğu gösterilmiştir. Bu profillerin farklılığı kanser hücrelerinde başarılı bir immünitinin sonucu olduğu düşünülmektedir (Mamassier vd. 2011). İmmün hücreler ile kanser tedavi etme çalışmaları son dönemde oldukça dikkat çekmektedir. Geleneksel yöntemlerin aksine spesifik, kanser hücresine özgü normal hücrelere zarar vermeden vücudun kendi immün sistemini kullanmak, kansere karşı tedavi yöntemi geliştirmede önemli bir adımdır. Bu doğrultuda NK-92 hücre tabanlı tedaviler ön plana çıkmaktadır. Hücrenin aktivatör yönünün desteklenmesi sitotoksite bakımından avantaj sağlamaktadır. Aktivatör reseptörü KIR2DL4'ü agonistik bir antikorla indükleyerek NK hücrelerini aktive etmek hala literatürde yer almayan özgün bir çalışmadır. NK-92 hücrelerinin anti-KIR2DL4 mAb 33 klonu ile aktive edilip meme kanser hücre hatları üzerinde anti-kanser etkisinin araştırılması ve trastuzumab ile kombinasyonu antikor tedavi yaklaşımı olarak tezin özgünlüğünü oluşturmaktadır. Bu tezden elde edilen sonuçlar, anti-KIR2DL4 mAb 33'un, meme kanseri tedavisinde kullanılması için gelecekteki *in vivo* ve faz çalışmalarına ışık tutacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER

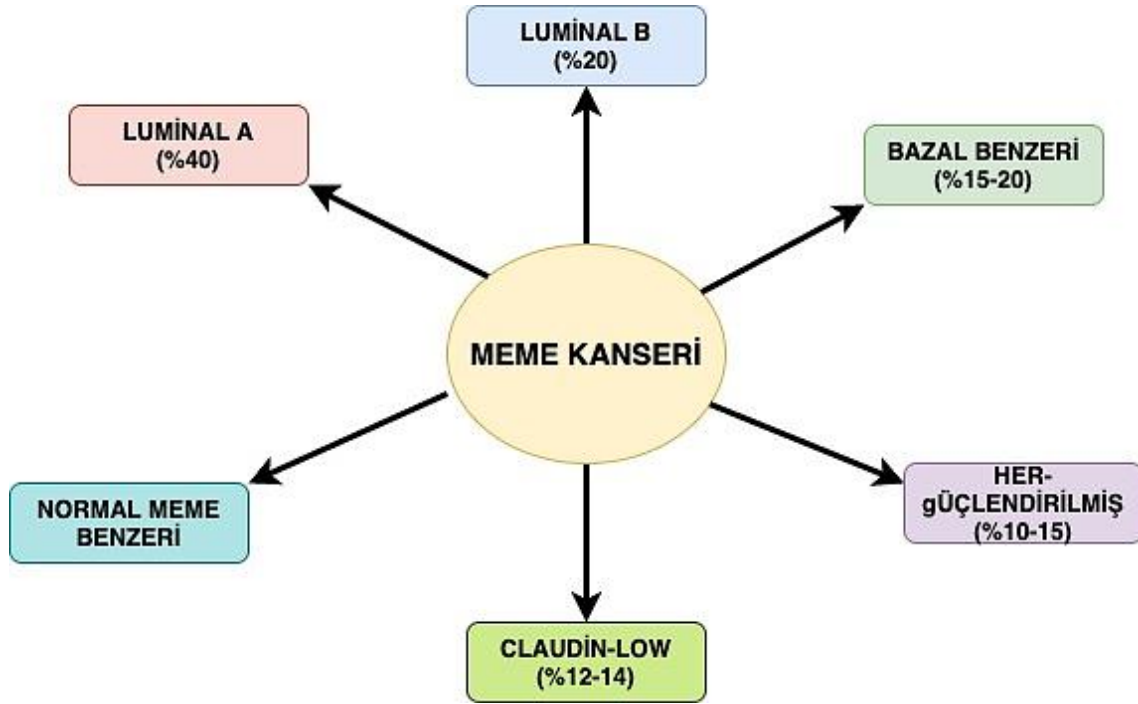
2.1 Kanser

Dünya sağlık örgütünden alınan verilere göre kanser; vücudun hemen hemen her organında ve dokusunda başlayabilen anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi ile diğer organ veya dokulara yayılarak normal sınırlarının ötesine geçen agresif bir hastalık grubudur. Başka doku ve organlara yayılma metastaz olarak adlandırılır ve kanserden ölümlerin başlıca nedenidir. Kötü huylu tümör ve neoplazma kanserin diğer yaygın isimleridir. Kanser altı farklı karakteristik özelliğe sahiptir (Hanahan ve Weinberg 2000). Bunlar; i. Hücre ölümüne direnç, ii. Anjiyogenez indüksiyonu, iii. Proliferasyon sinyalinin sürdürülmesi, iv. İnvazyon ve metastaz aktivasyonu, v. Replikatif ölümsüzlüğün sağlanması, vi. Büyüme baskılanmasından kaçıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile bu altı özelliğe ek olarak; i. İmmün sistemden kaçış, ii. Hücresel enerji sistemini yok etme olarak yeni özellikler belirlenmiştir (Hanahan ve Weinberg 2011).

Küresel olarak ikinci ölüm nedeni olan kanser 2020 yılında yaklaşık 10 milyon kişinin ölümüne neden olmuştur (Ferlay vd. 2019). Erkeklerde en yaygın kanser türleri akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer iken kadınlarda meme, kolorektal, akciğer, servikal ve tiroid kanseridir (Anonim 1). Uygun ve etkili tedavi için teşhisin önemi büyüktür. Her kanser çeşidi özel bir tedavi modeli gerektirir. Kanser tedavisi genellikle radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi içerir. En eski tedavi şekli olan cerrahi tümör bölgesini negatif sınıra kadar belirleyip çıkarmaktır. Radyoterapi, cerrahi sonrası kalan kanser hücrelerini DNA zincirine zarar verecek şekilde hücreyi öldürmesidir. Kemoterapi ise, hücre bölünmesini ve DNA sentezini durdurma amaçlı antikanser ajanların kullanımını amaçlar. Kemoterapi kanser hücrelerinin yanında sağlıklı hücreleride hedefleyerek ciddi yan etkilere yol açmaktadır (Alam vd. 2018). Bu nedenle spesifik ve yan etkisi daha az tedavi modellerinin arayışı sürmektedir. Bunun yanında tüm kanser türlerinde erken teşhisin önemi büyüktür. Meme kanseri, rahim ağzı kanseri ve kolorektal kanser türleri erken teşhis edildiğinde yüksek iyileşme oranlarına sahiptir.

2.2 Meme Kanseri

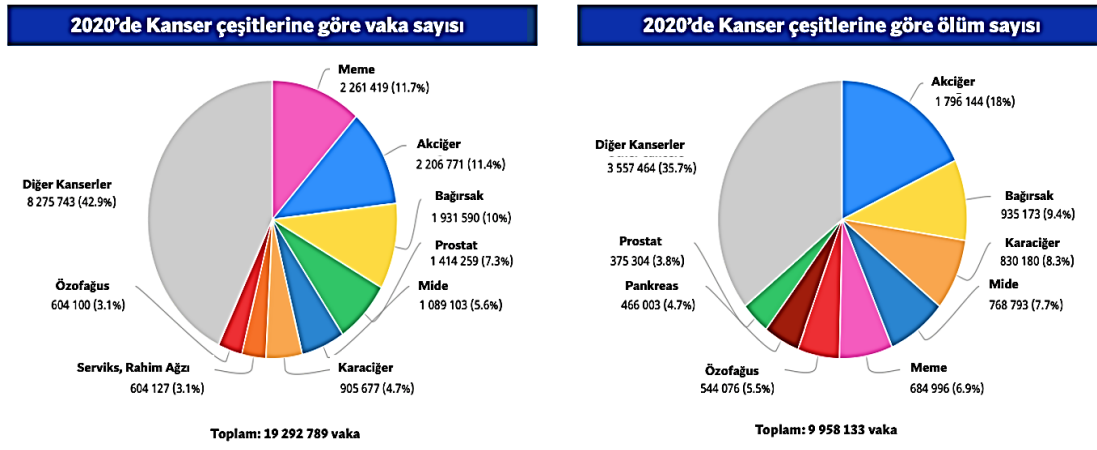
Meme kanseri, oldukça kompleks, farklı klinik ve biyolojik davranışlara sahip heterojen bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Hamilton vd. 1988, Mittendorf vd. 2014, Bayraktar vd. 2017). Meme kanserinin moleküler alt tiplerine ait patojenite ve histolojisi şekil 2.1’de gösterilmiştir (Anonim 2).



Şekil 2.1 Meme kanserinin moleküler alt tipleri (Valentin 2012’den uyarlanmıştır)

Meme kanseri % 85 memenin glandüler dokusundaki kanallarda ya da % 15 epitel hücrelerinde ortaya çıkmaktadır. Başlangıçta kanser hücrelerinin büyümesi hiçbir semptoma neden olmadan minimum yayılma ile kanal veya lobüllerde sınırlıdır. Zamanla, kanser ilerleyebilir ve çevredeki meme dokusunu istila edebilir. Daha sonra çevredeki lenf düğümlerine veya vücuttaki diğer organlara (metastaz) yayılabilir. Meme kanserinde en etkin ölüm sebebi metastazdır (Anonim 1). Meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen ve ölümlere neden olan kanser türüdür. Dünya sağlık örgütünden alınan verilere göre 2018’de dünyada tanı konulan hasta sayısının 2 milyonu aştığı ve mortaliteninde 627 bin olduğu belirtilmiştir. 2019 yılında alınan verilere göre ABD’de 271.270 kişiye yeni meme kanseri tanısı konulmuştur. Meme kanserinden kaybedilen hasta sayısının ise 42.260 olduğu tahmin edilmektedir (Siegel vd. 2019).

2020 yılında tüm dünyada meme kanseri teşhisi konan 2,3 milyon kadın bulunmaktadır ve bunların 685.000’de ölüm gerçekleşmiştir. 2020 sonu itibari ile son 5 yılda teşhisine göre kadınlar arasındaki en yaygın kanser türüdür. 2020 GLOBOCAN (Uluslararası Kanser Ajansı) istatistiklerine göre, tüm dünyada yaklaşık 19 milyon yeni kanser vakasının yaklaşık 2 milyonu meme kanseri tanısı almış ve bunların 626 bini ölümle sonuçlanmıştır (Anonim 3) (Şekil 2.2). Gelişmiş ülkelerde her 8 kadından birine meme kanseri teşhisi konulacağı tahmin edilmektedir. Bunun yanında meme kanseri görülme sıklığındaki artışa rağmen mortalitede azalma görülmektedir. Aksine gelişmekte olan ülkelerde ise görülme sıklığı ile mortalite doğru orantılıdır.



Şekil 2.2 Uluslararası Kanser Ajansı kanser yeni tanı ve ölüm vakaları dağılım grafiği (GLOBOCAN 2020) (Anonim 3)

2000’li yıllarda Türkiye’de ekonomik, sosyal, coğrafi ve kültürel faktörler nedeni ile farklı bölgelerde meme kanseri insidansı değişiklik göstermektedir. Türkiye’nin batısında meme kanseri insidansı (50/100.000) Türkiye’nin doğu kısmından (20/100.000) iki kattan daha fazla görülmektedir (Özmen 2008). Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de insidansı artmaktadır.

Meme kanseri kadın cinsiyetinde en yüksek risk faktörüdür. Meme kanserine yakalananların % 0.5-1’ini erkekler oluşturmaktadır. Ayrıca ailede meme kanseri öyküsü olması meme kanseri riskini artırmaktadır. BRCA1, BRCA2 ve PALB-2 genlerindeki yüksek penetranslı gen mutasyonları meme kanseri riskini büyük ölçüde artırmaktadır (Anonim 1).

2.2.1 Meme kanseri tedavisi

Meme kanseri tedavisi, erken teşhis edildiğinde % 90 ve üzerinde hayatta kalma olasılığı ile oldukça etkilidir. Hastalığın kontrolü için genellikle memenin lenf düğümlerinde ve çevresindeki alanlarda cerrahi, radyasyon terapisi ve kemoterapi uygulanmaktadır. Tedavide ilaçlar olarak endokrin (hormon) tedavisi, kemoterapi ve hedefe yönelik biyolojik tedavi (antikor) bulunmaktadır. Cerrahi tedavi genellikle hastalığın erken evresinde yapılan tedavi şeklidir. Radyoterapi lokal ileri evredeki kanserlerde uygulanan tedavi şeklidir. Kemoterapi ise erken evredeki hastalarda kür şansını artırmak için adjuvan, cerrahi tedaviyi kolaylaştırmak için neoadjuvan amaçlı ve ileri evredeki hastalarda yaşam ömrünü uzatmak amaçlı palyatif olarak tercih edilmektedir.

Meme kanseri için cerrahi öncesi ve sonrası verilebilecek tıbbi tedaviler kanserin biyolojik alt tipine bağlı olarak değişmektedir. Progesteron (PR) ve östrojen reseptörünü (ER) ifade eden kanserlerin, tamoksifen veya aromataz inhibitörleri gibi endokrin (hormon) tedavisine yanıt verme olasılığı yüksektir. Hormon reseptörü negatif olan kanser türleri PR ve ER eksprese etmeyen kanserlerdir ve kanser çok küçük olmadığı sürece kemoterapi ile tedavi edilmesi gerekmektedir. Günümüzde kullanılan kemoterapi çeşitleri kanserin yayılma ve nüks etme olasılığını azaltmaktadır. Ayrıca meme kanseri tedavisinde radyoterapinin de büyük önemi vardır. Erken evrede cerrahiyi önleyebilir, kanserin nüks etme riskini azaltabilmektedir (Mutebi vd. 2020). Meme kanserleri HER-2/ neu onkogeni adı verilen molekülü aşırı ifade edebilirler. HER-2 pozitif kanserler, trastuzumab gibi biyolojik ajanlar ile tedavisi mümkündür. Antikor tabanlı bu biyolojik ajanlar oldukça etkilidir. Kanser hücrelerini öldürmede daha etkili olmaları için kemoterapi ilaçları ile birleştirilmektedirler. Son yıllarda hedefe yönelik immünoterapi yaklaşımları tüm kanserlerde olduğu gibi meme kanserinde de dikkat çekmektedir.

2.3 İmmünoterapi

Bireylerin bağışıklık sisteminde yer alan hücrelerin belirli bir kısmını kullanarak kanser vb. hastalıkların tedavisinde kullanılan spesifik yöntem immünoterapi denilmektedir.

Biyolojik terapi veya biyoterapi olarakta adlandırılmaktadır (Anonim 4). Her geçen gün artmakta olan kanser vb. hastalıkların tedavi yöntemi non-spesifik yöntemlerden spesifik yöntemlere doğru ilerlemektedir. Geleneksel tedavi yöntemleri ile tümörün yok edilmesi sağlansa bile metastaz ile diğer dokulara yayılarak hastalığın nüks etmesi önemli bir sorundur. Geleneksel yöntemler ve ilaç tedavisinde kombine yaklaşımlar kanser hücreleri öldürmede başarılı olsa da aynı zamanda sağlıklı hücrelerde zarar vermektedir. Bu nedenle immünoterapi tabanlı tedavi yaklaşımlarının önemi artmaktadır (Wayteck vd. 2014). İmmünoterapide dışardan verilen maddelerle kanser hücrelerine karşı immün cevap oluşturulabildiği gibi vücudun kendi immün hücreleri ile de yanıt oluşturulabilmektedir. Örneğin; NK (Natural Killer) Hücreleri, T lenfositler, B lenfositler, makrofajlar, dentritik hücreler de tümörün yok edilmesinde rol oynayabilir. Kanser hücrelerine etki eden bu immün hücreler kemoterapötiklerin aksine direkt kanser hücrelerini hedeflerler (Barbaros ve Dikmen 2015).

2.4 Kanser İmmünoterapisi

2.4.1 Kanser immünoterapisinin tarihi

İmmün sistemin kanser tedavisinde kullanılması ve kanser hücrelerine karşı yanıt oluşturabileceği fikri ilk olarak 1980'li yıllarda William Coley isimli bir cerrah tarafından ortaya atılmış ve sarkom tedavisi için bakteri toksinlerini kullanması ile immünoterapi ortaya çıkmıştır (Coley 1893, 1908). İmmünoterapi yaklaşımı Bacillus Calmette-Guerin (BCG) bakterisinin yüzeysel mesane kanserinde etkisinin gösterilmesi ve IL-2'nin metastatik melanom tedavisinde kullanımı ile birlikte tekrar önem kazanmıştır (Morales vd. 1976, Atkins vd. 1999).

1900'lerde Paul Ehrlich tarafından tümörlerle etkileşen moleküllerin kanser tedavisinde önemli bir yere sahip olabileceği belirtilmiştir. Bu antikor aracılı pasif immünoterapi olarak sınıflandırılacak olan tedavinin ilk bulgularıdır. 1975 yılında monoklonal antikor üretimi için hibridoma teknolojisi Cesar Milstein ve George Köhler tarafından geliştirilmiştir. Monoklonal antikorlar 1982 yılında başarılı bir şekilde kullanılmış ve 1986 yılında muromonab-CD3'ü FDA tarafından onaylanmıştır. İlk hümanize

monoklonal antikor olan daclizumab ve rituximab 1997 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. FDA, 2020'ye kadar 79 farklı monoklonal antikoru onaylanmıştır. Günümüzde ise 570'den fazla terapötik monoklonal antikorların klinik faz çalışmaları sürdürülmektedir (Lu vd. 2020).

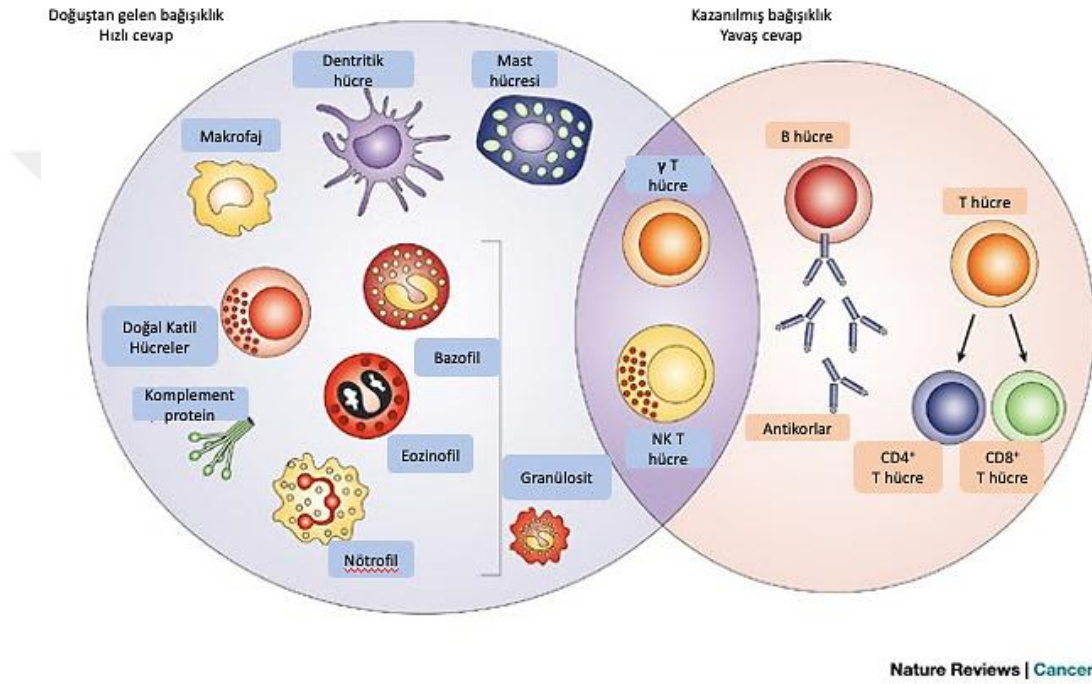
İlerleyen teknoloji sayesinde immünoloji alanındaki gelişmeler, hücresel ve humoral immünitinin daha iyi anlaşılması ile immünoterapi alanındaki gelişmeler hız kazanmıştır. İlk olarak 2010 yılında otolog hücresel immünoterapi aşısı olan Sipuleucel-T kastrasyon dirençli asemptomatik evre 4 prostat kanseri tedavisi, 2011 yılında ise anti-CTLA-4 immün denetim noktası inhibitör molekülü ipilimumab ileri evre melanom tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır (Mansh 2011, Gardner vd. 2012). Son çalışmalar ise hastanın kendi immün hücreleri kullanılarak yürütülen çalışmalarla ilerlemektedir. Bu gelişmeler dahilinde immünoterapi kanser tedavisinde cerrahi, radyasyon, sitotoksik kemoterapi ve hedefe yönelik tedavilerin yanında önemli bir yer edinmiştir.

2.4.2 İmmün sistem ve kanser

Organizmanın devamlılığının sağlanmasında, dış ve iç tehditlere karşı korumakla görevli bir takım hücre, sitokin ve proteinlerden oluşan kompleks sisteme immün sistem denilmektedir. İmmün cevap ise; konağın kendisine yabancı olan maddeyi tanıması ve ona karşı yanıt vermesidir (Akçam 2005). İmmün sistem vücudu çevresel faktörlerin ve genetik etkenlerin sebep olabileceği kansere karşı veya virüs, bakteri, mantar ve parazit gibi mikroorganizmaların oluşturabileceği enfeksiyonlara karşı korumaktadır (Anonim 4).

İmmün sistem “doğal bağışıklık” ve “edinsel (kazanılmış) bağışıklık” olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Vücut herhangi bir yabancı antijene karşı ilk doğal bağışıklık ve sonrasında daha yavaş etki gösteren edinsel (kazanılmış) bağışıklık mekanizmalarına sahiptir. Vücuda giren herhangi bir patojene veya genetik değişikliğe uğramış hücrelere karşı öncelikle doğal bağışıklık elemanlarından nötrofil ve monosit gibi fagositik hücreler, NK hücreleri, sitokinler ve bazı plazma proteinleri devreye girmektedir. Daha

sonra ise edinsel bağışıklık elemanlarından T ve B lenfositleri devreye girmektedir (Şekil 2.3). Doğal immünite vücuda giren patojenlere karşı ilk yanıt veren spesifik olmayan bir sistemdir. Kazanılmış immünite ise daha spesifik bir yanıt oluşturan, antijen tanıma kapasitesi daha fazla fakat geç yanıt oluşturulan bir sistemdir. Doğal ve edinsel bağışıklık birlikte çalışarak sağlıklı bir bireyde standart hücre döngüsünden çıkarak konağa yabancılaştırmış hücrelere karşı veya hücre içi ve dışı çeşitli patojenlere karşı korumada sağlam bir savunma sistemi oluşturmaktadır.



Şekil 2.3 İmmün sistemde rol alan elemanlar (Dranoff 2004)

İmmün sistemin kanser hücreleri ile mücadele de iki rolü vardır. Bunlardan ilki immün gözetim mekanizmasıdır. Burada immün sistem kanser hücrelerini tanıyarak yok etmektedir. Bu işlem, doğal ve kazanılmış immün sistemin ana hücreleri olan doğal öldürücü hücreler, doğal öldürücü T hücreleri, T hücreler ve interferon gibi tümör mikroçevresinde artan pro-immün humoral faktörler tarafından gerçekleştirilmektedir. İkincisinde ise, immün sistem kanser hücrelerini yok etmeye çalışırken kanser hücrelerinin de immün sisteme karşı değişiklikler meydana getirmesidir.

İmmün düzenleme üç aşamadan oluşmaktadır. Bunlar ;

Eliminasyon: Bu fazda immün sistem aktiftir ve kanser hücrelerine karşı baskındır. Bu fazdan kaçabilen kanser hücreleri çoğalmaya devam eder ve bir sonraki faz olan equilibrium (denge) fazına doğru ilerler. Büyüyen kanser hücreleri dokulara doğru göç eder ve hasar meydana gelmesi ile immün yanıt oluşmaya başlar (Grivennikov vd. 2010). İmmün sistem hücrelerinden doğal öldürücü (NK) hücreler, dendritik hücreler, makrofajlar ve T hücreleri burada toplanarak INF gama (IFN- γ) üretirler (Barbaros ve Dikmen 2015). IFN- γ apoptotik ve antiproliferatif etkileri ile kanser hücrelerinin yok edilmesini ve ortama kemokinlerin salınmasına neden olur. Kemokinler tümörlerde damar oluşumunu engeller ve ortama daha çok makrofaj hücrelerinin ve NK hücrelerinin gelmesini sağlar (Balkwill 2004, Tanaka vd. 2005). Tümörü yok eden NK hücreleri ve makrofajlar etkileşime girerek daha çok IFN- γ ve interlökin-12 üretimine sebep olurlar. Ortama tümör nekroz faktör (TNF)'lerin salınmasıyla perforin, apoptozu artıran ligand ve reaktif oksijen açığa çıkarak daha fazla kanser hücrelerinin ölümüne neden olur (Barbaros ve Dikmen 2015).

Denge (Equilibrium): Bu faz immün gözetim mekanizması olarak adlandırılmaktadır. Bu fazda eliminasyon fazından kaçan kanser hücreleri ile immün sistem dinamik bir denge içindedir. Denge fazında tümör ve immün sistem ikiside aktif durumdadır. İmmün sistem kanser hücrelerini tanıyıp yok etmeye çalıştığı esnada kanser hücreleride, tümör mikroçevresini ürettiği sitokinler ile kendisi için uygun hale getirmeye çalışır. Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β), interlökin-10 (IL-10), prostoglandin E2 (PGE2) gibi ürettiği sitokinler ile immün hücrelerini bazı dönüşümlere (T helper2, Treg, MDSC, tümör ilişkili makrofajlar) zorlayarak immün yanıtı etkisizleştirip inflamatuvar yanıtı ortadan kaldırmaya çalışırlar. Denge fazı uzun süre devam edebilir ve sonunda ya immün sistem üstün gelerek kanser hücrelerini yok eder ya da kanser hücrelerinin mücadelesi üstün gelir ve çoğalmaya başlar.

Kaçış (Escape): Kaçış fazı olan bu evrede kanser hücreleri immün sisteme karşı baskın gelmiş ve kontrolü ele almıştır. Tümör immün sistemi kendi lehine çevirmiş ve kontrolsüz bir şekilde büyümeye ve diğer dokulara yayılmaya başlamıştır (Dunn vd. 2004).

2.4.3 Kanser hücrelerine karşı immün yanıtta rol alan hücreler

Makrofajlar: Enflamasyonu başlatan ve düzenleyen sitokinler üreten makrofajlar immün sistemin önemli hücrelerindendir (Abbas vd. 2015). Makrofajlar antijen sunan hücre olarak da görev yaparlar ve kanser hücrelerinin lizisinde görev alan etki mekanizmalarını uyarırlar. Makrofajlar Th1 hücrelerinden salınan Tümör Nekroz Faktör (TNF), IFN- γ , Makrofaj aktive edici faktör (MAF) ve İnterloklin-4 (IL-4) ile aktive olurlar (Yılmaz 2019).

Doğal öldürücü (Natural Killer, NK) hücreler: İmmün sistemin önemli hücrelerinden olan NK hücreleri kanser hücrelerini veya enfekte olmuş hücreleri tanıyarak direkt olarak yok ederler. NK hücrelerinin önemli özelliğinden bir tanesi hafızalarının olmamasıdır. Bu yüzden MHC Sınıf I molekülleri olmayan kanser hücrelerini tanır ve etki ederler. NK hücrelerinin aktivitesi kanser hücrelerinin yüzeyindeki Fas reseptörü ile NK hücrelerinin yüzeyindeki Fas ligandının bağlanmasıyla gerçekleşir (Yılmaz 2019). Ayrıca taşıdıkları inhibitör ve aktivatör moleküller ile de aktivitesi düzenlenir. Aktivasyon ile perforin-granzim içeren granül ve sitokinlerin ekzositozu gerçekleşir. En bilinen doğal öldürücü hücre immünglobulin-benzeri reseptörlerdir (Killer cell immünglobulin-like receptor, KIR) (Gras Navarro vd. 2015).

Dentritik hücreler: Farklılaşmamış T lenfositleri uyaran dentritik hücreler, birincil immün yanıtın oluşmasını sağlarlar ve immün sistemin en önemli antijen sunan hücreleridir. Humoral immünitenin gelişmesinde ve B lenfositlerin fonksiyonunda önemli rol oynarlar. Bu özelliklerinden dolayı edinsel ve doğal immünitede köprü görevi görürler (Söker 2005, Hoffbrand ve Pettit 2013, Eyüpoğlu Ünüvar 2014).

T lenfositler: İmmün sistemin kanser hücreleri ile savaşında önemli göreve sahip T hücrelerinin iki önemli fonksiyonu vardır. Bunlar:

- Kanser hücrelerine ait olan antijenleri tanırlar ve immün sistemi aktifleştirirler.
- Direkt olarak kanser hücrelerini öldürürler.

B Lenfositler: Antikor üretiminden ve humoral immün sistemden sorumlu hücrelerdir (Diker 1998). Kanser hücreleri ile savaşta iki mekanizmada görev almaktadır. Bunlar :

Antikor Bağımlı Hücrel Sitotoksiste (ADCC) ve Komplemana Bağımlı Sitotoksiste (CDC) (Barbaros ve Dikmen 2015).

