

2023

DOKTORA

TIBBİ BİYOLOJİ

Ayfer KARLITEPE



T.C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ

DOKTORA PROGRAMI

**Genotoksik Stres İndüklü Otofaji İlişkili Sekretom'un
Doğal Öldürücü Hücre Aracılı Antitümör İmmün Yanıt
Üzerine Etkisinin Araştırılması**

AYFER KARLITEPE

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehtap KILIÇ EREN

AYDIN-2023

T.C
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

**Genotoksik Stres İndüklü Otofaji İlişkili Sekretom'un Doğal
Öldürücü Hücre Aracılı Antitümör İmmün Yanıt Üzerine
Etkisinin Araştırılması**

AYFER KARLITEPE

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehtap KILIÇ EREN

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-21017 proje numarası ile desteklenmiştir. Tez sahibi doktora süresince YÖK 100/2000 moleküler onkoloji alanından burs almıştır.

AYDIN-2023

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Ayfer KARLITEPE tarafından hazırlanan “Genotoksik Stres İndüklü Otofaji İlişkili Sekretom’un Doğal Öldürücü Hücre Aracılı Antitümör İmmün Yanıt Üzerine Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26.07.2023

Prof. Dr. Mehtap KILIÇ EREN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Prof. Dr. Levent KARAGENÇ	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Prof. Dr. Serdar KOCA	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Prof. Dr. L. Didem KOZACI	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi
Prof. Dr. Yasemin AKÇAY	Ege Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Doktora süresi boyunca bilimsel, akademik ve manevi destekleri ile hep yanımda olan, bilgi ve tecrübeleri ile her zaman yoluma ışık tutan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehtap KILIÇ EREN'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tüm yoğunluklarına rağmen tezimi değerlendiren, çok değerli tavsiyeler veren ve tez jüriliğimi kabul ederek beni onurlandıran Sayın hocalarım Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI, Prof. Dr. Yasemin AKÇAY, Prof. Dr. Levent KARAGENÇ ve Prof. Dr. Serdar KOCA hocalarıma teşekkür ediyorum.

Tezimin önemli bir kısmını oluşturan NK hücrelerini temin etmemi sağlayan ve tüm laboratuvar imkanlarını sunarak tezime çok büyük katkıları olan Sayın Dr. Tolga SÜTLÜ'ye ve Boğaziçi Üniversitesi'nde yapmış olduğum deneylerde bana önemli katkıları olan doktora öğrencisi sevgili Elif ÇELİK'e çok teşekkür ederim. Tezimin önemli bir kısmını oluşturan NK hücreleri ile ilgili değerli fikirlerini benimle paylaşan Sayın Dr. Adil Doğanay DURU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Otofajik sekretom içeriğinin LC-MS/MS analizi ile aydınlatılmasında emeği geçen Sayın Prof. Dr. Murat KASAP'a ve LC-MS/MS verilerinin biyoinformatik analizlerini yaparak tezime önemli katkıları olan Sayın Doç. Dr. Tuğba SÜZEK'e çok teşekkür ederim.

Tez süresi boyunca desteklerini hep hissettiğim sevgili laboratuvar arkadaşlarımlarım Ceylan Ak, Nazlıcan Kaygusuz, Hatice Pilevneli, Fevziye Özdemir Şimşek, Akıncan Koluman ve Hayrettin Çanakçı'ya destekleri için teşekkür ederim. Ayrıca çalışmam sırasında laboratuvarlarından faydalandığım Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezi Müdürlüğü'ne ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatımda olduğu gibi tez süresince de beni her zaman destekleyen varlıkları ve sevgileri ile beni şanslı kılan sevgili aileme teşekkür ederim.

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi TPF-21017 nolu proje, TÜBİTAK 1002B 122Z799 no'lu proje, TÜBİTAK 1001 119S135 no'lu projeler ile tezime sağladıkları destekler için TÜBİTAK ve BAP kurumlarına, YÖK 100/2000 Moleküler Onkoloji alanındaki bursiyerliğim ile de doktora sürecime olan katkıları ile de Yüksek Öğretim Kurumu'na destekleri için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Otofaji.....	3
2.1.1. Otofajinin Sınıflandırılması.....	4
2.1.1.1. Makrotofaji.....	4
2.1.1.2. Mikrotofaji.....	5
2.1.1.3. Şaperon Aracılı Otofaji (CMA).....	5
2.1.2. Otofajinin Moleküler Mekanizması.....	6
2.1.2.1. İnisiyasyon.....	6
2.1.2.2. Nükleasyon.....	7
2.1.2.3. Fagofor Uzaması.....	8
2.1.2.4. Otofagozomun Lizozom ile Birleşmesi.....	9
2.2. Genotoksik Stres İndüklü Otofaji.....	10
2.3. Otofaji Kanseri İlişkisi.....	12
2.3.1. Tümörögenезin Baskılanmasında Otofajinin Rolü.....	13
2.3.2. Tümörögenезin Gelişiminde Otofajinin Rolü.....	14
2.3.3. Kanserde Otofajinin Hedeflenmesi.....	16
2.4. Otofajik Sekretom.....	17
2.5. Otofaji ve İmmün sistem İlişkisi.....	19
2.6. Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer: NK).....	22
2.6.1. NK Hücre Biyolojisi.....	22
2.6.2. NK Hücre Aktivatör ve İnhibitör Reseptörleri.....	23
NK hücre aktivatör, inhibitör ve ko-reseptörleri.....	24
2.6.3. NK Hücre Aracılı Hücresel Sitotoksisite.....	24
2.6.4. NK Hücrelerinde Efektör İmmün Yanıt.....	26

2.6.5. NK Hücre Kaynakları	27
2.6.6. NK Hücrelerinde Genetik Modifikasyon ve Kanser İmmünoterapisinde Kullanımı	28
2.7. Otofajinin Doğal Öldürücü Hücreler (NK) Üzerindeki Etkisi	30
2.8. Çalışmanın Amacı	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Gereç.....	35
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Dizileri	35
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar.....	35
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Antikorlar.....	36
3.1.5. Kullanılan Kitler	37
3.1.6. Kullanılan Cihazlar ve Aletler	37
3.2. Yöntem	38
3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	38
3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması	39
3.2.3. Hücrelerin Dondurulup Saklanması	39
3.2.4. Hücrelerin Çözdürülüp Kullanılması.....	39
3.2.5. Hücrelerin Sayım Yöntemi.....	40
3.2.6. MCF-7 Hücre Hattında Otofaji İndüksiyonu ve İnhibisyonu.....	40
3.2.6.1. MCF-7 Hücrelerinde Genotoksik Stres İndüksiyonu ve Modülasyonu Sonrası Otofaji Belirteçlerinin Western Blot Analizi ile Belirlenmesi.....	41
3.2.6.1.1. Protein İzolasyonu	41
3.2.6.1.2. Protein Miktar Tayini	42
3.2.6.1.3. Western Blot analizi	42
3.2.6.2. Annexin V/7AAD apoptozis testi.....	46
3.2.6.3. İmmünfluoresan Boyama ve Konfokal Mikroskopi.....	46
3.2.6.4. DCFDA ROS Analizi	47
3.2.7.1. Koşullandırılmış Ortam (Conditioned medium: CM) toplanması.....	47
3.2.7.2. LC-MS/MS Analizi	48
3.2.7.2.1. Protein Özütlelerinin Hazırlanması	48
3.2.7.2.2. Proteinlerin Çözelti İçi Kesimi.....	48
3.2.7.2.3. Nano-sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi (nLC-MS/MS) Analizi	49
3.2.7.2.4. nLC-MS/MS Veri Analizi	50
3.2.7.2.5. Biyoinformatik Analizler.....	50
3.2.7.2.6. LC-MS/MS Sonuçlarının Analizi.....	51

3.2.7.3. Sitokin <i>Array</i> Analizi	51
3.2.7.4. ELISA Analizleri.....	51
3.2.8. Kemoterapi İndüklü Otofajinin, NK Hücrelerinin Anti-tümör İmmün Cevabına Etkisi	52
3.2.8.1. NK-92'nin Tümör Hücrelerini Hedefleme Kapasitesinin Belirlenmesi.....	52
3.2.8.1.1. Degranülasyon Analizi (<i>Degranulation assay</i>).....	52
3.2.8.1.2. DNAM1 Ekspresyonunun Flow Sitometri ile Analizi	54
3.2.9. Grafiklerin Hazırlanışı ve İstatistiksel Analizlerin Belirlenmesi	55
4. BULGULAR	56
4.1. Genotoksik Stres Aracılı Otofaji İndüksiyonu ve Modülasyonu	56
4.1.1. MCF-7 Hücrelerinde Genotoksik Stres İndüksiyonu Sonrası Otofaji Belirteçlerindeki (LC3I/II ve p62) Değişim.....	56
4.1.2. MCF-7 Hücrelerinde Genotoksik Stres İndüklü Otofajide LC3 Punkta Oluşumunun Belirlenmesi.....	57
4.1.3. MCF-7 Hücrelerinde Genotoksik Strese Bağlı Hücre Ölümünün Belirlenmesi	58
4.1.4. MCF-7 Hücrelerinde Genotoksik Stres İndüklü Otofajinin Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Düzeyine Etkileri	59
4.2. Genotoksik Stres Aracılı Otofaji İndüksiyonu ve İnhibisyonu Sonrası Otofajik Sekretom Karakterizasyonu	61
4.2.1. %1 FBS Ortamının Hücre Ölümüne Etkileri.....	62
4.2.2. MCF-7 Hücrelerinde Genotoksik Stres İndüklü Otofajik Sekretom İçeriğinin LC-MS/MS ile Belirlenmesi	63
4.2.2.1. LC-MS/MS Verilerinin Biyoinformatik Analiz Sonuçları.....	66
4.2.3. Genotoksik Stes İndüklü Otofajik Sekretomda Sitokin/Kemokin ve Büyüme Faktörlerinin Belirlenmesi.....	71
4.2.3.1. Otofajik Sekretomda Öne Çıkan Sitokin/Kemokin ve Büyüme Faktörlerinin ELISA ile Validasyonu.....	80
4.3. MCF-7 Hücrelerinde Genotoksik Stres Aracılı Otofaji ve Otofajik Sekretomun NK Hücrelerinin Anti-tümör İmmün Cevabına Etkileri	81
4.3.1. MCF-7 Hücrelerinde Genotoksik Stres'in CD155 Ligandına Etkisi.....	81
4.3.2. Otofajik Sekretomla Muamele Edilen DNAM1-NK92 ve Kontrol-NK92 Hücrelerinin MCF-7 Hücrelerini Hedefleme Kapasitesinin Analizi	82
4.3.3. Otofajik Sekretomla Muamele Edilen DNAM1-NK92 ve Kontrol-NK92 Hücrelerinde DNAM1 İfadesinin Flow Sitometri ile Analizi	91
TARTIŞMA.....	93

5.1. MCF-7 Hücrelerinde Kemoterapi Aracılı Otofaji İndüksiyonu	94
5.2. MCF-7 Hücrelerinde Kemoterapi İndüklü Otofajik Sekretom.....	95
5.3. Kemoterapi İndüklü Otofaji ve Otofajik Sekretomun DNAM1-NK92 Hücreleri Üzerindeki Etkisi	99
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	103
KAYNAKLAR.....	105
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	120
ÖZ GEÇMİŞ.....	121

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μM	: Mikro molar
3-MA	: 3 Metiladenin
AMPK	: 5'-adenosine monophosphate (AMP)- ile aktive edilmiş protein kinaz
ATG	: Otofaji ile ilişki protein ailesi
BafA1	: Bafilomisin
CAR	: Kimerik Antijen Reseptörü
CMA	: Şaperon Aracılı Otofaji
Cq	: Klorokin
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DDR	: DNA Hasar Yanıtı
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Geçiş
Eto	: Etoposit
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat-dehidrogenaz
GRZ B	: Granzim B
Hsp	: Isı Şoku Proteini
mTOR	: Rapamisinin memelilerdeki hedefi (Mammalian target of rapamycin)
MVB	: Multiveziküler cisimcik
PAS	: Peri Vakuolar Alan
PI3K	: Fosfotidilinositol 3 Kinaz
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Wt	: Wild type: Yabanıl tip

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Otofajinin Moleküler Mekanizması.....	10
Şekil 2. Otofaji ve Kanser.....	16
Şekil 3. Otofajik Sekretom ve İmmünite	22
Şekil 4. NK Hücreleri	26
Şekil 5. Otofaji ve NK Hücreleri	33
Şekil 6. Kontrol-NK92, DNAM1-NK92ve NKG2D-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu yapılan MCF-7 hücrelerinden elde edilen sekretomlar ile muamele edilmesinin ardından otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu yapılan MCF-7 hücreleri ile kökültüre edilmesi	54
Şekil 7. MCF-7 hücrelerinde LC3I/II ve p62ekspresyonlarının WB analizi.....	57
Şekil 8. MCF-7 hücrelerinde genotoksik stres aracılı otofaji indüksiyonunun ve klorokin ile otofaji inhibisyonunun LC3 punkta formasyonuna etkisinin immün boyama analizi ile gösterilmesi (Dapi: Nukleus, FITC: LC3, Lysobrite: Lizozom).....	58
Şekil 9. MCF-7 hücrelerinde genotoksik stres indüklü otofaji varlığında total apoptoz profilleri (A) ve total apoptoz grafiği (B) (24 sa) ($p \leq 0.05$) (K vs Cq, Eto, Eto+Cq, Eto+Cq vs Cq, Eto).....	59
Şekil 10. MCF-7 hücrelerinin DCFDA ile ROS analizi histogram (A) ve grafiği (B) (24 sa), (H_2O_2 vs Eto, H_2O_2 vs Eto+Cq, Eto vs Cq) ($p \leq 0.05$).....	60
Şekil 11. MCF-7 hücrelerinde %1 ve %10 FBS içeren ortamlarda genotoksik stres aracılı otofaji indüksiyonunun ve klorokin ile otofaji inhibisyonunun WB analizi ile gösterilmesi.....	61
Şekil 12. MCF-7 hücrelerinde %1 ve %10 FBS varlığında apoptoz profilleri (24 sa)...	63
Şekil 13. MCF-7 hücrelerinde %1 ve %10 FBS varlığındaki total apoptoz grafiği (24 sa) ($p \leq 0.05$) (%1 FBS K vs %10 FBS K, %1 FBS Cq vs %10 FBS Cq, %1 FBS Eto vs %10 FBS Eto, %1 FBS Eto+Cq vs %10 FBS Eto+Cq).....	63
Şekil 14. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve inhibisyonsonucu otofajik sekretom içeriğinde LC-MS/MS analizi ile belirlenen metabolik enzimler (sonuçlar kontrole göre normalize edilmiştir)	64

Şekil 15. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve modülasyonu ile oluşan otofajik sekretom içeriğinde LC-MS/MS analizi ile belirlenen şaperon proteinleri ve tümör antijenleri (sonuçlar kontrole göre normalize edilmiştir)	65
Şekil 16. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve modülasyonu ile oluşan otofajik sekretom içeriğinde LC-MS/MS analizi ile belirlenen metastaz ilişkili proteinler (sonuçlar kontrole göre normalize edilmiştir)	66
Şekil 17. MCF-7 hücrelerinin Eto ile Cq gruplarının karşılaştırılması ile proteinlerin zenginleştirme skoru 2 olan kümeler halinde Gen Ontolojisi analizine göre gruplandırılması (dotplot) (X eksen: p değeri, Y eksen: ontoloji kategorisi).....	67
Şekil 18. MCF-7 hücrelerinin Eto+Cq ile Cq gruplarının karşılaştırılması ile proteinlerin zenginleştirme skoru 2 olan kümeler halinde Gen Ontolojisi analizine göre gruplandırılması (dotplot) (X eksen: p değeri, Y eksen: ontoloji kategorisi).....	68
Şekil 19. MCF-7 hücrelerinin Eto ile Cq gruplarının karşılaştırılması ile proteinlerin zenginleştirme skoru 2 olan kümeler halinde Gen Ontolojisi analizine göre gruplandırılması (cnetplot).....	69
Şekil 20. MCF-7 hücrelerinin Eto+Cq ile Cq gruplarının karşılaştırılması ile proteinlerin zenginleştirme skoru 2 olan kümeler halinde Gen Ontolojisi analizine göre gruplandırılması (cnetplot).....	70
Şekil 21. MCF-7 hücrelerinin Eto ve Cq gruplarının karşılaştırılması ile proteinlerin zenginleştirme skoru 2 olan kümeler halinde Kegg analizine göre gruplandırılması	71
Şekil 22. MCF-7 hücrelerinde kontrol, Cq, Eto, Eto+Cq gruplarına ait sitokin array membranının ECL görüntüleme sonucu ve grafiksel gösterimi	73
Şekil 23. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu ile oluşan otofajik sekretomda bulunan sitokin/kemokin ve büyüme faktörlerinin grafiği ($p \leq 0.05$).....	74
Şekil 24. MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuna ait sitokin array membranının ECL görüntüleme sonucu ve grafiksel gösterimi.....	74
Şekil 25. MCF-7 hücrelerinde Cq grubuna ait sitokin array membranının ECL ile görüntüleme sonucu ve grafiği	75
Şekil 26. MCF-7 hücrelerinde Eto grubuna ait sitokin array membranının ECL ile görüntüleme sonucu ve grafiği	76
Şekil 27. MCF-7 hücrelerinde Eto grubuna ait sitokin array membranının ECL ile görüntüleme sonucu ve grafiği	76

Şekil 28. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu ile oluşan otofajik sekretomun sitokin array sonuçlarına göre büyüme faktörleri Angiogenin ve TGFβ1 grafikleri (K vs Cq, Eto, Eto+Cq, Eto vs Cq, Eto+Cq vs Cq, Eto+Cq vs Eto) ($p \leq 0.05$).	78
Şekil 29. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu ile oluşan otofajik sekretomun sitokin array sonuçlarına göre kemokin CCL5 ve CXCL8 grafikleri (K vs Cq ve Eto, Eto+Cq vs Cq, Eto+Cq vs Eto) ($p \leq 0.05$).	79
Şekil 30. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve modülasyonu ile oluşan otofajik sekretomun sitokin array sonuçlarına göre sitokin IL1β ve IL10 grafikleri (IL1β: K, Eto, Eto+Cq vs Cq, IL10: K vs Cq, Eto, Eto+Cq ve Eto+Cq vs Eto) ($p \leq 0.05$).	80
Şekil 31. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve modülasyonu ile oluşan otofajik sekretomun ELISA sonuçlarına göre CCL5, IL10 ve TGFβ grafikleri (CCL5: K vs Cq, Eto+Cq, Eto ve Eto+Cq vs Cq ve Eto, TGFβ: K vs Cq, Eto, Eto+Cq, Eto+Cq vs Cq ve Eto, IL10: K vs Cq, Eto, Eto+Cq, Eto+Cq vs Cq ve Eto) ($p \leq 0.05$).	81
Şekil 32. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve inhibisyon CD155 ligandına etkisinin WB analizi ile gösterilmesi.....	82
Şekil 33. wt-NK92 ve IG2pro-NK92 hücrelerinin MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasitesinin degranülasyon analizi sonuçlarının grafiği ($p \leq 0.05$).	83
Şekil 34. DNAM1-NK92 ve kontrol-NK92 hücrelerinin genotoksik stres aracılı otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasitesinin degranülasyon analizi sonuçlarının grafiği ($p \leq 0.05$).	85
Şekil 35. Otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu sonucu oluşan otofajik sekretomlar ile muamele edilen kontrol-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve modülasyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasitesinin degranülasyon analizi sonuçlarının grafiği ($p \leq 0.05$).	86
Şekil 36. (A): K562pozitif kontrol, (B): MCF-7 kontrol, (C): MCF-7 Cq, (D): MCF-7 Eto, (E): MCF-7 Eto+Cq gruplarına karşı Kontrol NK92 (K, Cq, Eto, Eto+Cq) hücrelerinin degranülasyon grafikleri ($p \leq 0.05$).	87
Şekil 37. Otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu sonucu oluşan otofajik sekretomlar ile muamele edilen DNAM1-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme yüzdeleri ($p \leq 0.05$).	88
Şekil 38. (A): K562pozitif kontrol, (B): MCF-7 kontrol, (C): MCF-7 Cq, (D): MCF-7 Eto, (E): MCF-7 Eto+Cq gruplarına karşı DNAM1 NK92 (K, Cq, Eto, Eto+Cq) hücrelerinin degranülasyon grafikleri ($p \leq 0.05$).	89