2.5 Kanser İmmünoterapisinde Son Gelişmeler

Günümüz onkolojisinin dayanak noktası haline gelen kanser immünoterapisi vücudun kanser hücreleri ile savaşmak için kendi bağışıklık sistemini kullandığı bir tedavi yöntemidir. Bu yaklaşım kanser hastasının kendi bağışıklık sistemi hücrelerini indükleyerek tedavi için immün sistemin gücünü ve seçiciliğini kullanır (Disis 2014, Shirkhoda vd. 2018). Kanser immünoterapisinde amaç kanser hücrelerine karşı bağışıklık sistemini uyararak daha etkin ve savunabilir hale getirmek veya bağışıklık sistemi proteinleri gibi bileşenleri vererek immün sistemi aktive etmektir. Son yıllarda immünoterapi bazı kanser türlerinin tedavisinin önemli bir parçası haline gelmiştir. Bağışık sistemi ile yapılan tedaviler gelecekte kanser tedavi yaklaşımlarına yön vereceği düşünülmektedir. Kanser hücreleri immün sistemden kaçmak için kendilerini normal hücrelere benzeten antijenleri ifade ederler ve bu sayede immün sistemden kaçarlar. Bazen ise immün sistem kanser hücrelerini tanır fakat kanser hücrelerinin TGF- β (Tümör Growth Factor) gibi immün sistemi baskılayan faktörler salgılaması ile yeterli ve güçlü cevap oluşmayabilir. Yapılan çalışmalar bunların üstesinden gelmek için immün sistemin kanser hücrelerini tanımasına ve tepkisini güçlendirmesine yardımcı olacak aktivatör ve inhibitör reseptörlerini antikor aracılı etkileyecek yollar bulmuştur ve bu antikorlar FDA tarafından tedavide kullanım için onaylanmıştır (Stojanovic vd. 2014, Westin vd. 2014, Huang vd. 2015, Lesokhin vd. 2015). İmmün sistem kontrol noktalarını belirlemeye ve bu noktaları hedefleyecek ilaç adayı antikor ve moleküller araştırılmaya devam etmektedir.

Kanser tedavisi için kullanılan başlıca immünoterapi çeşitleri;

a. Monoklonal antikorlar: İnsan yapımı immün sistem proteinleri olan monoklonal antikorlar hedefe yönelik glikoprotein yapısına sahip immüoglobülinlerdir. Klinikte kullanılan terapötik monoklonal antikorların tümü immüoglobülin G (IgG) izotipe sahip antikorlardır (Saeed ve Awan 2016). IgG antikorlarının başlıca etki

mekanizmaları; i. Kompleman bağımlı sitotoksite, ii. Antikor bağımlı hücrel sitotoksite ve fagositoz, iii. Reseptör-ligant etkileşiminin bozulması, iv. Reseptör internalizasyonu veya degradasyonu v. Apoptoz indüksiyonu ile hücre ölümüdür (Strohl ve Strohl 2012).

b. İmmün kontrol noktası inhibitörleri: Bu tür geliştirilmiş ve geliştirilmekte olan ilaçlar bağışıklık sistemindeki kanser hücresinin oluşturduğu blokajları kaldırarak kanser hücresinin tanınmasına ve yok edilmesine yardımcı olurlar. İmmün denetim noktaları immün hücrelerin kanser hücrelerine karşı verdiği yanıtı engelleyerek kaçıışı sağlarlar. Bu immün baskılamayı ortadan kaldırmak için klinikte PD-1, PD-L1 ve CTLA-4 gibi primer antikorlar kullanılmaktadır. Bu sayede tümör hücrelerine karşı immün sistemi güçlendiren monoklonal antikorların kullanımı hastalarda prognozu önemli ölçüde iyileştirmiştir (Ansell vd. 2015, Garon vd. 2015, Bellmunt vd. 2017). Dr James Allison ve Dr Tasuku Honjo geliştirdikleri anti-CTLA-4 ve anti-PD-1 monoklonal antikorları ve kanserde bağışıklık kontrol noktaları ile ilgili çalışmaları 2018’de Nobel Fizyoloji ve Tıp ödülü almıştır (Anonim 5).

c. Adoptif immünoterapi: Aktif sitotoksik immün hücrelerin kanser tedavisi ve tümör oluşumunun engellenmesi amacı ile *in vitro* ortamda çoğaltılarak hastaya verilmesine adoptif immünoterapi denir (Özet vd. 1996). Adoptif immünoterapide NK ve T hücreleri kullanılır. TIL (tümör infiltre edici lenfositler), antikorun ekstraselüler kısmı ile NK ve T hücresi reseptörünün sinyal mekanizmasını bir araya getiren kimerik antijen reseptörü (CAR) ekspresyonu için düzenlenmiş hücrelerdir (Barbaros ve Dikmen 2015). Bu sistem hematolojik ve solid tümörlerde önemli sonuçlar versede daha fazla optimizasyonu, etkinliğini artırma ve toksisitesini azaltmak çalışmaları yapılması gerekmektedir (Oiseth ve Aziz 2017, Rohaan vd. 2019).

d. Sitokinler: Hücrelere sinyaller ileten polipeptitlerdir. Sitokin bağlanması ile reseptörlerde gen transkripsiyonlarında değişiklikler sonucu hücre içi sinyaller tetiklenir. Bu sinyaller farklılaşmayı, çoğalmayı ve hücre fonksiyonlarını uyarmayı veya değiştirmeyi sağlarlar. Terapötik olarak ise doğrudan pro-apoptotik veya antiproliferatif etki ile yada dolaylı olarak immün hücrelerin kanser hücresine karşı sitotoksik aktivitesini artırarak etki ederler (Berraondo vd. 2019).

e. Kanser aşıları: Hastalıklara karşı bağışıklık tepkisini başlatmak için kullanılırlar ve ileri evre kanserleri tedavi etmeyi amaçlarlar. Kanser aşılarının bazıları önlemeye yönelikken bazıları tedaviye yöneliktir.

Ayrıca immün hücre tedavileri ile de bağışıklık sistemi güçlendirilmeye çalışılmaktadır. İmmün hücreler, kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını engelleyecek özel kısımlarını hedefleyecek şekilde tasarlanarak, yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmeye çalışılmaktadır (Gardner vd., 2016; Parlar vd., 2019) Bu immünoterapi çeşitleri her kanser türü için hala araştırılmaya devam etmektedir (Anonim 4). Heyecan verici bir yaklaşım olarak immün sistemde defekt hücreleri bulup öldürme yeteneği verilmiş NK hücrelerinin kanser tedavisi için en etkili hale getirilmesi günümüzün odak noktalarından biridir.

2.6 Meme Kanseri İmmünoterapisi

Meme kanseri immünoterapisinde ise HER2 reseptörünü aşırı ifade eden tümöre sahip hastalarda bazı onaylanmış monoklonal antikör tabanlı tedavi seçeneği bulunmaktadır. Bunlar başlıca Trastuzumab, Pertuzumab ve Trastuzumab emtansine vb'dir. Bu hedeflenen antikörler cerrahi sonrası erken evre HER2 pozitif meme kanseri için FDA tarafından onaylanmıştır. Bu ilaçlar büyüme faktörü HER2 proteininin ekstraselüler domainine karşı hazırlanan ve etkinliğini bloke eden monoklonal antikörlerdir. Günümüzde kemoterapi ile birlikte ek tedavi olarak verilen trastuzumab bir tirozin kinaz reseptör ailesi HER2 yüzey reseptörüne bağlanan hümanize (sekanslarının çoğu insana ait) immunoglobülin-G1 izotipi olan monoklonal antikördür. İmmunoglobülin-G1 izotipi antikör trastuzumab, HER2 reseptörüne bağlanarak kanser hücrelerinde aktive olan sinyal yollarını bloke eder ve baskılar. HER2⁺ meme kanseri hastalarında hayatta kalma süresini önemli ölçüde arttırdığı ve ölüm oranının yaklaşık % 20 oranında azalttığı gösterilmiştir (Slamon vd., 2001). İmmün kontrol noktası inhibitörlerinden Atezolizumab ise immün hücre ve kanser hücresi arasındaki inhibitör yolu PD-1/PD-L1 yolunu hedefleyen kontrol noktası inhibitörüdür. Meme kanseri üçlü negatif alt grupları için kemoterapi ile birlikte onaylanmıştır. Meme kanseri immünoterapisindeki bu gelişmeler ile başarılı sonuçlar alınsa da hala kanser hücrelerini etkili bir şekilde

öldürmek mümkün olmamaktadır. Trastuzumab, Trastuzumab emtansine ve Pertuzumab ile alınan sonuçlar doğrultusunda yeni terapötik antikorlar ve immün kontrol noktası inhibitörleri gibi hastaya zarar vermeden ve yaşam kalitesini düşürmeden tedavi olabilecek etkin yöntemlerin gerekliliği artmaktadır. Bu nedenle tümör spesifik reseptörler ve immün kontrol noktaları üzerinden en etkili kombine tedavi yaklaşımları ile başarılı sonuç alınabilecek yolların araştırılması gerekmektedir (National Cancer Institute, 2019).

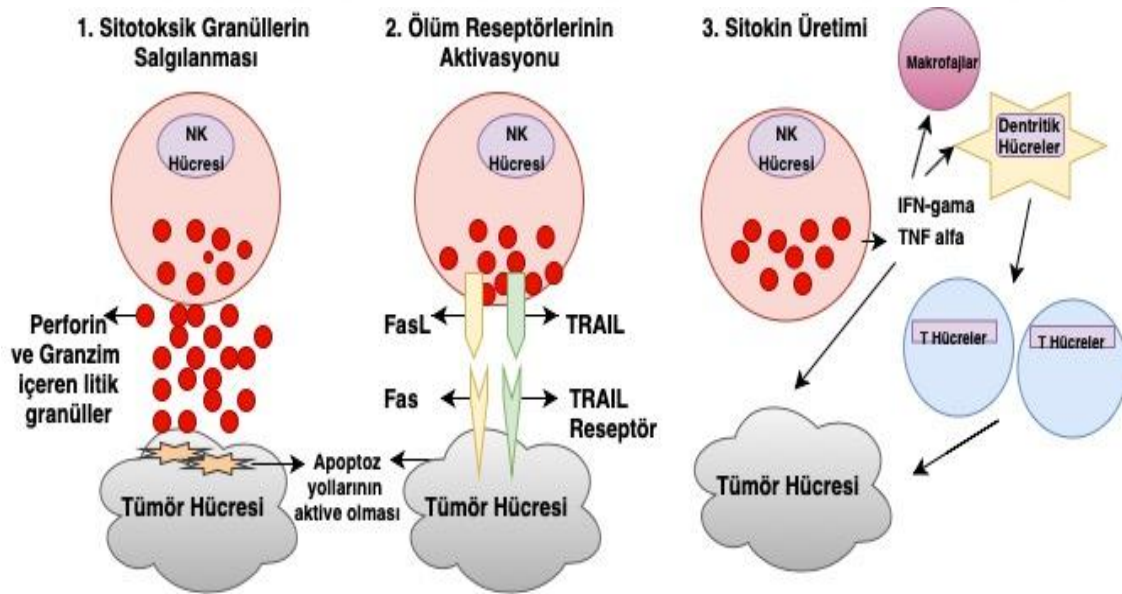
Son yıllarda immün hücreler ile yeni tedavi yaklaşımlarının arayışı hızla sürmektedir. NK hücreleride kanser hücrelerini hedeflemeye önemli sonuçlara varmıştır ve günümüzde bu yöndeki çalışmalar hız kazanmıştır.

2.7 Doğal Öldürücü (Natural Killer, NK) Hücreler

Kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerden türetilen doğal katil hücreleri olarak da adlandırılan NK hücreleri bir lenfosit çeşididir. Bu hücreler kanser hücresi ve viral enfekte hücrelere karşı sitotoksikiteye aracılık etmektedir (Ames vd. 2009, Ames ve Murphy 2014, Cheng vd. 2013). Bağışıklık sisteminin özelleşmiş savunma hücreleridirler ve kandaki lenfositlerin %10'unu oluştururlar (Sun ve Lanier 2011). Hem doğal hem kazanılmış bağışıklık sisteminde önemli roller üstlenen bu hücreler monositlerin ve sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonunu sağlarken, dendritik hücrelerin olgunlaşmasında da rol alırlar. Ayrıca B hücrelerini immünoglobülin üretmek için uyarır veya baskırlar. NK hücreleri tarafından üretilen sitokinler T yardımcı hücre polarizasyonunu da etkilemektedir (Deniz vd., 2013). Belirtildiği gibi genel immün yanıtta önemli görevler üstlenmişlerdir. NK hücreleri MHC-I (Major Histocompatibility Complex-I) moleküllerini normal seviyede ifade eden hücrelere saldırmazlar fakat MHC-I ifadesi azalmış veya bulunmayan hücrelere saldırarak öldürürler. Bu durum kanser hücrelerinde veya viral enfeksiyonlarda görülmektedir. Ayrıca NK hücreleri interferon gama (IFN- γ) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) salgılayarak diğer immün sistem hücrelerini regüle edebilirler ve hedef hücrelerin proliferasyonunu durdurabilirler (Zingoni vd., 2005). Sitotoksik NK hücrelerin en yaygın lizis mekanizması litik granüller salgılamalarıdır.

NK hücreleri kanser hücrelerini öldürmek için 3 farklı mekanizma kullanırlar. Bunlar ;

- İçinde perforin ve granzimleri içeren litik granüller salgırlar. Perforin hücre zarında porlar oluşturarak granzimlerin geçişini sağlarken serin proteaz ailesi olan granzimler ise kanser hücrelerinde kaspaz ve apoptoz yollarını indüklerler.
- İkinci mekanizmada, Fas ligand (FasL) ve Tümör Nekroz Faktör (TNF) ile ilişkili apoptoz indükleyen ligand-TRAIL (TRAIL-TNF-related apoptosis-inducing ligand) gibi hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörleri aracılığı ile apoptozu uyarak hücreyi ölüme götürürler.
- Üçüncü mekanizmada ise, NK hücreleri IFN- γ ve TNF- α sitokinlerini salgılayarak kanser hücrelerine etki ederler. NK hücreleri bu sitokinlerin salınımı ile direkt tümör hücrelerini etkilemenin yanında makrofajları, dentritik hücreleri ve T hücrelerini modüle etmektedir. Anti-kanser tepkileri etkileyebilen immün düzenleyici hücrelerdir (Liu vd. 2007). IFN- γ salgılanması makrofajların ve dendritik hücrelerin aktivasyonunu sağlar (Scott 1991). TNF- α salınımı ise kanser hücrelerinin nekrozuna sebep olmaktadır (Brinkman vd. 1995) (Şekil 2.4).



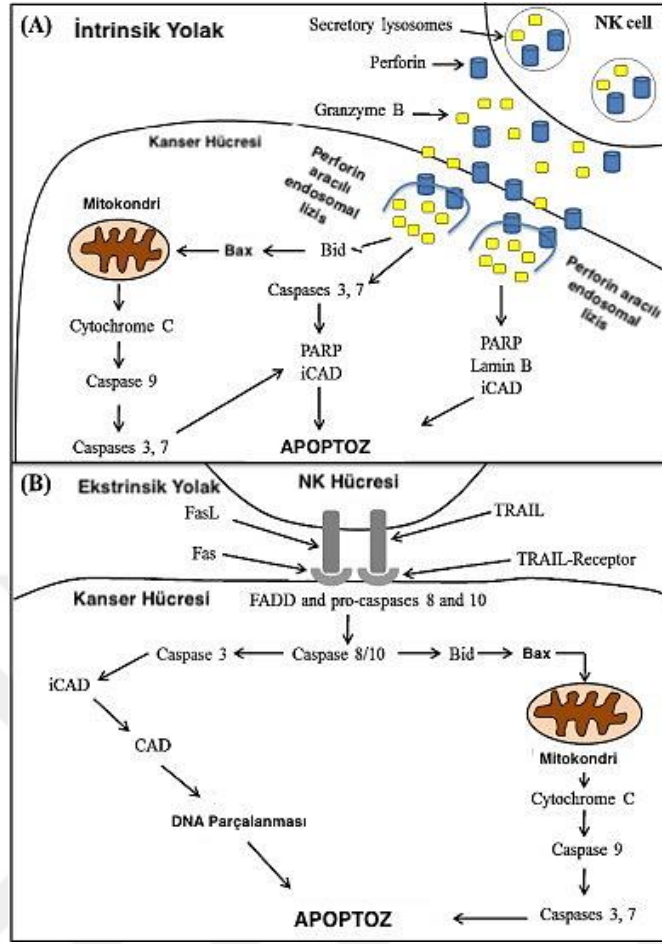
Şekil 2.4 NK hücrelerinin kanser hücrelerine etki etme mekanizmaları (Cheent ve Khakoo 2011'den uyarlanmıştır.)

NK hücrelerinin apoptoz yolağı ile hücreleri ölüme götürmesi:

NK hücreleri ölüm reseptörleri ve perforin-granzim B içeren litik granüller sayesinde kanser hücrelerinin apoptoz yolaklarına etki ederek her hangi bir nekrotik etki yaratmadan ölüme götürürler. Apoptoz yolağı ise içsel ve dışsal olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Rapoport ve Anderson 2019).

-İçsel yolak: İmmün hücrelerden salgılanan perforin ve granzimler içsel yolağı etkilemektedirler. Apoptozda içsel yolak DNA hasarı, mitokondriyal disfonksiyonu indükleyen büyüme faktörünün azalması, ER stresi, aşırı kalsiyum yüklenmesi, replikasyon stresi gibi çeşitli mikro-çevresel stresörler tarafından aktive edilirler (Rapoport ve Anderson 2019). Apoptozun içsel yolağı Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilmektedir (Zaman vd. 2014). Pro-apoptotik uyarılar yalnızca Bcl-2 homoloji 3 (yalnızca BH3 alanını içeren proapoptotik Bcl-2 proteini)'nin yukarı regülasyonunu başlatırlar. Daha sonra bu proteinler mitokondri membranında gözenek oluşturacak proteinleri (Bax, Bak vb.) aktive ederler (Liu ve Zhu 2017, Lomonosova ve Chinnadurai 2008). Bunlar oligomerize olarak mitokondri dış membran geçirgenliğini artırır. Bu içsel yolda meydana gelen en önemli olaydır (Elmore 2007). Ardından mitokondriyal membran proteinlerinden sitokrom-c salınır. Sitokrom-c salınımı ise APAF-1 (Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1) ve prokaspazı tetikler (Hassan vd. 2014, Zaman vd. 2014, Green ve Llambi 2015). Sonuçta mitokondriyal membran kaybı ile hücre ölümü gerçekleşir (Van de Walle vd. 2008) (Şekil 2.5).

-Dışsal yolak: Membran üzerindeki ölüm reseptörleri dışsal yolağı tetiklemektedir. Bunlar arasında Fas ligandı, TRAIL (TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand) ve TNF (Tümör nekroz faktör) yer almaktadır (Goldar vd. 2015). Ligand reseptör bağlanmasının ardından ortama bir adaptör protein alınır (Zaman vd. 2014, Liu vd. 2017). FADD (Fas ile ilişkili ölüm alanı) ve TRADD (Reseptör ile ilişkili ölüm alanı) en yaygın iki adaptör proteindir. Başlatıcı pro-kaspazlardan 8 ve 10 ölümü indükleyen sinyal kompleksini (DISC) oluşturmak için adaptör proteine bağlanır ve pro-kaspazların aktivasyonu sağlanır. Bu aktivasyon hücre içi proteinlerin bölünmesine aracılık eden ve hücre ölümüne yol açan kaspazlardan kaspaz 3, 6 ve 7'nin aktivasyonunu sağlarlar (Zaman vd. 2014) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Apoptozun içsel ve dışsal yolağı (Hazeldine ve Lord 2013)

Kanser hücrelerine cevap verebilen immün efektör hücreler olan NK hücrelerinin INF- γ , IL-2, IL-12, IL-15 ve IL-18 sitokinleri tarafından aktive olma, sağ kalım ve olgunlaşma süreçleri gerçekleşir (Nahta 2012). Aktivasyondan kısa süre sonra çekirdek ve hedef hücre arasında granüllerin polarizasyonu gerçekleşerek granül içeriği hücre dışına salınır ve hedef hücrenin lizisi gerçekleşir. Diğer bir deyişle NK hücreleri kanser hücrelerinde apoptozisi aktifleştirerek hücre ölümüne neden olurlar. Kendileri ise granüller içinde bulunan proteazlara dirençlidir. NK hücrelerindeki negatif yüklü bir proteoglikan olan kondroitin sülfat-A sayesinde hücrelerin kendi kendini otoliz etmesini önler (Delves vd. 2008). Ayrıca NK hücreleri kanser hücrelerini spesifik hedefleyebilir ve kemoterapötik ilaçların aksine direkt kanser hücresine yönelerek öldürülmesini sağlayabilirler (Barbaros ve Dikmen 2015). Transformasyona uğramış hücrelere karşı doğrudan sitotoksik olarak veya sitokin salgılayarak cevap verirler (Pegram vd., 2011).

YT, NKG, NKL, NK-92 ve KHYG-1 gibi sitotoksik hücre hatları malign NK hücre klonlarından oluşturulmuştur. Periferik kandaki NK hücre alt gruplarından en sitotoksik potansiyele sahip NK-92 hücreleridir. Ayrıca NK-92 hücreleri klinik öncesi çalışmalarda kanser hücrelerine karşı önemli derecede sitotoksik etkiler gösterir ve bilimsel çalışmalarda kullanılmak üzere FDA tarafından onaylı tek hücre hattıdır (Tonn vd. 2013) . NK-92 hücrelerinin K562 miyeloid lösemi ve Daudi lenfoma hücrelerini sırasıyla %84 ve %86 oranında öldürdüğü gösterilmiştir (Gong vd. 1994). Ayrıca NK-92 hücrelerinin klinik geliştirme için de uygun olduğu belirtilmiştir (Schönfeld vd. 2015).

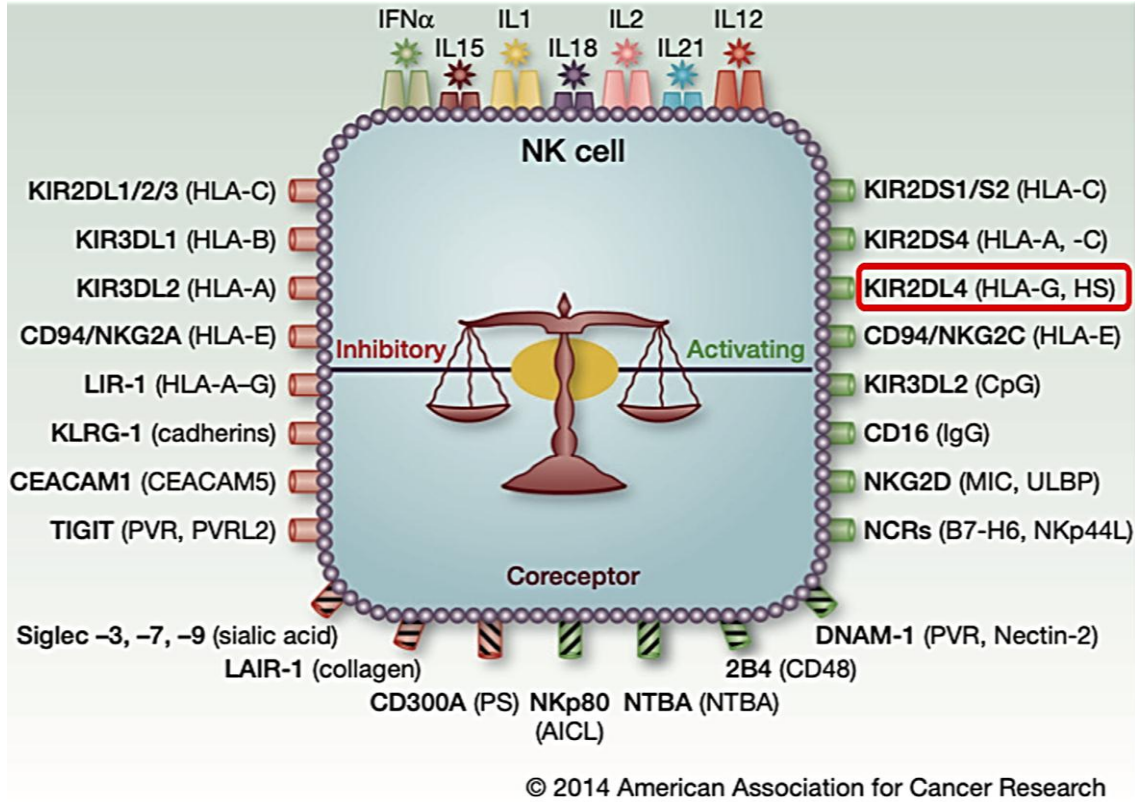
2.7.1 NK hücrelerinde bulunan inhibitör ve aktivatör reseptörleri

NK hücrelerinin sitotoksitesine, çeşitli inhibe edici ve aktive edici hücre yüzey reseptörleri aracılık eder. Bu reseptörler arasındaki denge NK hücrelerinin aktivasyonunu veya inhibisyonunu belirlemektedir (Pegram vd. 2011). İki farklı türde NK reseptör ailesi tanımlanmıştır. Bunlar Ig benzeri reseptörler ve C tipi lektin reseptörlerdir. Her iki reseptör yapısında da aktive edici ve inhibe edici reseptörler bulunmaktadır. İnhibitör reseptörler sitoplazmik uçlarında ITIM (Immunoreseptör tirozine dayalı inhibitör motifler) olarak adlandırılan yapılar içerirler. Bu motifler belirli fosfatazları algılayarak hücre içinde inhibisyon oluştururlar ve sinyal iletimini engellerler. Bu inhibisyon olmadığında NK hücreleri aktifleşerek sitokin sekresyonu ve sitotoksik granüller salgırlar. Aktifleştirici reseptörler DAP-12 gibi proteinlerle ilişkilidir. Bunlar ITAM (Immunoreseptör tirozine dayalı aktivatör motifler) sitoplazmik uca pozitif aktivasyon gösteren motiftir (Delves vd. 2008).

a) Aktivatör Reseptörleri: Hücreler transforme olup kanserleşmesi ile yüzeylerinde hücrel stres ligandları ifade ederler. NK hücre yüzeyindeki aktivatör reseptörleri tümör hücre yüzeylerinde ifade edilen stres ligandlarını tanıyarak bu hücrelerin defekt hücre olduğunu anlayarak anti-kanser etki gösterirler. Başlıca NK hücre aktivatör reseptörleri; CD16, NKG2D, DNAM-1, aktifleştirici KIR' lar, doğal sitotoksik reseptörleri (NKp30, NKp44 ve NKp46)'dir.

b) Inhibitör Reseptörleri: Kanser hücreleri kendilerini NK hücrelerin anti-kanser etkisinden korumak için NK hücrelerinin yüzeyinde bulunan inhibitör reseptörlerine karşı bazı moleküller ifade ederler. Bu sayede NK hücrelerini baskırlar ve anti-kanser etkisinden korunurlar. NK hücreleri üzerinde bulunan başlıca inhibitör reseptörleri ise; öldürücü hücre immünoglobülin benzer reseptör-KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor), lökosit immünoglobülin benzeri reseptör-LIR (Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor), PD-1, TIM-3, TIGIT ve CD94/NKG2A'dır.

Bazı KIR reseptör ailesinin alt grupları inhibitör rolü oynarken bazıları aktivatör rolü oynamaktadır (Leung 2014) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 NK hücreleri üzerinde bulunan aktive edici ve inhibe edici reseptörler (Leung 2014)

NK hücresi üzerinde bulunan KIR, LIR ve heterodimer CD94/NKG2A, inhibitör reseptörlerinin önemli sınıflarıdır. Bu reseptörler bir taraftan immün hücrelerin normal hücreleri tanımasında diğer taraftan kanser hücrelerinin normal hücreleri taklit ederek immün sistemden kaçış için kullandığı bir yol olması ile çok ince bir çizgide yer almaktadırlar. İmmün hücreler ile kanser hücresi arasındaki tanıma ve kaçış

mekanizması tamda bu noktalarda başlar. NK hücresi kanser hücrelerini yabancı olarak algıladığı anda aktivatör reseptörlerini artırır, litik granüllerini ve sitokinleri salgılar, FasL ölüm reseptörü üzerinden hücreyi apoptoza götürmeye çalışır. Kanser hücreleri ise, NK hücre inhibitör reseptör liganlarını ifade ederek (HLA-A, HLA-E vb. gibi) inhibisyonun ağır basmasını ve TGF- β salgılayarak NK hücre aktivatör reseptörlerinin ifadesini baskılayarak NK hücre aktivitesini durdurmaya çalışır. NK hücresi ve kanser hücresi arasında hangi taraf daha fazla etkinliğini ortaya koyarsa o taraf başarılı olacaktır. Bu sebeple bu dengeyi bozmak ve NK hücrelerini kanser hücrelerine karşı daha avantajlı hale getirmek, yeni bir tedavi modeli sunmada ve tedavi etkinliğini artırmada umut verici bir yaklaşımdır.

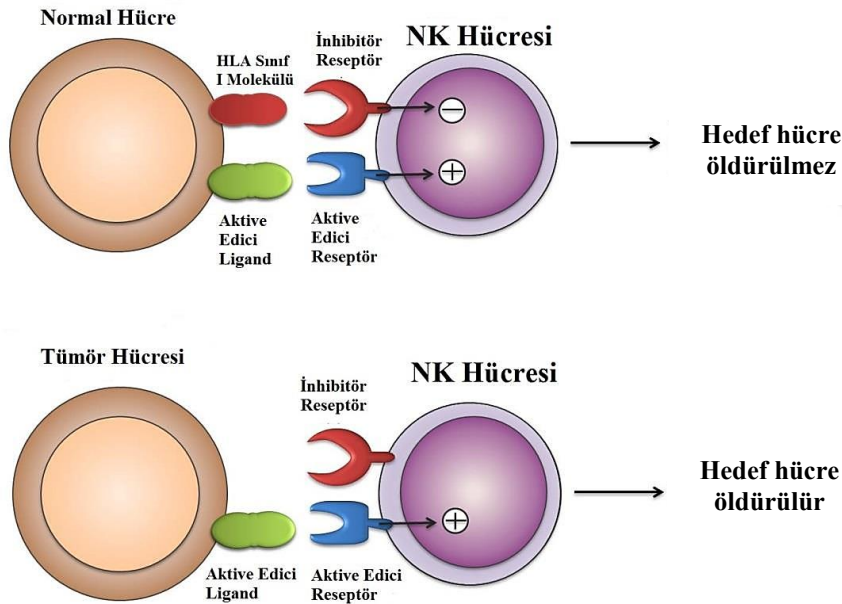
2.8 NK Hücrelerinin Kanser Hücrelerini Tanıma Mekanizması

İmmün sistemde NK hücreleri sağlıklı hücelere karşı toleranslıdır ve zarar vermez. Defekt hücelere karşı ise spesifik tanıyıp öldürme yeteneğine sahiptir. NK hücreleri sağlıklı hücreleri ve kanser hücrelerini ayırt etmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizmalar NK hücre aktivasyonunun temelini oluşturur. Bütün sağlıklı hücreler ana-histo uyumluluk kompleksi MHC-I (Major Histocompatibility Complex) moleküllerini ifade ederek NK hücrelerinin öldürme mekanizmasından korunurlar. NK hücreleri üzerinde bulunan inhibitör reseptörleri KIR veya CD94/NKG2A ile eşleşen HLA-I (Human Lökosit antijen-I) moleküllerini normal seviyede ifade ederler (Romagne vd. 2009). İnhibisyon reseptörleri MHC-I moleküllerinin alt grubu HLA-I molekülleri ile etkileşime girerek NK aktivitesini durdururlar (Shah ve Shpall 2009). NK hücreleri iki yolla kanser hücrelerini tanımaktadır. Bunlar;

- Hücrelerin transforme olup kanserleşmesi ile genellikle HLA-I moleküllerini kaybederler. Bu sayede NK hücreleri üzerinde bulunan inhibitör özelliğe sahip KIR' lar veya CD-94/NKG2A reseptörleri üzerinden inhibe edici sinyallerin hücre içine gitmemesi sonucu, NK hücreleri aktive olarak litik granüllerini ve sitokin salınımını artırır. Bu modele “Kendini tanıma eksikliği (missing-self recognition)” denilmektedir (Ljunggren ve Karre 1990).

- NK hücreleri, transforme olan hücrelerin yüzeyindeki stres kaynaklı ligandları tanıyan aktifleştirici reseptörler ifade ederler. Hücre transforme olup kanserleşmesi ile hasarla ilgili proteinlerin ifadesi artar. İfadesi artan bu proteinler NK hücre üzerindeki aktive edici reseptörler ile birleşerek NK hücrelerinin sitotoksitesini artırabilirler. Bu modele ise “ stres kaynaklı tanıma mekanizması (stress-induced recognition)” denilmektedir (Mosser vd. 1997, Groh vd. 1998).

NK hücre üzerindeki aktivasyon ve inhibisyon reseptörleri tarafından oluşturulan aktive edici veya inhibe edici sinyaller arasındaki denge ile NK hücrelerinin kanser hücrelerine saldırması veya saldırmaması belirlenir. Bu denge aktive olma yönünde ağır bastığında ise NK hücreleri doğrudan veya dolaylı olarak kanser hücrelerini öldürmektedir. Tam tersi inhibisyon yönünde ağır bastığında ise NK hücreleri anti-kanser yeteneğini durdurmaktadır (Le Mercier vd. 2015) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 NK hücrelerin tanıma mekanizması (Purdy ve Campbell 2009)

NK hücreleri vücutta kanser hücrelerine karşı ilk savunma sisteminde rol almaktadır ve transforme olmuş hücreleri tanıyıp yok etmektedir. Fakat kanser hücreleri immün sistemden kaçmak için sağlıklı hücreler gibi HLA-I moleküllerini ifade ederler ve NK hücrelerinin inhibisyon reseptörlerine bağlanarak bu hücrelerin aktivitesini durdurmaya başarılırlar. Bu yüzden tümör hücrelerinin ilk savunma sisteminden kaçışının

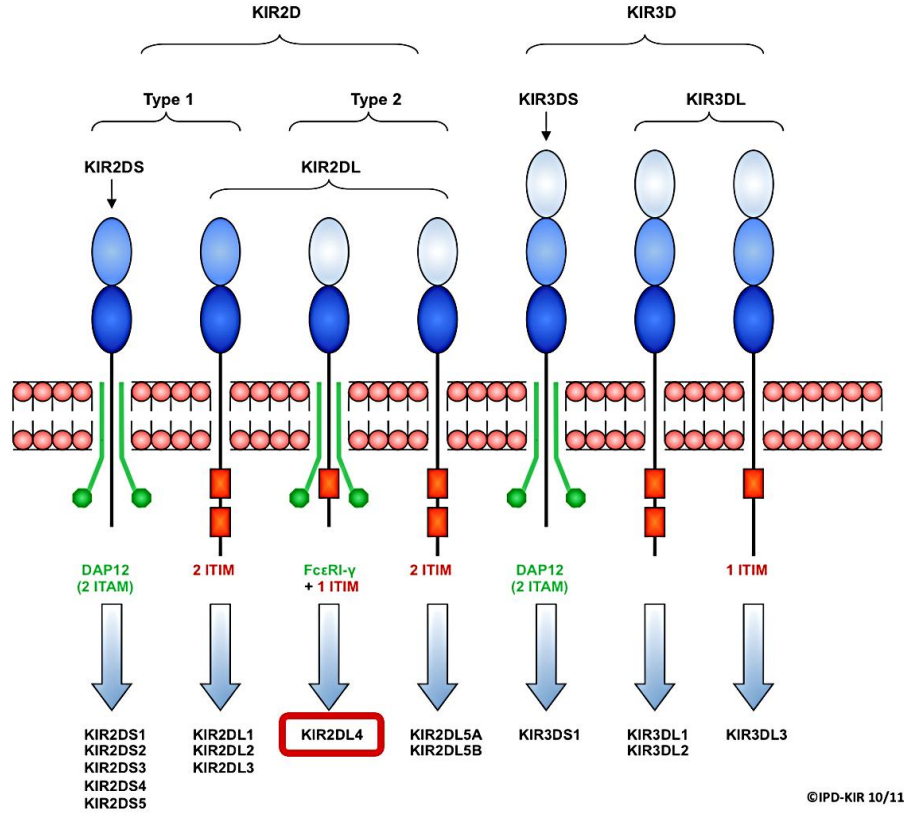
engellenmesi tedavi için önemli bir nokta olmaktadır. Bu sebeple NK hücre tabanlı kanser tedavisi için uygulanan ilk yaklaşım; interlökin-2 gibi aktifleştirici moleküllerin verilmesi ile NK hücrelerinin aktivasyonunu ve kalıcılığını arttırmaktır. İkincil yaklaşım ise; tümör hücrelerini daha spesifik tanıyıp öldürebilmesi için sitokinleri, inhibitör ve aktivatör reseptörlerine spesifik antikorları ve NK hücrelerinin adoptif transferini içerir (Ljunggren ve Malmberg 2007). İfade edilen tedavi yöntemleri doğrultusunda en iyi tedavi modelini geliştirmek için farklı kombinasyonlar denenmekte ve her kanser çeşidi için daha etkin NK hücre tabanlı tedavi modelleri arayışı sürdürülmektedir. Çeşitli çalışmalar ile nöroblastom (Yang vd. 2013) ve glioblastomaya (GenBler vd. 2016, Han vd. 2015, Zhang vd. 2015)'a karşı NK hücrelerinin anti-kanser potansiyelinden başarıyla yararlanılmış ve akciğer kanseri için de umut verici bulgular bildirilmiştir (Tonn vd. 2013, Besse vd. 2016). Bu nedenle sağlıklı hücrelere zarar vermeden sadece kanser hücrelerine karşı hızlı ve spesifik etkileri nedeniyle NK hücre tabanlı kanser immünoterapisi günümüzde ilgi odağı olmuştur. Kanser hücrelerine karşı hem sitotoksik etki gösterip kaspaz ve apoptoz yolları üzerinden ölüme götüren hem de ilaçlar gibi toksik etki bırakmayan NK hücreleri tedavi amaçlı kullanımda iyi bir seçenek olarak görülmektedir.

2.9 NK Hücreleri Üzerindeki KIR2DL4 Aktivatör Reseptörü

KIR genleri 19q13.4 kromozom üzerinde bulunurlar, polimorfik özelliğe sahip ve oldukça homologdurlar (Parsons vd. 2010). KIR genlerinin uzunluğu 4-16 Kb arasında değişirken 4-9 ekson içerebilirler. KIR genleri yapısal olarak üç gruba ayrılır;

- a) Tip I KIR2D genleri: D1 ve D2 konformasyonlu iki hücre dışı alan proteinini kodlayanlar,
- b) Tip II KIR2D genleri: Yapısal olarak farklı D0 ve D2 konformasyonlu iki hücre dışı alan proteinini kodlayanlar,
- c) KIR3D genleri: D0, D1 ve D2 üç hücre dışı immunoglobulin benzeri alana sahip proteinleri kodlayanlar (Vilches ve Parham 2002).

NK hücreleri tarafından ifade edilen KIR (Killer Cell Immünoglobulin) benzeri reseptörler NK hücrelerinin fonksiyonlarını düzenleyen transmembran glikoproteinleridir. KIR reseptörleri, NK hücreleri üzerinde eksprese edilen yüzey reseptörleridir ve hücre dışı immunoglobulin alanlarının (2D veya 3D) sayısına ve kısa (S) veya uzun (L) sitoplazmik alana sahip olup olmadıklarına göre sınıflandırılırlar. KIR reseptörleri kanser hücreleri üzerindeki HLA I ligand bağlanmasını sağlayan Ig benzeri alanlara sahiptir. Ayrıca NK hücrelerine iletilen sinyal türünü belirledikleri için işlevsel olarak ilgili olan transmembran ve sitoplazmik alanlara sahiptir. Bu alanlara gelen sinyaller NK hücrelerinin sitotoksitesini belirlemektedir (Moretta vd. 2002, Vilches ve Parham 2002). KIR2D iki adet immünoglobulin domainine sahipken , KIR3D ise üç adet immünoglobulin domainine sahiptir. Bu yüzey reseptörünün alt ailelerinin inhibitör ve aktivatör görevleri bulunmaktadır (Warren vd. 2001). KIR ailesinden KIR2DL4 reseptörü ise diğer KIR reseptörlerinden farklı olarak hem inhibitör hem de aktivatör özelliğe sahiptir. KIR2DL4 reseptöründe ITIM ve tipik bir aktive edici pozitif yüklü aminoasit (arjinin) sahiptir ve bu reseptörün hem aktivatör hem de inhibitör etki gösterdiğini kanıtlamaktadır (Selvakumar vd. 1996, Ponte vd. 1999, Rajagopalan vd. 2001) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 KIR protein yapıları (Anonim 6)

Evrım sürecinde en çok korunan KIR genlerinden biri olan KIR2DL4 reseptörü tüm NK hücreleri ve bir T hücre alt kümesi tarafından ifade edilmektedir. Yapısı, hücrel lokalizasyonu ve sinyalleme özellikleri açısından oldukça farklı bir KIR ailesi üyesidir (Rajagopalan ve Long 1999). NK hücre yüzeyinde ifade edilen ve KIR'lerden farklı olarak endozomlarda bulunmaktadır. KIR2DL4' un ligandı ise HLA sınıf I molekülü olan HLA-G'dir (Rajagopalan ve Long 2001). Ayrıca KIR2DL4 mRNA'sı diğer KIR alt gruplarının aksine tüm NK hücrelerinde bulunmaktadır ve tüm NK hücre klonlarında ifade edildiği tek KIR'dır. (Valiante vd. 1997, Cantoni vd. 1998).

KIR2DL4 (2DL4;CD158d) yapı ve işlevsel olarak oldukça farklıdır. KIR2DL4 reseptörü güçlü bir terapötik olarak rekombinant HLA-G tarafından veya mAb 33 ve mAb 181703 gibi agonistik antikorlar tarafından aktive edilebileceği belirtilmiştir (Kataoka vd. 2020). Ayrıca 2DL4 reseptörü stimülasyonu ile IFN- γ üretimini tetikleyen NK hücresi aktive edici reseptör olarak da öne çıkmaktadır (Benson ve Caligiuri 2014). Bağışıklık hücrelerindeki rolünün yanında bir çok kanser hücresinin büyümesini inhibe

etmektedir ve anti-tümör ajan olarak kabul edilmiştir (Harvat ve Jetten 1996, Meuller vd. 1996, Fujishima vd. 1998). INF- γ farklı kanser türleri yanında meme kanserinde de hücre büyümesini inhibe ettiği farklı çalışmalarda gösterilmiştir (Wadler ve Schwartz 1990, Kirchhoff ve Hauser 1999, Ruiz-Ruiz vd. 2000). INF- γ üretimi meme kanser hücrelerinde interferon düzenleyici faktör-1 üzerinden kanser hücrelerini apoptoza götürdüğü bildirilmiştir (Stang vd. 2007). Ayrıca KIR2DL4 reseptörünün ifadesinin artması ITIM'dan etkilenmeden IFN- γ üretimi ve hücre yüzeyindeki aktivasyon reseptörlerinin artış regülasyonunu sağlayan aktive edici reseptör olduğu bildirilmiştir. KIR2DL4 reseptörünün devreye girmesi hedef hücrelerin apoptozunu tetiklemek için FasL regülasyonunu artırmaktadır (Kikuchi-Maki vd. 2003). Bir çok yönden KIR2DL4 reseptörü için çalışmalar devam etmektedir.

Bu tezde MCF-7 ve SK-BR-3 meme kanseri hücre hatlarına karşı çözüm odaklı bir çalışma ortaya konulmuştur. NK-92 hücrelerinin anti-kanser etkinliğini artırarak spesifik olarak kanser hücrelerini hedeflemek heyecan verici bir yaklaşımdır. Bu bilgiler doğrultusunda KIR2DL4 aktivatör reseptörü anti-KIR2DL4 antikoru (Goodridge vd. 2009) ile hedeflenerek NK-92 hücrelerinin aktivitesini ve anti-kanser etkisini artırmakla meme kanser hücresine karşı etkili olacağı ön görülmüştür.

İmmün hücreler ile kanser tedavi etme çalışmaları son dönemde oldukça dikkat çekmektedir. Geleneksel yöntemlerin aksine spesifik, kansere özgü normal hücrelere zarar vermeden vücudun kendi immün sistemini kullanmak, kanser hücrelerine karşı tedavi yöntemi geliştirmede önemli bir adımdır. Bu doğrultuda NK-92 hücre tabanlı tedaviler ön plana çıkmaktadır. NK hücrelerinin sitotoksitesi, aktivatör ve inhibitör reseptörleri arasında gerçekleşen dengeye göre belirlenmektedir. Bu sebeple hücrenin aktivatör yönünün desteklenmesi sitotoksite bakımından avantaj sağlamaktadır. Aktivatör reseptörü KIR2DL4'ü agonistik bir antikorla tetikleyerek NK hücrelerini aktive etmek özgün bir çalışmadır. Bugüne kadar anti-KIR2DL4 #33 (Goodridge vd. 2009) klonu ile uyarılmış NK-92 hücrelerinin MCF-7 ve SK-BR-3 meme kanser hücre hattı üzerindeki etkisi araştırılmamıştır. NK-92 hücrelerinin anti-KIR2DL4 #33 klonu ile aktive edilip meme kanser hücre hatları üzerinde anti-kanser etkisinin araştırılması antikor tedavi yaklaşımı olarak tezin özgünlüğünü oluşturmaktadır. Ayrıca bu agonistik

antikor ile trastuzumab kombinasyonunun öldürme etkinliğinin değerlendirilmeside yeni bir yaklaşım olmaktadır. Anti-KIR2DL4 klon #33 kullanarak NK-92 hücrelerinin KIR2DL4 reseptörlerini aktive edip normal hücrelere zarar vermeden meme kanseri hücrelerine karşı sitotoksik etkinliğinin artırılması ve ayrıca bu agonistik antikorun trastuzumabla olan etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu tezden elde edilen sonuçlar, anti-KIR2DL4 #33 klonunun normal hücrelere zarar vermeden MCF-7 ve SK-BR-3 meme kanseri hücre hatlarının tedavisinde kullanılması için gelecekteki *in vivo* ve faz araştırmalarına ışık tutacağı öngörülmektedir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan hücre hatları

Deneylerde ATCC marka SK-BR-3 (HTB-30), MCF-7 (HTB-22) meme kanseri hücre hatları, MCF-12A normal meme hücre hattı ve NK-92 hücre hattı kullanılmıştır. MCF-7 hücre hattı Doç. Dr. Bala Gür DEDEOĞLU, SK-BR-3 hücre hattı Doç. Dr. Arzu ATALAY, MCF-12A hücre hattı Prof. Dr. Hakan GÜRDAL, NK-92 hücre hattı ise Prof. Dr. Ercüment OVALI tarafından hediye edilmiştir.

3.1.2 Kullanılan reaktifler ve kimyasallar

Hücre hatlarının çoğaltılması için Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (BI, 01-355-1A) besiyeri, McCoy's 5A (BI, 01-075-1A), DMEM/F-12(HAM)1:1 (BI, 06173-57-1A), TexMACS™ GMP medium (Miltenyi Biotec, 170-076-309) kullanılmıştır. Besiyerine fetal bovine serum (FBS) (Stem Cell, 04F11678), Penisilin/Streptomisin (Biowest, S12204L0018) ve Non-essential amino asit (Gibco 11140-50) eklenmiştir. Hücrelerin yıkanması için PBS (Lonza, BE17-516F), DPBS (Sigma, D8662) ve hücrelerin kaldırılması için Tripsin-EDTA (Stem Cell, 05A13807) kullanılmıştır. Normal meme hücresi için bovine insülin (Sigma, I6634), Epidermal growth factor (Genotropin, Pfizer), Hidrokortizon (Gadexon 8 mg, MSpharma) kullanılmıştır. NK-92 hücreleri için ise IL-2 (Proleukin), Beta merkaptotanol (SERVA, 60-24-2) kullanılmıştır. İmmün boyama için PFA (paraformaldehit, Sigma 158127) ve Hoechst mounting medium kullanılmıştır. Western blot analizi için Bradford çözeltisi (BioRad), İnsülin (Sigma I0516) kullanılmıştır. Genel olarak hücre kültürü aşamasında etanol (Merck 1.00983.2511) kullanılmıştır.

3.1.3 Kullanılan sarf malzemeler

Hücre kültürü flaskı 25 cm² (SARSTEDT, 5025112), Cryo.S kriyovial, Dnase-Rnase free, 2 ml (ROTH, 60024042), steril polipropilen konik santrifüj tüp, 1.5 ml'lik steril santrifüj tüpü (CELLSTAR[®] TUBES, Kat.no:188 271), pipet uçları; Dnase-Rnase free, steril, filtreli 10 µl, 100 µl, 1000 µl (BioPointe Scientific[®] Kat.no:321-4050A), steril serolojik pipetler 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml (JET BİOFİL, Lot No: 090415-071), 96 kuyucuklu düz tabanlı steril plaka (SARSTEDT, Lot:5025111), 24 kuyucuklu plaka (ROCHE, Lot:13019801), 12 mm çaplı yuvarlak lamel (Electron Microscopy Sciences, 72195-12), Lam (Citoglass), Lamel (Citoglass).

3.1.4 Kullanılan kit ve antikorlar

Aktivitesi artırılmış NK-92 hücresinin hedef hücrelere olan etkisini anlamak için WST-1 (Hücre proliferasyon reaktifi) (Takara, MK400) kiti kullanılmıştır. . Protein miktar tayini için (BCA) kiti (Thermo Scientific Pierce katalog numarası: 23225) kullanılmıştır. NK-92 hücrelerinin aktivitesini artırmak için kullanılan antikor anti-KIR2DL4 monoklonal antikor (Invitrogen, mAb#33), immün boyamada apoptoz ve kaspaz yolağındaki antikorların aktivitesini göstermek için Anti-caspase-3 antikor (Abcam, Ab13847), Anti-caspase-9 antikor (Abcam, Ab202068), Anti-bax antikor (Abcam, Ab32503), FITC goat anti rabbit sekonder antikor ve FITC goat anti mouse sekonder antikor, referans protein olarak β Tübülin (CST #2146) kullanılmıştır.

3.1.5 Kullanılan cihazlar

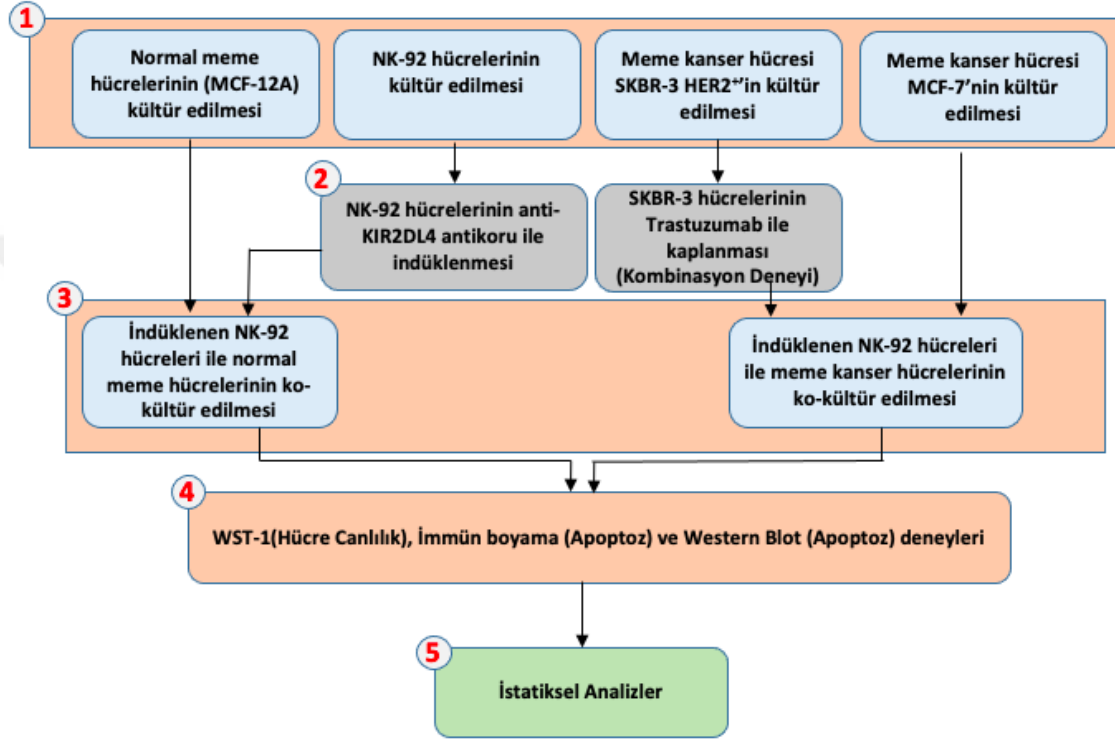
Bu tez kapsamında çizelge 3.1'de belirtilen ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü bünyesinde bulunan cihazlar kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 Kullanılan cihazlar listesi

Cihaz Adı	Markası
CO ₂ inkübatör	Sanyo CO ₂ inkübatör
Görüntüleme sistemi	Syngene Gene Genius Bio Imaging
Eliza okuyucu	Tecan
Kırık buz makinası	Scotsman
Laminar flow kabin	Holten LaminAir Model 1,8
Otomatik pipetler 10µl, 100µl, 1000µl	Gilson
Mikroskop	Leica DCF290
Saf su cihazı	Millipore Synergy, 185
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Rotina 35R
Çalkalayıcı	Finepcr Orbital Shaker SH30
Sıvı azot tankı	STATEBOURNE cryogenics
Spin santrifüj	BioSan
Su banyosu	Lab-Line Aquabath
Terazi	Shimadzu AX200
Pastör Pipet	Sigma
Konfokal Mikroskop	Carl Zeiss
Florasana Mikroskop	Zeiss Imager. M1
Elektroforez tankı	Thermo Scientific
Görüntüleme Sistemi	Syngene Gene Genius Bio Imaging
Güç Kaynağı	Thermo Scientific
Westwen Blot görüntüleme cihazı	Odyssey CLx

3.2 Yöntem

Anti-KIR2DL4 antikorı ile indüklenmiş NK-92 hücrelerinin *in vitro* koşullarda meme kanser hücrelerine karşı anti-kanser etkisini ve trastuzumab ile kombinasyonunun tedavi etkinliğini araştırmak için şekil 3.1’de gösterilen iş akış şeması takip edilmiştir.



Şekil 3.1 İş akış şeması

3.2.1 Hücre kültürü besiyerinin hazırlanması

Hücre kültürü çalışmalarının hepsi hücre kültürü odası ve steril güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. MCF-7 hücre hattı için; %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin içeren DMEM besiyerinde idame ettirilmiştir. SK-BR-3 (HER2⁺) hücreleri; %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin içeren McCoy’s 5A hazırlanan besi yeri içeriğinde geliştirilmiştir. MCF-12A hücreleri; %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, 250 µl hydrokortizon, 3,75 µL EGF, 300 µl insülin içeren DMEM Ham’s F12 besiyerinde kültür edilmiştir. Ayrıca NK-92 hücreleri %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin 1.8 µl beta merkaptotanol ve 500 UI IL2 içeren

TexMacs GMP besiyeri ile kültür edilmiştir. Çizelge 3.2’de belirtildiği gibi her hücreye ait besiyeri hazırlanıp kültüründe kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 Hücre hatları ve kültür için kullanılan besiyeri içerikleri

Hücre hatları	Besiyeri İçeriği
SK-BR-3 (Meme Kanseri)	• McCoy’s 5a / DMEM (Yüksek Glikoz) (500 ml) • %10 FBS • %1 P/S • %1 L-Glutamin
MCF-7 (Meme Kanseri)	• DMEM (Yüksek Glikoz) (500 ml) • %10 FBS • %1 P/S • %1 L-Glutamin
MCF-12A (Normal meme)	• DMEM Hams F-12 (Yüksek Glikoz) (100 ml) • %10 FBS • %1 P/S • 250 µl Hidrokortizon • 3,75 µl EGF • 300 µl insülin
NK-92	• TexMacs (GMP) (500 ml) • %10 FBS • %1 P/S • 1.8 µl Beta merkaptotanol • 500 IU IL-2

3.2.2 Hücre kültürü

Sıvı nitrojen tankında dondurulmuş olarak saklanan hücreler çalışma öncesi alınarak çözündürülmüştür. Çizelge 3.2’de belirtilen besiyerleri kullanılarak laminar kabin içerisinde ayrı ayrı açılan MCF-7, SK-BR-3, MCF-12A ve NK-92 hücreleri kendi özel besiyerlerinde 37°C’de %5 CO₂’li inkubatörde kültür edilmiştir. Hücrelerin idamesi T-

25'lik (25 cm²'lik) ve T-75'lik (75 cm²'lik) flasklar içerisinde gerçekleştirilmiştir. Çoğalma hızları, morfolojik yapıları ve canlılıkları invert mikroskop ile takip edilen hücreler %80 oranında doluluğa ulaşması durumunda tripsin enzimi ile muamele edildikten sonra kaldırılarak pasajlanmış ve çoğaltılmıştır. Süspanse halde olan NK-92 hücresi invert mikroskopta takibinin ardından % 80 doluluğa ulaşmasının ardından pasajlanmıştır. Stok olarak saklanacak hücreler %10 DMSO içeren FBS dondurma çözeltisi hazırlanarak kryoviallere alınıp sıvı nitrojende saklanmıştır. Her bir hücre hattının gelecek çalışmalarda kullanımı için depolanması sağlanmıştır.

3.2.3 Kullanılan hücre sayısının optimizasyonu ve plate yerleşimi

Sitotoksik deneylerde kullanılacak uygun hücre sayısının belirlenmesi amacıyla 96 kuyucuklu mikrolakalarda iki farklı kanser hücresi ve bir adet normal meme hücresi için altı tekrarlı olarak kuyucuklara ekim yapıldı. Her bir hücre hattı için 3×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 hücre içeren 100 µl özel besiyeri içerisinde ekim yapıldı. Mikrolaklar 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı ve hücrelerin çoğalması mikroskopik olarak gözlemlendi. Optimizasyon sonrası hücrelerin 24 saat çoğalmalarına bağlı olarak bir kuyucukta MCF-12A için 5×10^3 , MCF-7 için 5×10^3 , SK-BR-3 için 6×10^3 olarak belirlendi ve deneylere belirlenen hücre sayıları ile devam edildi.