Şekil 39. Otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu sonucu oluşan otofajik sekretomlar ile muamele edilen NKG2D-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme yüzdeleri ($p \leq 0.05$)..... 91

Şekil 40. (A): K562pozitif kontrol, (B): MCF-7 kontrol, (C): MCF-7 Cq, (D): MCF-7 Eto, (E): MCF-7 Eto+Cq gruplarına karşı NKG2D NK92 (K, Cq, Eto, Eto+Cq) hücrelerinin degranülasyon grafikleri ($p \leq 0.05$)..... 91

Şekil 41. MCF-7 hücrelerinden otofaji indüksiyonu ve modülasyonu sonucu oluşan otofajik sekretomlar ile muamele edilen DNAM1-NK92 ve IG2pro-NK92 hücrelerinde DNAM1 ifadesinin MFI değerinin flow sitometri analizi ile gösterilmesi ($p \leq 0.05$) (K vs Cq, Eto, Eto+Cq, Eto+Cq vs Cq ve Eto)..... 92

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmalarda kullanılan besiyerleri ve kimyasalların listesi.....	35
Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan antikorların listesi.....	36
Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan kitlerin listesi.....	37
Tablo 4. Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve aletlerin listesi.....	37
Tablo 5. Paketleyici ve ayırıcı jelin içeriği ve miktarları	43
Tablo 6. Kullanılan primer antikorlar ve dilüsyonları.....	44
Tablo 7. Kullanılan sekonder antikorlar ve dilüsyonları.....	45
Tablo 8. Kontrol grubunda bulunan sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin miktarları (pg/ml)	74
Tablo 9. Cq grubunda bulunan sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin miktarları (pg/ml)	75
Tablo 10. Eto grubunda bulunan sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin miktarları (pg/ml)	76
Tablo 11. Eto+Cq grubunda bulunan sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin miktarları (pg/ml)	76
Tablo 12. Otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu sonucu oluşan koşullandırılmış ortamlar ile muamele edilen kontrol-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve modülasyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme yüzdeleri.....	85
Tablo 13. Otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu sonucu oluşan koşullandırılmış ortamlar ile muamele edilen DNAM1-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve modülasyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme yüzdeleri.....	88
Tablo 14. Otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu sonucu oluşan koşullandırılmış ortamlar ile muamele edilen NKG2D-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve modülasyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme yüzdeleri.....	90

ÖZET

Genotoksik Stres İndüklü Otofaji İlişkili Sekretom'un Doğal Öldürücü Hücre Aracılı Antitümör İmmün Yanıt Üzerine Etkisinin Araştırılması

Karlıtepe A. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2023.

Amaç: Bu tezin amacı, kemoterapi ajanı etoposid ile indüklenen genotoksik stres aracılı otofajiye bağlı oluşan otofajik sekretomun karakterize edilmesi ve bu sekretom içeriğinin MCF-7 meme kanseri hücrelerine yönelik NK aracılı immün cevabı etkileyip etkilemediğinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada MCF-7, kontrol-NK92 ve DNAM1-NK92 hücre dizileri kullanılmıştır. Etoposid aracılı otofaji indüksiyonu, LC3I/II ve p62 western blot ve immünfluoresan analizleriyle ölçülmüştür. Hücrelerde apoptoz oranı Annexin V/7AAD analizi ile ölçülmüştür. Otofajik sekretom karakterizasyonu LC/MS-MS ve sitokin *array* analizleri ile yapılmıştır. Sitokinlerin validasyonu da ELISA analizi ile yapılmıştır. Kontrol-NK92 ve DNAM1-NK92 hücrelerinin MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasitesi degranülasyon analizi ile belirlenmiştir.

Bulgular: 24 saat süre ile 150 µM Etoposid ile MCF-7 hücrelerinde otofajinin indüklendiği LC3I/II ve p62 gibi otofaji belirteçleri ile gösterilmiştir ve kemoterapi indüklü otofajinin apoptoza neden olmadığı tespit edilmiştir. LC/MS-MS sonuçları ile kemoterapi indüklü otofaji sırasında metabolik enzimlerin, tümör antijenlerinin, şaperonlar ve metastazla ilişkili proteinlerin salgılandığı tespit edilmiştir. Ayrıca, sitokin *array* analizi ile de sekretom içerisinde 41 farklı sitokin/kemokin ve büyüme faktörü tespit edilmiştir ve CCL5, TGFβ ve IL10 gibi bazı sitokin, kemokin ve büyüme faktörü için ELISA analizleri ile validasyon yapılmıştır. Son olarak, kontrol NK-92 ve DNAM1-NK92 hücrelerinin otofajik sekretomlarla muamele edilmesinin ardından, MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasitesinde gruplar arasında farklılıklar olduğu görülmüştür.

Sonuç: Tez kapsamında ilk kez kemoterapi ile indülenen otofajik sekretomun içeriği tümüye karakterize edilmiştir. *In vitro* şartlarda, kemoterapiye bağlı otofaji indüksiyonunun NK hücre efektör fonksiyonlarını uyarıp uyarmadığını ve antikanser aktivitesine katkıda bulunan ilaç

kaynaklı stres türlerini nasıl algıladığını ve bunlara nasıl tepki verdiğini belirlemede önemli veriler elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Genotoksik stres, Otofaji, Otofajik sekretom, NK92 hücreleri.

ABSTRACT

Investigation of the Effect of Genotoxic Stress-Induced Autophagy-Associated Secretome on Natural Killer Cell Mediated Antitumor Immune Response

Karltepe A. Aydın Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Medical Biology Program, Doctorate Thesis, Aydın, 2023.

Objective: The aim of this project was to characterize the genotoxic stress induced autophagic secretome and to investigate whether autophagic secretome affects the NK-mediated immune response to MCF-7 breast cancer cells.

Material and Methods: Etoposide was used to induce genotoxic stress mediated autophagy in MCF-7 cells. Analysis of autophagy induction was tested by using autophagy markers including LC3I/II and p62 degradation by western blot and immunofluorescence. Annexin V/7AAD analysis used to measure the rate of apoptosis in MCF-7 cells. LC/MS-MS analysis and cytokine array analyses were used to characterize the chemotherapy-induced autophagic secretome content. Finally, how the chemotherapy-induced autophagic secretome affects the capacity of DNAM1-NK-92 cells to target MCF-7 cells was determined by degranulation analysis.

Results: Autophagy markers such as LC3I/II and p62 showed that autophagy was induced in MCF-7 cells by 150 μ M Etoposide for 24 hours and it was determined that chemotherapy-induced autophagy did not cause apoptosis. LC/MS-MS results showed that metabolic enzymes, tumor antigens, chaperones and metastasis-related proteins were secreted during chemotherapy-induced autophagy. In addition, 41 different cytokines/chemokines and growth factors were detected in the secretome by cytokine array analysis and validated by ELISA analysis for some cytokines, chemokines and growth factors such as CCL5, TGF β and IL10. Finally, after treatment of control NK-92 and genetically modified DNAM1-NK92 cells with autophagic secretomes, differences in the capacity to target MCF-7 cells were observed between the groups.

Conclusion: In this thesis, for the first time, the contents of the chemotherapy-induced autophagic secretome were fully characterized. Under in vitro conditions, important data were

obtained to determine whether chemotherapy-induced autophagy induction stimulates NK cell effector functions and how they detect and respond to the types of drug-induced stresses that contribute to anticancer activity.

Keywords: Genotoxic stress, Autophagy, Autophagic secretome, NK92 cells.

1. GİRİŞ

Makrotofaji (otofaji), substratların otofagozom olarak adlandırılan sitozolik çift membranlı veziküller içinde tutulduğu bir süreçtir (Feng ve diğerleri, 2014). Otofaji birçok stres faktörü tarafından uyarılabilmektedir. Yapılan çalışmalarda bu faktörlere besin azlığı, metabolik stres, endoplazmik retikulum stresi ve anti kanser terapiler tarafından da indüklenebilen genotoksik stres örnek gösterilmiştir (Eren, 2020).

Otofajinin kanser hücresi proliferasyonunu veya tümörigenezi inhibe ettiği veya teşvik ettiği yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. Bu durum otofajinin tümörün farklı evrelerinde farklı rolleri olduğuna işaret etmektedir. (White, 2015). Özellikle ilerlemiş tümörlerde otofajinin tümör teşvikini sağlamanın ortaya çıkışıyla otofaji son yıllarda kanser tedavisi için umut verici bir hedef haline gelmiştir. Kinolin ailesinin üyesi olan klorokin (Cq), otofagozomların ve lizozomların füzyonunu bloke ederek otofaji inhibitörü işlevi gören aynı zamanda klinik olarak mevcut bir antimalaryal ajandır. Bu nedenle otofaji inhibisyonu için pre-klinik ve klinik çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Liu ve diğerleri, 2020).

Genotoksik ajanlar; DNA replikasyon hataları, spontan ve UV kaynaklı mutasyonlar, toksik moleküller (kemoterapötükler vb.) ve reaktif oksijen türleri gibi çok çeşitli faktörleri içerir (Torii ve diğerleri 2020). Otofaji; metabolik stres, endoplazmik retikulum stresi ve anti kanser terapiler tarafından da indüklenebilmektedir (Eren, 2020). Yapılan çalışmalar kemoterapi ajanlarının otofajiyi indüklemesinin yanı sıra kemoterapi direncine de neden olduğunu göstermektedir. 5- fluorourasil (5-FU), dosetaksel (DTX) ve paklitaksel (PTX) dahil olmak üzere yaygın olarak kullanılan bazı kemoterapötik ajanlar, tümör hücrelerinde otofajiyi indükleyebilmektedir (Zamame ve diğerleri, 2021).

Salgısal otofaji yada otofajik sekretom terimi, proteinlerin otofagozom içinde doğrudan plazma membranına multiveziküler cisimcikler (MVB) veya hücre dışı salgınları için salgı lizozomlarına taşınarak salgılanmasında rol aldığı süreci tanımlamak için kullanılmaktadır (Cotzomi-Ortega ve diğerleri, 2018). Otofajiye bağlı salgılar pro/anti enflamatuar sitokinlerden kemokinlere, büyüme faktörlerine vb. kadar çok sayıda hücre dışı faktörler içermektedirler (New ve Thomas, 2019).

Otofaji aktivasyonu, bağışıklık hücrelerinin homeostazını, aktivasyonunu, çoğalmasını ve farklılaşmasını modüle ederek tümör gelişimini teşvik edebilir veya engelleyebilir.

Otofajinin doğal öldürücü (NK) hücreleri üzerindeki etkisini araştıran az sayıda alışma, Granzim B'nin otofajik degradasyona uğraması sonucu NK hücrelerinin tümör hücrelerini öldürme kabileyetini azalttığını göstermektedir (Mgrditchian ve diğerleri, 2017).

Kanser terapisinde önemli bir yer tutan kemoterapi ajanlarıyla indüklenen genotoksik stres ve buna bağlı aktive olan otofajik sekretomun içeriği ve sekretomun NK hücreleri üzerindeki etkisi henüz bilinmemektedir Bu tezin amacı, genotoksik stresle (kemoterapötik ajan) indüklenen otofajiye bağlı oluşan otofajik sekretomun karakterizasyonu ve bu sekretomun tümöre yönelik NK aracılı immün cevabı nasıl etkilediğinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Otofaji

Otofaji, anormal proteinler, hasarlı organeller, patojenler ve diğer hücre sel bileşenler gibi hücre içi bileşenlerin lizozomal yolla parçalandığı bir süreci ifade eder. Bu katabolik süreç mayadan memeli hücrelerine kadar evrimsel olarak korunmuştur. Otofaji, ökaryotik hücrelerin zorlu ortamlarda strese yanıt veren ve hayatta kalmalarını destekleyen bir mekanizmadır (Chen ve diğerleri, 2022).

Modern otofaji kavramı, Christian de Duve tarafından 1950'lerde lizozomun keşfi ve takiben işlevini inceledikten sonra 1960'larda ortaya atılmıştır. Ancak, lizozomun keşfinden sonraki 40 yıl boyunca, otofaji araştırmaları, sınırlı araştırma araçları ve moleküler mekanizmalarının anlaşılması nedeniyle nispeten küçük bir alan olarak kalmıştır. Ancak Ohsumi'nin keşifleri, mayada otofaji ile ilgili yollar üzerinde eşzamanlı olarak çalışan diğer bilim insanlarının keşifleriyle birlikte, günümüzde binlerce bilim insanının şu anda dünya çapında otofajinin memeli sağlığı ve hastalığındaki rollerini araştırmak için kullandığı otofajinin moleküler mekanizması hakkında önemli bir bilgi kaynağı sağlamıştır. Bu nedenle 2016'da Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü, "otofaji mekanizmalarının keşfi" nedeniyle Yoshinori Ohsumi'ye verilmiştir (Levine ve diğerleri 2017).

Mayada yapılan çalışmalar, otofagozom oluşumunun moleküler mekanizmalarını aydınlatmak için çok önemlidir. İlk maya genetik taramaları, otofajinin açlık sırasında hayatta kalmak ve sporülasyonun maya farklılaşma süreci için gerekli olduğunu da ortaya koymuştur. Bununla birlikte, mayalar tek hücreli organizmalar olduğundan, daha karmaşık ökaryotlarda (özellikle memelilerde) otofajinin moleküler mekanizmasının keşfi, otofajinin sağlık ve hastalığındaki işlevlerini tanımlamak için kritik öneme sahiptir (Levine ve diğerleri 2017).

Son on yılda yapılan araştırmalar, otofaji sürecinin birçok farklı şekilde gerçekleşebileceğini ortaya koymuştur. Üç ana otofaji türü belirlenmiştir: makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılı otofaji; bunların hepsi de son aşamada substratların parçalanmak üzere lizozoma gönderilmesini içerir (Aman ve diğerleri 2021).

2.1.1. Otofajinin Sınıflandırılması

Memeli hücrelerinde otofaji; makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere üç ana tipte sınıflandırılmıştır. Bunlardan makrotofaji, çift membranlı organel olan otofagozomun oluşumuyla öne çıkar. Ancak hem mikrotofaji hem de şaperon aracılı otofaji otofagozom oluşumunu atlar ve kargolar doğrudan lizozoma iletilir (Lu ve diğerleri, 2022).

2.1.1.1. Makrotofaji

Makrotofaji (otofaji), substratların otofagozom olarak adlandırılan sitozolik çift membranlı veziküller içinde tutulduğu otofajik sürecin bir türüdür. Otofajik degradasyonun ardından, parçalanma ürünleri makromoleküler bileşenleri geri dönüştürmek ve olumsuz koşullar altında hücre canlılığını sürdürmek ve çeşitli stres koşulları sırasında hücreyi korumak için enerji üretmek amacıyla sitozole geri salınır (Feng ve diğerleri, 2014). Makrotofajide yer alan yapılar; otofagozom, peri-vakuolar alan ve fagofor olarak adlandırılır.

Otofagozom: Makrotofaji sırasında sitoplazmik kargoları tutan, fagofor genişlemesi ve kapanmasının ürünü olan tamamlanmış çift membranlı bir bölmedir (Fimia ve diğerleri, 2007).

Peri-vakuolar Alan (PAS): Fagofor birleşme bölgesidir. Mayalarda bulunur ancak PAS'ın memelideki eşdeğeri tanımlanmamıştır (He ve Klionsky, 2007).

Fagofor: Çift zarlı yapıya sahip olan ve otofajik kargonun ilk ayrıldığı aktif yapıdır. Fagofor uzar/genişler ve son olarak kapanarak tamamlanmış bir otofagozom yapısı oluşturur (Suzuki ve diğerleri, 2001).

Otofaji bir stres yanıtıdır ve organizmada strese neden olan birçok faktör otofaji mekanizmasını aktifleştirir. Bu duruma yönelik bazı örnekler aşağıda özetlenmiştir.

Herpes simpleks virüs enfeksiyonları sırasında otofajinin indüklenmesi ve viral partiküllerin otofajik vakuoller içinde lokalize olması, otofajinin enfekte olmuş hücrelerde bir konakçı savunma mekanizması olarak hareket ettiğini göstermektedir. Kas ve kalp hücrelerinde otofaji, mitokondri de dahil olmak üzere sitoplazmik bileşenlerin dönüşümünde özel bir temizlik rolüne sahip gibi görünmektedir. Bu durum, lizozomal membran proteini LAMP-2'nin eksikliğine bağlı olarak otofajik degradasyona sahip insan ve farelerde miyopati ve

kardiyomiyopatiye neden olmaktadır. Ayrıca, ilerlemiş kanserlerde otofajinin kanser gelişimine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Maya otofaji geni Apt6/ Vps30'un memeli homologu olan Beclin 1, insan meme ve yumurtalık kanserlerinin büyük bir kısmında monoalelik olarak delesyona uğramıştır. Son olarak, otofaji yaşam uzunluğuna da katkıda bulunabilir. Uzun süreli düşük kalori alımı birçok türde yaşam uzunluğunu artırmaktadır. Ayrıca, otofajinin apoptoz veya programlanmış hücre ölümünde de rolü vardır (Macroautophagy in Mammalian Cells Eeva-Liisa Eskelinen). Strese veya hasara yanıt olarak otofaji, hücreleri canlı ve metabolik olarak aktif tutmak için anabolik süreçleri kapatmaya teşvik edilir ve hücre onarımına ve daha fazla hasardan kaçmaya izin verir. Hücre hasar çok şiddetli olduğunda, doku homeostazını korumak için onarılamaz hücreleri ortadan kaldırmak üzere apoptoz devreye girer (Fan ve Zhong 2012).

2.1.1.2. Mikrotofaji

Mikrotofaji otofagozom yapısı içermez. Bunun yerine, lizozom doğrudan otofajik kargoyu fagositoz yoluyla içine alır. Mikrotofaji için gerekli olan tek dönüşüm membran füzyonudur. Genel otofaji mekanizmasına ihtiyaç yoktur. Mikrotofaji, mayalarda yeni sentezlenen bazı hidrolazların ve bitkilerde pigmentlerin biyosentetik dağıtımını gerçekleştirir. İnsan hücrelerinde ise amino asit yoksunluğunda endozomlarda belirli sitozolik proteinlerin parçalanmasını tetikler (Schuck, 2020).

2.1.1.3. Şaperon Aracılı Otofaji (CMA)

Şaperon Aracılı Otofaji (CMA) lizozomal aracılı bir protein yıkım yoludur. Sitozolik proteinlerin en az % 30'u bu süreç tarafından parçalanabilir. CMA'nın iki ana proteini LAMP-2A ve HSC70'tir. LAMP-2A, lizozomal membrandaki protein substratları için bir reseptör olarak çalışırken, HSC70 özellikle protein hedeflerini bağlar ve onları CMA degradasyonu için hedefler. CMA tarafından degrid edilen proteinler özellikle lipid ve karbonhidrat metabolizmasında yer almaktadır (Alfaro ve diğerleri, 2018). CMA başlangıçta strese karşı hücre tepkinin bir parçası olarak tanımlanmıştır, ancak bazal CMA aktivitesi neredeyse tüm memeli hücrelerinde tespit edilmiştir. Bazal CMA seviyeleri hücre tipleri ve dokular arasında

büyük farklılıklar gösterir, bu da CMA'ya bağımlılıklarında olası farklılıklara işaret etmektedir. CMA, açlık, oksidatif stres, genotoksik stres, hipoksi ve radyasyon gibi çok çeşitli stres faktörlerine yanıt olarak aktive olmaktadır (Kaushik ve Cuervo 2018).

2.1.2. Otofajinin Moleküler Mekanizması

Makrootofaji (bundan sonra otofaji olarak adlandırılacaktır), fagoforların (izolasyon membranları olarak da adlandırılır) oluşması (insiyasyon) ve nükleasyon ile başlar. Bunu uzama ve otofagozom olarak bilinen çift membranlı vezikül oluşturmak üzere fagoforun kapanması takip eder. Son olarak otofaji, otofagozomun lizozom ile birleşerek otofagozomun intraveziküler içeriğinin degradasyonu için otolizozomu oluşturmasıyla sona erer (Majeed ve diğerleri, 2022).

2.1.2.1. İnisiyasyon

Memeli hücrelerinde otofaji, omegasom olarak adlandırılan endoplazmik retikulum (ER) subdomainlerinden fagoforların oluşmasıyla başlarken, maya hücrelerine otofaji PAS (fagofor birleşme bölgesi) olarak adlandırılan noktasal bir yapıda başlar (Feng ve diğerleri, 2014). Otofajinin başlatılmasında için en karakterize indükleyici hücre büyümesinde/çoğalmasında görevli olan mTOR'un inhibisyonu ile sonuçlanan amino asit yoksunluğudur. mTOR, mTORC1 ve mTORC2 olmak üzere iki farklı protein kompleksinden oluşur, ancak sadece mTORC1 doğrudan otofajiyi düzenler. Yüksek besin koşullarında, ATG13 ve ULK1'in her ikisi de mTORC1 tarafından fosforile edilir ve bu fosforile formda inaktif kalır. Açlık koşullarında, ULK1'e bağlı mTORC1 bölgeleri defosforile olur ve ULK1 mTORC1'den ayrılır. Eş zamanlı olarak ULK1 otofosforilasyona uğrar ve bunu ATG13, FIP200 ve ATG101'in fosforilasyonu takip eder. ULK1-ATG13-FIP200-ATG101 kompleksi oluşumu ile otofaji süreci başlatılır (Bar-Peled ve Sabatini, 2014).

Otofaji, hücre homeostazı düzenleyici kinazlar 5' AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) ve serin/treonin protein kinaz STK11 (LKB1) tarafından ATP:AMP oranı aracılığıyla algılanan glikoz açlığında olduğu gibi hücresel enerji seviyelerinin düşmesi üzerine de indüklenebilir. LKB1, TSC2 (tuberous sclerosis 2) kompleksinin aktivasyonu

yoluyla doğrudan mTORC1'i inhibe ederek AMPK aracılığıyla otofajiyi aktive eder (Kim ve diğerleri, 2011).

2.1.2.2. Nükleasyon

Nükleasyon süreci, sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz-kompleks 1'in (PI3KC3-C1) fagofor başlangıç bölgelerindeki ULK1 kompleksine katılmasıyla başlatılır. Sınıf III PI3KC3, kompleks I ve II (PI3KC3-C1 ve PI3KC3-C2) olarak bilinen iki farklı kompleksten oluşur. Her iki kompleks de katalitik alt birimde VPS34, VPS15 ve BECN1 (beclin1) proteinleri bulunur. PI3KC3-C1, kompleksi fagofor başlatma bölgelerine yönlendiren ATG14L içerirken, PI3KC3-C2 endozom ve otofagozom olgunlaşmasını yönlendiren UVRAG (UV radyasyon direnci ilişkili gen) içerir. PI3KC3-C1, otofaji başlatma bölgelerinde aktif ULK1 kompleksine katıldıktan sonra otofagozomların nükleasyonuna yardımcı olmak için fosfatidilinositol-3 fosfat (PI3P) üretir. ER'de PI3KC3 aracılı PI3P üretimi omegasomların alt yapısını oluşturur. ER'de PI3KC3 kompleksi ULK1 kompleksini stabilize eder (Koyama-Honda ve diğerleri, 2013).

PI3KC3-C1'in ULK1 kompleksi aktivasyonu ve translokasyonu sonrası otofaji başlatma bölgelerine alınmasına birden fazla faktör aracılık eder. Transmembran proteini vakuol membran proteini 1 (VMP1) ATG aracılığıyla BECN1'in BH3 domaini ile etkileşime girerek PI3KC3-C1'i otofaji başlatma bölgesine alır. ATG14L açlık sırasında PI3KC3-C1'in translokasyonuna yardımcı olur. PI3KC3-C1'e özgü ATG14L proteininin fagofor hedeflemedeki rolüne ek olarak, PI3KC3-C1'in diğer üyeleri olan BECN1, VPS34 ve VPS15'in de fagofor nükleasyonunda rolü vardır (Molejon ve diğerleri, 2013).

PI3KC3-C1'in bir başka etkileşim ortağı olan Beclin 1 inaktivasyonu yoluyla otofajiyi inhibe eder. BECN1 Bcl-2 protein ailesi üyeleri Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-I ile etkileşime girer. Bcl-2'nin BECN1 ile etkileşime girmesi sonucunda VPS34 kinaz aktivitesi inaktive olur ve otofajiyi inhibe edilir (Stjepanovic ve diğerleri, 2017). Vezikül nükleasyonunda klasik otofaji yolu olan BECN1-ATG14L-VPS34 kompleksi, endoplazmik retikulumun fagositik membranı ile etkileşime girer ve sırasıyla AMBRA1 ve Bcl-2/Bcl-xL'nin bağlanmasıyla uyarılır ve inhibe edilir; BECN1-VPS15-Vps34-UVRAG kompleksi, otofagozomun endositik yoludur ve AMBRA1 ve ATG14 bileşenlerini UVRAG ve düzenleyici unsuru SH3GLB1 ile

yapısal olarak yer değiştirerek doğrudan fagositik etkiye ve otofagozomların hızlandırılmış olgunlaşmasına yol açar (Zhu ve diğerleri, 2022).

2.1.2.3. Fagofor Uzaması

Otofagozom uzaması, büyüyen fagofora lipid parçalarının iletilmesini içerir. İki ubikitin benzeri konjugasyon sistemi; ATG12 ve ATG8 fagofor uzamasında etkili proteinlerdir. ATG8 ailesi proteinleri iki alt gruba ayrılır. LC3A, LC3B, LC3B2, LC3C'yi içeren LC3 (hafif zincir 3) alt ailesi ve GABARAP, GABARAPL1 ve GABARAPL2'yi içeren g-aminobütirik asit reseptörü ile ilişkili protein (GABARAP) alt ailesidir (Klionsky ve Schulman, 2014).

Yaklaşık 17 kDa'lık protein olan LC3, memeli hücrelerinde otofagozom belirteci olarak tanımlanmıştır. LC3 sentezi, C-terminal peptidin memeli ATG4B homologları tarafından LC3-I oluşturmak üzere kesilerek bir öncü protein (proLC3) oluşturulmasıyla başlar. Sitozolik LC3-I daha sonra E1 enzimi (ATG7) tarafından aktive edilir ve E2 enzimi (ATG3)'e aktarılır ve son olarak lipid fosfatidiletanolamin (PE)'nin amino grubuna konjuge edilerek membrana bağlı bir protein olan LC3-II'ye modifiye edilir. Bu konjugasyon reaksiyonu, E3 enzimi olarak görev yapan yaklaşık 800 kDa'lık bir kompleksi olan ATG12-ATG5-ATG16L kompleksi tarafından katalize edilir (Majeed ve diğerleri, 2022).

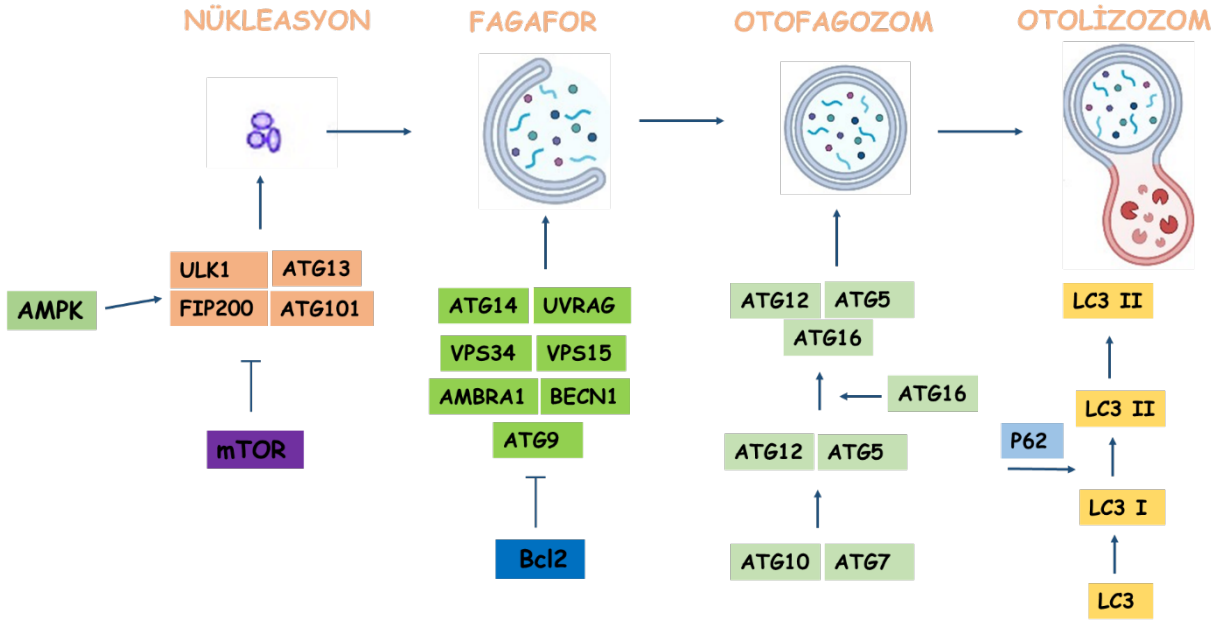
Atg12-Atg5 konjugat sistemi, ubikitinasyon yolağındaki E1-E2-E3 aktivasyon sistemi ile benzerdir. Atg12, E1 benzeri bir enzim olan Atg7 tarafından aktive edilir. E1 benzeri aktivasyonun ardından Atg12, E2 benzeri bir enzim olan Atg10'a aktarılır ve son olarak Atg5'e konjuge edilir. Atg12-Atg5 konjugatı ~350-kDa ağırlığında Atg12-Atg5-Atg16 kompleksi oluşturmak için Atg16 ile etkileşime girer (Martens ve Fracchiolla, 2020).

Atg8 konjugasyon sistemi, Atg12 konjugat sisteminin aşağı akış yönünde hareket eder. Normal koşullar altında, Atg8 konjuge olmayan formda bulunur. Bununla birlikte, açlıkla indüklenen otofajide, Atg8 aktive edilir ve PE konjuge forma dönüştürülür. Atg8'in aktivasyonu, PE'ye kovalent bağlanması ve ardından E1 benzeri enzim Atg7 tarafından aktivasyonu ile başlatılır. Daha sonra, aktive edilmiş Atg8, E2 benzeri enzim Atg3'e aktarılır (Majeed ve diğerleri, 2022).

Buna ek olarak, p62/SQSTM1, NBR1, NDP52 gibi çeşitli übikülin-bağlanma proteinleri kargo reseptörleri olarak görev yapar. Bu kargo reseptörleri, otofagozomun spesifik olarak hedeflenmesi için gerekli olan LC3-etkileşim bölgesi içerir (Weidberg ve diğerleri, 2011). Bu kargo reseptörlerinden olan p62 degradasyonu otofajiye bağlıdır, yani otofajinin inhibisyonuna yanıt olarak p62 seviyesi birikir yada otofajinin indüksiyonuna yanıt olarak p62 seviyesi azalır (Zhu ve diğerleri, 2022).

2.1.2.4. Otofagozomun Lizozom ile Birleşmesi

Çift membranlı otofagozomlar otofaji yolağının son aşamasında otofajik kargonun degradasyonu için lizozomlarla birleşir. FYCO1 (FYVE ve CC alanı içeren 1), ORP1L (oksissterol bağlayıcı proteinle ilişkili protein 1L), PLEKHM1 (Pleckstrin Homolojisi ve RUN Alanı İçeren M1), BORC (BLOC-1 ile ilişkili kompleks, BLOC: Biogenesis of lysosomerelated organelles complex 1) ve RILP (Rab-interacting lysosomal protein), Arl8'in yanı sıra GTPases-Rab7 ve Rab 2 gibi protein kompleksleri otofagozomların ve lizozomların hücre iskeleti boyunca birbirlerine doğru taşınmasını sağlar (Majeed ve diğerleri, 2022). Süreçteki bir sonraki adım otofagozomların ve lizozomların bağlanmasıdır. Otofagozom-lizozom füzyonundan sonra, otofajik kargo parçalanır ve makromoleküler öncüller geri dönüştürülür veya metabolik yollarda kullanılır. N-etilmaleimide duyarlı füzyon protein bağlanması protein reseptörü (SNARE) domainleri membranları birbirine kaynaştırır. Oluşan cis-SNARE kompleksi N-etilmaleimide duyarlı füzyon proteini (NSF; memelilerde secl8p) ve α -SNAP (alfa çözünür NSF bağlanma proteini; memelilerde secl7p) proteinleri tarafından geri dönüşüm için tanınır ve parçalanır. Otofajik kargo bozunması sırasında adaptör protein p62 ve LC3II de degrade olur (Itakura ve diğerleri, 2012).



Şekil 1. Otofajinin Moleküler Mekanizması

2.2. Genotoksik Stres İndüklü Otofaji

Otofaji sadece besin azlığı ile değil, aynı zamanda genotoksik stres de dahil olmak üzere diğer birçok stres faktörü tarafından da uyarılabilir. Son çalışmalar otofajinin metabolik stres, endoplazmik retikulum stresi ve anti kanser terapiler tarafından da indüklenebileceğini göstermiştir (Eren, 2020). Genotoksik stres indüklü otofaji ile ilgili literatürde birçok çalışma yer almaktadır. Bu çalışmalarda ATM, ATR ve p53 gibi bazı DNA hasar sensörlerinin önemli otofaji düzenleyicileri olduğu bildirilmiştir ve bu nedenle otofajinin DNA hasar yanıtında (DDR) bir rolü olduğu görülmektedir (Czarny ve diğerleri, 2015).

DNA hasarına yanıt olarak fosforile olan ATM'nin otofaji indüksiyonunda da rolü olduğu gösterilmiştir. Stagni ve ark. tarafından, ATM'nin otofajinin negatif regülatörü olan mTOR kompleks 1'i (mTORC1) inhibe ederek otofajiyi aktive ettiği gösterilmiştir. Oksidatif stres ile ATM aktivasyonu, LKB1/AMPK/TSC2 sinyal ekseninin aktivasyonundan sorumludur, bu da mTORC1 inhibisyonu ile sonuçlanır ve otofagozom membranının

nükleasyonundan ve oluşumundan sorumlu anahtar protein olan ULK1'in aktive olmasını sağlar. ATM'den başlayan bu sinyal yolu, otofaji indüksiyonu ile sonuçlanır (Stagni ve diğerleri, 2018).

Otofajinin çeşitli tümör hücrelerinde indüklenmesinin veya inhibe edilmesinin hücre sağkalımı ve ilaç direnci ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Macintosh ve Ryan, 2013; Camuzard ve diğerleri, 2020). Fizyolojik koşullar altında, hücrelerin farklı stres sinyallerine maruz kalması p53 sinyal yolunu aktive ederek hücrelerin; hücre döngüsünün durması, DNA onarımı, yaşlanma ve apoptoz gibi çeşitli transkripsiyonel programları aktive etmesini sağlar ve tümör büyümesinin baskılanmasına yol açar (Marei ve diğerleri 2021). Ancak P53 otofajinin düzenlenmesinde ikili bir rol oynamaktadır. Otofajinin p53 tarafından düzenlenmesi p53'ün hücrel konumuna bağlı olarak değişmektedir. Nükleer p53 otofajiyi indüklerken, sitozolik p53 otofajiyi baskılayıcı yönde görev yapmaktadır (Kong ve diğerleri, 2012). Ma ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, lösemi hücre hattı CEM/CEM-VLB (p53mutant) kullanılarak kemoterapi ve radyoterapi direncinde etkisi olan p53 kaynaklı otofajinin rolü araştırılmıştır. Kullanılan hücre hattında p53'ün mutant olması nedeni ile hücre döngüsünün ilerleyişini engellemek için kullanılan genotoksik ilaçlar otofajiyi aktive etmekte, hücre ölümünü engellemekte ve ilaç direncine yol açmaktadır. Ancak CEM-VLB hücrelerinde iyonize radyasyon (IR) ile otofaji inhibitörü olan 3-metiladenin (3-MA) kombin kullanıldığında apoptozda önemli oranda artış olduğu görülmüştür. Bu nedenle, CEM-VLB hücrelerinde kemoterapi ajanları ile genotoksik stres aracılı otofaji indüklendiğinde kemoterapiye yanıtın azaldığı, radyoterapinin ise otofaji inhibitörleri ile birlikte terapötik etkiyi arttırdığı sonucuna varılmıştır (Ma ve diğerleri, 2021).

Otofaji, karsinogenezin ilerlemesindeki rolünün yanı sıra tümör hücrelerinde ilaç direnci gelişimine de neden olur. 5- fluorourasil (5-FU), dosetaksel (DTX) ve paklitaksel (PTX) dahil olmak üzere yaygın olarak kullanılan bazı kemoterapötik ajanlar, tümör hücrelerinde otofajiyi indükleyebilmektedir (Zamame ve diğerleri, 2021). 5-FU, otofajiyi indükleyen AMPK ve p53 üzerinden doğrudan etki ederek tümör hücrelerinde otofajinin artmasına neden olur (Longley ve diğerleri, 2003). DTX ve PTX'in otofajiyi bloke etmesi beklenirken, DTX'in doğrudan Bcl-2 ve BECN1 ekspresyonunu arttırarak, PTX'in ise BECN1 ekspresyonunu arttırarak otofajiyi indükledikleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Wang ve diğerleri, 2018; Yu ve diğerleri, 2017).