3.2.4 Hücre sayımı

Tripan blue canlılık testi membranı zarar görmüş hücrelerde söz konusu boyanın hücre içine girmesiyle hücre sitoplazmasını boyaması esasına dayanmaktadır (Strober 1997). Bu nedenle mikroskop altında canlı hücreler sarı parlak görünürken ölü hücreler mavi görünmektedir. Flasktan kaldırılarak 15'lik falkon tüpe alınan hücreler santrifüj edildi ve süpernatant çekilip atıldı. Pellet halindeki hücreler taze besiyeri ile süspanse edildi. Süspanse olmuş hücreden 100 µl çekilerek 100 µl tripan blue ile karıştırıldı. Boya karışımı süspansiyon thoma lamı oluklarına dikkatlice yayıldı. Hücreler 40X' de sayıldı ve boya almayan hücrelerin (canlı hücreler) yüzde oranı hesaplandı. Thoma laminin alt ve üst kısmında bulunan 16 karedeki hücreler mikroskop altında 40X objektif

büyütmesinde dört defa tekrarlanarak sayıldı ve aritmetik ortalaması alındı. Canlılık oranı aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Strober 1997).

$$\text{Canlılık oranı (\% olarak)} = \frac{\text{Sayılan Canlı Hücre Miktarı}}{\text{Sayılan Toplam Hücre Miktarı}} \times 100$$

Sayılan Toplam Hücre Miktarı

3.3 NK-92 Hücrelerinin İndüklenmesi için Gerekli Etkin Antikor Konsantrasyonu ve İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu

Sitotoksik NK-92 hücrelerinin meme kanser hücrelerine karşı sitotoksitesini ve aktivitesini artırmak için daha önce yapılan çalışmalar göz önüne alınarak anti-KIR2DL4 (mAb #33) için konsantrasyon ve inkübasyon süresi belirlenmiştir. Yapılan çalışmada anti-KIR2DL4 için 1 µg/ml konsantrasyonda 20 saat inkübasyon ile NK-92 hücrelerinin indüklenmesi sağlanmıştır (Goodridge vd. 2009). Bu tez çalışmasında da aynı konsantrasyon ve inkübasyon süresi NK-92 hücrelerinin indüklenmesi için kullanılmıştır.

3.4 Anti-KIR2DL4 mAb 33 Antikorumun NK-92 Hücrelerinin KIR2DL4 Reseptörlerine Tutunması

NK hücreleri arasında en sitotoksik özelliğe sahip NK-92 hücreleri meme kanser hücre hatları MCF-7 ve SK-BR-3'e karşı sitotoksitesini artırmak için anti-KIR2DL4 antikoru ile indüklenmesi sağlanmıştır. Agonist etki hücre reseptörüne bağlanarak hücrede tepki oluşturan bileşiklerdir. Agonistler bağlandıkları reseptörü aktive ederek özgün fizyolojik ve farmakodinamik yanıt oluşturlar. Anti-KIR2DL4 mAb #33 antikorunda agonist etki sağlaması için kullanılmıştır. Daha önce yapılan antikorun hücre reseptörüne bağlanma deneylerinin optimizasyonu sonucunda elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, NK-92 hücrelerinin indüklenmesi için kültür edilen bu hücreleri 1 µg/ml anti-KIR2DL4 mAb #33 ile 20 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası antikorun tutunup tutunmadığı immün boyama deneyleri ile valide edildi. Valide edilen ve anti-KIR2DL4 antikoru ile indüklenmesi sağlanan NK-92 hücreleri planlanan deneylerde kullanıldı.

3.4.1 İmmün boyama öncesi yuvarlak lamellerin poly-L-lisin kaplaması

Yuvarlak lameller örnek sayısı kadar 24 kuyucuklu plate'e yerleştirildi. Üzerine 200 µl poly-L-lisin eklendi ve 1 saat laminar flow kabinde inkübasyona bırakıldı. 1 saat sonunda poly-L-lisin çekildi ve 1 saat daha kurumaya bırakıldı. Kurumanın ardından yuvarlak lameller DPBS ile yıkandı ve yarım saat UV altında kurumaya bırakıldı. Poly-L-lisin ile kaplanan yuvarlak lameller immün boyama deneyi için hazır hale getirildi. Lamellerin poly-L-lisin kaplanması hücrelerin tutunmasını sağlamak için yapılmıştır.

3.4.2 İmmün boyama için fiksasyon işlemi

1 µg/ml anti-KIR2DL4 ile 20 saat inkübe edilen NK-92 hücreleri santrifüj ile pellet haline getirildi ve bağlanmayan antikörleri elimine etmek için PBS ile yıkama yapıldı. Taze PBS ile süspanse edilen hücreler pellet haline getirilip süpernatant atıldı. Poly-L-lisin ile kaplanan yuvarlak lamellerin üzerine NK-92 hücrelerinin pelleti süspanse edilerek eklendi ve yarım saat tutunması beklendi. Ardından süpernatant çekilip atıldı (tutunmayan hücreler) ve üzerine oda sıcaklığında 200 µl % 3,5'lik PFA eklendi. 25 dk laminar kabinde inkübe edildi. Daha sonra 2 defa PBS ile yıkama yapıldı.

3.4.3 NK-92 hücrelerinin immün boyaması

Primer antikor ile muamele edilen ve yuvarlak lamel üzerine fikse olmuş hücrelere sekonder antikor FITC eklendi ve iki saat 37°C'de inkübe edildi. Bağlanmayan antikörleri uzaklaştırmak için PBS ile iki defa yıkama yapıldı. Ardından hücre çekirdeklerinin boyanması için 7-AAD çekirdek boyası eklendi ve 45 dk daha 37°C'de inkübasyonu sağlandı. Tekrar PBS ile iki defa yıkama yapıldı. Yuvarlak lameller kapatma medium eklenerek lam üzerine kapatıldı ve görüntü almak için - 20°C'de saklandı.

3.5 Sitotoksik Deneyler için Kanser Hücreleri ile NK-92 Hücrelerinin Ko-Kültürü

Kanser hücreleri, 96 kuyucuklu steril hücre kültürü plaklarına MCF-12A 5×10^3 , MCF-7 5×10^3 , SK-BR-3 6×10^3 hücre/kuyucuk olarak ekildi ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Belirlenen sayılarda kültüre edilen hücreler invert mikroskopta deney için uygunluğu kontrol edildi. İnkübasyon sonrası kanser ve normal meme hücrelerinin üzerine farklı oranlarda (1:1, 1:5, 1:10) NK-92 hücreleri eklenmiştir. Ayrıca 20 saat boyunca 1 µg/ml anti-KIR2DL4 mAb #33 ile indüklenmiş NK-92 (iNK-92) hücreleri de aynı oranlarda (1:1, 1:5, 1:10) kanser hücreleri ve normal meme hücre ile ko-kültür edilmiştir. Böylece kontrol grup dahil olmak üzere deneyler yedi gruptan ve her grup altı tekrardan oluşmaktadır. Ko-kültür aşamaları her hücre için yarı yarıya ortak hazırlanmış özel besiyeri ile gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.3). Ko-kültür süresinin belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları farklı süreler (48, 24 ve 4 saat) kullanarak yapılmıştır. Bu deneylerden elde edilen sonuçlara göre hücre yoğunluğuna bakarak, 4 saat inkübasyon süresinin uygun olabileceği tespit edilmiştir. Bu inkübasyon süresi diğer araştırmacılar tarafından da desteklenmektedir (Wang vd. 2012, Somanchi vd. 2015, Karlıtepe vd. 2021).

Çizelge 3.3 Hücreler için ortak ko-kültür besiyeri

Ko-kültür için gerekli besiyerleri	Besiyeri içeriği (100 ml)
MCF-12A:NK-92	• 45 ml DMEM Ham's F-12 • 45 ml TexMacs (GMP) • %10 FBS • %1 P/S • 250 µl Hidrokortizon • 3,75 µl EGF • 300 µl insülin • 1.8 µl Beta merkaptotanol • 500 IU IL-2

Çizelge 3.3 Hücreler için ortak ko-kültür besiyeri (devam)

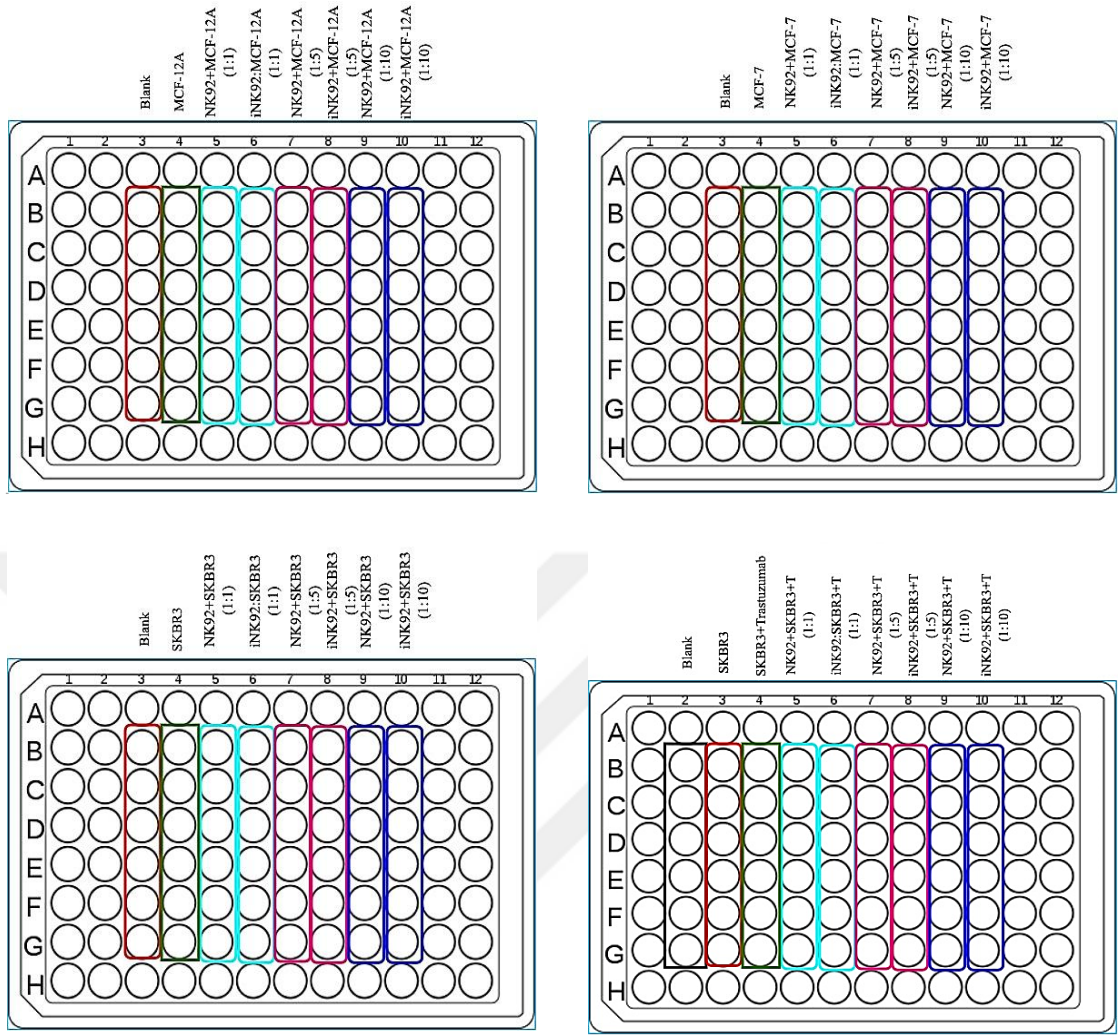
MCF-7:NK-92	• 45 ml DMEM (Yüksek Glikoz) • 45 ml TexMacs (GMP) • %10 FBS • %1 P/S • 1.8 µl Beta mercaptoetanol • 500 IU IL-2
SK-BR-3:NK-92	• 45 ml McCoys'5a • 45 ml TexMacs (GMP) • %10 FBS • %1 P/S • 1.8 µl Beta merkaptoetanol • 500 IU IL-2

3.6 Hücre Canlılık Deneyleri (WST-1)

Canlı hücrelerin metabolik aktivitesini ölçmek için kullanılan WST-1 protokolü hücre çoğalması ve sitotoksikite testleri için kullanılan bir yöntemdir. Protokol, WST-1((2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium sodium salt))'in yaşayan hücreler tarafından indirgenme esasına dayanmaktadır. Reaksiyon sonrasında suda çözünür formazan tuzu oluşur ve açığa çıkan formazan boyası spektrofotometrik okuyucu aracılığı ile ölçülür. Ölçüm sonucunda alınan absorbans değerleri her kuyu için ayrı olarak aşağıda belirtilen formüle göre % olarak hesaplandı. Daha sonra bu değerler GraphPad programı kullanılarak analiz edildi. Bu sayede indüklenmemiş ve indüklenmiş NK-92 hücrelerinin kanser hücrelerine (MCF-7 ve SK-BR-3) ve normal meme hücresine (MCF-12A) olan sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir.

$$\text{Hücre Canlılık Oranı (\% olarak)} = \frac{\text{Örnek OD değeri}}{\text{Kontrol OD değeri}} \times 100$$

Ko-kültür için hedef:efektör hücre oranları (Kanser Hücresi:NK-92 / Normal Meme Hücresi: NK-92) 1:1, 1:5 ve 1:10 olarak belirlenmiştir. Bunun için MCF-7, SK-BR-3 ve MCF-12A hücreleri optimize edilen hücre sayıları şekil 3.2’de gösterilen deney düzeneğine uygun şekilde ekilmiştir. Ekilen hücreler 24 saat inkübasyondan sonra invert mikroskopta kontrol edilmiş ve ko-kültür aşamasına geçilmiştir. Hücre ekimine paralel olarak NK-92 hücrelerinin anti-KIR2DL4 mAb #33 antikoru ile 20 saat boyunca 1 µg/ml’ de indüklenmesi sağlanmıştır. Ekim ve ko-kültür uygulaması her bir kuyu için 100 µl besiyeri kullanılarak yapılmıştır. İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri, meme kanser hücreleri ve normal meme hücresi ile ko-kültür yapılmıştır. Ko-kültür yapılan hücreler 4 saat 37°C’de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 4 saat sonunda NK-92 hücreleri ortamdan uzaklaştırılıp 3 defa DPBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrası 100 µl taze besiyeri kuyucuklara eklenip her bir kuyu için 10 µl WST-1 çözeltisi konulmuştur. Plaka 37°C’de etüv içinde inkübasyona bırakılarak 4. saat sonunda 450 nm’de spektrofotometrik okuma yapılmıştır. Sonuçlardan elde edilen absorbans değerleri kullanılarak sitotoksisite ve canlılık oranları hesaplanmıştır. Deneyler yedi grupta ve altı tekrar ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2 Sitotoksiste deneyi plaka yerleşimi MCF-12A, MCF-7, SK-BR-3'nın NK-92 hücreleri ile ko-kültür ve WST-1 için 96 kuyucuklu plaka yerleşimi ve SK-BR-3'nin Trastuzumab kombinasyonlu NK-92 hücreleri ile ko-kültür ve WST-1 için 96 kuyucuklu plaka yerleşimi

Ayrıca HER2⁺ olan SK-BR-3 meme kanser hücre hattına karşı trastuzumab ile kombine anti-KIR2DL4'un etkisinde araştırılmıştır. Bu deneyde her kuyu için ekilen 6×10^3 HER2⁺ SK-BR-3 hücresi 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda uygun olarak tutunduğu belirlenen hücreler daha önceki çalışmalar göz önüne alınarak 100 µg/ml Trastuzumab (Herceptin) ile 1 saat inkübe edilmiştir (Parihar vd. 2002). Daha sonra Trastuzumab (Herceptin)'lı ortam çekilip 3 defa yıkama yapılmıştır. 20 saat boyunca 1 µg/ml'de indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri belirlenen SK-BR-3:NK-92 hücre oranları 1:1, 1:5, 1:10 olacak şekilde ko-kültür yapılmıştır. Ko-kültür sonrası 4

saat inkübasyona bırakılmıştır. 4 saat sonunda NK-92 hücreleri uzaklaştırılıp 3 defa DPBS ile yıkama yapılmıştır. Ardından 100 µl besiyeri eklenip 10 µl WST-1 çözeltisi her kuyucuga eklenmiştir. 37°C’de etüv içinde inkübasyona bırakılarak 4. saat sonunda 450 nm spektrofotometrik okuma yapılmıştır. Sonuçlardan elde edilen absorbans değerleri kullanılarak sitotoksite ve canlılık oranları hesaplanmıştır. Deneyler yedi grup ve altı tekrar ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).

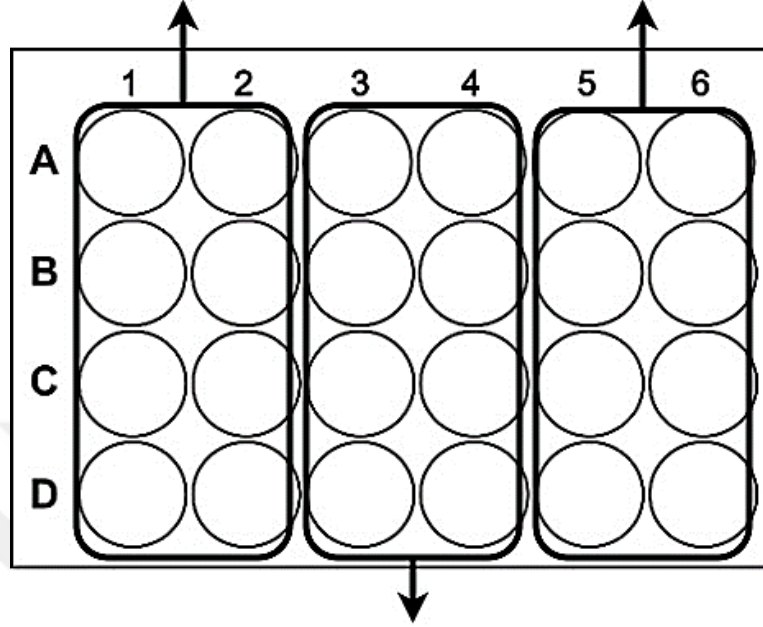
3.7 Ko-kültür Edilmiş Hücrelerin İmmün Boyaması

WST-1 analizlerinden elde edilen verilere göre ko-kültür hücre oranı 1:10 olduğunda en yüksek hücre ölümü gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu doğrultuda ko-kültür immün boyama deneyleri sadece 1:10 oranı ile dizayn edilip uygulanmasına karar verilmiştir. T-75 flasklar kullanılarak kültüre edilip çoğaltılan MCF-12A, MCF-7 ve SK-BR-3 hücreleri yeterli doluluğa ulaştığında poly-L-lisin kaplanmış 24 kuyucuklu plakalara ekim yapılmıştır. Hücre yoğunluğu her bir plaka için MCF-12A’da $2,5 \times 10^4$, MCF-7’de $2,5 \times 10^4$, SK-BR-3’de 3×10^4 olarak belirlenmiştir. 24 kuyucuklu plakalardaki deney planı şekil 3.3’de gösterilmiştir.

Ayrıca SK-BR-3 HER2⁺ hücre hattı indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin Trastuzumab kombinasyonu ile WST-1 deneylerinden elde edilen sonuçlara göre indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin sitotoksik özellikleri arasında anlamlı bir fark olmadığı için immün boyama deneylerine dahil edilmemiştir.

Herhangi bir uygulama
yapılmamış hücre
hattı

İndüklenmiş NK-92: Kanser hücre hatları
(MCF-7, SK-BR-3)
Normal meme hücre hattı (MCF-12A)



İndüklenmemiş NK-92: Kanser hücre hatları
(MCF-7, SK-BR-3)
Normal meme hücre hattı (MCF-12A)

Şekil 3.3 İndüklenmiş NK-92 hücrelerinin WST-1 sonucunda elde edilen etkili hücre oranının 24 kuyucuklu plak üzerinde deney düzeneği

Kanser ve normal meme hücreler belirlenen sayılarda ekim yapıldıktan sonra 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında PBS ile yıkandıktan sonra 1:10 hücre oranı olacak şekilde indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri, total hacim 500 μ l hücrelerin ortak besiyeri ile ko-kültür edilip 4 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ko-kültür sonrası yuvarlak lameller üç defa PBS ile yıkayıp immün boyama için hazır hale getirilmiştir.

3.8 Apoptozda Rol Oynayan Proteinlerin İmmün Boyama Analizi

Ko-kültür aşamasından sonra meme kanser hücre hatları ve normal meme hücreleri coverslipler üzerinde boyama için hazır hale getirilmiştir. Bax, kaspaz 3 ve kaspaz 9 gibi apoptoz yolağındaki proteinlerin sentezinin belirlenmesi için hücreler önce fiks

edildi. Fikse edilmiş hücreler lammeller üzerinde sekonder antikor ve çekirdek boyası ile boyanarak florasan mikroskop altında görüntülenmiştir.

3.8.1 Hücre fiksasyonu

24 kuyucuklu plakalarda bulunan yuvarlak lameller üzerindeki deneye alınmış hücreler üzerine 250 µl % 3,5'lik PFA eklenip 25 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. PFA ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 2 defa 1 ml PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra yuvarlak lameller azitli PBS içinde +4°C' de muhafaza edilmiştir.

3.8.2 İmmün boyama ve görüntüleme

İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile ko-kültür yapıp fikse edilen meme kanser ve normal meme hücre hattı immün boyama için hazır hale getirilmiştir. Öncelikle stok çözeltisinden primer antikorlar önerilen oranlarda sulandırılıp ara stok oluşturulmuştur. Hücreler sulandırılmış bax, kaspaz 3 ve kaspaz 9 primer antikorları ile 24 saat +4°C' de inkübe edilmiştir. Daha sonra üç defa PBS ile yıkandı ve FITC işaretli sekonder antikor ile 2 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tekrar 3 defa PBS ile yıkanıp son olarak 45 dk 7-AAD çekirdek boyası ile 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 45 dk sonunda tekrar 3 defa PBS ile yıkanmanın ardından hoechst içeren kapatma medyumunu ile lam üzerine kapatılmıştır. Her bir primer için aynı işlemler tekrar edilip florasan mikroskopta görüntülenmiştir. Preparatlar daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.9 Western Blot Yöntemi

3.9.1 Örneklerin hazırlanması

MCF-12A, MCF-7 ve SK-BR-3 hücre hatları 1:10 (Hedef/Efektör) oranında indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile 4 saat ko-kültür edilmiştir. Hücre canlılık deneylerinden alınan sonuçlara göre en iyi etkinin 1:10 oranında olduğu tespit

edilmiş ve western blot deneylerine bu oran ile devam edilmiştir. Ko-kültürün ardından NK-92 hücreleri uzaklaştırılıp kalan hücreler tripsinize edilerek toplanmıştır. Hücreleri lizis edebilmek için soğuk RIPA tamponu içerisinde sertçe vorteks ve pipetaj yapılmıştır. Lizatlar soğutmalı santrifüjde 13000 g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatant temiz bir tüpe aktarılmıştır.

3.9.2 Toplam protein tayini

Lizatların toplam protein miktarını ölçmek için BCA kiti (Thermo Scientific Pierce katalog numarası: 23225) kullanılmıştır. BSA standartları 2000 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml konsantrasyonlarında RIPA çözeltisi içerisinde hazırlanmış ve kit protokolünde önerilen şekilde 96 kuyucuklu plate prosedürü için 25'şer µl standartlar ve uygulama yapılmış hücre lizatları üç tekrar karıştırılarak her kuyucuğa 200 µl eklenmesinin ardından yarım saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından absorbans değerleri 563 nm'de spektrofotometrede (viktor3V 1420 multilabel plate counter) ölçülüp, BSA standart proteini elde edilen absorbans değerleriyle oluşturulan standart eğri grafiği excel'e çizdirilmiş ve hesaplanan regresyon denklemi aracılığıyla, örneklerin absorbanslarından yararlanarak total protein miktarı hesaplanmıştır. Grafikten elde edilen R^2 değeri ne kadar 1'e yakınsa sonuçlar o kadar doğru olarak yorumlanmaktadır (Smith et al., 1985).

3.9.3 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)

Total protein tayini yapılan hücre lizatları Laemmli tamponu içerisinde 95°C'de 10 dakika kaynatılmıştır. Tüm proteinlerin jelde birbirinden daha iyi bir şekilde ayrılabilmesi için gradiyent jel hazırlanmıştır.

Çizelge 3.4 Gradyent jel prosedürü

Ayırıcı Jel %15	Miktar (ml)
% 30 Akrilamid-Bisakrilamid	9 ml
1,5 M Tris (pH:8.8)	4,5 ml
H ₂ O	4,12 ml
SDS	180 µl
APS	180 µl
TEMED	18 µl
Toplam hacim	18 ml
Ayırıcı jel % 5	
% 30 Akrilamid-Bisakrilamid	3 ml
1,5 M Tris (pH:8.8)	4,5 ml
H ₂ O	10,12 ml
SDS	180 µl
APS	180 µl
TEMED	18 µl
Toplam hacim	18 ml
Hizalayıcı jel	
% 30 Akrilamid-Bisakrilamid	2,55 ml
1 M Tris (pH:6.8)	1,84 ml
H ₂ O	10,2 ml
SDS	150 µl
APS	150 µl
TEMED	15 µl
Toplam hacim	15 ml

Her jel için 1,5 mm'lik camlar kullanılmıştır. İlk olarak ayırıcı jelden; %5'lik jelden 3.5 ml, daha sonra %15'lik jelden 4 ml çekilerek iki cam arasına dökülmüştür. Dökülen jelin polimerleşmesi için, jelin üzeri bir miktar izopropanol ile kapatılmıştır. Polimerleşmenin ardından izopropanol uzaklaştırılarak üst jel dökülmüş ve 15 kuyucuklu taraklar takılmıştır. İşlemlerin ardından polimerleşmesi beklenmiştir. Kaynatılan örnekler her kuyucuğa 10 µg protein gelecek şekilde yüklenmiştir. 80V' da yaklaşık 3 saat yürütme tamponu içerisinde yürütülmüştür.

Western blot analiz yönteminde kullanılacak olan çözeltiler çizelge 3.5'de belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5 Western blot analiz yönteminde kullanılacak olan çözeltiler

Bloklama Tamponu	5 g BSA (Çözelti içinde %5 olacak şekilde) + TBST ile 100 ml'ye tamamlanır.
4X Örnek Tamponu (Loading sample Buffer) (10ml)	1 M Tris-HCl (pH=6.8) + 0,8 g SDS + 4 ml Gliserol + 0,5 ml Betamerkaptoetanol + %10 Brom fenol mavisi eklenir.
10X Towbin Buffer (Transfer Tamponu) Stok Çözeltisi (1 litre)	30.3gTris+144gGlisin+20ml%10 SDS + Saf su eklenerek çözelti 1 litreye tamamlanır.
1X Towbin Buffer (Transfer Tamponu) Çözeltisi	100 ml 10X Towbin Buffer Stok çözeltisi + 200 ml %100 Metanol + 700 ml saf su ile 1X'e seyreltilir.
10X TBS Stok Çözeltisi (1 litre)	24.23 g Trizma-HCl + 80.06 g NaCl + Saf su eklenerek çözelti 1 litreye tamamlanır (pH= 7.6).
TBST Çözeltisi	10X TBS stok çözeltisi, 10 ml 10X stok + 89.95 ml Saf su + 50 µl Tween 20 (çözeltide son hacim oranı %0.05 olacak şekilde) ile 1X'e seyreltilir.

3.9.4 Jelin membrana transferi

SDS PAGE'in PVDF membrana transferi ıslak transfer sistemi ile sağlanmıştır. Sünger-Whatman kağıdı-jel-membran-Whatman kağıdı-sünger sırasıyla; siyah(-) yönden beyaz(+) yöne doğru, jelden membrana transfer sağlanmıştır. Proteinlerin jelden membrana transferi, transfer çözeltisi içerisinde, 100 V'da 2 saatte aktarılmıştır.

3.9.5 Membran bloklanması

Proteinlerin membrana transferinden sonra, %5 BSA TBS-T içerisinde hazırlanmış ve membranlar 1-2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

3.9.6 Membranların primer antikor ile inkübasyonu

Membranlar +4°C'de gece boyu primer antikor ile (ya da oda sıcaklığında 2 saat) inkübe edilmiştir. Antikor uygulaması sonrası membranlar 3 kez 10'ar dakika TBS-T ile yıkanmıştır.

3.9.7 Membranların sekonder antikor ile inkübasyonu

Sekonder antikorlar primer antikorların kaynağına göre belirlenmiştir. HRP işaretli sekonder antikor, %5 BSA TBS-T içersinde 1/5000 dilüsyonda hazırlanmıştır. Membranlar sekonder antikorlar ile 1-2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 3 defa 10'ar dakika TBS-T ile yıkama yapılmıştır. Ardından ECL kemilüminesans substrat ile LI-COR görüntüleme cihazından membran görüntülenmiştir.