Kemorapi indüklü otofaji ile ilgili bir diğer çalışmada ise HepG2 karaciğer kanseri hücreleri etoposid ile muamele edildiğinde otofajinin indüklendiği görülmüştür. Ayrıca,

otofajinin klorokin ile baskılanması etoposid ile indüklenen hücre ölümünü artırmıştır. Bu sonuçlara dayanarak, etoposid ile indüklenen otofajinin kanser hücrelerinin hayatta kalımında işlev gördüğü ve AMPK aktivitesi ile yakından ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (Xie ve diğerleri, 2011).

Genotoksik stres ile meydana gelen DNA hasarı ve otofaji ilişkisini araştıran başka bir çalışmada, histiyositik lenfoma hücre hattının (U937) farklı etki mekanizmaları yoluyla DNA hasarını indükleyebilen (menadion, etil metansülfonat (EMS) ve bleomisin), bortezomib gibi genotoksik ajanlarla muamele edilmesi sonrası gelişen otofaji indüksiyonu gösterilmiştir. DNA hasarı yaratan genotoksik ajanlarla muamele edilen hücrelerde otofajinin indüklendiği ve DDR sırasında otofajinin sitoprotektif rolü olduğu görülmüştür. Otofajinin klorokin ile inhibe edilmesi ise kanser hücrelerinin genotoksik ajanlara karşı daha duyarlı hale gelmesini sağlamıştır. Bu veriler ışığında otofaji modülasyonunun genotoksik stres yaratan antikanser ilaçlarının aktivitesini artırabileceği sonucuna varılmıştır (Galati ve diğerleri, 2019).

Qiang ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, DNA hasarına yol açan ultraviyole B (UVB) radyasyonunun deri kanserinde mitojen aktive protein kinaz (AMPK) aktivasyonu aracılığıyla otofajiyi indüklediği bildirilmiştir. Bu çalışmada, genotoksik stres oluşturan UVB'nin AMPK aktivasyonu yoluyla keratinositlerde ve fare embriyonik fibroblastlarında (MEF) otofajiyi indüklediği gösterilmiştir. AMPK aracılı otofaji, potansiyel olarak mutajenik hücrelerin yok edilmesini engelleyebilecek UVB kaynaklı apoptozu inhibe etmektedir. Otofaji inhibisyonu ise p62 up-regülasyonu yoluyla p38 aktivasyonunu artırarak, hücreleri UVB kaynaklı apoptoza karşı hassaslaştırmıştır. Deri karsinomunda genotoksik stres indüklü otofaji, DNA hasar yanıtı yolunun aktivasyonu ile birlikte aktive olmuş ve p38 fosforilasyonunu azaltmıştır; bu durum kanser gelişimi sırasında otofajinin UVB kaynaklı DNA hasarını takiben p38 yolağını da inhibe ederek tümör hücrelerinin hayatta kalma avantajını arttırmaktadır (Qiang ve diğerleri, 2013).

2.3. Otofaji Kanser İlişkisi

Otofajinin kanser hücresi proliferasyonunu veya tümörigenezi inhibe ettiği veya teşvik ettiği yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. Bu durum otofajinin tümörün farklı evrelerinde farklı rolü olduğuna işaret etmektedir (White, 2015). Otofaji tümörün erken evrelerinde malign

dönüşümü önlerken, ilerlemiş tümörlerde tümörün büyümesini teşvik etmektedir (Lim ve diğerleri, 2021). Klasik bir örnek olarak, tümörün evresine göre meme kanserinde otofajinin ikili rolü verilebilir. Otofajinin tümörjenik faktörleri (protein agregatları, onkoproteinler ve hasarlı mitokondri vb.) parçaladığı ve immün yanıtı desteklediği için erken evrede tümör baskılayıcı bir mekanizma olarak görev yaptığı, ancak ilerleyen evrelerde hücrelerinin hayatta kalmasına, istilasına ve göçüne yardımcı olduğu bilinmektedir. Böylece metastatik süreci desteklemekte ve otofajinin kanserdeki ikili rolünü doğrulamaktadır (Patergnani ve diğerleri 2021).

2.3.1. Tümörögenезin Baskılanmasında Otofajinin Rolü

Mayada otofajinin ilk araştırmaları doğrultusunda, bu sürecin hücrenin hayatta kalmasını destekleyen bir mekanizma olarak işlev gördüğü genel olarak kabul edilmektedir. Çalışmalar, besin yokluğunda besinlerin sağlanması için hücrenel bileşenleri bozmak üzere otofajinin aktive olduğunu göstermiş ve bu yanıtın yüksek ökaryotlarda korunduğu bulunmuştur. Otofajinin, protein ve organel hasarı ve redoks dengesizliği de dahil olmak üzere farklı hücrenel stres biçimlerine yanıt vermek ve bunları hafifletmek için oldukça uyarlanabilir olduğu da açıkça ortaya çıkmıştır. Otofaji sadece besin mevcudiyetine katkıda bulunmak ve metabolik adaptasyon için bir araç sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücrenel bütünlüğü, redoks dengesini ve proteostazı destekleyen hücreler içinde önemli bir homeostatik mekanizmadır. Bu işlevler ışığında, otofajinin kansere karşı koruyucu rollere sahip olması şaşırtıcı değildir (Levine ve diğerleri 2017).

Otofaji başlangıçta, tümör başlangıcı sırasında PI3K'daki fonksiyon kazanımı mutasyonları veya amplifikasyonları ya da mTOR'u aktive eden ve dolayısıyla otofajiyi inhibe eden AKT veya PTEN kaybı veya susturulması gibi değişiklikler sonucu tümör baskılayıcı bir mekanizma olarak kabul edilmiştir (Kimmelman, 2011). Normal koşullarda ve kanserin erken evresinde otofaji, hücreleri zararlı uyarılardan ve malign dönüşümden korumak için bir kalkan görevi görmektedir. Otofaji, reaktif oksijen türlerinin (ROS) yıkıcı etkisini sınırlandırarak DNA hasarını önler ve genom bütünlüğünü korur (Lim ve diğerleri, 2021). Mekanistik açıdan bakıldığında, otofajinin baskılanması ROS artışına, DNA hasarına ve mitokondriyal bozulmaya yol açmaktadır ve bunların hepsi potansiyel olarak pro-tümörjeniktir (Mathew ve diğerleri, 2007). Otofaji kor kompleksinde yer alan Beclin1/class III PI3K bileşeni olan UV radyasyon direnci ile ilişkili gen Bif-1 hücre çoğalmasının

kontrolünü ve tümör oluşumunun baskılanmasını sağlamaktadır (Takahashi ve diğerleri, 2007). Otofajinin tümör oluşumunu baskılamadaki rolüne dair in vivo genetik çalışmalarda Atg7, Atg5 ve Becn1 gibi otofajik genler baskılanarak otofajinin inhibe edilmesi sonucunda tümör oluşumunda artış olduğu gösterilmiştir (Takamura ve diğerleri, 2011). Otofajinin baskılandığı in vivo modellerde, otofaji inhibisyonu sonucu p62 birikiminin tümör oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Wei ve diğerleri, 2014). Ayrıca p62'nin bulunduğu kromozom 5q'nun ve dolayısıyla p62 ifadesinin amplifikasyonu, renal hücreli karsinom gelişimi ile de ilişkili bulunmuştur (He ve Tian, 2020). Otofaji inhibisyonu immortalize fare böbrek (iBMK) hücrelerini anöploidi ile sonuçlanabilecek mutasyonlara ve kromozomal instabiliteye duyarlı hale getirmiştir (Lim ve diğerleri, 2021). Tüm bu literatür bilgileri tümörün başlangıcında otofajinin koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir.

2.3.2. Tümörögenезin Gelişiminde Otofajinin Rolü

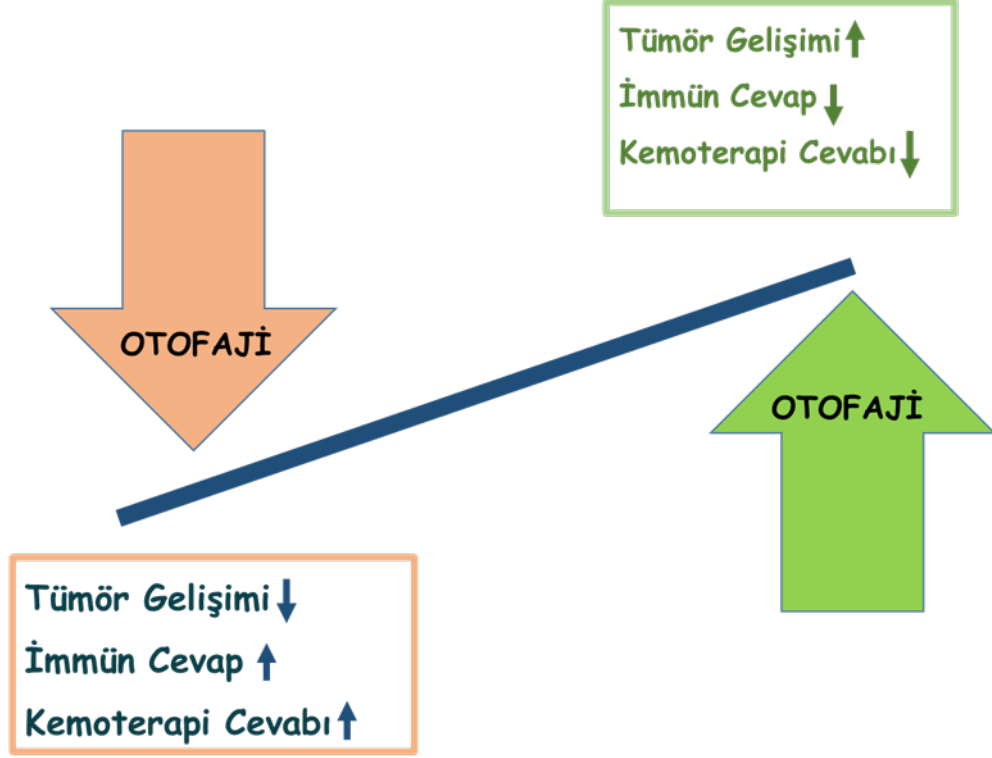
Gelişmiş kanserlerin sürdürülmesinde otofajinin rolünü destekleyen ilk kanıtlar, bazı tümör dokularının birikmiş otofagozomların göstergesi olan yüksek seviyelerde LC3 punkta ve lipidlenmiş LC3 (LC3-II) sergilediği bulgusuna dayanmaktadır. Bununla birlikte, bu statik doku bazlı okumalar kesinlikle sadece otofagozom seviyelerini gösterir, bu nedenle otofajinin indüksiyonu veya otofagozom döngüsünün bozulması arasında büyük ölçüde ayırım yapamazlar. Dokudaki otofajik akışın analiz edilememesi, kanserlerde otofajinin incelenmesinde önemli bir sınırlama olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, çok sayıda prelinik çalışma, otofajinin çeşitli onkogenlerin aktivasyonu ve/veya tümör baskılayıcıların inaktivasyonu sonucunda ilerlemiş tümörlerin büyümesini ve metabolizmasını desteklediğini göstermiştir (Levine ve diğerleri 2017).

Stres koşulları (hipoksi, besin yoksunluğu, metabolik stres, genotoksik stres vb.) altında otofaji, katlanmamış proteinleri ortadan kaldıran ve endojen substratları hızla parçalayarak adenozin trifosfat (ATP) üretimi için substratlar sağlayan bir pro-survival mekanizmadır. Otofaji, hücrel streslerle başa çıkmak için aktive olan bir mekanizmadır ancak otofaji aktivasyonu kanser gelişimine, ilaç direncine ve metastaza aracılık eder (White, 2015).

Bazal otofaji, hipoksik tümör bölgelerinde aktive olarak tümör hücresinin hayatta kalmasını sağlar (Degenhardt ve diğerleri, 2006). Otofaji RAS-transforme kanser hücrelerinde de aktive olarak tümör hücre büyümesini, hayatta kalmasını, invazyonu ve metastazı destekler

(Guo ve diğeri, 2011). Açlık indüklü otofaji, hepatoselüler karsinom hücrelerinin invazyonunu ve epitelyal-mezenkimal geçişini (EMT) teşvik eder. Hepatoselüler karsinomda indüklenen otofajinin, anoikis direnci ve kolonizasyonu teşvik ederek pulmoner metastazı desteklediği de bildirilmiştir (Peng ve diğeri, 2013). Pankreas kanserinde, hipoksi ile indüklenen otofaji, HIF-1 α upregülasyonu ve EMT yoluyla migrasyon ve invazyonu arttırmıştır (Zhu ve diğeri, 2014). Otofaji indüksiyonu, TGF β aracılığıyla EMT'yi kolaylaştırarak mesane kanseri hücrelerinin invazyon ve metastazını indüklemiştir (Tong ve diğeri, 2019). Otofaji ile ilişkili faktörler, DRAM1 ve p62'nin otofaji aktivasyonu yoluyla glioma kök hücrelerinin enerji metabolizmasını ve invazyonunu düzenlediği bildirilmiştir (Galavotti ve diğeri, 2013). Kemoterapinin, küçük hücreli olmayan akciğer karsinomunda artmış otofaji seviyelerine sahip CD133+ kanser kök hücrelerinin oranının arttığı bildirilmiştir. Otofajinin inhibe edilmesi ile akciğer kanseri kök hücrelerinin sferoid oluşumunda ve koloni oluşumunda azalma olduğu gösterilmiştir (Hao ve diğeri, 2019). TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) tümör hücrelerinde metastazın baskılanmasının düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. Ancak TRAIL dirençli kanser hücrelerinde artmış otofaji seviyelerinin metastaz sırasında tümör hücrelerinin hayatta kalmasını arttırdığı gösterilmiştir (Bhutia ve diğeri, 2013). FIP200 otofagozom oluşumunu başlatmak için ULK1/Atg13/FIP200/ATG101 kompleksinde işlev gören önemli bir otofaji proteindir. Polyoma T antijeni (PyMT) kaynaklı meme kanserinde FIP200 yokluğunda tümör büyümesinin baskılandığı ve sağkalımın arttığı görülmüştür (Wei ve diğeri, 2011). Kras kaynaklı glioblastoma fare modelinde Ulk1, Atg7 veya Atg13'ün shRNA ile nakavt edilmesi sonucunda tümör başlangıcının ve büyümesinin baskılandığı, farenin hayatta kalma süresini uzadığı bildirilmiştir (Amaravadi ve diğeri, 2016).

Tüm bu literatür bilgilerinin ışığında otofajinin indüklenmesinin, tümör hücrelerinin hipoksik, yüksek asidik ve/veya toksik (kemoterapiye bağlı) ortamda hayatta kalmaları için bir tür kendini koruma mekanizması olabileceği düşünülmektedir (Li ve diğeri, 2017).



Şekil 2. Otofaji ve Kanser

2.3.3. Kanserde Otofajinin Hedeflenmesi

Son yıllarda otofaji, kanser tedavisi için umut verici bir hedef haline gelmiştir. Bu nedenle, bazı otofaji modülatörleri ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kanser tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır (Marinkovic ve diğerleri, 2018). 3-Methyladenine (3-MA) ve Bafilomycin A1 (Baf A1), sırasıyla PI3K inhibisyonu yoluyla erken otofajide ve vakuolar tip ATPaz'ı bloke ederek geç otofajide işlev gören yaygın otofaji inhibitörleridir. Kinolin ailesinin üyesi olan klorokin (Cq), otofagozomların ve lizozomların füzyonunu bloke ederek otofaji inhibitörü işlevi gören aynı zamanda klinik olarak mevcut bir antimalaryal ajandır. Cq, FDA tarafından antimalaryal bir ajan olarak kullanım için onaylandığından, klinik çalışmalarda otofaji inhibitörü olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Liu ve diğerleri, 2020).

Yapılan çalışmalar, otofaji inhibitörlerinin ve diğer terapötik ajanların kullanımında sinerjik bir etki olduğunu öne sürmektedir (Lim ve diğerleri, 2021). Yapılan çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir:

Cq ve 3-MA pirimidin analogu olan kemoterapötik ilaç 5-fluorourasilin kolon kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini güçlendirmektedir (Sasaki ve diğerleri, 2010). Sitarabin, DNA sentezini inhibe ederek akut miyeloid lösemi (AML) ve non-Hodgkin lenfoma tedavisinde etkili bir kemoterapi ajanıdır. Baf A1 ve Cq, sitarabin ile muamele edilen lösemi hücrelerinde apoptotik ölümü önemli oranda artırmaktadır (Bosnjak ve diğerleri, 2014). Hidroksi klorokin (HCq) ya da 3-MA, otofaji inhibisyonu yoluyla doksorubisin (DOX) dirençli miyeloma hücrelerinin ilaç direncini kısmen tersine çevirebilmektedir (Pan ve diğerleri, 2015). Kanser hücrelerinin proteozom inhibitörlerine karşı direnç göstermesinin otofaji ile ilişkili olması nedeniyle multiple miyelom (MM) ile ilgili yapılan bir çalışmada Cq ve HCq 'nun MM'da otofajiyi inhibe ederek karfilzomib kaynaklı hücre ölümünü arttırdığı görülmüştür (Baranowska ve diğerleri, 2016). Tirozin kinaz inhibitörü olan Sorafenib'in Cq ile kombinasyon tedavisinin glioblastoma multiforme'de otofaji inhibisyonu yoluyla hücre proliferasyonu ve migrasyonunun azalttığı ve apoptotik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir (Liu ve diğerleri, 2016). mTOR inhibitörü olan everolimusun, Cq ile kombinasyonunun güçlü ve sinerjik bir şekilde böbrek kanserinde hücre ölümünü indüklediği bildirilmiştir (Grimaldi ve diğerleri, 2015). Agresif prostat kanserlerinde, AKT inhibitörü AZD5363'ün etkinliğini arttırmak için otofaji inhibitörleri 3- MA, Cq ve Baf A1 ile birlikte kullanılması hücre ölümünü artırmıştır (Lamoureux ve diğerleri, 2013). İn vitro ve in vivo çalışmaların ötesinde otofaji inhibitörlerinin kemoterapi veya hedefe yönelik tedavi ile birlikte uygulandığı klinik çalışmalar da devam etmektedir (Amaravadi ve diğerleri, 2019).

2.4. Otofajik Sekretom

Salgısal otofaji yada otofajik sekretom terimi, proteinlerin otofagozom içinde doğrudan plazma membranına multiveziküler cisimcikler (MVB) veya hücre dışı salınımları için salgı lizozomlarına taşınarak salgılanmasında rol aldığı süreci tanımlamak için kullanılır. Böylece, otofagozomal kargo degradasyonunu indüklemek yerine, salgısal otofaji otofagozomal içeriğin hücre dışı boşluğa atılmasına yol açar (Cotzomi-Ortega ve diğerleri, 2018). Otofajiye bağlı salgılar pro/anti enflamatuar sitokinlerden kemokinlere, büyüme faktörlerine vb. kadar çok sayıda hücre dışı faktörler içerir (New ve Thomas, 2019).

Otofajiye bağlı bileşenlerin başında ilk sırada interlökinler yer alır. İnterlökin 1 beta (IL-1 β)'nin salgısal otofajinin rolü üzerine yapılan çalışmalarda otofajinin inflamazom ve IL-

IL-1 β aktivasyonu ve salgılanmasında doğrudan bir rolü olduğu bulunmuştur. Bazal otofajinin IL-1 β salgılanmasını inhibe ederken, indüklenmiş otofajinin IL-1 β salgılanmasını artırdığı yapılan çalışmada gösterilmiştir (Dupont ve diğerleri, 2011). Başka bir çalışmada ise Atg7'nin baskılanmasının hem UVB kaynaklı enflamasyona hem de tümör oluşumuna karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. Atg7 aracılı olarak otofajinin baskılanması sonucu IL1 β sekresyonu da azalmıştır (Qiang ve diğerleri, 2017).

IL-1 ailesinin dışında, diğer interlökinlerin, özellikle IL6 ve CXCL8'in otofaji ile önemli bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir. MDA-MB-468 meme kanseri hücrelerinde Atg7'nin baskılanmasının IL-6 salınımını azalttığı ve buna bağlı olarak hücre sağkalımı ve mamosfer oluşumunun da azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlar otofajinin IL6 salınımını modüle ederek meme kanseri hücrelerinin ve meme kanseri kök hücrelerinin devamlılığının sağlanmasında etkili olduğunu ortaya koymaktadır (Maycotte ve diğerleri, 2015).

Lock ve arkadaşlarının RAS'a bağlı invaziv meme kanseri modelinde protümorijenik faktörlerin otofaji aracılı salgılanmasını araştırdıkları bir çalışmada, otofaji RAS-transforme MCF10A meme kanseri hücrelerinde IL-6, matriks-metalloproteinaz 2 ve 9 (MMP2/9) ve WNT5A gibi proinvaziv faktörlerin salgılanmasının arttırdığı ve bunun sonucunda invazyon ve EMT'nin indüklendiği bulunmuştur (Lock ve diğerleri, 2014).

Bazal otofajinin yüksek olduğu melanom hücre hatlarında, inflamasyon ve tümörigenezde rolleri olduğu bilinen IL-1 β , CXCL8, LIF, FAM3C ve DKK3'ün yüksek seviyelerde salgılandığı görülmüştür. Bu proteinlerin seviyeleri ATG7'nin susturulmasıyla azalmıştır. Bazal otofajinin yüksek seyrettiği melonoma hastaların serumlarında da yüksek düzeyde otofaji ile düzenlenen salgi proteinleri bulunmuştur (Kraya ve diğerleri, 2015).

TLR4 ve TLR3'ün lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılması sonucu akciğer kanseri hücrelerinde indüklenen otofajinin, TRAF6 (TNF reseptörü ile ilişkili faktör 6) ubiquitinasyonunu teşvik ederek akciğer kanseri hücrelerinden salınan çeşitli sitokin üretimlerini artırdığı (IL6, CCL2/MCP-1 CCL20/MIP-3 α ,) görülmüştür. Ayrıca VEGFA (vasküler endotelyal büyüme faktörü A) ve MMP2 seviyelerinde de artış tespit edilmiştir. Bu sitokinlerin TLR aktivasyonu ile akciğer kanseri hücrelerinin invazyon ve migrasyon kapasitesini arttırdığı görülmüştür (Zhan ve diğerleri, 2014).

Meme kanserinde, kanser ilişkili fibroblastlarda (CAF) normal fibroblastlara göre artmış otofaji görülmüştür. Kanserle ilişkili fibroblastlardan toplanan koşullandırılmış ortamlarla muamele edilen meme kanseri hücrelerinde invazyonun arttığı, 3-MA otofaji inhibitörü kullanıldığında ise kanser hücrelerinde migrasyonun azaldığı görülmüştür (Wang ve diğerleri, 2017).

CAF'larda yapılan başka bir çalışmada, otofaji Cq aracılı inhibe edildikten sonra CAF destekli baş boyun kanseri (HNSCC) progresyonunda azalma gözlemlenmiştir. Otofaji inhibisyonu sonrası toplanan koşullandırılmış kültür ortamında saptanan IL6, IL8 ve diğer sitokinlerin seviyelerinin otofaji ile modüle edildiği görülmüştür. HNSCC'nin fare ksenograft modelinde, otofajik protein Vps34'ün farmakolojik inhibisyonu, sisplatinin antitümör etkinliğini artırmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda, HNSCC stromal hücrelerinde salgısal otofajinin malign progresyonu desteklediği sonucuna varılmıştır (New ve diğerleri, 2017).

Otofajiye bağlı salgılaşmanın hücre dışı matris bileşenleri ile bir ilişkisi olduğu görülmüştür. Pankreatik stromal matrisi sentezleyen pankreatik stellat hücrelerinde, otofajinin baskılanması matris sentezini azaltır. ATG7'nin baskılanması ile temel matris bileşenlerinin COL1A1/Collagen 1 α 1, FN1 (fibronektin 1) ve POSTN (periostin) ekspresyonlarının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Endo ve diğerleri 2017).

Otofajiye bağlı salgılar apoptotik ve nekrotik hücrelerde de farklılık göstermektedir. Nekrotik hücreler seçici olarak HMGB1 (high mobility group box 1) salgılaşarak, apoptotik hücreler bu bağışıklık uyarımını çekirdeklerinde tutarlar. Ayrıca, hücre dışı ATP salınımı, hasarlı bir bölgeye yönelik bir bağışıklık tepkisine aracılık etmek için bir kemokin görevi görür. Örneğin, radyoterapinin ardından ATP salınımı bağışıklık hücrelerini hasarlı bölgeye yönlendirir. Ancak ATG5'in inhibe edilmesi ATP salınımını engeller ve normal bir bağışıklık yanıtı oluşamaz. Kemoterapiyle tedavi edilen hücreler normalde benzer şekilde ATP salgılar ve otofaji blokajı farmakolojik olarak hasar görmüş hücrelerden ATP salınımını zayıflatır. Bu nedenle, otofajiye bağlı salgı, apoptotik veya nekrotik hücrelerden HMGB1 ve ATP salınımını düzenleyerek uygun hasar yanıtlarına aracılık eder (New and Thomas 2019).

Bu çok sayıda faktörün salgılanmasıyla, otofajiye bağlı salgı hem normal fizyolojiyi hem de patofizyolojiyi etkilemektedir. Hastalıklarda otofajiye bağlı salgılaşmanın anlaşılması öncelikle kanser, enfeksiyon ve nörodejenerasyon gibi üç hastalık sınıfında gelişmiştir (New and Thomas 2019).

2.5. Otofaji ve İmmün sistem İlişkisi

Otofaji aktivasyonu, bağışıklık hücrelerinin homeostazını, aktivasyonunu, çoğalmasını ve farklılaşmasını modüle ederek tümör gelişimini teşvik edebilir veya engelleyebilir. Otofaji,

CD8+ T hücrelerinin sitotoksik T lenfositlere (CTL) farklılaşmasını kolaylaştırır, T hücrelerinin T helper (Th) hücrelerine farklılaşmasını teşvik eder. Ayrıca otofaji, dentritik hücrelerin (DC) gelişimini ve B hücrelerinin plazma hücrelerinin farklılaşmasını sağlar. Makrofajlarda otofaji inhibisyonu M1 benzeri makrofaj polarizasyonunu teşvik ederek spesifik immün yanıtların artmasına neden olur, ancak otofaji aynı zamanda makrofajların immünosupresif M2 benzeri TAM'lara polarizasyonunu da artırır. Ayrıca otofaji, Miyeloid türevli baskılayıcı hücrelerin (MDSC'ler) büyümesini kolaylaştırır ve bu hücreler tümör gelişimini teşvik ederler (Jiang ve diğerleri, 2019).

Antitümör bağışıklığı artırmayı amaçlayan immünoterapötik stratejiler kanser tedavisi için oldukça ümit vericidir. Tümörlerde gelişen immün tolerans, kanser immünoterapisinde önemli bir engeldir. İmmünolojik tolerans molekülleri olarak CTLA-4 ve PD-1 otofaji yolakları aracılığıyla tümör immün toleransını düzenleyebilmektedir (Clark ve diğerleri, 2017, Shukla ve diğerleri, 2018).

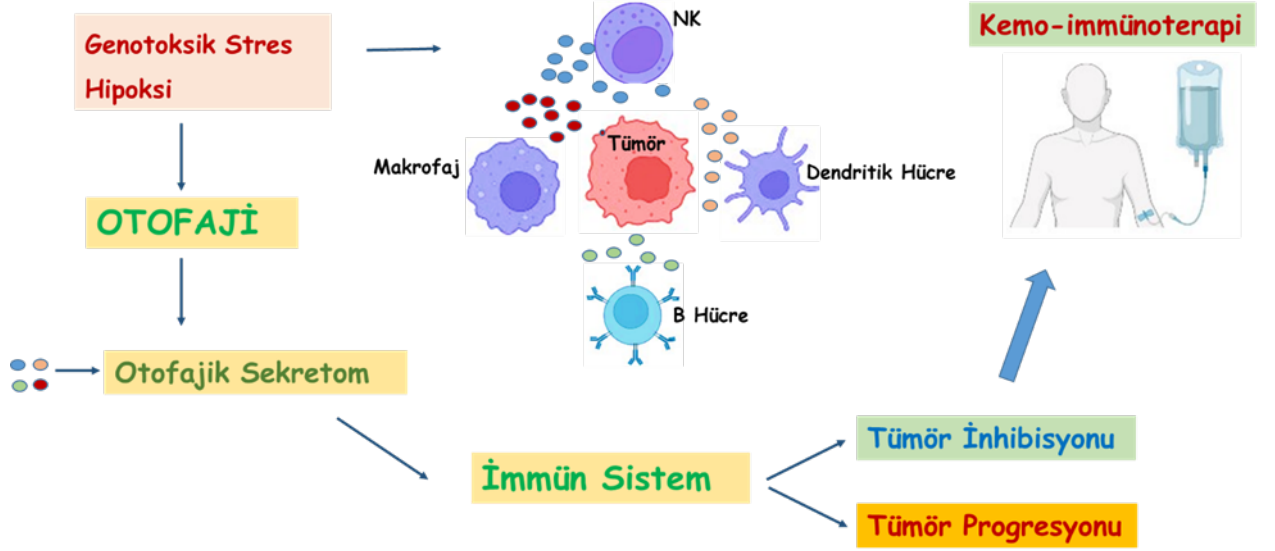
PD-1, T hücresi inhibitör kontrol noktası molekülü olarak görev yapar ve T hücresi toleransı geliştirerek, T hücresi proliferasyonunu inhibe eder ve tümör hücrelerinin yüzeyindeki PD-L1 ile etkileşime girerek tümör hücrelerinin tanınmasını engelleyip anti-tümör bağışıklığı baskılar. PD-L1/PD-1 etkileşimi, besin yoksunluğu nedeniyle yakındaki T hücrelerde otofajiyi indükleyebilir (Robainas ve diğerleri, 2017). PD-L1/PD-1 ekseninin anti-PD1 veya anti-PD-L1 antikorumları ile bloke edilmesi, tümör hücrelerinde otofajiyi indükler ancak anti-PD1 veya anti-PD-L1 antikorumları ile otofaji inhibitörlerinin kombin kullanılması tümör immünoterapisi yaklaşımlarında oldukça önemlidir (Clark ve diğerleri, 2017). Bir immün tolerans kontrol noktası olarak CTLA-4, kanser hastalarında etkili bir terapötik hedefdir. Melanomlarda, anahtar otofagozom bileşeni LC3 ve diğer otofaji aktivatörlerinin ekspresyonu CTLA-4 blokajının inhibisyonunu engelleyen MAGE-TRIM28 kompleksini baskılayarak CTLA-4 blokajını kolaylaştırır. Bu da otofaji indüksiyonunun anti-CTLA-4 'ün etkilerini artırabileceğini göstermektedir (Shukla ve diğerleri, 2018).

İmmünoterapinin anti-tümör etkilerini artırmak için otofajiyi hedefleyen tedaviler, ileriye dönük önemli tedavi stratejileri haline gelmiştir. Otofaji, immün hücreleri ve sitokinlerin salınımını etkileyerek bağışıklık tepkisini arttırabilmekte yada baskılayabilmektedir.

Otofaji, MHCI ve MHCII sunumu için antijen işlemede rol oynar. Yarı sentetik E vitamini türevi alfa-tokoferiloksiasetik asit (α -TEA), tümör antijenlerinin CD8+ T hücrelere MHCI aracılı sunumunu güçlendirmek için otofajiyi uyarabilir ve bu da anti-tümör immün yanıtlarını güçlendirerek immünoterapi için bir adjuvan strateji olarak görülmektedir (Hahn

ve Akporiaye, 2013). Başka bir çalışmada ise otofajinin DC bazlı aşılarda antijen sunumunu artırmadaki etkileri gösterilmiştir. Laktozillenmiş N-Alkil polietilenimin kaplı süper paramanyetik demir oksit (SPIO) nanopartiküllerinin indüklediği otofaji DC'lerin olgunlaşmasını indükleyerek DC'lerin aşı fonksiyonlarını arttırmıştır (Shen ve diğerleri, 2018). Ayrıca otofaji, tümör antijenini kodlayan DNA aşılarda etkinliğini de artırabilmektedir. Otofaji kargo reseptörü SQSTM1/p62 bir kanser antijeni olarak görülmektedir. P62 kodlayan DNA aşısının anti-tümör ve anti-metastatik aktiviteleri olduğu rapor edilmiştir (Gabai ve Shifrin, 2014).

Otofaji, immünolojik hücre ölümü (ICD) indükleyicileri (doksorubisin, mitoksantron, oksaliplatin vb.) uygulandığında da aktive olmaktadır. Kolon tümörlerinde mitoksantron veya oksaliplatin tedavisinin tümör hücrelerinde otofajiyi indükleyerek dendritik hücrelerin ve T hücrelerinin infiltrasyonunu arttırdığı bulunmuştur (Michaud ve diğerleri, 2011). Başka bir çalışmada, hipoksi kaynaklı otofajinin tümör hücrelerinde fosfo-STAT3'ü düzenleyerek CTL aracılı tümör hücre lizisini bozduğu gösterilmiştir. Ancak hipoksik hücrelerde otofaji inhibisyonu ile STAT3'ün fosforilasyon seviyesinin azalmadığı ve buna bağlı olarak CTL aracılı tümör hücre lizisinin geri kazanıldığı görülmüştür (Noman ve diğerleri, 2012). Hipoksi ile indüklenen otofaji aynı zamanda NK kaynaklı Granzim B (GrzB)'yi degrade eder ve biriken HIF-2 α çekirdeğe aktarılıp otofaji sensörü ITPR1'in ekspresyonunu indükleyerek NK aracılı hücre ölümünün bozulmasına ve immünoterapi etkilerinin azalmasına yol açar (Robainas ve diğerleri, 2017). Bir başka çalışmada yüksek doz IL-2'nin otofaji inhibitörü Cq ile birlikte kullanılmasının metastatik karaciğer tümörü modelinde immün hücre proliferasyonunu ve infiltrasyonunu artırarak tümör büyümesini inhibe ettiği ve serum IFN γ , IL-6 ve IL-18 seviyelerinde artış olduğu bildirilmiştir (Liang ve diğerleri, 2012). PI3K inhibitörü 3-MA, Vps34 ve PI3K γ üzerinde etkilidir ve oral skuamöz hücreli karsinomlarda (OSCC) IL-24 ile indüklenen apoptozu önemli ölçüde artırır; bu da otofaji inhibitörleri ve IL-24 kombinasyonunun tümör immünoterapisi için umut verici bir yaklaşım olduğunu göstermektedir (Li ve diğerleri, 2015). Diğer bir çalışmada ise SB02024 veya SAR405 inhibitörleri kullanılarak VPS34 kinaz aktivitesinin baskılanması, tümör mikroçevresi (TME)'de CCL5, CXCL10 ve IFN γ seviyelerinde artışa neden olarak melanom ve kolorektal karsinom modellerinde yüksek seviyelerde NK hücre ve T hücre tümör infiltrasyonuna yol açmıştır (Noman ve diğerleri, 2020).



Şekil 3. Otofajik Sekretom ve İmmünite

2.6. Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer: NK)

2.6.1. NK Hücre Biyolojisi

NK hücreleri, doğal immünite hücrelerinin tanımlanan ilk alt tipidir ve virüs ile enfekte hücelere ve/veya transforme hücelere karşı efektör yanıtlar verirler. Büyük oranda dolaşımda bulunan ve periferal kan mononükleer hücrelerinin (PBMC'ler) yaklaşık %5-10'unu oluşturan NK hücreleri, kemik iliği ve dalak gibi lenfoid dokularda bulunur (Cherrier ve diğerleri, 2018). Gelişim sırasında, immünoresptör tirozin inhibitör motifleri (ITIM'ler) ifade eden NK hücrelerinin majör histo-uyumluluk kompleksi-I (MHC-I) ile etkileşimini tanımlayan süreç, NK hücrelerinin sağlıklı hücelere saldırmasını engellemeye yardımcı olur. Tümör hücreleri CD8+ T hücresi aracılı sitotoksiteden kaçmak için her zaman MHC-I'i düşük seviyelerde eksprese etmektedir. ancak bu durum NK hücrelerinin aktive olmasını sağlar (Chiossone ve diğerleri, 2018).

NK hücrelerinin en iyi karakterize edilmiş iki alt tipi $CD56^{bright}CD16^{-}$ ve $CD56^{dim}CD16^{+}$ popülasyonlarıdır. $CD56^{bright}$ hücreler periferal kanda daha düşük oranda bulunur (dolaşımdaki NK hücrelerinin %90'ı $CD56^{dim}$ 'dir), ancak dokuda yerleşik NK hücreleri ağırlıklı olarak $CD56^{bright}$ NK hücreleridir. $CD56^{bright}$ NK hücreleri güçlü sitokin

üreticileridir ve IL-15 gibi pro-inflamatuar sitokinlerle indüklenmedikleri sürece zayıf sitotoksiste gösterirler. Buna karşın, CD56^{dim} NK hücre popülasyonu, enfekte ve/veya malign hücrelerin öldürülmesine granzim B ve perforin içeren sitolitik granüllerin ekzositozu yoluyla aracılık eder ve bu da hedef hücrenin apoptozunu ile sonuçlanır (Myers ve Miller, 2021).

2.6.2. NK Hücre Aktivatör ve İnhibitör Reseptörleri

B hücreleri ve T hücrelerinin aksine, NK hücreleri somatik olarak düzenlenmiş antijen reseptörlerini değil, aktive edici reseptörler ve inhibe edici reseptörlerin stokastik kombinasyonlarını ifade ederler; bu çeşitli reseptörler aracılığıyla uyarıcı ve baskılayıcı sinyallerin net dengesi, hedef hücrelere karşı bir yanıt veya toleransla sonuçlanır. CD16 olarak da bilinen düşük afiniteli IgG Fc reseptörü III (FcγRIII), NK hücreleri tarafından ifade edilen en güçlü aktive edici reseptördür. Oponize hücreler (fagositler tarafından opsoninlerle işaretlenmiş patojenler) üzerindeki IgG antikorlarının Fc bölgeleri CD16 molekülleri ile çapraz bağlanır ve böylece antikora bağlı hücre aracılı sitotoksiste (ADCC) yoluyla NK hücreleri aktive olur (Barrow ve diğerleri, 2019).