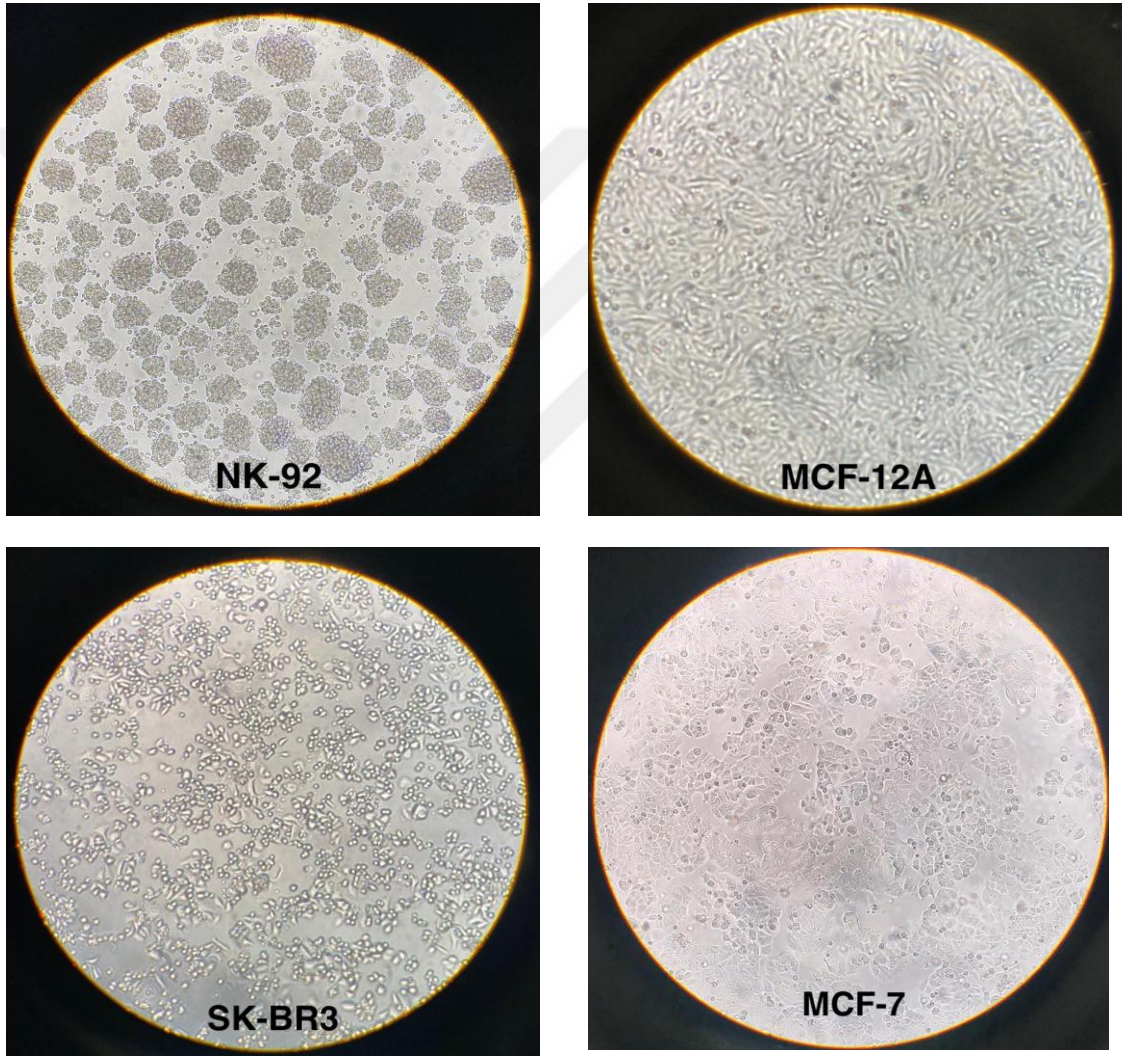
3.10 İstatistiksel Analiz

Farklı oranlarda indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 ile ko-kültür edilmiş meme kanser hücre hatları ve normal meme hücrelerinin WST-1 sitotoksosite analizi, alınan OD değerlerinin % canlılık oranları belirlendikten sonra GraphPad Prism 9 ile tek yönlü varyans analiz yöntemi ile değerlendirilmiştir. Deney planımız yedi grup ve altı tekrar ile her hücre hattı için ayrı olarak gerçekleştirilmiştir. Varyans analizi yöntemi verilerin normal dağılım gösterdiği varsayımına dayanmaktadır. Bu ön şartın sağlanıp sağlanmadığını test etmek için Shapiro-Wilk ve Kolmogorov- Smirnov testlerinden yararlanılmıştır. Deneylerimiz One way Anova Multiple Comparisons testi ile analiz edilmiştir. Uygulamada yaygın olarak kullanılan çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey's önem testinden ($p<0,05$) yararlanılmıştır.

4. ARAşTIRMA BULGULARI

4.1 Hücrelerin Kültür Edilmesi ve İnvirt Mikroskopta Görüntülenmesi

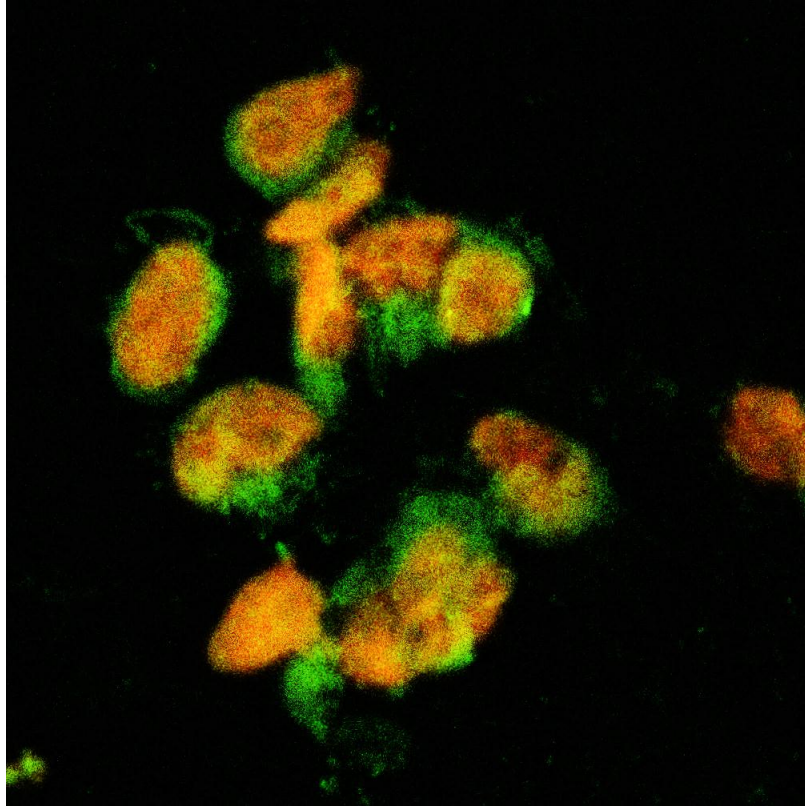
Uygun kültür şartlarında NK-92, normal meme hücresi MCF-12A, meme kanser hücreleri SK-BR-3 ve MCF-7 zel besi yerlerinde deneyler için uygun hale getirilmiştir. Çoğaltılan hücreler günlük olarak invert mikroskop altında takip edilmiştir (şekil 4.1).



şekil 4.1 Kültür edilen NK-92, MCF-12A, SK-BR-3 ve MCF-7 hücrelerinin invert mikroskopta 10X mercek altında görüntüsü

4.2 Anti-KIR2DL4 Antikorumun NK-92 Hücreleri Üzerindeki KIR2DL4 Reseptörüne Tutunmasının İmmün Boyama ile Validasyonu

NK-92 hücrelerinin anti-KIR2DL4 agonistik antikoru ile 20 saat inkübasyonu sağlanmıştır. Antikor-reseptör etkileşiminin gerçekleştirildiğinin validasyonu için immün boyama yöntemi kullanılmıştır. Antikorumun tutunmasını florasan olarak görüntülü hale getirmek için FITC goat anti-mouse sekonder antikoru kullanılmıştır. Ayrıca hücrelerin çekirdekleri 7-AAD DNA boyası (kırmızı sinyal) ile boyanmıştır. Bu etkileşimin konfokal mikroskop görüntüsü şekil 4.2’de gösterilmiştir. Hücre membranı üzerinden alınan yeşil sinyal (FITC) antikorun reseptöre bağlandığı noktaları göstermektedir. Şekil 4.2’de bağlanmanın başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği gösterilmiştir.



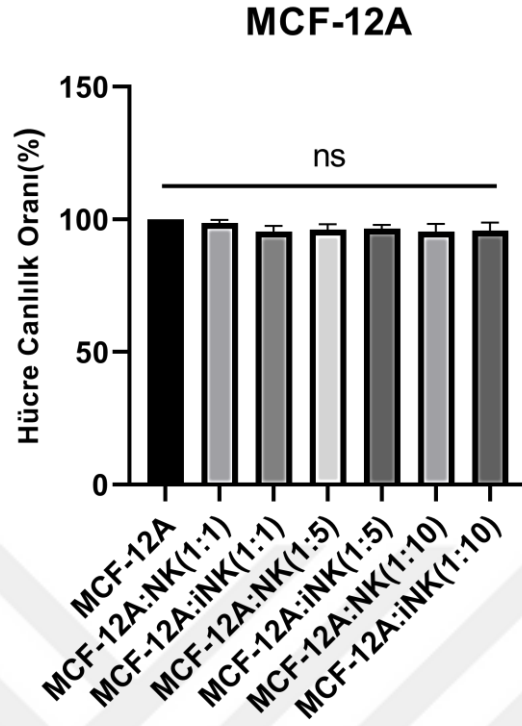
Şekil 4.2 NK-92: anti-KIR2DL4 bağlanması. Çekirdek boyası (DNA boyası,) 7-AAD ve sekonder olarak FITC kullanılmıştır. Alınan yeşil sinyal antikorumun membran üzerinde lokalize olduğunu, kırmızı sinyal ise çekirdek lokalizasyonunu göstermektedir (Büyütme: 64 X)

4.3 Ko-kültür Sonrasında Hücre Canlılık Deney Sonuçları

İndüklenen ve indüklenmeyen NK-92 hücrelerinin 1:1, 1:5 ve 1:10 hücre oranlarında MCF-12A normal meme hücresi ve SK-BR-3 ve MCF-7 meme kanser hücreleri ile 4 saat ko-kültür sonrasında hücre canlılığı tespiti için yapılan WST-1 uygulaması sonucunda alınan OD değerleri hücre canlılık oranları hesaplandı ve GraphPad Prism 9 ile analiz edildi. Belirlenen hücre oranları yedi farklı grupta ve altı tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Bu deneyin sonucunda indüklenmiş NK-92 hücrelerinin indüklenmemiş hücrelere göre normal meme hücresine ve kanser hücrelerine karşı etkileri değerlendirilmiştir.

4.3.1 İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin MCF-12A(normal meme) hücreleri üzerindeki canlılık etkisinin sonuçları

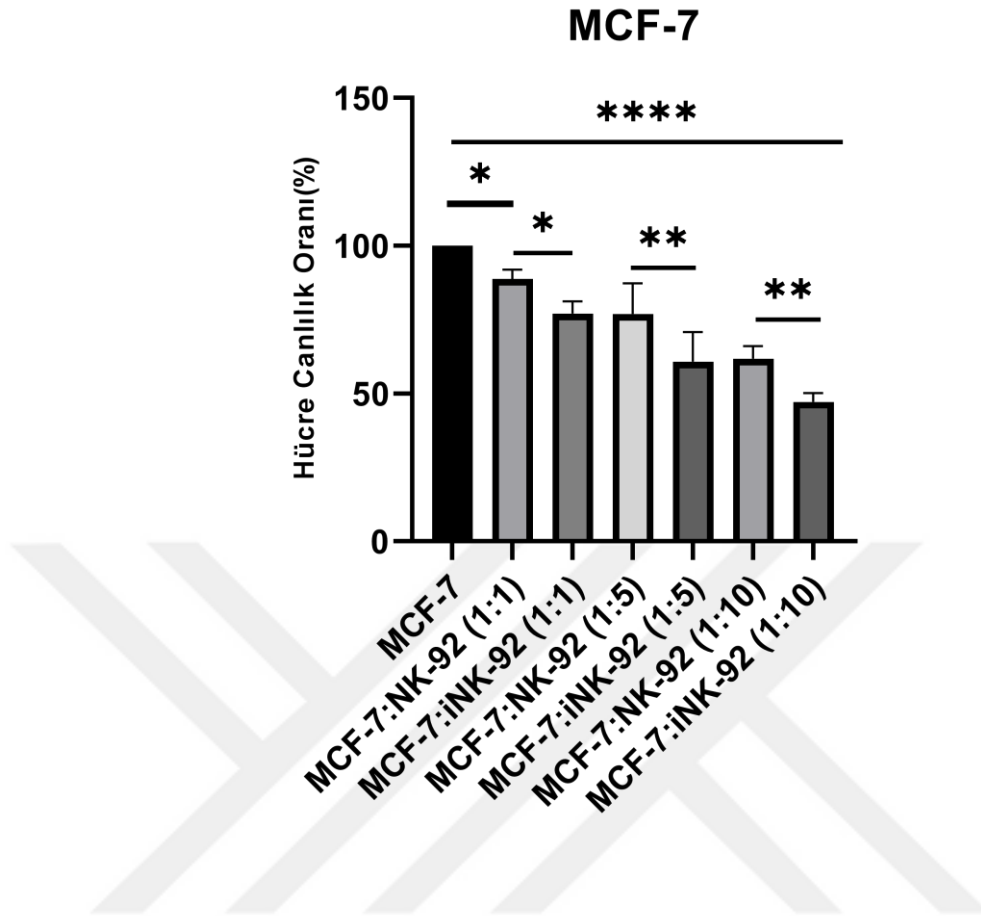
İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin MCF-12A hücre hattı üzerindeki öldürücü etkisi WST-1 deney sonuçlarından alınan OD değerleri % canlılık hesaplaması yapıldıktan sonra analiz edilmiştir. Şekil 4.3’de gösterildiği gibi yapılan istatistik analizlere dayanarak farklı konsantrasyonlarda uygulanan NK-92 ve iNK-92 hücrelerinin kontrol gruba göre anlamlı derecede öldürücü etkisi olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.3 Farklı oranlarda indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin, MCF-12A normal meme hücrelerinin üzerindeki sitotoksik etkisi (ns=anlamalı değil)

4.3.2 İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin MCF-7 (meme kanser hücresi) hücreleri üzerindeki canlılık etkisinin sonuçları

İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin MCF-7 hücre hattı üzerindeki öldürücü etkisi WST-1 deney sonuçlarından alınan OD değerlerinin her kuyu için hücre canlılık oranı hesaplandı ve GraphPad Prism 9’da analiz edildi. Şekil 4.4’de gösterildiği gibi yapılan istatistik analizlere dayanarak farklı konsantrasyonlarda uygulanan NK-92 ve iNK-92 hücrelerinin kontrol gruba göre tüm hücre oranlarında sitotoksik etki tespit edilmiştir. İndüklenmiş ve indüklenmemiş hücrelerde farklı oranlarda indüklenmişlerin indüklenmeyenlere göre tüm oranlarında hücre canlılığında azalma görülmüştür. Bu farklılığın anlamlı derece de olduğu belirlenmiştir.

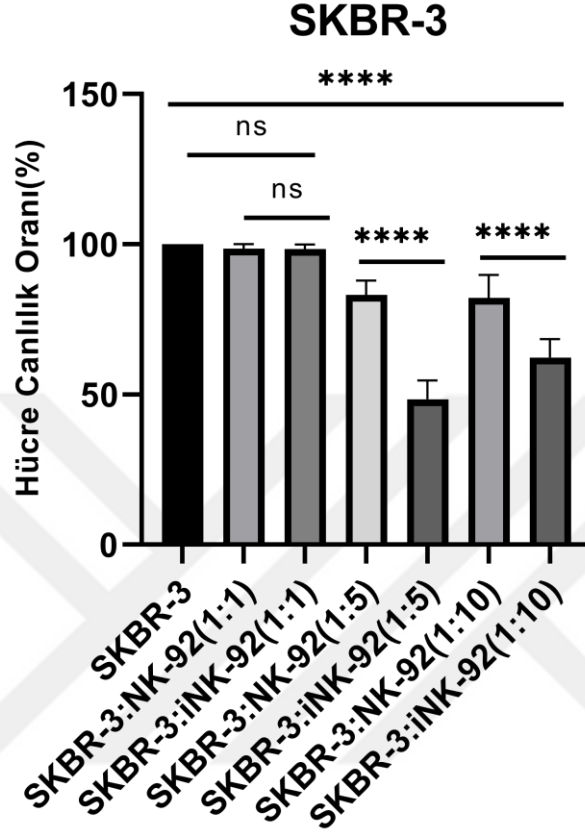


Şekil 4.4 Farklı oranlarda indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin, MCF-7 (meme kanser hücresi) hücrelerinin üzerindeki sitotoksik etkisi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ **** $p<0.0001$)

4.3.3 İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin SK-BR-3 (meme kanser hücresi) hücreleri üzerindeki canlılık etkisinin sonuçları

İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin SK-BR-3 hücre hattı üzerindeki öldürücü etkisi WST-1 deney sonuçlarından alınan OD değerleri değerlerinin her kuyu için hücre canlılık oranı hesaplandı ve GraphPad Prism 9’da analiz edildi. Şekil 4.5’de gösterildiği gibi yapılan istatistik analizlere dayanarak farklı konsantrasyonlarda uygulanan NK-92 ve iNK-92 hücrelerinin kontrol gruba göre tüm gruplarda (1:1 oranı hariç) hücre canlılığında azalma görülmüştür. İndüklenmiş NK-92 hücrelerinin (1:10 ve 1:5 oranlarında) indüklenmemiş NK-92 hücrelerine göre (1:10 ve 1:5 oranlarında) hücre canlılığında azalma görülmüştür. Bu farklılık yüksek anlamlılık göstermektedir. Ancak

indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin SK-BR-3 hücreleri üzerinde 1:1 oranında herhangi bir etkisi olmadığı gösterilmiştir.

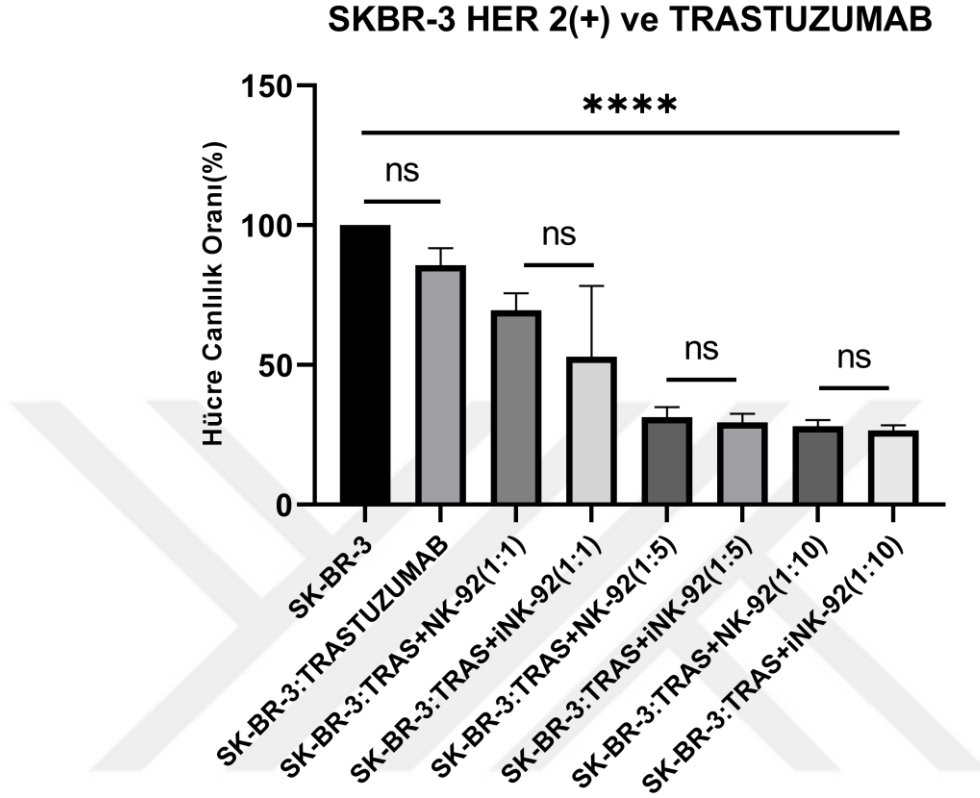


Şekil 4.5 Farklı oranlarda indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin, SK-BR-3 (meme kanser hücresi) hücrelerinin üzerindeki sitotoksik etkisi (**** $p < 0.0001$, ns=anlamli değil)

4.3.4 İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin Trastuzumab kombinasyonu ile SK-BR-3 (meme kanser hücresi) hücreleri üzerindeki canlılık etkisinin sonuçları

İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin Trastuzumab kombinasyonu ile SK-BR-3 hücre hattı üzerindeki öldürücü etkisi WST-1 deney sonuçlarından alınan OD değerleri değerlerinin her kuyu için hücre canlılık oranı hesaplandı ve GraphPad Prism 9’da analiz edildi. Şekil 4.6’da gösterildiği gibi yapılan istatistik analizlere dayanarak farklı konsantrasyonlarda uygulanan NK-92 ve iNK-92 hücrelerinin kontrol gruba göre diğer tüm gruplar (SK-BR-3+ Trastuzumab grubu hariç) ile ko-kültürü sonucunda SK-BR-3 hücre canlılığında anlamlı derecede azalma görülmüştür. Ancak indüklenmiş NK-

92 ve Trastuzumab kombinasyonu ayrıca indüklenmemiş NK-92 ve Trastuzumab konsatrasyonu arasında anlamlı derece canlılık farkı bulunmamaktadır.



Şekil 4.6 Farklı oranlarda indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin Trastuzumab kombinasyonlu SK-BR-3 (meme kanser hücresi) hücrelerinin üzerindeki sitotoksik etkisi ($p < 0.0001$, ns= anlamlı değil)

4.4 İmmün Boyama ile Apoptoz Yolağına Ait Proteinlerin İfadesinin Belirlenmesi

İmmün boyama öncesi 24 kuyucuklu plakalarda MCF-7, SK-BR-3 ve MCF-12A hücreleri deney için uygun hale getirilmiştir. KIR2DL4 mAb #33 ile indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri normal meme ve meme kanser hücrelerinin (MCF-7, SK-BR-3 ve MCF-12A) ko-kültürü gerçekleştirilmiştir. WST-1 deneylerinden elde edilen sonuçlara göre indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri 1:10 (her kanser hücre hattının 10 katı indüklenmiş veya indüklenmemiş NK-92 hücresi ile ko-kültürü) oranında en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla immün boyama deneylerinde sadece 1:10 hücre oranı

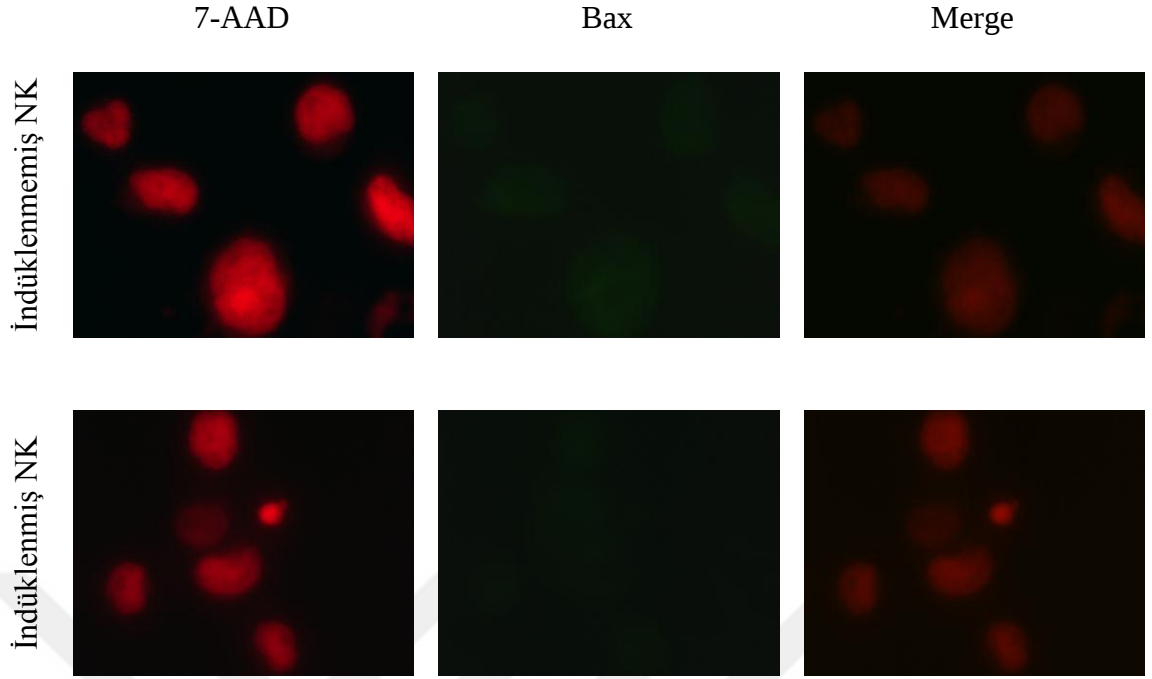
kullanılmıştır. Ko-kültür deneylerinden sonra indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile birlikte kültürlenmiş normal ve kanser meme hücreleri fikse edilmiştir. Bu deneylerde çekirdek boyası olarak 7-AAD, primer antikor olarak Bax, Kaspaz 3, Kaspaz 9 ve sekonder antikor olarak ise FITC işaretli goat anti rabbit antikor kullanılmıştır. Alınan görüntülerin tümü floresan mikroskopunda 100X büyütmede alınmıştır. Görüntülenme sonrası fotoğrafların düzenlenmesi için Image J programı kullanılmıştır.

4.4.1 Ko-kültür sonrası MCF-12A hücre hattının immün boyama ile apoptoz yoluna ait proteinlerin sentezinin belirlenmesi

İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile ko-kültür edilmiş MCF-12A hücreleri fikse edilmiştir. Apoptoz yoluna ait Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 proteinlerinin sentezi immün boyama yöntemi ile analiz edilmiştir. Görüntülerde bu proteinlerin (Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9) sentezi yeşil sinyal (FITC) ile gösterilmektedir. Alınan kırmızı sinyal (7-AAD) ise hücre çekirdek lokasyonunu göstermektedir (Şekil 4.7-4.9).

4.4.1.1 Ko-kültür sonrası MCF-12A hücrelerinde Bax protein sentezinin immün boyama yöntemi ile belirlenmesi

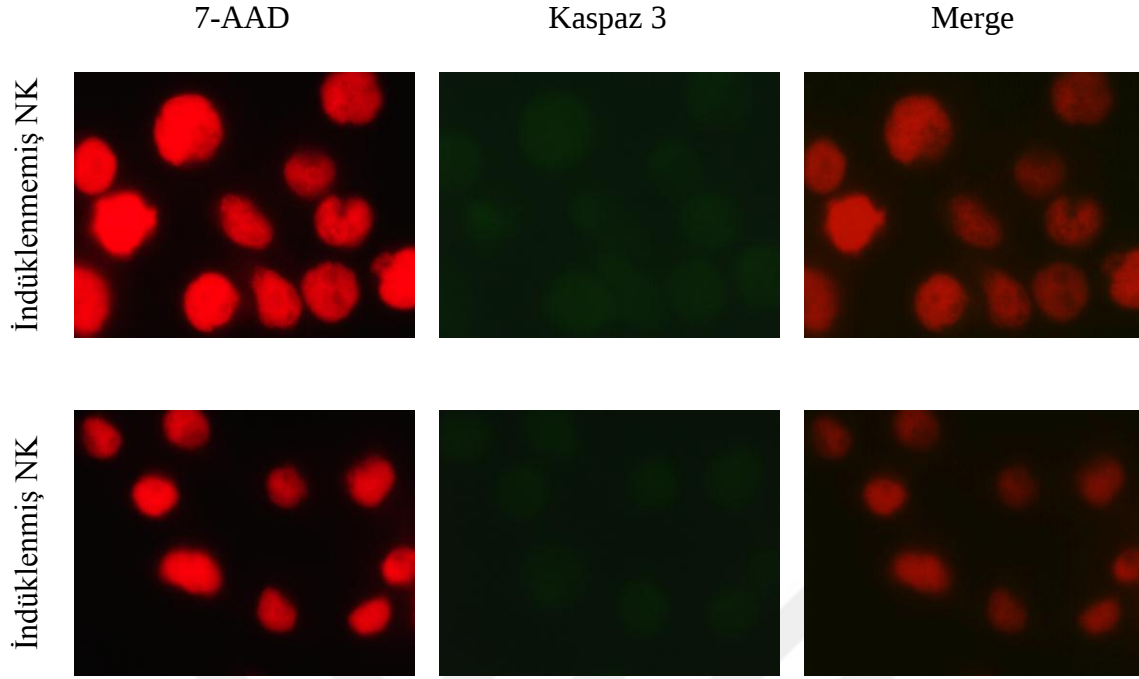
İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile MCF-12A hücrelerinin ko-kültür sonrası bax proteininin sentezi araştırılmıştır. Bax antikor, FITC işaretli sekonder ve çekirdek (DNA) için 7-AAD immün boyama deneylerinde kullanılmıştır. Şekil 4.7’de gösterildiği gibi floresan mikroskopundan alınan sinyallere göre indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile ko-kültür edilen MCF-12A hücrelerinde bax protein sentezinde herhangi bir fark görülmemiştir.



Şekil 4.7 MCF-12A (Normal meme hücresi)’ne ait Bax proteininin sentezinin florasan mikroskopundaki görüntüsü. Çekirdek boyası (DNA) 7-AAD (Kırmızı sinyal) ve FITC işaretli sekonder antikor (Yeşil sinyal) kullanılmıştır (100X)

4.4.1.2 Ko-kültür sonrası MCF-12A hücrelerinde Kaspaz 3 protein sentezinin immün boyama yöntemi ile belirlenmesi

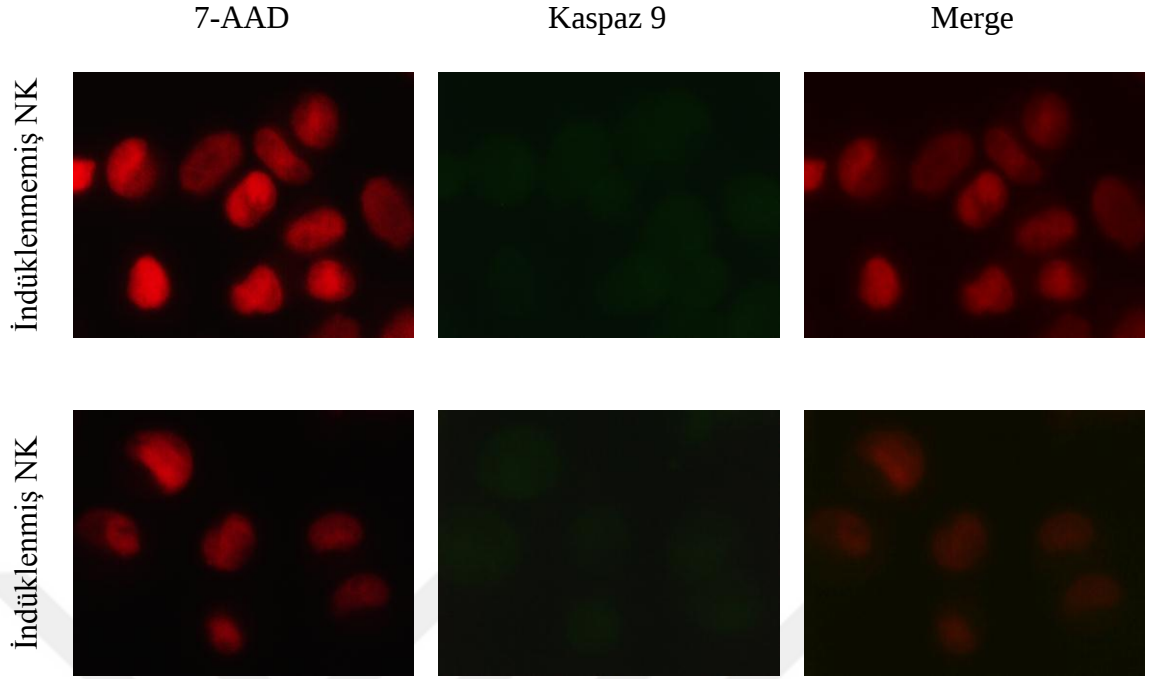
İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile MCF-12A hücrelerinin ko-kültür sonrası kaspaz 3 proteininin sentezi araştırılmıştır. Kaspaz 3 antikoruna, FITC işaretli sekonder ve çekirdek (DNA) için 7-AAD immün boyama deneylerinde kullanılmıştır. Şekil 4.8’de gösterildiği gibi florasan mikroskopundan alınan görüntülere bakıldığında indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile ko-kültür edilen MCF-12A hücrelerinde bir kaspaz 3 protein sentezinde herhangi bir fark görülmemiştir.



Şekil 4.8 MCF-12A (Normal meme hücresi)'ne ait kaspaz 3 proteininin sentezinin florasen mikroskopundaki görüntüsü. Çekirdek boyası (DNA) 7-AAD (Kırmızı sinyal) ve FITC işaretli sekonder antikor (Yeşil sinyal) kullanılmıştır (100X)

4.4.1.3 Ko-kültür sonrası MCF-12A hücrelerinde Kaspaz 9 protein sentezinin immün boyama yöntemi ile belirlenmesi

İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile MCF-12A hücrelerinin ko-kültür sonrası kaspaz 9 proteininin sentezi araştırılmıştır. Kaspaz 9 antikor, FITC işaretli sekonder ve çekirdek (DNA) için 7-AAD immün boyama deneylerinde kullanılmıştır. Şekil 4.9'da gösterildiği gibi florasen mikroskopundan alınan görüntülere bakıldığında indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile ko-kültür edilen MCF-12A hücrelerinde kaspaz 9 protein sentezinde herhangi bir fark görülmemiştir.



Şekil 4.9 MCF-12A (Normal meme hücresi)'ne ait kaspaz 9 protein sentezinin florasan mikroskopundaki görüntüsü. Çekirdek boyası (DNA) 7-AAD (Kırmızı sinyal) ve FITC işaretli sekonder antikor (Yeşil sinyal) kullanılmıştır (100X)

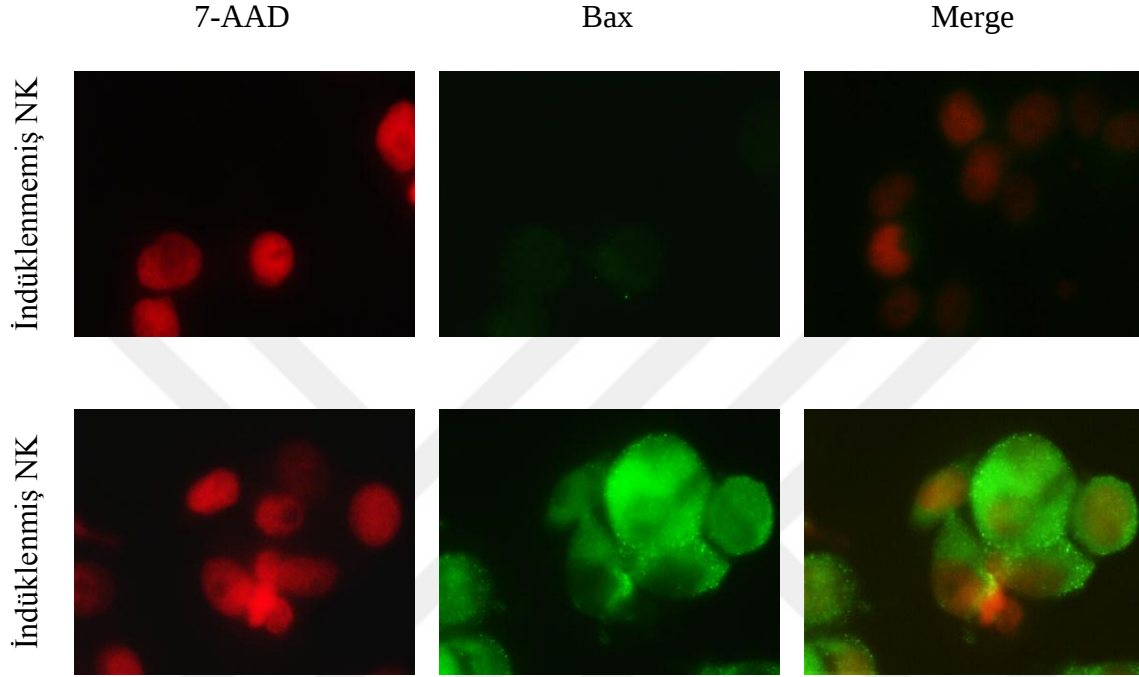
4.4.2 MCF-7 hücre hattının immün boyama ile apoptoz yolağına ait proteinlerin sentezinin belirlenmesi

İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreler ile ko-kültür edilmiş MCF-7 hücreleri yuvarlak lamel üzerine fıkse edilmiştir. Apoptoz yolağına ait Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 proteinlerin sentezi immün boyama yöntemi ile analiz edilmiştir. Görüntülerde bu proteinlerin (Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9) sentezi yeşil sinyal (FITC) ile gösterilmektedir. Alınan kırmızı sinyal (7-AAD) ise hücre çekirdek lokasyonunu göstermektedir (Şekil 4.10- 4.12).

4.4.2.1 Ko-kültür sonrası MCF-7 hücrelerinde Bax protein sentezinin immün boyama yöntemi ile belirlenmesi

İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile MCF-7 hücrelerinin ko-kültür sonrası Bax proteininin sentezi araştırılmıştır. Bax antikor, FITC işaretli sekonder ve çekirdek (DNA) için 7-AAD immün boyama deneylerinde kullanılmıştır. Şekil 4.10'da

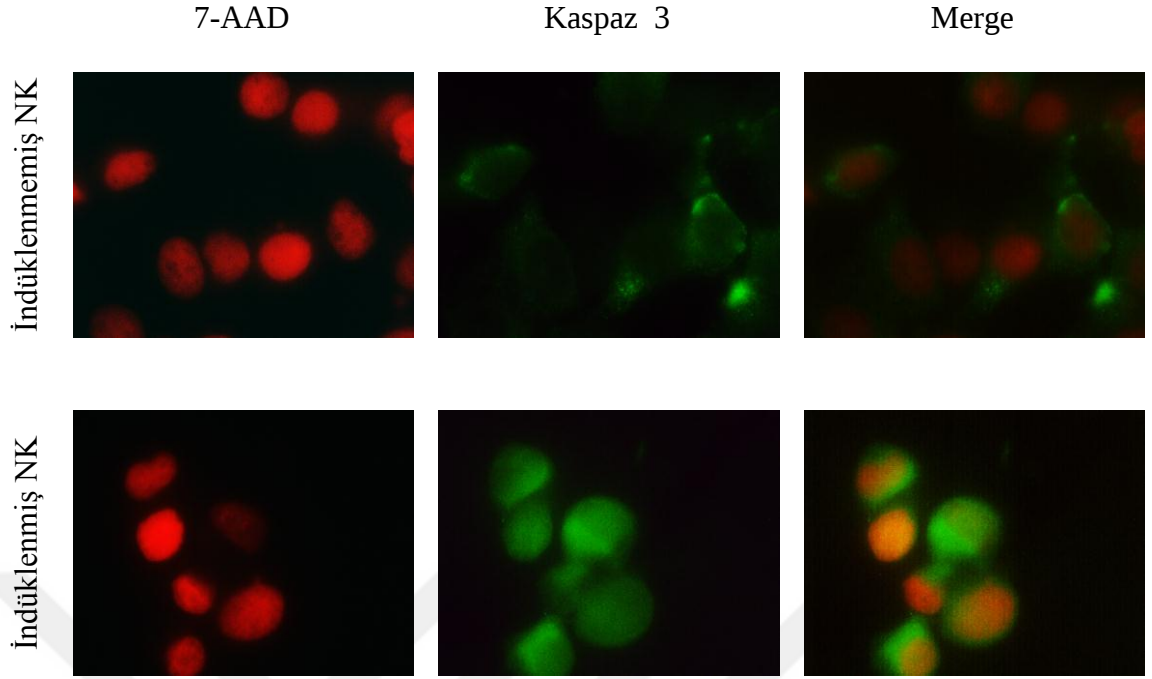
gösterildiği gibi florasana mikroskobundan alınan görüntülere bakıldığında indüklenmemiş NK-92 ko-kültür edilmiş MCF-7 hücrelerinde Bax proteininin sentezi gerçekleşmezken, indüklenmiş NK-92 hücreleri ile ko-kültür edilen MCF-7 hücrelerinde yüksek seviyede Bax proteininin sentez olduğu görülmüştür (Yeşil sinyal).



Şekil 4.10 MCF-7 (Meme kanser hücresi)'ne ait Bax protein sentezi florasana mikroskobundaki görüntüsü. Çekirdek boyası (DNA boyası) 7-AAD ve sekonder olarak FITC kullanılmıştır (100X).

4.4.2.2 Ko-kültür sonrası MCF-7 hücrelerinde Kaspaz 3 protein sentezinin immün boyama yöntemi ile belirlenmesi

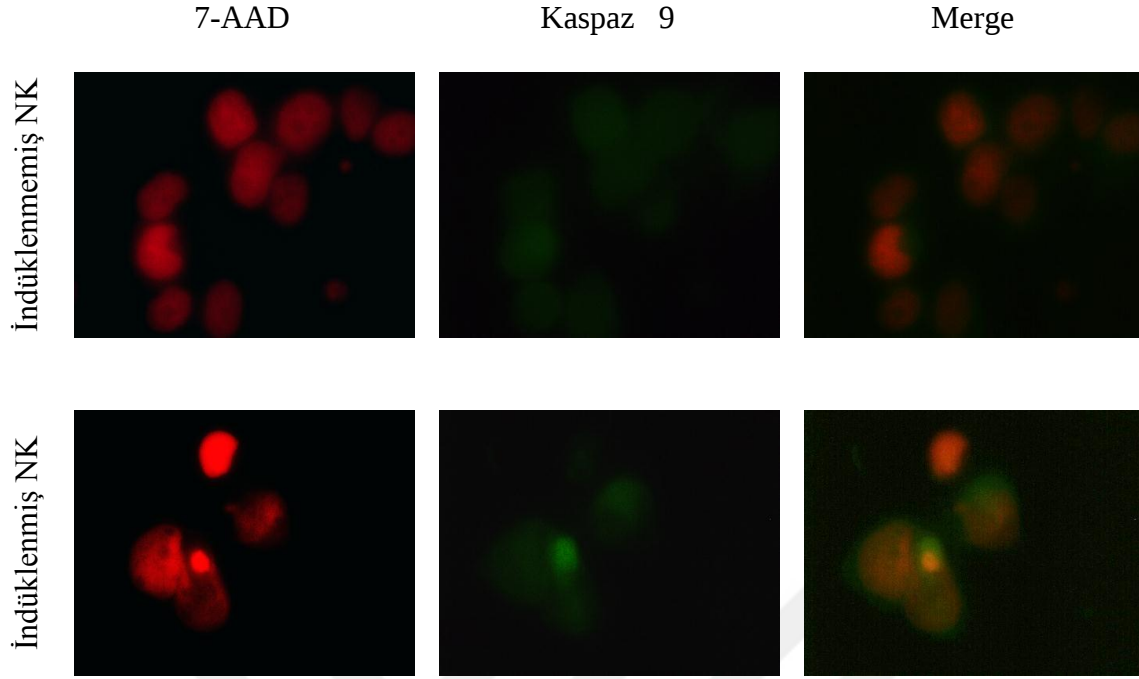
İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile MCF-7 hücrelerinin ko-kültür sonrası Kaspaz 3 proteininin sentezi araştırılmıştır. Kaspaz 3 antikoruna, FITC işaretli sekonder ve çekirdek (DNA) için 7-AAD immün boyama deneylerinde kullanılmıştır. Şekil 4.11'de gösterildiği gibi florasana mikroskobundan alınan görüntülere bakıldığında indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile ko-kültür edilen MCF-7 hücrelerinde Kaspaz 3 sentezi görülmüştür. Ancak alınan sinyal yoğunluğuna göre indüklenmiş NK-92 ile ko-kültür edilmiş MCF-7 hücrelerinde bu protein sentezinin diğer gruba göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir



Şekil 4.11 MCF-7 (Meme kanser hücresi)'ne ait Kaspaz 3 protein sentezinin florasana mikroskopundaki görüntüsü. Çekirdek boyası (DNA boyası) 7-AAD ve sekonder olarak FITC kullanılmıştır (100X)

4.4.2.3 Ko-kültür sonrası MCF-7 hücrelerinde Kaspaz 9 protein sentezinin immün boyama yöntemi ile belirlenmesi

İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile MCF-7 hücrelerinin ko-kültür sonrası Kaspaz 9 proteininin sentezi araştırılmıştır. Kaspaz 9 antikoruna, FITC işaretli sekonder ve çekirdek (DNA) için 7-AAD immün boyama deneylerinde kullanılmıştır. Şekil 4.12'de gösterildiği gibi florasan mikroskopundan alınan görüntülere bakıldığında indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile ko-kültür edilmiş MCF-7 hücrelerinde Kaspaz 9 proteininin sentezi neredeyse yokken, indüklenmiş NK-92 hücreleri ile ko-kültür edilen MCF-7 hücrelerinde belirgin seviyede Kaspaz 9 proteininin sentez olduğu görülmektedir (Yeşil sinyal).



Şekil 4.12 MCF-7 (Meme kanser hücresi)'ne ait kaspaz 9 proteininin florasan mikroskopundaki görüntüsü. Çekirdek boyası (DNA boyası) 7-AAD ve sekonder olarak FITC kullanılmıştır (100X)

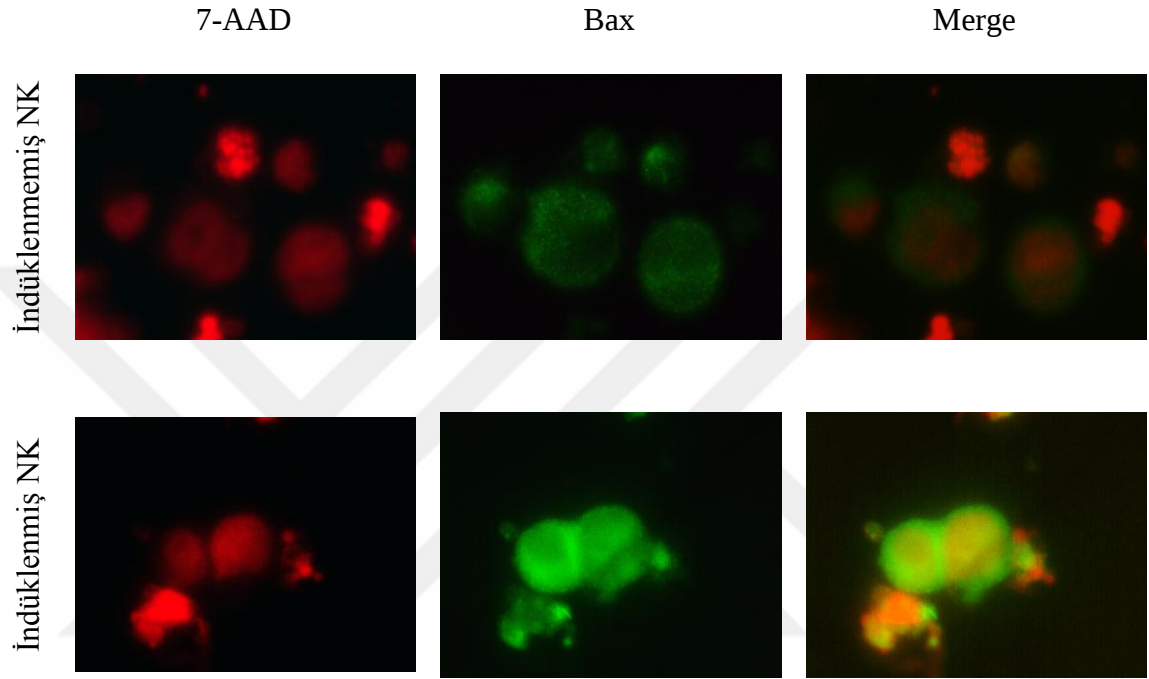
4.4.3 SK-BR-3 hücre hattının immün boyama ile apoptoz yolağına ait proteinlerin sentezinin belirlenmesi

İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreler ile ko-kültür edilmiş SK-BR-3 hücrelerinin fiksasyonu sağlanmıştır. Apoptoz yolağına ait Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 proteinlerin sentezi immün boyama yöntemi ile analiz edilmiştir. Görüntülerde bu proteinlerin (Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9) sentezi yeşil sinyal (FITC) ile gösterilmektedir. Alınan kırmızı sinyal (7-AAD) ise hücre çekirdek lokasyonunu göstermektedir (Şekil 4.13- 4.15).

4.4.3.1 Ko-kültür sonrası SK-BR-3 hücrelerinde Bax protein sentezinin immün boyama yöntemi ile belirlenmesi

İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile SK-BR-3 hücrelerinin ko-kültür sonrası Bax proteininin sentezi araştırılmıştır. Bax antikoru, FITC işaretli sekonder ve çekirdek (DNA) için 7-AAD immün boyama deneylerinde kullanılmıştır. Şekil 4.13'de

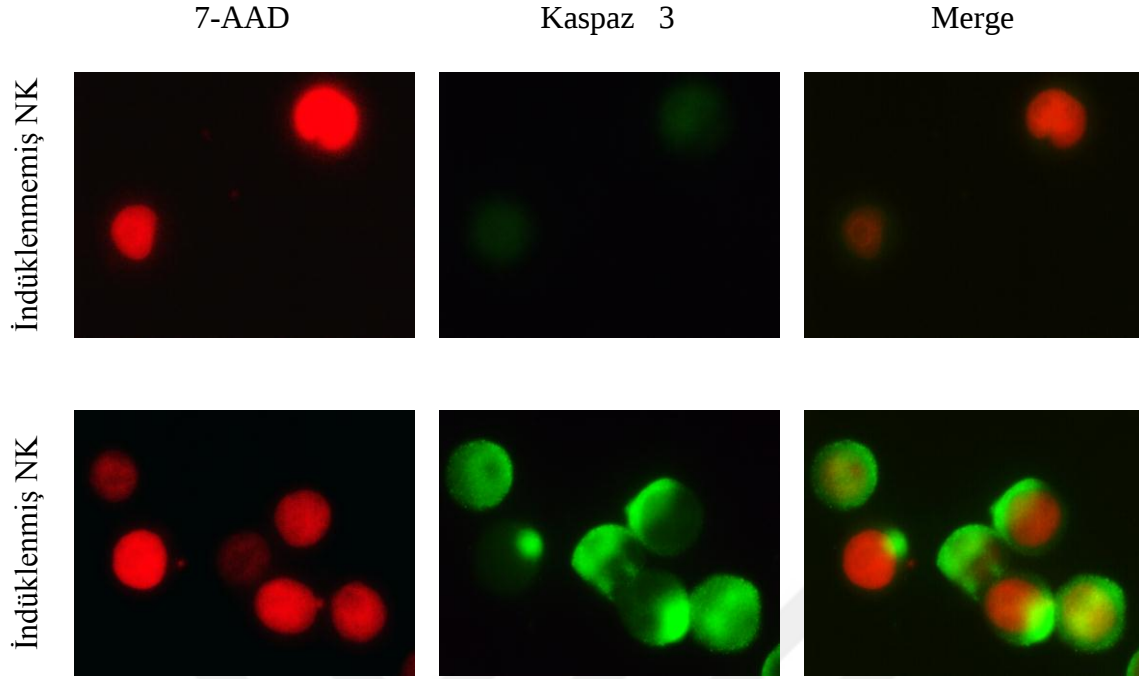
gösterildiği gibi florasana mikroskobundan alınan görüntülere bakıldığında indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile ko-kültür edilen SK-BR-3 hücrelerinde Bax sentezi görülmüştür. Ancak alınan sinyal yoğunluğuna göre indüklenmiş NK-92 ile ko-kültür edilmiş MCF-7 hücrelerinde bu protein sentezinin diğer gruba göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.13 SK-BR-3 (Meme kanser hücresi)'ne ait Bax protein sentezinin florasana mikroskobundaki görüntüsü. Çekirdek boyası (DNA boyası) 7-AAD ve sekonder olarak FITC kullanılmıştır (100X)

4.4.3.2 Ko-kültür sonrası SK-BR-3 hücrelerinde Kaspaz 3 protein sentezinin immün boyama yöntemi ile belirlenmesi

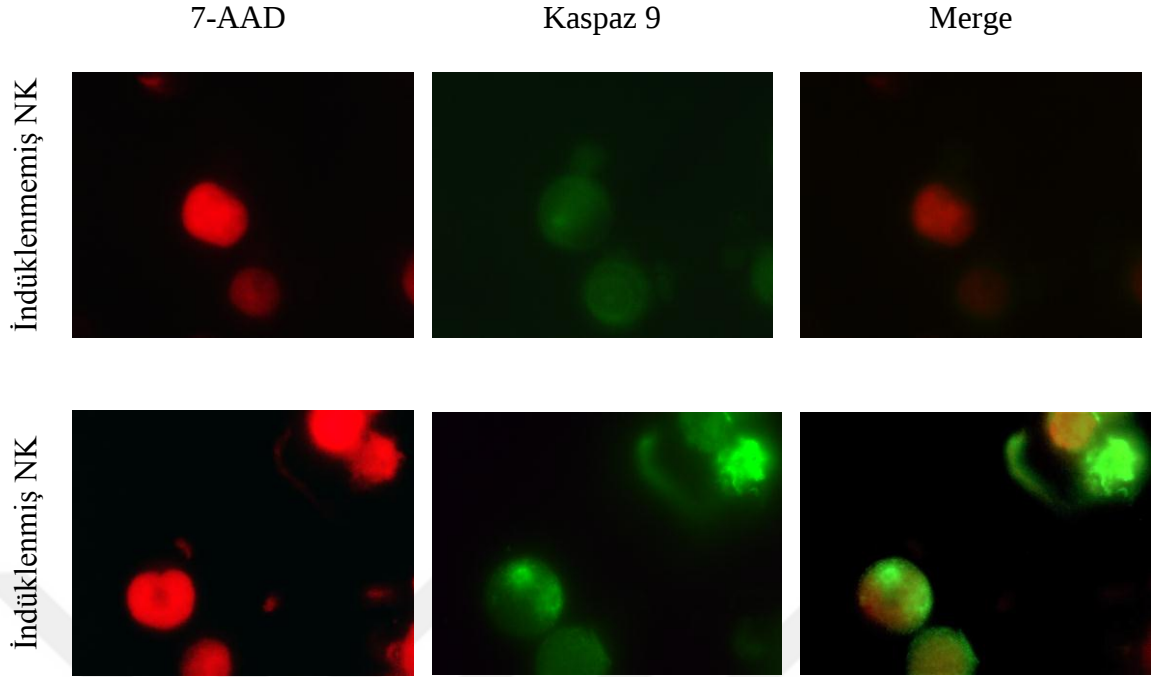
İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile SK-BR-3 hücrelerinin ko-kültür sonrası Kaspaz 3 proteininin sentezi araştırılmıştır. Kaspaz 3 antikoru, FITC işaretli sekonder ve çekirdek (DNA) için 7-AAD immün boyama deneylerinde kullanılmıştır. Şekil 4.14'de gösterildiği gibi florasana mikroskobundan alınan görüntülere bakıldığında indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile ko-kültür edilmiş SK-BR-3 hücrelerinde Kaspaz 3 proteininin sentezi neredeyse yokken, indüklenmiş NK-92 hücreleri ile ko-kültür edilen SK-BR-3 hücrelerinde belirgin seviyede Kaspaz 3 proteininin sentez olduğu görülmektedir (Yeşil sinyal).



Şekil 4.14 SK-BR-3 (Meme kanser hücresi)'ne ait Kaspaz 3 protein sentezinin florasan mikroskopundaki görüntüsü. Çekirdek boyası (DNA boyası) 7-AAD ve sekonder olarak FITC kullanılmıştır (100X)

4.4.3.3 Ko-kültür sonrası SK-BR-3 hücrelerinde Kaspaz 9 protein sentezinin immün boyama yöntemi ile belirlenmesi

İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile SK-BR-3 hücrelerinin ko-kültür sonrası Kaspaz 9 proteininin sentezi araştırılmıştır. Kaspaz 9 antikor, FITC işaretli sekonder ve çekirdek (DNA) için 7-AAD immün boyama deneylerinde kullanılmıştır. Şekil 4.15'de gösterildiği gibi florasan mikroskopundan alınan görüntülere bakıldığında indüklenmemiş NK-92 hücreleri ile ko-kültür edilmiş SK-BR-3 hücrelerinde Kaspaz 9 proteininin sentezi çok düşük seviyelerdeyken, indüklenmiş NK-92 hücreleri ile ko-kültür edilen SK-BR-3 hücrelerinde belirgin seviyede Kaspaz 9 proteininin sentez olduğu görülmektedir (Yeşil sinyal).