CD16'ya ek olarak, NKp30, NKp40, NKp44 ve NKp46 dahil olmak üzere doğal sitotoksiste reseptör ailesinin üyeleri NK hücrelerinde aktivasyon sinyallerini indükler, bu reseptörler sitokin üretimini ve hücre ölümünü güçlendirmek için viral, bakteriyel ve/veya tümörle ilişkili ligandlara doğrudan bağlanır (Barrow ve diğerleri, 2019). NKG2D terapötik hedefler olarak önemli translasyonel etkileri olan aktive edici reseptördür. NKG2D, MHC sınıf I polipeptit ilişkili sekans A (MICA), MICB ve ULBP protein ailesi dahil olmak üzere tümörler ve viral olarak enfekte olmuş hücreler üzerinde bulunan ligandlara bağlanan homodimerik C-tipi lektin ailesi reseptörüdür (Zingoni ve diğerleri, 2018).

DNAX aksesuar molekülü-1 (DNAM-1), NK hücrelerinde ifade edilen diğer bir aktivatör reseptördür. DNAM-1 ayrıca CD8⁺ T hücreleri ve miyeloid hücreler dahil olmak üzere diğer immün hücrelerde de ifade edilir. DNAM-1, tümör hücreleri ve virüsle enfekte olmuş hücrelerde ifade edilen CD155 (poliovirüs reseptörü) ve CD122'yi (nektin yapışma molekülü) tanır ve bağlanır (Wu ve diğerleri, 2021).

NK hücreleri ayrıca immünolojik öz-tolerans ve aktive edici reseptörlerden gelen uyarıcı sinyallere karşı koyan negatif geri besleme mekanizmaları sağlayan çeşitli inhibitör reseptörleri de ifade eder. NK hücre inhibitör reseptörlerinin ligandları genellikle sınıf I HLA

molekülleridir (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E ve HLA-G). Bu reseptörlerin çoğu, aktive edici reseptör sinyalinin ve dolayısıyla NK hücre aktivasyonunu azaltan membran proksimal fosfatazlar için bağlanma bölgeleri olarak hizmet eden ITIM'ler içeren hücre içi alanlara sahiptir.

İmmünoglobulin benzeri reseptör (KIR) ailesi 14 polimorfik reseptörden oluşur: altısı aktive edici (2DS1-2DS5 ve 3DS1), yedisi inhibe edici (2DL1-2DL3, 2DL5 ve 3DL1-3DL3) ve biri hem aktive edici hem de inhibe edici fonksiyonlara sahiptir (2DL4). NKG2A, CD94-NKG2 C-tipi lektin ailesine ait bir tip II transmembran reseptörüdür. KIR, HLA-C ifadesini tanıırken, NKG2A diğer hücrelerdeki klasik olmayan HLA-E ifadesini tanıır (Kumar, 2018).

NK hücre aktivatör, inhibitör ve ko-reseptörleri

Aktivatör Reseptörler	İnhibitör Reseptörler	Ko-reseptörler
NKp30	NKG2A/KLRD1	CD59
NKp44	KIR2DL1	CD352
NKp46	KIR2DL2/3	NKp80
NKG2C	KIR2DL5	DNAM-1
NKG2D	KIR3DL1	2B4
CD16	KIR3DL2	
KIR2DS1	LAG-3	
KIR2DS2/3	PD-1	
KIR2DL4	Tactile	
KIR2DS4	TIGIT	
KIR2DS5	TIM-3	

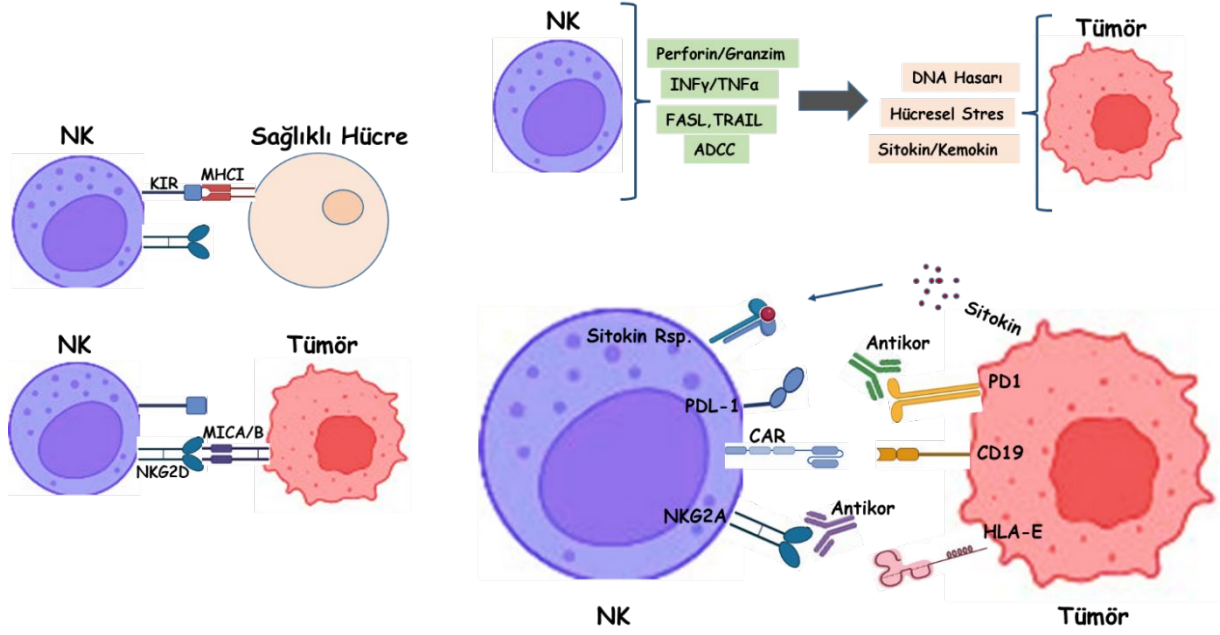
2.6.3. NK Hücre Aracılı Hücresel Sitotoksosite

NK hücreleri, sitoplazmalarında tümör hücreleri de dahil olmak üzere belirli hedefleri öldürmek için kullanılacak bir dizi sitotoksik granül üretir ve depolar. Bu granüller farklı sitolitik efektör moleküller ve bunların granüller içinde korunmasını, hedef hücre sitoplazmasına girişini ve aktivasyonunu destekleyen proteinler içerir. Sitolitik moleküller, hedef hücrede salındıktan sonra kaspazlar da dahil olmak üzere çeşitli proteinleri parçalayan

ve hücrenin ölümüne yol açan bir dizi olayı tetikleyen farklı proteolitik enzimleri (granzimler) içerir. NK hücrelerinin sitolitik granülleri içinde beş tip granzim depolanabilir. Granzim B ve A (GrzB ve GrzA) en çok çalışılanlardır ve tümör hücresi ölümünün indüklenmesinde önemli bir rol oynarlar. Granzim K, M ve H (GrzK, GrzM, GrzH) ise GrzB ve GrzA'nın aktivitesini arttırmada rol oynar (Prager ve Watzl, 2019). Granzim B, hedef hücreye girdikten sonra apoptoz başlatıcı kaspaz-8'in yanı sıra kaspaz-3'ü de aktive ederek kaspaz bağımlı apoptozu indükler. Granzim B ayrıca pro-apoptotik protein Bid'in proteolitik kesilmesi ile mitokondriden sitokrom C salınımını indükleyerek kaspaz bağımsız bir şekilde de apoptozu indükleyebilmektedir (Abel ve diğerleri, 2018).

Sitolitik granüller perforinleri de içerir. Perforinler, ökaryotik veya prokaryotik hücrelerde porlar oluşturabilen kompleman faktörlerini ve farklı bakteriyel toksinleri içeren Membran Atak Kompleksi/Perforin/Kolesterol Bağımlı Sitolizin (MACPF/CDC) proteinleri ailesine aittir. Özellikle perforinler, ökaryotların kolesterol bakımından zengin membranlarına bağlanır, bu nedenle etkilerini bakteriler üzerinde değil, özellikle virüs enfekte hücreler ve tümör hücreleri üzerinde gösterirler (Cantoni ve diğerleri, 2020). Hedef hücrenin tanınması ve sinaps oluşumundan sonra sitotoksik granüller birleşir ve içeriklerini sinaptik boşluğa bırakır. Salınan perforinler hedef hücre yüzey membranına bağlanır, polimerize olur ve granüllerden salınan granzimlerin ve diğer moleküllerin girişini sağlayan porlar oluşturur (Law ve diğerleri, 2010).

Bir diğer mekanizma ise hedef hücrenin yüzeyinde bulunan ve ekstrinsik apoptotik yolu başlatan ölüm reseptörlerinin aktivasyonunu içerir. Bu reseptörler TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand-reseptörü (TRAIL-R) ve Fas'ı (CD95) içerir. Bu reseptörler, NK hücreleri üzerinde bulunan Fas ligand (FasL) (CD95L) ve TRAIL gibi ligandlar tarafından aktive edilirler. Ölüm reseptörlerinin ifadesi, NK hücrelerinde IFN- γ salınımını arttırarak pro-apoptotik sinyal yollarını başlatır (Abel ve diğerleri, 2018).



Şekil 4. NK Hücreleri

2.6.4. NK Hücrelerinde Efektör İmmün Yanıt

Aktive olmuş NK hücreleri IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-10, IL-5 ve IL-13 gibi çok çeşitli sitokinler ve MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8 ve CCL5 gibi kemokinler salgılar. IFN- γ , NK hücreleri tarafından salgılanan en güçlü efektör sitokinlerden biridir ve antiviral, antibakteriyel ve antitümör aktivitede önemli bir rol oynar. IFN- γ 'nın kaspaz, FasL ve TRAIL ekspresyonunu modüle ettiği ve antitümör immün yanıtı aktive ettiği bilinmektedir. Dendritik hücreler, makrofajlar ve nötrofiller tarafından salgılanan IL-12, NK hücrelerinde IFN- γ üretimini indükler ve bu indüksiyon TNF- α , IL-1 ve IL-18 ile daha da artırılabilir. Buna karşılık, TGF- β NK hücrelerinde IFN- γ , TNF- α ve GM-CSF salınımı engeller. IL-10, IL-18 ile birlikte NK hücre proliferasyonunun, sitotoksik fonksiyonunun ve IFN- γ üretiminin güçlü bir indükleyicisidir. IL-12'nin tümör metastazını NKG2D ve perforin bağımlı şekilde inhibe ettiği bilinmektedir. IL-21'in melanom ve renal hücreli karsinomda NK hücre aktivasyonunu indüklediği ve ayrıca NKG2D'ye bağımlı bir şekilde çeşitli murin tümörlerinin reddine aracılık ettiği gösterilmiştir. IL-15'in NK hücre fonksiyonunu aktive ettiği ve tümör büyümesini baskıladığı bilinmektedir. IL-2/IL-15 reseptörü üzerinden gelen sinyaller NK

hücre homeostazı ve in vivo kalıcılık için kritik öneme sahiptir. Ayrıca, SOCS1, SOCS3 ve CISH dahil olmak üzere IL-2/15 sinyalinin birden fazla negatif düzenleyicisi tanımlanmıştır. Bu çalışmalar, NK hücre sitotoksik fonksiyonunun yanı sıra, NK hücreleri tarafından salgılanan sitokinlerin de antitümör bağışıklığa önemli bir destek sağladığına işaret etmektedir. Benzer şekilde, tümör mikroçevresindeki diğer bağışıklık hücreleri veya stromal hücreler tarafından salgılanan sitokinler de NK hücrelerinin antitümör işlevini olumlu veya olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Paul ve Lal, 2017).

2.6.5. NK Hücre Kaynakları

Tedavide kullanılan NK hücreleri göbek kordon kanı (UKK), periferik kan (PK), insan embriyonik kök hücreleri (EKH'ler) veya indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH'ler) gibi çeşitli kaynaklardan ve NK-92 gibi hücre hatlarından elde edilebilmektedir. Bugüne kadar, NK hücre klinik çalışmalarının çoğu UKK-NK hücreleri, PK-NK hücreleri ve lenfoma türevi NK hücre hattı NK-92'yi kapsamaktadır (Heipertz ve diğerleri, 2021).

Göbek kordonu, kanser hücrelerine karşı yüksek litik potansiyele sahip sitotoksik CD56⁺CD16⁺ NK hücrelerinin bol miktarda bulunduğu bir kaynaktır. UKK-NK hücreleri doğumdan sonra göbek kordonundan ven ponksiyonu yoluyla alınıp, yoğunluk gradiyenti santrifüjü ile saflaştırılarak kordon kanından izole edilir. Alternatif olarak, CD34 hematopoetik kök hücreler de UKK'dan izole edilebilir ve NK hücrelerine farklılaştırılabilir. UKK, sağlıklı bir donörden izole edilip birden fazla doz üretme potansiyeline sahip, kolayca bulunabilen bir kaynaktır. Ayrıca, UKK-NK hücreleri PK-NK hücrelerine göre daha genç ve daha proliferatif bir fenotipe sahiptir (Berrien-Elliott ve diğerleri, 2023; Kundu ve diğerleri, 2021).

PK-NK hücreleri CD3/CD19 pozitif hücrelerin uzaklaştırılması (~%50 CD56⁺CD3⁻) veya CD3 pozitif hücrelerin uzaklaştırılması ve CD56 pozitif hücrelerin seçilimi (>%90 CD56⁺CD3⁻) ile zenginleştirilebilir. PK-NK hücreleri ile ilgili zorluklar arasında donörden donöre değişkenlik ve tek bir aferezden elde edilebilecek sınırlı sayıda NK hücresi olmasıdır. Ancak PK-NK hücrelerini çoğaltmak için birden fazla strateji geliştirilmiştir (Berrien-Elliott ve diğerleri, 2023). PK-NK hücreleri farklı sitokinlerle uyarılarak ve otolog veya allojenik besleyici hücrelerle birlikte kültüre edilerek *ex vivo* ortamda çoğaltılabilmektedir. Antitümör

aktivitelerini daha da artırmak için, farklı tümör antijenlerine karşı kimerik antijen reseptörleri ile genetik modifikasyonlar yapılabilmektedir (Granzin ve diğerleri, 2017).

Pluripotent kök hücreler (iPKH veya EKH), tedavi amaçlı NK hücrelerinin üretilmesi için sınırsız bir kaynaktır. iPKH veya EKH'den farklılaştırılan NK hücreleri IL-3, IL-7, IL-5, kök hücre faktörü (SCF), fms benzeri tirozin kinaz reseptör-3 ligandı (FLT3L) kullanılarak stromal besleyici tabakalar üzerinde farklı iPKH hücre hatlarından üretilir. Bu şekilde üretilen NK hücreleri homojendir, CD56, KIR, CD16, NKp44, NKp46'yı ifade eder ve tümör hücrelerini öldürebilme kapasitesine sahiptir. EKH'ler de CD34⁺CD45⁺ hücre seleksiyonu ardından ve IL-3, IL-5, IL-7, FLT3L ve SCF besleyici tabakaları üzerinde kültüre edilerek NK hücrelerine farklılaştırılabilmektedir (Berrien-Elliott ve diğerleri, 2023; Zhu ve Kaufman, 2019).

Mevcut NK kanser hücre hatları arasında sadece NK-92 hücre hattı çeşitli tümörlerde antitümör aktivite göstermiş ve pre-klinik çalışmalarda iyi sonuçlar vermiştir. Ayrıca, NK-92 hücre hattı klinik faz denemeleri için FDA onayı almıştır. NK-92 hücre hattı iyi karakterize edilmiştir ve cGMP üretimi için sağlam klinik protokoller bulunmaktadır. Bu hücreler %4-%95 arasında değişken bir verimlilikle genetik olarak tasarlanabilirler. NK-92 hücrelerinde KIR ekspresyonu yoktur ve bu nedenle inhibe olma olasılıkları daha düşüktür, bu da onları hücre tedavide kullanımı için çekici kılar. Ancak dezavantaj ise, CD16 ekspresyonu eksikliği nedeniyle, NK-92 hücrelerinin ADCC yoluyla hücre öldürmeye aracılık etme yeteneğinden yoksun olmasıdır ve NK-92 hücre hattı lenfoma türevli olduğu için infüzyondan önce ışınlama gerektirmektedir bu da in vivo da kalıcılığın düşmesine neden olur (Williams ve diğerleri, 2017).

2.6.6. NK Hücrelerinde Genetik Modifikasyon ve Kanser İmmünoterapisinde Kullanımı

NK hücreleri graft-versus host hastalığı (GvHD) veya sitokin salınım sendromu (CRS) gibi ciddi toksisitelere aracılık etmez ve HLA eşleşmesi gerektirmez. Ancak NK hücrelerinin solid tümörlerdeki etkisi kısıtlıdır. Bu durum NK hücrelerinin tümör infiltrasyon zorluğundan, in vivo da kısa ömürlü olmasından, bozulmuş NK hücre aktivitesinden ve immünosupresif tümör mikroçevresi (TME)'den kaynaklanmaktadır. Bu dezavantajların üstesinden gelmek

için NK hücrelerinde genetik modifikasyonlara yönelik çalışmalar yapılmıştır (Mantesso ve diğerleri, 2020).

Kimerik antijen reseptörleri (CAR'lar), hücre dışı antijen tanıma alanı ve hücre aktivasyonunu tetikleyen hücre içi sinyalizasyon parçaları içeren sentetik füzyon proteinleridir. Başlangıçta T hücreleri için tasarlanan CAR'lar (CD3 ve T hücresi ko-stimülatör moleküllerini içeren) CAR NK hücrelerinin üretimi için de kullanılmış ve iyi sonuçlar elde edilmiştir (Schmidts ve diğerleri, 2019). Genetik veya epigenetik varyasyonlara sahip heterojen tümör hücreleri aktive edici reseptörleri baskılayarak NK hücre sitotoksitesininin kaçabilmektedir. Ancak CAR-NK hücreleri nüks insidansını azaltmayı ve tam remisyona ulaşmayı amaçlayan yeni terapötik bir seçenek olarak kabul edilmiştir. Kloess ve arkadaşları tarafından akut miyeloid lösemi (AML) immünoterapisi üzerine yapılan prelinik çalışmada, CD123-CAR-NK-92 hücrelerinin, donör kaynaklı CD123-CAR-NK hücrelerine göre daha yüksek seviyelerde granzim ve interlökin salgıladığı ve yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Kloess ve diğerleri, 2019).

Otolog ve allojenik donör kaynaklı PK-NK hücreleri ve CAR-PK-NK hücreleri en çok akut lösemi tedavisinde etkili olurken, solid tümörlere karşı nispeten minimal aktivite göstermektedir. Quintarelli ve arkadaşları tarafından yapılan prelinik bir çalışmada, CD19-CAR ile transdüklenmiş PK-NK hücrelerinin B-hücresi öncüsü akut lenfositik lösemiye (Bcp-ALL) karşı güçlü sitotoksitesiteye aracılık ettiği ve genetik modifikasyondan sonra tüm doğal NK koreseptörlerinin işlevini koruduğu gösterilmiştir (Quintarelli ve diğerleri, 2020).