Şekil 4.15 SK-BR-3 (Meme kanser hücresi)’ne ait Kaspaz 9 protein sentezinin florasan mikroskopundaki görüntüsü. Çekirdek boyası (DNA boyası) 7-AAD ve sekonder olarak FITC kullanılmıştır (100X)

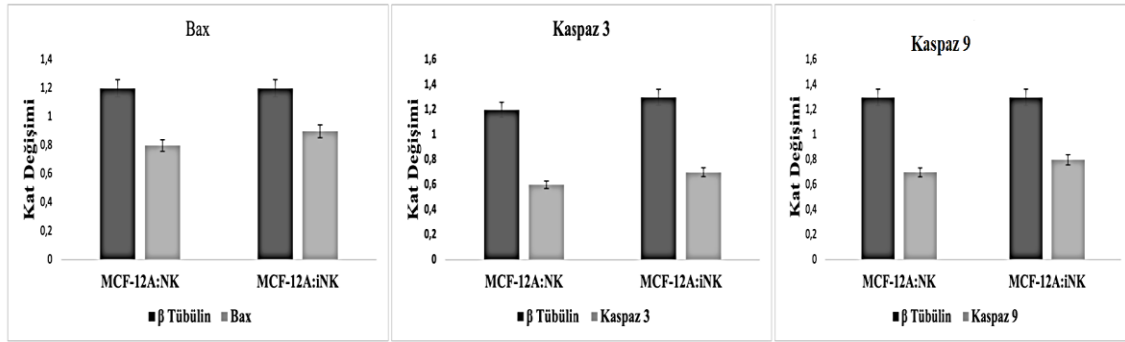
4.5 Western Blot Analiz Sonuçları

4.5.1 MCF-12A’nın NK-92 ve iNK-92 ile ko-kültürü sonrası apoptoz yolağındaki protein sentezinin western blot ile analiz sonuçları

NK-92 ve iNK-92 hücrelerin normal meme hücresi MCF-12A ile ko-kültür edilmesi sonucunda apoptoz yolağında rol alan Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 proteinlerin sentezine bakılmıştır. Referans protein olarak β Tübülün kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında apoptoz yolağındaki proteinlerin ifadesi referans proteine göre kıyaslandığında iNK-92 ile ko-kültür edilen grupta ve NK-92 ile ko-kültür edilen grupta herhangi bir fark olmadığı ve apoptoz yolağında rol alan proteinlerin sentezinin referans proteine göre artmadığı çizelge 4.1’de ve protein kat değişimi şekil 4.16’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 MCF-12A ile ko-kültür edilen NK-92 ve iNK-92 hücrelerin apoptoz yolağındaki Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 protein sentezine etkisi

	MCF-12A: NK	MCF-12A: iNK
β Tübülün		
Bax		
Kaspaz 3		
Kaspaz 9		



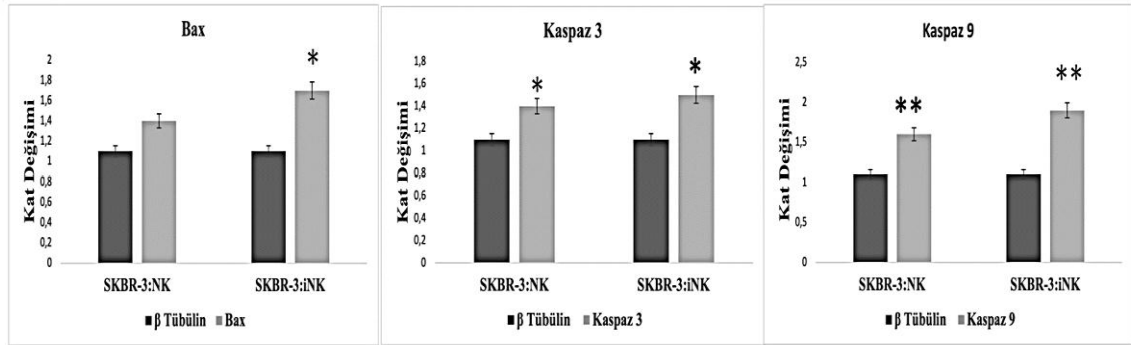
Şekil 4.16 NK-92 ve iNK-92 hücreleri ile ko-kültür edilen MCF-12A hücrelerinde apoptoz yolağındaki Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 protein sentezi üzerine etkinin gösterilmesi

4.5.2 SK-BR-3'ün NK-92 ve iNK-92 ile ko-kültürü sonrası apoptoz yolağındaki protein sentezinin western blot ile analiz sonuçları

NK-92 ve iNK-92 hücrelerin normal meme hücresi SK-BR-3 ile ko-kültür edilmesi sonucunda apoptoz yolağında rol alan Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 proteinlerin sentezi incelenmiştir. Elde edilen veriler referans protein β Tübülün'e göre apoptoz yolağındaki proteinler Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 8'in indüklenmiş NK-92 grubunda indüklenmemişlere göre sentezinin arttığı görülmüştür. Bu artış Kaspaz 3 ve Kaspaz 9'da belirgin şekildedir. Sonuçlara ait western blot jel görüntüleri çizelge 4.2'de ve protein kat değişimi şekil 4.17'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 SK-BR-3 ile ko-kültür edilen NK-92 ve iNK-92 hücrelerin apoptoz yolağındaki Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 protein sentezine etkisi

	SK-BR-3: NK	SK-BR-3: iNK
β Tübülün		
Bax		
Kaspaz 3		
Kaspaz 9		



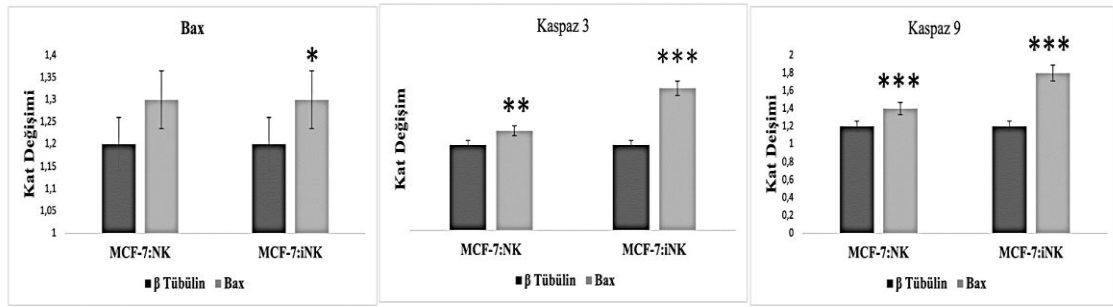
Şekil 4.17 NK-92 ve iNK-92 hücreleri ile ko-kültür edilen SK-BR-3 hücrelerinde apoptoz yolağındaki Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 protein sentezi üzerine etkinin gösterilmesi (*p<0,05 ** p<0,01)

4.5.3 MCF-7'nin NK-92 ve iNK-92 ile ko-kültürü sonrası apoptoz yolağındaki protein sentezinin western blot ile analiz sonuçları

NK-92 ve iNK-92 hücrelerin normal meme hücresi MCF-7 ile ko-kültür edilmesi sonucunda apoptoz yolağındaki rol alan Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 proteinlerin sentezi incelenmiştir. Referans protein ile kıyaslandığında indüklenmiş NK-92 gruplarında indüklenmemişlere kıyasla protein sentezinin arttığı görülmüştür. Sonuçlara ait jel görüntüleri ve protein kat değişimi Çizelge 4.3-Şekil 4.18'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 MCF-7 ile ko-kültür edilen NK-92 ve iNK-92 hücrelerin apoptoz yolağındaki Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 protein sentezine etkisi

	MCF-7: NK		MCF-7: iNK	
β Tübülün				
Bax				
Kaspaz 3				
Kaspaz 9				



Şekil 4.18 NK-92 ve iNK-92 hücreleri ile ko-kültür edilen MCF-7 hücrelerinde apoptoz yolağındaki Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 protein sentezi üzerine etkinin gösterilmesi (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doğal öldürücü (NK) hücreler immün sistemin doğuştan gelen bağışıklık sistemi hücreleridir. Kanser ve viral enfekte hücreleri güçlü bir şekilde tanıyarak immün gözetimde ilk savunma mekanizmasında yer alırlar (Sutlu ve Alıcı 2009). NK hücreleri yüzeyinde aktive edici ve inhibe edici reseptörler bulunur. Bu reseptörler ilişkili olduğu ligandlara bağlanarak hedef hücrelerin öldürülmesini sağlar veya engellerler (Lanier 2008). İnhibe edici ve aktive edici reseptörler arasındaki denge NK hücrelerinin sitotoksitesini belirlemektedir. NK hücrelerinin kanser hücrelerini tanıma ve yok etme mekanizması immün gözetimde önem arz etmektedir. Bu nedenle NK hücresinin kanser hücresi ile arasındaki etkileşim kanser immünoterapisinde terapötik olarak kullanımı etkili bir yaklaşımdır.

NK hücrelerinin agonistik antikorlar ile aktivasyonu ve hedef hücrelere karşı sitotoksitesinin artırılması kanser immünoterapisinde önemli bir basamaktır (Lin vd. 2008, Melero vd. 2013, Khanna vd. 2021). NK hücrelerinin anti-kanser özelliğini artırmak için aktivatör reseptörlerini stimüle etmek ve hedef hücrelere karşı NK hücrelerinin aktivitesini artırmak immünoterapide yeni bir etki mekanizmadır. Yapılan araştırmalar incelendiğinde bu güne kadar KIR ailesi üyesi olan KIR2DL4 aktivatör reseptörü indüklenerek kanser hücrelerine olan sitotoksik etkisi ile ilgili herhangi bir araştırma bulunmamaktadır. Bu tezde NK-92 hücreleri üzerinde bulunan KIR2DL4 reseptörünü agonistik antikor aracılığı ile indükleyerek kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi araştırılmıştır. KIR2DL4 aktivatör reseptörünün antikor aracılı indüklenmesi, meme kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik özelliğinin artırılması, trastuzumab kombinasyonlu sitotoksitesisi ve apoptotik yollar üzerindeki etkisi bu tezin temel hedefini oluşturmaktadır.

Bu tez çalışmasında ilk aşamada anti-KIR2DL4 mAb #33 kullanılarak NK-92 hücrelerinin aktive edilmesi ve ikinci aşamada bu hücrelerin sitotoksik etkisi iki farklı meme kanser hücresi ve normal meme hücresi üzerinde araştırılmıştır. İndüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin meme kanser hücrelerine karşı ortaya koyduğu öldürücü etki değerlendirilmiştir. Buna paralel olarak normal meme hücresine olan

etkisi de araştırılmıştır. Bir başka grup olarak meme kanseri tedavisinde kullanılan antikor tabanlı ilaç (Trastuzumab) ile birlikte elde edilen indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir.

Anti-KIR2DL4 mAb #33 ile 20 saat inkübasyonu sağlanan NK-92 hücrelerinin antikor reseptör bağlanması immün boyama yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.2). Antikor-reseptör etkileşiminin validasyonu tez çalışmasında yapılacak deneylerin temelini oluşturmaktadır. Rajagopalan ve arkadaşları 2006'da yaptığı çalışmada anti-KIR2DL4 antikorumun ilgili aktivatör reseptörüne bağlandığı immün boyama yöntemi ile gösterilmiştir ve bu indükleme sonrası NK hücrelerinin INF- γ üretiminin arttığı ifade edilmiştir. Bağlanma sonucunda süpernatandaki INF- γ miktarı elisa yöntemi ile analiz edilmiş ve bu antikor ile INF- γ salınımının arttığını belirtilmiştir (Rajagopalan vd. 2006). Bu tez çalışmasında da aynı antikor aracılığı ile NK-92 hücrelerinin indüklenmesi ve meme kanser hücrelerine karşı sitotoksitesinin artırılması sağlanmıştır. Antikor-reseptör bağlanması Rajagopalan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer olarak immün boyama ile valide edilmiştir. Elde edilen sonuçlar NK-92 hücreleri üzerinde bulunan KIR2DL4 reseptörünün kullanılan antikor ile etkileşime girdiği gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin normal meme ve kanser hücrelerine karşı öldürücü etkisi araştırılmıştır. Elde edilen deney sonuçlarına göre indüklenmiş NK-92 hücrelerinin indüklenmemişlere göre tüm kanser deney gruplarında anlamlı derecede öldürücü etkisi olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5). Sitotoksik deney sonuçlarına göre indüklenmiş olan NK-92 hücreleri kanser hücrelerine karşı öldürücü etki gösterirken normal meme hücrelerine etki etmediği görülmektedir. Bu tez çalışmasında iki farklı insan meme kanser hücre hattı (SK-BR-3 ve MCF-7 hücre hatları sırayla HER2⁺ ve HER2⁻ olarak) kullanılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre kullandığımız her iki kanser grubunda kontrol gruba kıyasla hücre sayısında azalma tespit edilmiştir ve bu azalma anlamlı derecede olduğu gösterilmiştir. Ayrıca indüklenmiş NK-92 hücreleri indüklenmemiş hücrelere kıyasla meme kanser hücrelerine karşı (MCF-7 ve SK-BR-3) üç farklı oranda da (1:1, 1:5, 1:10) öldürücü etkiye sahip olduğu belirlenmiştir ve bu etkinin SK-BR-3 grubunda 1:1 oranı hariç tüm

gruplarda anlamlı olduğu gösterilmiştir. Tüm kanser hücre deneylerinde en yüksek öldürücü etki gösteren grup 1:10 oranında indüklenmiş hücrelerde olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla indüklenmiş NK-92 hücre oranının artması ile kanser hücrelerine karşı öldürücü etkinin arttığı belirlenmiştir. Şuana kadar yapılan çalışmalara bakıldığında NK-92 hücrelerinin KIR2DL4 reseptörünün indükleyerek kanser hücrelerine karşı sitotoksitesini artırması ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürde bulunan diğ er ajan ve reseptörlerle indüklenmiş NK hücrelerinin sitotoksite etkisi farklı gruplar tarafından araştırılmıştır.

Jardine ve arkadaşlarının 2012’de yaptığı çalışmada NK hücreleri üzerinde bulunan aktivatör reseptörü NKG2D ligandlarının bir proteazom inhibitörü olan bortezomib, histon deasetilaz inhibitörü olan valproatin ve tiazolidindion olan Troplitazon ile indüklenmesi akut lenfoblastik lösemisinin (ALL) NK hücrelerini etkili hale getirilmeye çalışılmıştır. Her üç ilacında NKG2D’ye bağı lı mekanizma yoluyla NK hücre degranülasyonunu artırdığı na ve in vivo olarak NK aracılı anti-lösemik etkileri güçlendirdiğı i bulunmuştur. Üç ajandan en etkilisi bortezomib olarak belirtilmiştir (Jardine vd. 2013). Bu tez çalışmasında da benzer olarak aktivatör reseptörü stimülasyonu ile NK-92 hücrelerinin aktivitesi artırılmıştır ve meme kanser hücrelerine karşı etkili sonuçlar alınmıştır.

2012’de Wang ve arkadaşları tarafından sitokinlerle (IL-12 ve IL-15) kordon kanından elde edilen NK hücrelerinin aktivitesi artırılmıştır. K562 hücre hattına karşı WST-1 analizi ile bu hücrelerin sitotoksitesi belirlenmiştir. Bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre indüklenmiş hücrelerde indüklenmemiş hücrelere göre sitotoksitenin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar tez çalışmasından elde ettiğimiz sitotoksite deneylerinden alınan sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Ancak yapılan tez çalışmasından farklı olarak NK hücrelerinin indüklenmesi için sitokinler kullanılmıştır. (Wang vd. 2012). Ayrıca Karlitepe ve arkadaşlarının 2021’de yaptığı araştırmada her hangi bir işleme tabi tutulmayan kordon kanından elde edilen NK hücrelerinin meme kanserine karşı WST-1 deneyi ile sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada, tez çalışmamızdan farklı olarak kordon kanından elde edilen her hangi bir indüklenme işleminin yapılmadan total NK hücreleri kullanılmıştır. Karlitepe ve arkadaşlarının yaptığı

çalışmada da kordon kanından taze olarak alınan NK hücreler ile ko-kültür edilen meme kanser hücre hatları, kontrol grup ile kıyaslandığında anlamlı derecede sitotoksiste belirlenmiştir (Karlıtepe vd. 2021).

2006 yılında von Strandmann ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada NK hücrelerinin NKG2D üzerinden aktive etmek için rekombinant bi-spesifik protein ULBP2-BB4'i tasarlamışlardır. Bu proteinin NKG2D reseptörüne bağlanması ile NK hücrelerinden IFN- γ salınımında artış ve güçlü bir şekilde aktive edilmiş NK hücreleri elde edilmiştir. Bu indüklemeye NK hücrelerini aktive eder ve *in vitro*'da multiple miyelomlu hücrelere karşı sitotoksik etki gösterir. *In vivo*'da yapılan çalışmada ise ULBP2-BB2 ile aktive edilen NK hücreleri tümör büyümesini engellediği tespit edilmiştir (von Strandmann vd. 2006). Yapılan bu çalışmadan farklı olarak antikor kullanılan bu tez çalışmasında da aktivatör reseptörü üzerinden NK-92 hücrelerinin aktivasyonunun arttığı bulunmuştur

2018 yılında Turaj ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada NK hücrelerinin OX40 (CD134) aktivasyon reseptörünü agonistik bir antikor anti-CD134 ile stimüle edip lenfomaya karşı anti-tümör etkisi değerlendirilmiştir. Bu araştırmada OX40 tümör nekroz faktör reseptör ailesinin üyesi olan bu reseptör, çeşitli malignitelerde NK hücrelerinde anti-tümör etkisi gösterdiği bildirilmiştir. Agonistik antikor ile stimülasyonu sağlanan NK hücreleri IFN- γ üretimini ve hücre sitotoksitesini artırmıştır (Turaj vd. 2018). Bu araştırma farklı agonistik antikor ve reseptör kullanmasına rağmen elde ettiği sitotoksik sonuçları bu tez çalışmasının sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Kohrt ve arkadaşlarının 2012'de yaptığı çalışmada CD137 agonistik antikor ile aktive edilen NK hücrelerinin meme kanseri üzerindeki öldürücü etkisi araştırılmıştır. Agonistik antikor ile aktive edilen NK hücrelerinin meme kanseri üzerinde sitotoksik etkisini artırdığı ve buna bağlı olarak trastuzumabın da etkinliğini artırdığı belirtilmiştir. Anti-CD137 agonistik antikor ile aktive edilen NK hücreleri *in vitro* koşullarda çoğaltılarak meme kanseri ile *in vitro* ve *in vivo* koşullarda birlikte kültürlendiğinde sitotoksik etkisini önemli ölçüde artırdığını bildirilmiştir. Ayrıca trastuzumab ile kombinasyonunda ise hem kanser hücrelerini hedefleme hem aktivatör rolü oynayan antikor ile NK hücre aktivitesi artırma stratejisi, trastuzumabın da etkinliğini artırdığı

belirtilmiştir (Kohrt vd. 2012). Bu tez çalışması Kohrt ve ark.'larının yaptığı çalışmaya benzer olarak agonistik antikor anti-KIR2DL4 ile NK hücrelerinin aktivitesi artırılmış ve meme kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etkisini gösterilmiştir. Bunun yanında yapılan trastuzumab kombinasyonu Kohrt ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan farklı olarak trastuzumab etkinliğinde anlamlı dereceden bir etki olduğu bulunamamıştır.

Pahl ve arkadaşlarının 2018'de yaptığı çalışmada AFM13 agonistik antikor ile NK hücrelerinin sitotoksik etkisi artırılmıştır. AFM13 agonistik antikor ile belli süre indüklenen NK hücreleri lenfoma hücre hatlarına karşı sitotoksik etkisi araştırılmış ve önemli sonuçlar elde edilmiştir. Alınan sonuçlarda indüklenen NK hücreleri lenfoma hücre hatlarına karşı hem sitotoksitesini artırarak hemde INF- γ salınımını artırarak etki ettiği belirtilmiştir (Pahl vd. 2018). Yapılan tez çalışmasında da agonistik antikor ile aktive edilen NK hücrelerinin meme kanser hücre hatlarına karşı etkisi değerlendirilmiş ve benzer olarak sitotoksik etkisinin arttığı bulunmuştur.

Sanmamed ve arkadaşları 2015 yılında yaptığı derlemede NK hücrelerinin transmembranında aktive edici reseptör olarak bulunan CD137, OX40, GITR, CD27, CD28 ve ICOS glikoproteinlerine yönelik kullanılan agonist antikorların bu reseptörler ile ligasyonu lenfositlere aktive edici sinyaller iletir. Hücrel bağışıklık tepkisinin güçlendirilmesi yönünde hareket eden bu tepkiler fare modellerinde anti-tümör etkilere yol açtığı gösterilmiştir (Sanmamed vd. 2015). Bu derlemede yapılan çalışmalara benzer olarak agonistler ile immün hücreleri stimüle ederek aktivasyonunu artırmak kanser hücrelerine karşı etkili olduğu bulunmuştur.

Kemoterapi ve klinikte kullanılan atikorlar ile birlikte en etkili tedavi modeli için kombine tedavi yaklaşımları üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmalar deneysel, faz çalışmaları ve klinikte olmak üzere hala sürdürülmektedir. Bu tez çalışmasında ise KIR2DL4 reseptörünün indüklenmesi ile NK-92 hücrelerinin aktivitesinin artırılmasının yanında HER2⁺ meme kanseri tedavisinde kullanılan trastuzumab ile kombinasyon çalışması yapılmıştır. Alınan sonuçlar da kontrol gruba göre tüm grupların sitotoksik özelliği anlamlı derecede artmıştır. Fakat trastuzumab ile kombine olarak kullanılan indüklenmiş grupta indüklenmemiş gruba göre anlamlı bir

farklılık bulunmamıştır. 2006 yılında Roda ve arkadaşlarının *in vivo* da yaptığı çalışmada IL-21 ile indüklenen NK hücreleri trastuzumab kaplı murin kanser modellerine kombine olarak verildiğinde kanser hücrelerine karşı sitotoksitenin arttığı gösterilmiştir (Roda vd. 2006). Bu araştırmanın sonuçları bizim elde ettiğimiz sonuçlarla farklılık göstermektedir. Bu farklılık kullanılan indükleme ajanı, inkübasyon süresi ve çalışma şartlarından (*in vivo*) kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Guillerey ve arkadaşlarının 2015’de yaptığı çalışmada TLR3 (Toll-like reseptors)’ün interlökinlerden IL-12, IL-15 ve IL-18 reseptörlerinin agonistleri ile kombine olarak verildiğinde stimülasyon sonucunda IFN-gama üretiminin arttığı belirtilmiştir (Guillerey vd. 2015). Guillerey ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer olarak Trastuzumab ile kombine edilen ve aktivatör reseptörünü hedefleyen antikora NK-92 hücrelerinin artırılması sonucunda meme kanser hücrelerine karşı *in vitro* koşullarda etkili sonuçlar elde edilmiştir.

Yaptığımız tez çalışmasında immün boyama deneylerinden elde ettiğimiz sonuçlara göre MCF-7 kanser hücreleri indüklenmiş NK-92 hücreleriyle ko-kültür edildiğinde indüklenmemiş hücrelere göre Bax ve Kaspaz 3 proteinlerinin sentezinde fazla bir artış görülürken Kaspaz 9 protein sentezinde daha az artış görülmüştür. Ancak indüklenmiş NK-92 hücrelerinin SK-BR-3 kanser hücresinde Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 protein sentezi diğer gruba göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu da indüklenmiş NK-92 hücrelerinin indüklenmemişlere göre yüksek sitotoksik etkisinin apoptotik yollar üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir. Buna ek olarak MCF-12A normal meme hücrelerinde indüklenmiş NK-92 ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerine maruz kaldığında Bax, Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 gibi apoptotik proteinlerin sentezinde herhangi bir artış olmadığı gösterilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar MCF-12A hücrelerinin indüklenmiş ve indüklenmemiş NK-92 hücrelerinin etkisiyle apoptotik yollarının aktive olmadığı gösterilmiştir. Sonuç olarak immün boyama deneyleri sonucunda alınan görüntüler indüklenmiş NK-92 hücrelerinin indüklenmemişlere göre kanser hücrelerinde daha fazla apoptoz proteinleri sentezine neden olduklarını göstermektedir. Bu proteinlerin sentezinin arttığı alınan sinyallerle daha fazla olduğu belirlenmiştir. 2021 yılında Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Metionin Enkefalin (MENK)

pentapeptitin farelerde akciğer kanserine karşı NK hücrelerini aktive ederek Granzim B ve IFN- γ salınımını elisa yöntemi ile test edilmesi sonucu arttığı gösterilmiştir. Granzim B ve IFN- γ tümör hücrelerinin apoptoz yollarını hedeflemektedir. Araştırmacılar aktivasyon sonrasında birlikte kültürledikleri akciğer kanser hücrelerinde apoptoz yolağındaki proteinlerin (Bax, Bcl2 ve Kaspaz 3) sentezine western blot ile protein boyutunda analiz edilmiştir. Bu proteinlerin indüklenen NK hücreleri ile birlikte kültürlenenlerde sentezinin arttığı görülmüştür. Bu çalışma indüklenmiş NK hücrelerinin akciğer kanser hücrelerine karşı oldukça etkili olduğunu göstermektedir (Zhang vd. 2021). Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışma NK hücrelerini aktive edilmesi ve apoptoz proteinlerinin sentezinin protein boyutunda bakılması ve sonuçları yaptığımız tez çalışmasına benzerlik göstermektedir. Fakat bu araştırma tez çalışmasından farklı olarak NK hücreleri akciğer kanserine karşı peptit dizisiyle indüklenmiştir. Apoptoz yolağındaki proteinler tez çalışmasındaki western blot yöntemi analizlerinden elde edilen sonuçlara benzerlik göstermektedir.

Cui ve arkadaşlarının 2020’de yaptığı çalışmada IL-2 ve IL-15 ile indüklenerek aktivitesi artırılan NK-92 hücrelerinin kolon kanserine karşı sitotoksik etkisi ve apoptoz yolağında yer alan Bcl-2 ve Bax proteinlerin sentezine bakılmıştır. Alınan sonuçlar tez çalışmasında kullanılan Bax protein sentezinin referans proteine göre artışı Cui ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile benzerlik göstermektedir. NK hücrelerinin apoptoz da yer alan Bax protein sentezini artırdığı western blot yöntemi ile gösterilmiştir (Cui vd. 2020).

NK-92 hücreler üzerindeki reseptörler hedeflenerek bu hücrelerin sitotoksitesisi artırılıp hedef hücrelere karşı etkili hale getirmek günümüz çalışmalarının odak noktası olmuştur. Bu tez çalışmasında NK-92 hücrelerindeki KIR2DL4 aktivatör reseptörünü hedef hücrelere karşı indüklemek literatürde olmayan bir çalışmadır ve bu çalışmanın özgün değerini oluşturmaktadır. Alınan sonuçlar temel bilgi niteliği taşımaktadır ve ilerleyen çalışmalara öncülük edip *in vivo* ve faz çalışmalarına ışık tutacaktır. NK-92 hücrelerinin indükleyerek otolog ve allojenik olarak kullanımında ön çalışmaların tamamlanması ile kliniğe yansiyabilecek potansiyele sahiptir. Ayrıca yapılan çalışmada normal meme hücresine (MCF-12A) indüklenmiş NK-92 hücrelerinin herhangi bir

sitotoksik etki göstermemesi klinikte kullanımı için önem arz etmektedir. Sitotoksisite deneylerinden alınan sonuçlar doğrultusunda yapılan immün boyama analizi ile hücrelerin apoptoz yolağındaki antikolar ile boyaması sağlanmıştır. Elde edilen görüntüler indüklenmiş NK-92 hücreleri ile ko-kültür edilen kanser hücrelerinde apoptoz yolağındaki proteinlerin sentezini artırdığı görülmüştür. Alınan sonuçlar her hangi bir nekrotik iltihaplanmaya neden olmadan apoptoz yolağı üzerinden kanser hücrelerini ölüme götürmesi bakımından önemlidir. Bu çalışmanın sonuçları ile yapılacak *in vivo* ve faz çalışmaları sonucunda anti-KIR2DL4 antikoruna ile indüklenen ve çoğaltılan NK-92 hücreleri klinik kullanım için değerlendirilebilir niteliktedir. Bu antikorun ilerleyen çalışmalar doğrultusunda tedavi amaçlı kullanılabileceği gerçeğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

- Abbas, W., Tariq, M., Iqbal, M., Kumar, A., Herbein, G. 2015. Eradication of HIV-1 from the macrophage reservoir: an uncertain goal? *Viruses*, 7(4), 1578-1598.
- Akçam, F. Z. 2005. HLA sistemi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 25(6), 829-834.
- Alam, A., Farooq, U., Singh, R., Dubey, V., Kumar, S., Kumari, R., Dhar, K. 2018. Chemotherapy treatment and strategy schemes: A review. *Open Access J Toxicol*, 2, 555600.
- Ames E, Hallett WH, Murpy WJ. 2009. Sensitization of human breast cancer cells to natural killer cell-mediated cytotoxicity by proteasome inhibition. *Clinical and Experimental Immunology*.155(3):504-513.
- Ames E, Murphy WJ. Advantages and clinical applications of natural killer cells in cancer immunotherapy. 2014 *Cancer Immunology and Immunotherapy*.63(1):21-8.
- Anonim 1. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 Erişim tarihi: 28.04.2021.
- Anonim 2. <http://www.pathophys.org/breast-cancer/breastcancer-copy/>, Erişim tarihi: 08.05.2021.
- Anonim 3. <https://gco.iarc.fr/today/home>. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2021 Erişim tarihi : 09.07.2021
- Anonim 4. American Cancer Society, Cancer Immunotherapy, Copyright American Cancer Society. Erişim tarihi: 05.05.2021.
- Anonim 5. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/press-release/>. The 2018 nobel Prize in Physiology or Medicine-Press release-NobelPrize.org. Erişim tarihi: 16 Temmuz 2021.
- Anonim 6. <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html> Erişim Tarihi: 02.06.2021.
- Ansell, S. M., Lesokhin, A. M., Borrello, I., Halwani, A., Scott, E. C., Gutierrez, M., Armand, P. 2015. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, 372(4), 311-319. doi:10.1056/NEJMoa1411087

- Atkins, M. B., Lotze, M. T., Dutcher, J. P., Fisher, R. I., Weiss, G., Margolin, K., Hawkins, M. 1999. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *Journal of clinical oncology*, 17(7), 2105-2105.
- Balkwill, F. 2004. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*, 4(7), 540-550. doi:10.1038/nrc1388
- Barbaros, M. B. ve Dikmen, M. 2015. Kanser immünoterapisi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 31(4), 177-182.
- Bayraktar, R., Pichler, M., Kanlikilicer, P., Ivan, C., Bayraktar, E., Kahraman, N., Arslan, A. 2017. MicroRNA 603 acts as a tumor suppressor and inhibits triple-negative breast cancer tumorigenesis by targeting elongation factor 2 kinase. *Oncotarget*, 8(7), 11641.
- Bellmunt, J., De Wit, R., Vaughn, D. J., Fradet, Y., Lee, J.-L., Fong, L., Choueiri, T. K. 2017. Pembrolizumab as second-line therapy for advanced urothelial carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 376(11), 1015-1026.
- Benson, D. M., Jr., & Caligiuri, M. A. 2014. Killer immunoglobulin-like receptors and tumor immunity. *Cancer Immunol Res*, 2(2), 99-104. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0219
- Berraondo, P., Sanmamed, M. F., Ochoa, M. C., Etxeberria, I., Aznar, M. A., Pérez-Gracia, J. L., Melero, I. 2019. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *British journal of cancer*, 120(1), 6-15.
- Besse, B., Charrier, M., Lapierre, V., Dansin, E., Lantz, O., Planchard, D., Laplanche, A. 2016. Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. *Oncoimmunology*, 5(4), e1071008.
- Brinkman, B. M., Zuijdeest, D., Kaijzel, E. L., Breedveld, F. C., & Verweij, C. L. 1995. Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. *J Inflamm*, 46(1), 32-41.
- Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., Pessino, A., Cilli, M., Conte, R., Biassoni, R. 1998. p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily. *Eur J Immunol*, 28(6), 1980-1990. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199806)28:06<1980::AID-IMMU1980>3.0.CO;2-F
- Cheent, K., & Khakoo, S. I. 2011. Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction. *Gut*, 60(2), 268-278. doi:10.1136/gut.2010.212555

- Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. 2013. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Molecular Immunology*.10(3):230-52.
- Coley, W. B. 1893. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases. 1. *The American Journal of the Medical Sciences (1827-1924)*, 105(6), 487.
- Coley, W. B. 1908. The treatment of sarcoma with the mixed toxins of erysipelas and bacillus prodigiosus. *The Boston Medical and Surgical Journal*, 158(6), 175-182.
- Cui, F., Qu, D., Sun, R., Zhang, M., & Nan, K. 2020. NK cell-produced IFN- γ regulates cell growth and apoptosis of colorectal cancer by regulating IL-15. *Experimental and therapeutic medicine*, 19(2), 1400-1406.
- Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. Doğal Immün Cevap. Roitt's Temel İmmünoloji. Çev. Ed. İlman MN, Yıldız M. Atlas Kitabevi, Ankara, (In: Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. Roitt's Essential Immunology, Blackwell Science, 11. Ed, UK) 2008; Bölüm 1, sf: 1-20.
- Deniz, G., van de Veen, W., & Akdis, M. 2013. Natural killer cells in patients with allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 132(3), 527-535. doi:10.1016/j.jaci.2013.07.030
- DeSantis, C., Ma, J., Bryan, L., & Jemal, A. 2014. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*, 64(1), 52-62. doi:10.3322/caac.21203
- Diker KS, I. 1998. 1. baskı. Medisan yayınevi, Ankara. s, 22-59.
- Disis, M. L. 2014. Mechanism of action of immunotherapy. Paper presented at the Seminars in oncology.
- Dorak, M. T. 2002. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. *American Journal of Epidemiology*, 155(2), 185-186.
- Dranoff, G. 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 4(1), 11-22. doi:10.1038/nrc1252
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137-148. doi:10.1016/j.immuni.2004.07.017
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516. doi:10.1080/01926230701320337

- Eyüpoğlu Ünüvar, F. 2014. Periferik kan mononükleer hücre kaynaklı dendritik hücre üretiminin optimizasyonu: IL-15 sitokininin maturasyon sürecine etkisinin araştırılması. Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Pineros, M., . . . Bray, F. 2019. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*, 144(8), 1941-1953. doi:10.1002/ijc.31937
- Fujishima, H., Nakano, S., Tatsumoto, T., Masumoto, N., & Niho, Y. 1998. Interferon-alpha and -gamma inhibit the growth and neoplastic potential of v-src-transformed human epithelial cells by reducing Src tyrosine kinase activity. *Int J Cancer*, 76(3), 423-429. doi:10.1002/(sici)1097-0215(19980504)76:3<423::aid-ijc22>3.0.co;2-a
- Gardner, R., Wu, D., Cherian, S., Fang, M., Hanafi, L. A., Finney, O., Turtle, C. J. 2016. Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood*, 127(20), 2406-2410. doi:10.1182/blood-2015-08-665547
- Gardner, T. A., Elzey, B. D., & Hahn, N. M. 2012. Sipuleucel-T (Provenge) autologous vaccine approved for treatment of men with asymptomatic or minimally symptomatic castrate-resistant metastatic prostate cancer. *Hum Vaccin Immunother*, 8(4), 534-539. doi:10.4161/hv.19795
- Garon, E. B., Rizvi, N. A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A. S., Eder, J. P. 2015. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 372(21), 2018-2028. doi:10.1056/NEJMoa1501824
- Genßler, S., Burger, M. C., Zhang, C., Oelsner, S., Mildnerberger, I., Wagner, M., Wels, W. S. 2016. Dual targeting of glioblastoma with chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells overcomes heterogeneity of target antigen expression and enhances antitumor activity and survival. *Oncoimmunology*, 5(4), e1119354.
- Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., & Baradaran, B. 2015. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(6), 2129-2144. doi:10.7314/apjcp.2015.16.6.2129
- Gong, J. H., Maki, G., & Klingemann, H. G. 1994. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia*, 8(4), 652-658.

- Goodridge, J. P., Lathbury, L. J., John, E., Charles, A. K., Christiansen, F. T., & Witt, C. S. 2009. The genotype of the NK cell receptor, KIR2DL4, influences INFgamma secretion by decidual natural killer cells. *Mol Hum Reprod*, 15(8), 489-497. doi:10.1093/molehr/gap039
- Gras Navarro, A., Bjorklund, A. T., & Chekenya, M. 2015. Therapeutic potential and challenges of natural killer cells in treatment of solid tumors. *Front Immunol*, 6, 202. doi:10.3389/fimmu.2015.00202
- Green, D. R., & Llambi, F. 2015. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(12), a006080. doi:10.1101/cshperspect.a006080
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025
- Groh, V., Steinle, A., Bauer, S., & Spies, T. 1998. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science*, 279(5357), 1737-1740. doi:10.1126/science.279.5357.1737
- Guillerey, C., Chow, M. T., Miles, K., Olver, S., Sceneay, J., Takeda, K., Smyth, M. J. 2015. Toll-like receptor 3 regulates NK cell responses to cytokines and controls experimental metastasis. *Oncoimmunology*, 4(9), e1027468.
- Guillerey, C., Huntington, N. D., & Smyth, M. J. 2016. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat Immunol*, 17(9), 1025-1036. doi:10.1038/ni.3518
- Hamilton, G., Reiner, A., Teleky, B., Roth, E., Kolb, R., Spona, J., & Jakesz, R. 1988. Natural killer cell activities of patients with breast cancer against different target cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 114(2), 191-196. doi:10.1007/BF00417836
- Han, J., Chu, J., Chan, W. K., Zhang, J., Wang, Y., Cohen, J. B., Grandi, P. 2015. CAR-engineered NK cells targeting wild-type EGFR and EGFRvIII enhance killing of glioblastoma and patient-derived glioblastoma stem cells. *Scientific reports*, 5, 11483.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Harvat, B. L., & Jetten, A. 1996. Gamma-interferon induces an irreversible growth arrest in mid-G1 in mammary epithelial cells which correlates with a block in hyperphosphorylation of retinoblastoma. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 7(3), 289-300.

- Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., & Sakuragi, N. 2014. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*, 2014, 150845. doi:10.1155/2014/150845
- Hazeldine, J., & Lord, J. M. 2013. The impact of ageing on natural killer cell function and potential consequences for health in older adults. *Ageing Res Rev*, 12(4), 1069-1078. doi:10.1016/j.arr.2013.04.003
- Hoffbrand, A. V., & Pettit, J. E. 2013. *Grundlagen der Hämatologie*: Springer-Verlag.
- Huang, B. Y., Zhan, Y. P., Zong, W. J., Yu, C. J., Li, J. F., Qu, Y. M., & Han, S. 2015. The PD-1/B7-H1 pathway modulates the natural killer cells versus mouse glioma stem cells. *PLoS One*, 10(8), e0134715. doi:10.1371/journal.pone.0134715
- Jardine, L., Hambleton, S., Bigley, V., Pagan, S., Wang, X.-N., & Collin, M. 2013. Sensitizing primary acute lymphoblastic leukemia to natural killer cell recognition by induction of NKG2D ligands. *Leukemia & lymphoma*, 54(1), 167-173.
- Kataoka, T. R., Ueshima, C., Hirata, M., Minamiguchi, S., Haga, H. 2020. Killer immunoglobulin-like receptor 2DL4 (Cd158d) regulates human mast cells both positively and negatively: Possible roles in pregnancy and cancer metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 954.
- Khanna, V., Kim, H., Zhang, W., Larson, P., Shah, M., Griffith, T. S., Panyam, J. 2021. Novel TLR 7/8 agonists for improving NK cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). *Sci Rep*, 11(1), 3346. doi:10.1038/s41598-021-83005-6
- Kikuchi-Maki, A., Yusa, S.-i., Catina, T. L., & Campbell, K. S. 2003. KIR2DL4 Is an IL-2-Regulated NK Cell Receptor That Exhibits Limited Expression in Humans but Triggers Strong IFN- γ Production. *The Journal of Immunology*, 171(7), 3415. doi:10.4049/jimmunol.171.7.3415
- Kirchhoff, S., & Hauser, H. 1999. Cooperative activity between HER oncogenes and the tumor suppressor IRF-1 results in apoptosis. *Oncogene*, 18(25), 3725-3736.
- Kohrt, H. E., Houot, R., Weiskopf, K., Goldstein, M. J., Scheeren, F., Czerwinski, D., Levy, R. 2012. Stimulation of natural killer cells with a CD137-specific antibody enhances trastuzumab efficacy in xenotransplant models of breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(3), 1066-1075. doi:10.1172/JCI61226
- Lanier, L. L. 2008. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol*, 9(5), 495-502. doi:10.1038/ni1581

- Le Mercier, I., Lines, J. L., & Noelle, R. J. 2015. Beyond CTLA-4 and PD-1, the Generation Z of Negative Checkpoint Regulators. *Front Immunol*, 6, 418. doi:10.3389/fimmu.2015.00418
- Lesokhin, A. M., Callahan, M. K., Postow, M. A., & Wolchok, J. D. 2015. On being less tolerant: enhanced cancer immunosurveillance enabled by targeting checkpoints and agonists of T cell activation. *Science Translational Medicine*, 7(280), 280sr281-280sr281.
- Leung, W. 2014. Infusions of allogeneic natural killer cells as cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 20(13), 3390-3400.
- Lin, W., Voskens, C. J., Zhang, X., Schindler, D. G., Wood, A., Burch, E., Tamada, K. 2008. Fc-dependent expression of CD137 on human NK cells: insights into “agonistic” effects of anti-CD137 monoclonal antibodies. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 112(3), 699-707.
- Liu, C., Yu, S., Kappes, J., Wang, J., Grizzle, W. E., Zinn, K. R., & Zhang, H. G. 2007. Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood*, 109(10), 4336-4342. doi:10.1182/blood-2006-09-046201
- Liu, H., Su, D., Zhang, J., Ge, S., Li, Y., Wang, F., Liang, P. 2017. Improvement of Pharmacokinetic Profile of TRAIL via Trimer-Tag Enhances its Antitumor Activity in vivo. *Sci Rep*, 7(1), 8953. doi:10.1038/s41598-017-09518-1
- Liu, Y., & Zhu, X. 2017. Endoplasmic reticulum-mitochondria tethering in neurodegenerative diseases. *Transl Neurodegener*, 6(1), 21. doi:10.1186/s40035-017-0092-6
- Ljunggren, H.-G., & Kärre, K. 1990. In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today*, 11, 237-244.
- Ljunggren, H.-G., and Malmberg, K.-J. 2007. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nature Reviews Immunology*, 7(5), 329.
- Lomonosova, E., & Chinnadurai, G. 2008. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*, 27 Suppl 1(1), S2-19. doi:10.1038/onc.2009.39
- Lu, R.-M., Hwang, Y.-C., Liu, I.-J., Lee, C.-C., Tsai, H.-Z., Li, H.-J., & Wu, H.-C. 2020. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 1-30.

- Mamessier, E., Sylvain, A., Thibult, M. L., Houvenaeghel, G., Jacquemier, J., Castellano, R., Olive, D. 2011. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest*, 121(9), 3609-3622. doi:10.1172/JCI45816
- Mansh, M. 2011. Ipilimumab and cancer immunotherapy: a new hope for advanced stage melanoma. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 84(4), 381.
- Melero I, Hirschhorn-Cymerman D, Morales-Kastresana A, Sanmamed MF, Wolchok JD. Agonist antibodies to TNFR molecules that costimulate T and NK cells. *Clin Cancer Res*. 2013 Mar 1;19(5):1044-53. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2065. Erratum in: *Clin Cancer Res*. 2013 Apr 1;19(7):1913. PMID: 23460535; PMCID: PMC4397897.
- Min, B., Kim, D., & Feige, M. J. 2021. IL-30(dagger) (IL-27A): a familiar stranger in immunity, inflammation, and cancer. *Exp Mol Med*, 53(5), 823-834. doi:10.1038/s12276-021-00630-x
- Mittendorf, E. A., Philips, A. V., Meric-Bernstam, F., Qiao, N., Wu, Y., Harrington, S., Alatrash, G. 2014. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res*, 2(4), 361-370. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0127
- Morales, A., Eidinger, D., & Bruce, A. W. 1976. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol*, 167(2 Pt 2), 891-893; discussion 893-895. doi:10.1016/s0022-5347(02)80294-4
- Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Cantoni, C., Pende, D., Mingari, M. C., & Moretta, A. 2002. Human NK cells and their receptors. *Microbes and Infection*, 4(15), 1539-1544.
- Mosser, D. D., Caron, A. W., Bourget, L., Denis-Larose, C., & Massie, B. 1997. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 17(9), 5317-5327. doi:10.1128/MCB.17.9.5317
- Mueller, H., Flury, N., Liu, R., Scheidegger, S., & Eppenberger, U. 1996. Tumour necrosis factor and interferon are selectively cytostatic in vitro for hormone-dependent and hormone-independent human breast cancer cells. *Eur J Cancer*, 32A(13), 2312-2318. doi:10.1016/s0959-8049(96)00273-0
- Mutebi, M., Anderson, B. O., Duggan, C., Adebamowo, C., Agarwal, G., Ali, Z., Eniu, A. 2020. Breast cancer treatment: A phased approach to implementation. *Cancer*, 126 Suppl 10, 2365-2378. doi:10.1002/cncr.32910

- Nahta R. Molecular Mechanisms Of Trastuzumab-Based Treatment In HER2-Overexpressing Breast Cancer. 2012. ISRN Oncology.;428062. doi:10.5402/2012/428062.
- O, A., A, G., M, J., H, W. C., Al-Kandari, A., S, C., & M, M. 2011. Is laparoscopic inguinal hernia repair more effective than open repair? J Coll Physicians Surg Pak, 21(5), 291-296. doi:05.2011/JCPSP.291296
- Oiseth, S. J., & Aziz, M. S. 2017. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. Journal of Cancer Metastasis and Treatment, 3, 250-261.
- Özet, G., Baykal, Y., Özet, A., Alanoğlu, G. 1996. Adoptif İmmünoterapi, T. Klin. Tıp Bilimleri, 16(5), 329-332.
- Özmen, V. 2008. Breast cancer in the world and Turkey. J Breast Health, 4(2), 6-12.
- Pahl, J. H. W., Koch, J., Götz, J.-J., Arnold, A., Reusch, U., Gantke, T., Cerwenka, A. 2018. CD16A Activation of NK Cells Promotes NK Cell Proliferation and Memory-Like Cytotoxicity against Cancer Cells. Cancer Immunology Research, 6(5), 517. doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0550
- Parihar, R., Dierksheide, J., Hu, Y., & Carson, W. E. 2002. IL-12 enhances the natural killer cell cytokine response to Ab-coated tumor cells. J Clin Invest, 110(7), 983-992. doi:10.1172/JCI15950
- Parlar, A., Sayitoglu, E. C., Ozkazanc, D., Georgoudaki, A. M., Pamukcu, C., Aras, M., Sutlu, T. 2019. Engineering antigen-specific NK cell lines against the melanoma-associated antigen tyrosinase via TCR gene transfer. Eur J Immunol, 49(8), 1278-1290. doi:10.1002/eji.201948140
- Parsons, M. S., Zipperlen, K., Gallant, M., & Grant, M. 2010. Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL1 licenses CD16-mediated effector functions of natural killer cells. J Leukoc Biol, 88(5), 905-912. doi:10.1189/jlb.1009687
- Pazina, T., Shemesh, A., Brusilovsky, M., Porgador, A., & Campbell, K. S. 2017. Regulation of the Functions of Natural Cytotoxicity Receptors by Interactions with Diverse Ligands and Alterations in Splice Variant Expression. Front Immunol, 8, 369. doi:10.3389/fimmu.2017.00369
- Pegram, H. J., Andrews, D. M., Smyth, M. J., Darcy, P. K., & Kershaw, M. H. 2011. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. Immunol Cell Biol, 89(2), 216-224. doi:10.1038/icb.2010.78

- Ponte, M., Cantoni, C., Biassoni, R., Tradori-Cappai, A., Bentivoglio, G., Vitale, C., Mingari, M. C. 1999. Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(10), 5674-5679. doi:10.1073/pnas.96.10.5674
- Purdy, A. K., & Campbell, K. S. 2009. Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR). *Cancer Biol Ther*, 8(23), 2211-2220. doi:10.4161/cbt.8.23.10455
- Rajagopalan, S., & Long, E. O. 1999. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(7), 1093-1100.
- Rajagopalan, S., & Long, E. O. 2012. KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G. *Front Immunol*, 3, 258. doi:10.3389/fimmu.2012.00258
- Rajagopalan, S., Bryceson, Y. T., Kuppusamy, S. P., Geraghty, D. E., van der Meer, A., Joosten, I., & Long, E. O. 2006. Activation of NK cells by an endocytosed receptor for soluble HLA-G. *PLoS Biol*, 4(1), e9. doi:10.1371/journal.pbio.0040009
- Rajagopalan, S., Fu, J., & Long, E. O. 2001. Cutting edge: induction of IFN- γ production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *The Journal of Immunology*, 167(4), 1877-1881.
- Rapoport, B. L., & Anderson, R. 2019. Realizing the Clinical Potential of Immunogenic Cell Death in Cancer Chemotherapy and Radiotherapy. *Int J Mol Sci*, 20(4), 959. doi:10.3390/ijms20040959
- Roda, J. M., Parihar, R., Lehman, A., Mani, A., Tridandapani, S., & Carson, W. E., 3rd. 2006. Interleukin-21 enhances NK cell activation in response to antibody-coated targets. *J Immunol*, 177(1), 120-129. doi:10.4049/jimmunol.177.1.120
- Rohaan, M. W., Wilgenhof, S., & Haanen, J. B. 2019. Adaptive cellular therapies: the current landscape. *Virchows Archiv*, 474(4), 449-461.
- Romagné, F., André, P., Spee, P., Zahn, S., Anfossi, N., Gauthier, L., Blaser, B. W. 2009. Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 114(13), 2667-2677.

- Ruiz-Ruiz, C., Munoz-Pinedo, C., & Lopez-Rivas, A. 2000. Interferon-gamma treatment elevates caspase-8 expression and sensitizes human breast tumor cells to a death receptor-induced mitochondria-operated apoptotic program. *Cancer Res*, 60(20), 5673-5680.
- Saeed, A., & Awan, S. 2016. Advances in monoclonal antibodies production and cancer therapy. *MOJ Immunol*, 3(4), 00099.
- Sanmamed, M. F., Pastor, F., Rodriguez, A., Perez-Gracia, J. L., Rodriguez-Ruiz, M. E., Jure-Kunkel, M., & Melero, I. 2015. Agonists of co-stimulation in cancer immunotherapy directed against CD137, OX40, GITR, CD27, CD28, and ICOS. Paper presented at the Seminars in oncology.
- Schonfeld, K., Sahm, C., Zhang, C., Naundorf, S., Brendel, C., Odendahl, M., Wels, W. S. 2015. Selective inhibition of tumor growth by clonal NK cells expressing an ErbB2/HER2-specific chimeric antigen receptor. *Mol Ther*, 23(2), 330-338. doi:10.1038/mt.2014.219
- Scott, P. 1991. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol*, 147(9), 3149-3155.
- Selvakumar, A., Steffens, U., & Dupont, B. 1996. NK cell receptor gene of the KIR family with two IG domains but highest homology to KIR receptors with three IG domains. *Tissue Antigens*, 48(4 Pt 1), 285-294. doi:10.1111/j.1399-0039.1996.tb02647.x
- Shah, N., & Shpall, E. J. 2009. NK antibody therapy: KIR-active intent. *Blood*, 114(13), 2567-2568. doi:10.1182/blood-2009-07-230904
- Shirkhoda, M., Memari, F., Dana, H., Mahmoodzadeh, H., Samarghandi, N., Gharagozlou, E., Nia, E. 2018. Immunotherapy a New Hope for Cancer Treatment: A Review. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 21(3), 135-150.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. 2019. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*, 69(1), 7-34. doi:10.3322/caac.21551
- Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Pegram, M. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine*, 344(11), 783-792.
- Somanchi, S. S., McCulley, K. J., Somanchi, A., Chan, L. L., Lee, D. A. 2015. A novel method for assessment of natural killer cell cytotoxicity using image cytometry. *PLoS One*, 10(10), e0141074.

- Söker, S. 2005. Dendritik Hücreler. Dicle Tıp Dergisi, 3, 158-160.
- Stang, M. T., Armstrong, M. J., Watson, G. A., Sung, K. Y., Liu, Y., Ren, B., Yim, J. H. 2007. Interferon regulatory factor-1-induced apoptosis mediated by a ligand-independent fas-associated death domain pathway in breast cancer cells. *Oncogene*, 26(44), 6420-6430. doi:10.1038/sj.onc.1210470
- Stojanovic, A., Fiegler, N., Brunner-Weinzierl, M., Cerwenka, A. 2014. CTLA-4 is expressed by activated mouse NK cells and inhibits NK cell IFN- γ production in response to mature dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 192(9), 4184-4191.
- Strober, W. 1997. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 21(1), A. 3B. 1-A. 3B. 2.
- Strohl, W. R., & Strohl, L. M. 2012. Therapeutic antibody engineering: current and future advances driving the strongest growth area in the pharmaceutical industry: Elsevier.
- Sun, J. C., & Lanier, L. L. 2011. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells. *Nat Rev Immunol*, 11(10), 645-657. doi:10.1038/nri3044
- Sutlu, T., & Alici, E. 2009. Natural killer cell- based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *Journal of Internal Medicine*, 266(2), 154-181.
- Tanaka, T., Bai, Z., Srinoulprasert, Y., Yang, B. G., Hayasaka, H., & Miyasaka, M. 2005. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Cancer Sci*, 96(6), 317-322. doi:10.1111/j.1349-7006.2005.00059.x
- Tonn, T., Schwabe, D., Klingemann, H. G., Becker, S., Esser, R., Koehl, U., Bug, G. 2013. Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy*, 15(12), 1563-1570.
- Turaj, A. H., Cox, K. L., Penfold, C. A., French, R. R., Mockridge, C. I., Willoughby, J. E., Glennie, M. J. 2018. Augmentation of CD134 (OX40)-dependent NK anti-tumour activity is dependent on antibody cross-linking. *Scientific reports*, 8(1), 1-11.
- Valentin, M. D., da Silva, S. D., Privat, M., Alaoui-Jamali, M., & Bignon, Y. J. 2012. Molecular insights on basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 134(1), 21-30. doi:10.1007/s10549-011-1934-z

- Valiante, N. M., Uhrberg, M., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Arnett, K. L., D'Andrea, A., Parham, P. 1997. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity*, 7(6), 739-751. doi:10.1016/s1074-7613(00)80393-3
- Vilches, C., & Parham, P. 2002. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annual Review of Immunology*, 20, 217-251. doi:10.1146/annurev.immunol.20.092501.134942
- von Strandmann, E. P., Hansen, H. P., Reiners, K. S., Schnell, R., Borchmann, P., Merkert, S., Purr, I. 2006. A novel bispecific protein (ULBP2-BB4) targeting the NKG2D receptor on natural killer (NK) cells and CD138 activates NK cells and has potent antitumor activity against human multiple myeloma in vitro and in vivo. *Blood*, 107(5), 1955-1962.
- Wadler, S., & Schwartz, E. L. 1990. Antineoplastic activity of the combination of interferon and cytotoxic agents against experimental and human malignancies: a review. *Cancer Res*, 50(12), 3473-3486.
- Walle, L. V., Lamkanfi, M., & Vandenabeele, P. 2008. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death & Differentiation*, 15(3), 453-460.
- Wang, J., Sun, Z. M., Cao, L. L., & Li, Q. 2012. [Biological characteristics of cord blood natural killer cells induced and amplified with IL-2 and IL-15]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 20(3), 731-735.
- Warren, H. S., Campbell, A. J., Waldron, J. C., & Lanier, L. L. 2001. Biphasic response of NK cells expressing both activating and inhibitory killer Ig-like receptors. *International Immunology*, 13(8), 1043-1052.
- Wayteck, L., Breckpot, K., Demeester, J., De Smedt, S. C., & Raemdonck, K. 2014. A personalized view on cancer immunotherapy. *Cancer Lett*, 352(1), 113-125. doi:10.1016/j.canlet.2013.09.016
- Westin, J. R., Chu, F., Zhang, M., Fayad, L. E., Kwak, L. W., Fowler, N., Neelapu, S. S. (2014). Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 15(1), 69-77. doi:10.1016/S1470-2045(13)70551-5

- Yang, R. K., Kalogriopoulos, N. A., Rakhmievich, A. L., Ranheim, E. A., Seo, S., Kim, K., Sondel, P. M. 2013. Intratumoral treatment of smaller mouse neuroblastoma tumors with a recombinant protein consisting of IL-2 linked to the hu14.18 antibody increases intratumoral CD8⁺ T and NK cells and improves survival. *Cancer Immunol Immunother*, 62(8), 1303-1313. doi:10.1007/s00262-013-1430-x
- Yılmaz, M. 2019. Solid ve hematolojik neoplazilerde doğal öldürücü (nk) hücre aktivitesinin değerlendirilmesi. Namık Kemal Üniversitesi,
- Zaman, S., Wang, R., & Gandhi, V. 2014. Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma*, 55(9), 1980-1992. doi:10.3109/10428194.2013.855307
- Zhang, S., Liu, N., Ma, M., Huang, H., Handley, M., Bai, X., & Shan, F. 2021. Methionine enkephalin (MENK) suppresses lung cancer by regulating the Bcl-2/Bax/caspase-3 signaling pathway and enhancing natural killer cell-driven tumor immunity. *Int Immunopharmacol*, 98, 107837. doi:10.1016/j.intimp.2021.107837
- Zheng, G., Guo, Z., Li, W., Xi, W., Zuo, B., Zhang, R., Jia, L. 2021. Interaction between HLA-G and NK cell receptor KIR2DL4 orchestrates HER2-positive breast cancer resistance to trastuzumab. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 1-15.
- Zhou, J. 2014. Advances and prospects in cancer immunotherapy. *New Journal of Science*, 2014.
- Zingoni, A., Sornasse, T., Cocks, B. G., Tanaka, Y., Santoni, A., & Lanier, L. L. 2005. NK cell regulation of T cell-mediated responses. *Mol Immunol*, 42(4), 451-454. doi:10.1016/j.molimm.2004.07.025
- Zitvogel, L., Rusakiewicz, S., Routy, B., Ayyoub, M., & Kroemer, G. 2016. Immunological off-target effects of imatinib. *Nat Rev Clin Oncol*, 13(7), 431-446. doi:10.1038/nrclinonc.2016.41