Hematolojik malignansiler dışında, CAR-NK hücreleri meme kanseri, yumurtalık kanseri, pankreas kanseri, kolon kanseri, glioblastoma, hepatosellüler karsinoma, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinoma (HNSCC) dahil olmak üzere çok sayıda solid tümörde prelinik olarak test edilmiş ve terapötik etkisi olduğu görülmüştür (Zhang ve diğerleri, 2022).

Tümör hücrelerinin NK hücresi aracılı tanınması ve lizisi, NK hücresi aktive edici reseptörleri NKG2D ve DNAM-1 ile tümör hücrelerindeki ligandlarının ekspresyonları ile doğrudan bağlantılıdır. DNAM-1 için PVR/CD155 ve Nectin-2/CD112 ligandları solid tümör hücrelerinde eksprese edilir ve normal doku hücrelerinde ekspresyonu düşüktür. Yapılan bir çalışmada PB NK hücreleri kullanılarak CD3 zeta zinciri ve 2B4 ve kostimülatör molekülü içeren DNAM-1 tabanlı kimerik reseptörü eksprese eden NK hücreleri üretilmiştir. Çalışmada buna ek olarak, p53 işlevlerini geri kazandırabilen ve immünomodülatör etkisi olduğu bilinen MDM2 hedefli bir ilaç olan Nutlin-3a'nın, insan nöroblastom (NB) LA-N-5 ve SMS-KCNR hücre hatlarında DNAM1-NK hücreleri ile birlikte kullanımının etkileri araştırılmıştır. Nutlin-

3a ile muamele edilen LA-N-5 ve SMS-KCNR hücrelerinin DNAM1-NK hücrelerine karşı önemli ölçüde duyarlı olduğu bulunmuştur (Focaccetti ve diğerleri, 2022).

DNAM-1 ligandlarının (CD112 ve CD155) yüksek oranda ifade edildiği sarkoma eksplantları ve sarkoma hücre hatlarında yapılan bir çalışmada DNAM-1 ve NKG2D'nin genetik modifikasyonu yapılan NK-92 hücrelerinin etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar DNAM-1 ve NKG2D'nin aşırı ekspresyonunun, sarkom ve diğer tümör hücreleri üzerinde sırasıyla yaygın ligandlar CD112 ve CD155 veya MICA/B ve ULBP1-5 ile etkileşimi güçlendirerek in vitro etkili anti-sarkom yanıtlarına neden olduğunu göstermektedir. NK hücrelerini aksi takdirde etkisiz kalacakları tümör hedeflerine karşı bu şekilde silahlandırmak, kolayca kliniğe aktarılabilir ve sarkom tedavisini önemli ölçüde iyileştirme potansiyeline sahip umut verici yeni bir hücre immünoterapi stratejisi sağlamaktadır (Sayitoglu ve diğerleri, 2020).

Yang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada TGF- β tip II reseptörünün (DNT β R2) mutant formunu ifade edecek şekilde genetik olarak modifiye ederek TGF- β 'nin baskılayıcı etkilerine dirençli bir NK-92 hücre hattı oluşturmuştur. Bu TGF- β duyarsız NK-92 hücrelerinin akciğer kanseri modeli oluşturulan farelere adoptif transferi, infüze edilen hücrelerden salınan IFN- γ seviyelerinin artmasıyla ilişkilendirilmiş ve *wild type* NK-92 ile infüze edilen farelere kıyasla sağkalım oranlarının artmasıyla sonuçlanmıştır (Yang ve diğerleri, 2013).

NK hücre fonksiyonu için önemli bir hedef olan CISH, NK hücrelerinin malign hücreleri öldürme yeteneğinde azalmaya ve JAK-STAT sinyal yolunun down-regüle olmasına neden olur. CRISPR/Cas9 kullanılarak iPKH'lerde CISH nakavt edilerek farklılaştırılan NK hücreleri in vivo ortamda uzun süreli kalıcılık ve akut miyeloid lösemi için gelişmiş antitümör aktivite sergilemiştir (Daher ve diğerleri, 2021).

NKG2A reseptörünün bloke edilmesi, NK hücrelerinin efektör fonksiyonunu artırır. Berrien-Elliott ve arkadaşları, NK hücrelerinden NKG2A'yı silmek için CRISPR/CAS9 gen düzenlemesini kullanmışlardır. Kontrol NK hücrelerine kıyasla NKG2AKO NK hücrelerinin HLA-E+ K562 lösemi hücrelerine karşı daha etkili olduğu görülmüştür (Berrien-Elliott ve diğerleri, 2019).

2.7. Otofajinin Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer: NK) Üzerindeki Etkisi

Solid tümörlerin tedavisi için etkili bir tedavi olan immünoterapi uygulamalarının önündeki en büyük engel tümör mikro çevresinin (TME) immün yanıt üzerindeki negatif etkileridir. Yapılan çalışmalar, hipoksik bir mikro çevrenin tümör hücrelerini birden fazla mekanizma ile antitümör immün yanıtı koruduğunu göstermektedir (Lee ve diğerleri, 2010). Son zamanlarda tümör hücrelerinde hipoksik stresin otofajiyi indüklediği ve bu durumun immün yanıtlar üzerinde etkili olabileceği üzerine durulmaktadır.

Baginska ve diğerleri, yaptığı bir çalışmada, hipoksi ile indüklenen otofajinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinin PK-NK aracılı lizise duyarlılığını *in vitro* olarak azalttığı gösterilmiştir. Bu durumun nedenin NK hücreleri tarafından hedef hücrenin tanınmasıyla ilgili olmayıp, hipoksik hücrelerin otofagozomlarında NK hücrelerinden salınan Granzim B'nin degrade olmasıyla ilgili olduğu bildirilmiştir. Otofajinin Beclin1 (BECN1)'in hedeflenerek inhibe edilmesi, hipoksik hücrelerde Granzim B seviyelerini arttırmış ve NK aracılı tümör hücresi lizisini kolaylaştırarak *in vivo* tümör regresyonunu indüklemiştir. Sonuç olarak, otofaji hipoksik tümör hücrelerinin NK aracılı lizise direncinin altında yatan bir mekanizma olarak vurgulamaktadır (Baginska ve diğerleri, 2013).

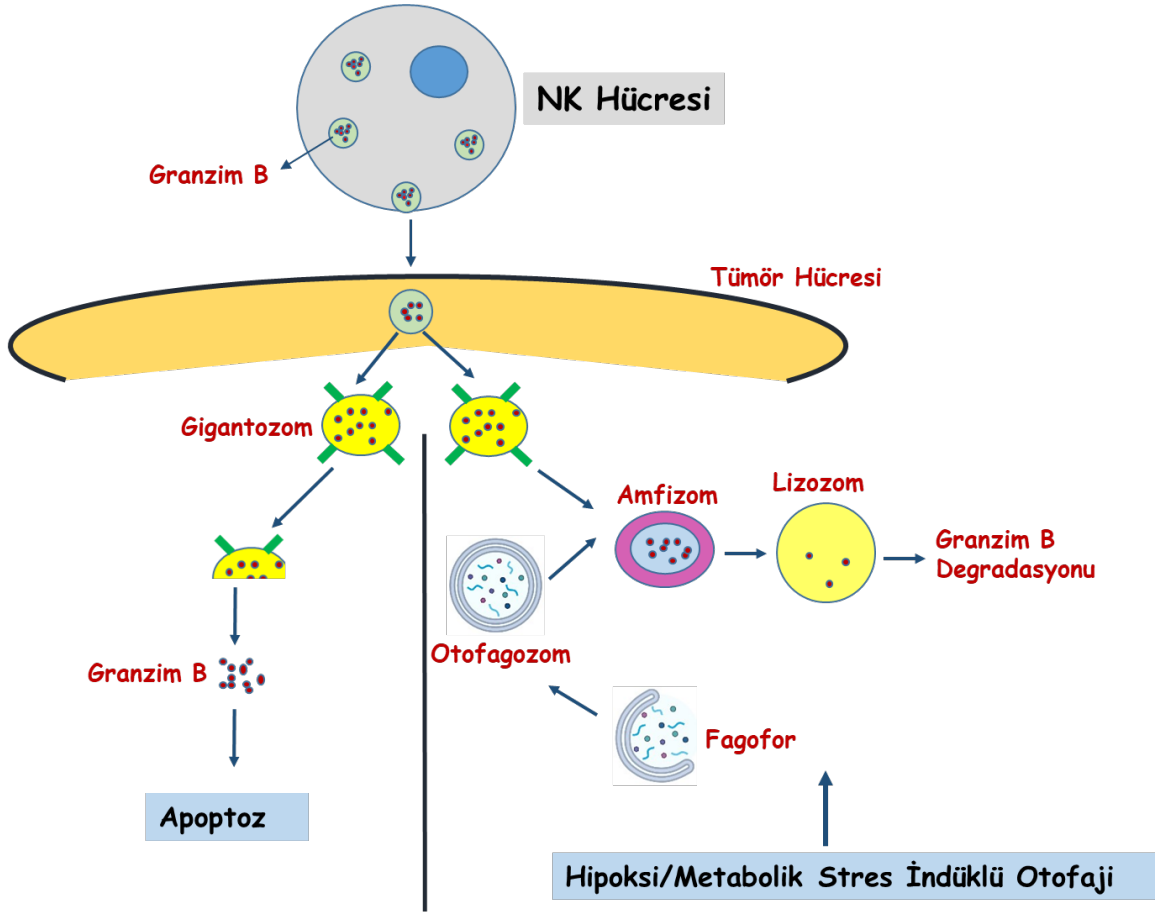
Başka bir çalışmada Beclin1 (BECN1)'in hedeflenmesinin PK-NK hücrelerinin melanomlara infiltrasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. BECN1'in hedeflenmesinin tümör büyümesini engellemesinin yanı sıra, fonksiyonel NK hücrelerinin melanom tümörlerine infiltrasyonunu arttırdığı görülmüştür. Otofaji baskılanmış tümörlerde NK hücrelerinin tümör yatağına yönlendirilmesinin CCL5 artışı ile ilgili olduğu bulunmuştur. CCL5'in up-regülasyonunun, fosfataz PP2A katalitik aktivitesinin bozulması ve ardından JNK aktivasyonunu içeren bir mekanizma ile transkripsiyon faktörü c-Jun'un aktivasyonu yoluyla gerçekleştiği gösterilmiştir. BECN1'e benzer şekilde, ATG5, p62/SQSTM1 gibi diğer otofaji genlerinin hedeflenmesi veya otofajinin farmakolojik olarak klorokin ile inhibe edilmesi de melanom hücrelerinde CCL5 ekspresyonunu indüklemiştir. Klinik olarak, melanom hastalarında CCL5 ile NK hücre belirteci NKp46 ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon bulunmuş ve CCL5'in yüksek ekspresyon seviyesi melanom hastalarının sağkalımında önemli bir iyileşme ile ilişkilendirilmiştir (Mgrditchian ve diğerleri, 2017).

Yao ve ark. yaptığı çalışmada ise doğal ürün rocaglamide'in (RocA) küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) PK-NK hücre aracılı tümör lizisinin *in vitro* ve *in vivo* olarak arttığı gösterilmiştir. Bu etki NK hücrelerinin hedef hücreleri tanınması veya ölüm reseptörlerinin ekspresyonu ile ilişkili olmayıp, RocA'nın otofajiyi inhibe ederek NSCLC hücrelerinde NK hücrelerinden salınan Granzim B seviyelerini geri kazandırmasıyla ilgilidir. Ayrıca, RocA'nın hedefinin otofaji başlatılması için gerekli olan ULK1 olduğu ve ULK1

translasyonunu engelleyerek otofajiyi baskıladığı belirlenmiştir. Sonuç olarak RocA'nın NK hücre aracılı sitotoksisiteye karşı otofajik bağışıklık direncini engelleyebileceği savunulmuştur (Yan ve diğerleri, 2022).

Sitotoksik T lenfositlerin (CTL) ve NK hücrelerin aracılık ettiği, tümör hücrelerinin ortadan kaldırılması çoğunlukla wt p53 proteini tarafından düzenlenen Granzim B apoptotik yolağına bağlıdır. İnsan tümörlerinde sıklıkla bulunan TP53 inaktive edici mutasyonlar Granzim B aracılı hücre ölümüne müdahale edebileceğinden, p53 mutasyonlu tümör hücrelerinde wtp53 fonksiyonunu yeniden etkinleştirmek için geliştirilen küçük moleküllerin kullanımı, CTL veya NK hücrelerinin Granzim B salınımı üzerinde etkili olabilmektedir. Bu çalışmada, küçük molekül CP-31398 kullanılarak p53 mutasyonlu meme kanseri hücrelerinde wt benzeri bir p53 işlevinin farmakolojik olarak yeniden etkinleştirilmesinin, meme kanseri hücrelerinin NK aracılı lizise karşı duyarlılıklarının arttığı gösterilmiştir. Bu durum, sestrin-AMPK-mTOR yolu ve ULK eksenini aracılığıyla otofajinin p53 aracılı indüksiyonuna bağlıdır. CP31398 ile indüklenen otofaji, otofagozomlarda Bcl-XL ve XIAP dahil olmak üzere çeşitli anti-apoptotik proteinleri sekrete ederek Granzim B aracılı mitokondriyal dış membran permeabilizasyonunu, kaspaz-3 aktivasyonunu ve Granzim B veya NK hücreleri ile indüklenen apoptozu kolaylaştırmıştır. Elde edilen sonuçlar, kombin immünoterapötik yaklaşımlarda potansiyel uygulamalarla birlikte, p53'e bağlı otofaji indüksiyonu yoluyla p53 mutasyonlu meme kanseri hücrelerinin sitotoksik lenfosit aracılı lizisini artırmanın yeni bir yolu olabileceğini vurgulamaktadır (Chollat-Namy ve diğerleri, 2019).

Otofajinin NK hücreleri üzerindeki etkisini araştıran az sayıda alışma, Granzim B'nin otofajik degradasyona uğraması sonucu NK hücrelerinin tümör hücrelerini öldürme kabileyetini azalttığını göstermektedir.



Şekil 5. Otofaji ve NK Hücreleri

2.8. Çalışmanın Amacı

Otofaji hücre hasarını önleyen ve enerji ya da besin azlığı durumunda hayatta kalmayı sağlayan ve çeşitli hücrel stres koşullarında uyarılan hücrel bir yanıt mekanizmasıdır. Otofaji hücre metabolizmasını, genomik bütünlüğü ve hücre sağ kalımını sürdürmek için proteinleri ve hasarlı organelleri lizozomal bozulma için hedefler. Günümüzde otofaji modülasyonunun kanser başta olmak üzere çeşitli insan patolojilerinde terapötik bir yaklaşım olarak önem kazandığı bilinmektedir.

Otofaji sadece açlıkla değil genotoksik stres dahil başka birkaç stres faktöründe de uyarılabilmektedir. Otofaji indüksiyonu sonucu tümör hücrelerinden sekrete edilen ve immün

hücrelerin anti-kanser yanıtlarını etkileyen pro-inflamatuar ve/veya anti-inflamatuar sitokin ve kemokinlerinin salınımı söz konusudur. Tümörün başlangıç evresinde ve gelişmiş tümörlerde otofajinin farklı fonksiyonlar kazanmış olması gibi, otofajik sekretomun da anti-tümör yanıtındaki rolünün tümörün tipine ve evresine bağlı olarak değişebileceği düşünülmektedir.

Otofajinin NK hücreleri üzerindeki etkisini araştıran az sayıda çalışma, Granzim B'nin otofajik degradasyona uğraması sonucu NK hücrelerinin tümör hücrelerini öldürme kabiliyetini azalttığını göstermektedir. Ancak kanser terapisinde önemli bir yer tutan kemoterapi ajanlarıyla indüklenen otofaji ve otofajik sekretomun NK hücreleri üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Bu tez kapsamında, genotoksik stresle (kemoterapötik ajan) indüklenen otofajiye bağlı oluşan otofajik sekretomun karakterizasyonu ve otofajik sekretomun tümöre yönelik NK aracılı immün cevabı etkileyip etkilemediğinin araştırılmasıdır. *wt*-NK92 (*wt*:wild type, yabanıl tip) hücrelerinin reseptörler ekspresyonlarının düşük olması nedeni ile tez kapsamında kontrol NK92 hücreleri yanısıra DNAM1 genetik modifikasyonu yapılan NK92 hücreleri de kullanılmıştır. MCF-7 hücrelerinde artmış CD155 ekspresyonu nedeni ile CD155'in NK hücrelerindeki reseptörü olan DNAM1 için genetik modifikasyon yapılan NK92 hücreleri tercih edilmiştir. Böylece, DNAM-1 modifikasyonunun NK hücrelerinin anti-tümör aktivitesini artırmada avantaj sağlayıp sağlamayacağı da hedeflenmiştir.

Tezden elde edilen sonuçlar, kemoterapiye bağlı otofaji indüksiyonunun NK hücre efektör fonksiyonlarını uyarıp uyarmadığını ve antikanser aktivitesine katkıda bulunan ilaç kaynaklı stres türlerini nasıl algıladığını ve bunlara nasıl tepki verildiğinin ilk defa ortaya koyması açısından önemlidir. Bu kapsamda kanser tedavisinde hedefe yönelik ve immünoterapötik tedavi stratejileri geliştirilebilmesi ve önemli bilgiler elde edilmesi bakımından literatüre katkı sağlayacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Dizileri

Tez çalışması boyunca, ATCC tarafından ticari olarak üretilmiş MCF-7 meme kanseri hücre dizisi kullanılmıştır. Lentiviral yolla genetik modifikasyon yapılarak elde edilen DNAM1-NK92, NKG2D-NK92 ve kontrol (boş vektör içeren) olarak IG2pro-NK92 hücreleri Dr. Tolga Sütü'nün laboratuvarından (Boğaziçi Üni. Moleküler Biyoloji ve Genetik AD.) temin edilerek kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar

Tablo 1. Çalışmalarda kullanılan besiyerleri ve kimyasalların listesi

Ürün	Firma
DMEM	Gibco
RPMI 1640	Gibco
Fetal Bovin Serum	Gibco
Penisilin Streptomisin	MultiCell
Tripsin-EDTA	MultiCell
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS)	SIGMA®
Dimetilsülfooksit (DMSO)	SIGMA®
İnterlökin (IL) 2	Prospec
Vitamin Solüsyonu	Sigma
Non-Esantial Amino Asit Solüsyonu	MEM Thermo

Klorokin	Sigma
Tris-base	AppliChem
Glisin	ChemCruz®
Sodyum Dodesil Sülfat	BioShop®
Sodyum Klorür	SIGMA-ALDRICH
Potasyum Klorür	SIGMA-ALDRICH
Gliserol	BioShop
Merkaptoetanol	SIGMA®
Magnezyum Klorür	SIGMA
Amonyum Persülfat	SIGMA
Bromfenol Blue	SIGMA-ALDRICH
Tween 20	SIGMA-ALDRICH
Skim Milk	Fluka®
Bowin Serum Albumin	ChemCruz
Sodyum Deoksikolat	SIGMA-ALDRICH
Sodyum Ortovanadat	SIGMA-ALDRICH

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Antikorlar

Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan antikorların listesi

Ürün	Firma
LC3 I/II	ProteinTech
P62	ProteinTech
CD155	BT Lab.
GAPDH	Proteintech
Anti-mouse IgG	Proteintech
Anti-rabbit IgG	Proteintech
CD107	BioLegend
CD56	BioLegend

3.1.5. Kullanılan Kitler

Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan kitlerin listesi

Ürün	Firma
BCA Assay Kit	TaKaRa
Annexin V /7AAD Muse Kit	Muse
DCFDA Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Sitokin Array Kit C3	RayBiotech
ELISA Kit (CCL5, IL10, TGFβ)	ELK

3.1.6. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

Tablo 4. Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve aletlerin listesi

Ürün	Firma
Class II biyogüvenlik Kabin	AirStream
Co2 İnkübatör	NUAIRE
Su Banyosu	Nüve
Muse Hücre Analiz Cihazı	Muse
Otoklav	HIRAYAMA
Sıvı Azot Tankı	MRC
Dikey Jel Elektroforezi	BIO-RAD
Görüntüleme Cihazı	Chemidoc-It ² 510 İmager
Transfer Cihazı	BIO-RAD
Güç Kaynağı	Thermo
Inverted Mikroskop	Euromex
Vorteks	Iso-Lab

Manyetik Karıştırıcı	IKA
pH Metre	Hanna Instruments
Mikro Santrifüj	Hettich
Soğutmalı Mikro Santrifüj	Eppendorf
Soğutmalı Santrifüj	Hettich
Kriyo-Dondurucu Kap	Nalgene
Spektrofotometre	Thermo
Flow sitometre	BD Biosciences
Mikroplaka Okuyucu	Thermo
Konfokal Mikroskop	ZEN

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışma boyunca kullanılan MCF-7 meme kanseri hücre hattı DMEM besiyeri içerisinde % 10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren ortamda % 5 CO₂ ve 37°C'de kültüre edilmiştir. Hücrelerin çoğaltılması 75 cm² flasklar ile sağlanmıştır. Flaskın hücre yoğunluğu % 70'e ulaşıncaya hücreler ATCC'de belirtilen oranlarda haftada 2-3 kez pasajlanmıştır.

Kontrol (IG2pro-NK92) ve DNAM1 NK92 hücreleri RPMI 1640 besiyeri içerisinde % 20 FBS, 20 mM L-Glutamin, 0,1 mM β-merkaptotanol, % 1 vitamin solüsyonu, % 1 non-esansiyel amino asit solüsyonu ve 500 U/ml IL2 içeren ortamda % 5 CO₂ ve 37°C'de kültüre edilmiştir. Hücrelerin çoğaltılması 25 cm² flasklar ile sağlanmıştır. Hücreler 2 günde bir pasajlanarak kültüre devam edilmiştir.

3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması

MCF-7 hücreleri % 70 yoğunluğa ulaştığında pasajlanmıştır. Pasajlama işleminde ilk olarak kullanılmış besi yeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücreler 1X PBS ile yıkanmış ve PBS ortamdan uzaklaştırılmıştır. 1X Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek hücreler 4-5 dakika inkibatörde bekletilmiştir. Daha sonra Tripsin-EDTA solüsyonun aktivasyonunu durdurmak ve hücreleri kaldırabilmek için tamamlanmış DMEM besi yeri ile hücreler flask yüzeyinden kaldırılmıştır. Bu basamaktan sonra hücreler istenilen oranda bölünmüştür ve/veya dondurularak saklanmıştır.

NK92 hücreleri süspanse olduğu için hücreler 2 günde bir 350.000 hücre/ml olacak şekilde pasajlanmıştır. Her pasajlama sonrası flaska 500 U/ml IL2 eklenmiştir.

3.2.3. Hücrelerin Dondurulup Saklanması

Hücrelerin devamlılığının sağlanabilmesi için kültürdeki hücrelerin bir kısmı dondurularak sıvı azotta saklanmıştır. Bu işlem için bölüm 3.2.2'de 1X Tripsin-EDTA ile kaldırılan MCF-7 hücrelerin üzerine tamamlanmış DMEM besiyeri eklenerek hücreler steril falkona alınmış ve ardından 1100 rpm 4°C'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından pelet % 40 DMEM (complete medium), % 50 FBS, % 10 DMSO içeren dondurma besi yeri ile süspanse hale getirilmiştir. DNAM1 ve IG2pro NK92 hücreleri ise % 90 FBS ve % 10 DMSO içeren dondurma besi yeri ile süspanse hale getirilmiştir. Bu basamaktan sonra, dondurma tüplerine 1'er ml olacak şekilde eklenmiştir. Dondurma tüpü -80°C'de Mr. Frostie'de bir gece muhafaza edilmiş ve daha sonra dondurma tüpleri sıvı azot tankına alınarak -196°C'de saklanmıştır.

3.2.4. Hücrelerin Çözdürülüp Kullanılması

Sıvı azotta stoklanmış olan hücreler 37 °C'lik su banyosunda hızlıca çözdürülmüştür. Çözölmüş olan hücreler 15 ml' lik steril falkona aktarılmıştır. MCF-7 hücrelerinin üzerine 2ml

tamamlanmış DMEM besiyeri ilave edilerek 1100 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Üzerine tamamlanmış DMEM besiyeri eklenerek hücreler süspanse hale getirilmiştir. Süspanse haldeki hücrelerin bir kısmı hücre sayımı için ayrılmıştır. Yapılan sayımdan sonra 75 cm²'lik flaklara ekim işlemi yapılmıştır.

NK92 hücreleri 37 °C'lik su banyosunda hızlıca çözüldükten sonra 15 ml' lik steril falkona aktarılan hücrelerin üzerine 5 ml FBS eklenmiştir. Süspanse haldeki hücrelerin bir kısmı hücre sayımı için ayrılmıştır. Yapılan sayımdan sonra 25 cm²'lik flaklara 350.000 hücre/ml olacak şekilde hücreler ekilmiştir.

3.2.5. Hücrelerin Sayım Yöntemi

Hücre kültürü çalışmalarında hücre canlılığına bakılarak, yapılacak deneylerde gerekli hücre sayılarının belirlenmesi için hücre sayımı yapılmaktadır. Kültür ortamındaki hücrelerin canlılık oranlarının belirlenmesi için hücre süspanasyonu ve tripan mavisini 1:1 (v:v) oranında karıştırılmıştır. Daha sonra karışımdan 10µl alınarak Neubauer lamına aktarılmıştır. Neubauer lamı ışık mikroskopunda görüntülenmektedir. Canlı hücreler şeffaf görünürken, ölü hücreler ise tripan mavisinin hücre içine girmesinden dolayı koyu mavi görülmektedir. 4 ayrı büyük kare içerisine düşen hücrelerin sayımı yapıldıktan sonra bu sayıların ortalamaları alınmıştır. Bu işlemin ardından ortalama değer dilüsyon faktörü ve 10⁴ sabiti çarpılarak 1 ml'de ne kadar canlı hücre olduğu bulunmuştur. Ölü ve canlı hücre sayısı birbirine oranlanarak canlılık yüzdesi bulunmuştur.

3.2.6. MCF-7 Hücre Hattında Otofaji İndüksiyonu ve İnhibisyonu

Kinolin ailesinin üyesi olan klorokin (Cq), otofagozomların ve lizozomların füzyonunu bloke ederek otofaji inhibitörü işlevi gören aynı zamanda klinik olarak mevcut bir antimalaryal ajandır. Cq, FDA tarafından antimalaryal bir ajan olarak kullanım için onaylandığından, klinik çalışmalarda otofaji inhibitörü olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Liu ve diğerleri, 2020; Klionsky ve diğerleri 2012).

Etoposit (Eto) kanserin tedavisinde kullanılan önemli bir kemoterapötik ajandır. Eto için birincil sitotoksik hedef topoizomeraz II'dir. Eto, DNA çift sarmal kırıklarını (DSB) indükler ve DSB birikimi hücrede apoptozunu tetikler (Zhang ve diğerleri, 2021).

MCF-7 hücrelerinde genotoksik stres aracılı otofaji indüksiyonunun sağlanması için hücreler 150 µM Eto ile 24 saat muamele edilmiştir. MCF-7 hücrelerinde otofajiyi baskılamak için de otofaji inhibitörü olan Cq kullanılmıştır. Hücreler 10 µM Cq ile 24 saat süre ile muamele edilerek otofaji inhibisyonu gerçekleştirilmiştir.

MCF-7 deney grupları:

1. Kontrol
2. Cq (10 µM)
3. Eto (150 µM)
4. Cq (10 µM) + Eto (150 µM)

3.2.6.1. MCF-7 Hücrelerinde Genotoksik Stres İndüksiyonu ve Modülasyonu Sonrası Otofaji Belirteçlerinin Western Blot Analizi ile Belirlenmesi

3.2.6.1.1. Protein İzolasyonu

Western blot analizi için Bölüm 3.2.6.'da anlatıldığı gibi MCF-7 hücreleri Eto ve Cq ile belirtilen sürelerde muamele edilmiştir. İnkübasyonun sonunda besiyeri uzaklaştırılmıştır. Ardından hücreler 1X PBS ile 1 kez yıkanıp PBS uzaklaştırılmıştır. Petrilerin her birine 120µl olacak şekilde RİPA lizis tamponundan eklenmiştir. Petriler orbital çalkalayıcıda buz üzerinde 5 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra petri üzerindeki hücreler hücre kazıyıcı (*scraper*) ile kazınarak eppendorflara toplanmıştır. Ardından eppendorflar 4°C'de 450 rpm'de 45 dakika boyunca orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Son basamakta ise örnekler 4°C'de 13500 rpm'de 45 dakika santrifüj edilerek, santrifüjü takiben süpernatant toplanarak protein izolasyonu tamamlanmıştır.

Protein izolasyonu için kullanılan RİPA lizis bufer içeriği aşağıda verilmiştir.

RİPA Lizis Buffer İçeriği (100 ml Stok İçin): 5 ml Tris-HCl (50Mm, pH: 7,4), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0,1 g SDS, 0,5 g Sodyum deoksikolat, 1 ml NP40

Kullanmadan önce stok içerisinden 12ml bir falkona alınır. İçersine 120 µl 100mM Na₃VO₄ ve yarım tablet proteaz inhibitör kokteyl eklenerek kullanıma hazır hale getirilir.

3.2.6.1.2. Protein Miktar Tayini

Protein izolasyonu yapılan örneklerin total protein miktarının belirlenmesi için TaKaRa BCA Protein Assay Kit kullanılmıştır. Bu kit içerisinde bulunan BSA standart olarak kullanılmak üzere µg/ml değerleri sırasıyla 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 50 ve 0 olacak şekilde seyreltilerek distile su içerisinde hazırlanmıştır.

Miktar tayini yapılacağı zaman 96 kuyucuklu *plate* içerisinde iki tekrarlı olarak her bir standarttan 20 µl eklenmiştir. Örnekler 1:10 dilüsyonu yapılarak iki tekrarlı olarak 20 µl eklenmiştir. Kör olarak ise protein izolasyonu RIPA lizis tamponu içerisinde yapıldığı için aynı şekilde o da örnek gibi 1:10 dilüsyonundan 20 µl alınarak iki tekrarlı olarak eklenmiştir. Kit içerisinde bulunan A ve B solüsyonundan miktarı örnek sayısına bağlı olarak 100:1 oranında karıştırılmıştır. Her bir standart, örnek ve körün üzerine 200 µl eklenerek 20 dakika 37 °C'de inkübe edilmiştir. Ardından 562 nm'de spektrofotometrede ölçümü yapılarak örneklerin miktarları belirlenmiştir. Yapılan ölçümün ardından örnekler 100 µg olacak şekilde hesaplanmıştır. Ardından ependorfların içerisindeki örneklere 6X *loading dye* ilave edilmiştir. Daha sonra örnekler 95 °C'de 5 dakika inkübe edilerek proteinler denatüre edilmiştir.

6X Loading Dye (10 ml): 3,75 ml 1M Tris-HCl (pH: 6,8), 5 ml Gliserol+H₂O (4:1), 1 g SDS, 900 µl Merkaptoetanol, % 0,06 Bromfenol blue, Distile su

3.2.6.1.3. Western Blot analizi

SDS-PAGE (SDS- Poliakrilamid Gel) elektroforezi, elektrik akımı ile proteinleri molekül ağırlıklarına göre ayırmaktadır. Camlar stand üzerine yerleştirilir ve bakılacak

proteinin molekül ağırlığına göre hazırlanan ayırıcı jel dökülmüştür. Jel kırıkları oluşmasını engellemek için alt jel döküldükten sonra izopropanol eklenerek 20-30 dakika oda sıcaklığında polimerleşme reaksiyonunun gerçekleşmesi beklenmiştir. Ardından üst jel Tablo 7'deki gibi hazırlanmıştır. İzopropanol dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra, üst jel dökülmüştür. Dökülmesinin hemen ardından hızlı bir biçimde camlar arasına taraklar yerleştirilmiş ve üst jel polimerizasyonu için beklenmiştir.

Tablo 5. Paketleyici ve ayırıcı jelin içeriği ve miktarları

Bileşenler	2X Paketleyici Jel	2X Ayırıcı jel	konsantrasyonları	
	%3	%8	%10	%15
Distile su	2,862 ml	6,230 ml	5,55 ml	4,8 ml
Upper Buffer	1,134 ml	-	-	-
Lower Buffer	-	4,5 ml	4,5 ml	4,5 ml
%40	0,450 ml	3,6 ml	4,5 ml	6,75 ml
Akrilamid/bisakrilamid				
%10 SDS	45 µl	180 µl	180 µl	180 µl
Gliserol	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
TEMED	5,6 µl	22,5 µl	22,5 µl	22,5 µl
%40 APS	4,5 µl	9 µl	9 µl	9 µl

Jeller hazır olduktan sonra yürütme işlemine geçilmiştir. Kasetler dikey jel elektroforezine yerleştirildikten sonra 1X Running Buffer eklenip taraklar dikkatli bir biçimde çıkarılmıştır. Ardından örneklerin kuyucuklara yüklenmesi basamağına geçilmiştir. Bölüm 3.2.6.1.2'de hesaplandığı şekilde örnekler kuyucuklara yüklenmiştir. Tankın kapağı kapatılarak yürütme basamağına geçilmiştir. Örnekler *stacking* jelden *seperating* jele gelene kadar 90 voltta 40 dakika, *seperating* jelde ise 120 voltta 100 dakika yürütülmüştür.

Molekül ağırlıklarına göre jelde ayrılmış olarak bulunan proteinler daha sonra nitroselüloz veya polivinilidin difluorid (PVDF) membrana transfer edilmiştir. Blotlama olarak adlandırılan bu basamak yarı kuru (semi-dry) blotlama metodu ile yapılmış olup bu basamağın sonunda proteinler membrana aktarılmıştır. 9 cm eni 7 cm boyu olacak şekilde kesilen PVDF membran 5 dk aktifleşmesi için % 100 metanollü ortamda bekletilmiştir. Bu

sırada blotlama kağıtlarından 11cm eni 15cm boyu olacak şekilde 12 adet kesilmiştir. 6'şar 6'şar ayrılan bu kâğıtlar % 20 metanollü Towbin buffer ile ıslatılıp blotlama kasedine yerleştirilmiştir. Aktifleşen membran nemli blotlama kağıtlarının üzerine yerleştirilmiştir. Ardından kasetten ve camdan ayrılmış olan ayrıştırıcı jel membranının üzerine düz olacak şekilde yerleştirilmiştir. Kalan 6 nemli blotlama kağıdı da jelin üzerine, jeli oynatmayacak şekilde yerleştirildikten sonra blotlama kasedi dikkatli bir biçimde kapatılmıştır. Blotlama işleminin süresi jel konsantrasyonuna göre artmakla birlikte, % 15'lik jel için 0,4A° akım ve 25V'da 41 dakika, %8-10'luk jel için ise 0,4A° akım ve 25V'da 37 dakika olarak belirlenmiştir.

Blotlama işleminin ardından, membranda primer antikorların non-spesifik bölgelere bağlanarak kirlilik yaratmamasını sağlamak için membran oda sıcaklığında, % 6 yağsız süt ile muamele edilerek orbital çalkalayıcıda 1 saat inkübe edilmiştir. Bu basamak bloklama olarak adlandırılmaktadır. Primer antikor muamelesinden önce, membran 2 dk 1X TBS-T solüsyonu ile orbital çalkalayıcıda yıkanarak yağsız süt kalıntıları ortamdaki uzaklaştırılmıştır.

Tablo 6. Kullanılan primer antikorlar ve dilüsyonları

Antikor	Dilüsyon Oranı
LC3 I/II	1:1000
P62	1:10000
CD155	1:1000
GAPDH	1:30000

LC3 I/II, p62 ve internal kontrol olarak GAPDH antikorları primer antikor olarak kullanılmıştır. Primer antikor % 5 BSA içeren TBS-T ile Tablo 8' de belirtilen oranlarda seyreltildikten sonra membran 16 saat +4°C'de orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. 16 saatlik inkübasyon süresinin sonunda primer antikor uzaklaştırılmıştır. Membran oda sıcaklığında 3 kez 5'er dk. 1X TBS-T ile orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.

Primer antikor muamelesinin ardından, membran sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Sekonder antikor dilüsyonu % 6'luk yağsız süt içeren TBS-T ile Tablo 9' da gösterildiği gibidir. Sekonder uzaklaştırıldıktan sonra

membran oda sıcaklığında 3 kez 5'er dakika 1X TBS-T ile orbital çalkalayıcıda yıkanmıştır. Yeni 1X TBS-T eklendikten sonra membran görüntülenmesi basamağına geçilmiştir. Membran üzerine 1:1 oranında eklenen ECL solüsyonu ile membran 5 dakika kadar karanlıkta inkübe edilip ardından ChemiDoc-ItR2 Imager (UVP) cihazı ile görüntülenmiştir.

Tablo 7. Kullanılan sekonder antikorlar ve dilüsyonları

Antikor	Dilüsyon
Anti-Mouse IgG-HRP	1:2000
Anti-Rabbit IgG-HRP	1:2000

Western Blot için kullanılan tamponlar ve solüsyonlar aşağıda belirtildiği gibidir.

Lower Buffer (500 ml): 91 g Tris-base, 20 ml %10'luk SDS, 14 ml HCl (6N) üzeri 500ml'ye tamamlanacak şekilde distile su eklenir ve pH'ı 8,8'e ayarlanır.

% 40 Amonyum persülfat: 0,4 g APS, 1 ml Distile su

TOWBIN Transfer Buffer (800 ml): 3.03 g Tris-base, 14,4 g Glycin, 5 ml % 10'luk SDS, Distile su (pH: 8,1-8,5) **Not:** Blotlama işleminden önce %20 metanol ilave edilmektedir.

10X Running Buffer (1L): 30 g Tris-base, 144 g Glisin, 15 g SDS, Distile su (pH: 8,6)

Upper Buffer (500 ml): 30,5 g Tris-base, 20 ml % 10'luk SDS, 30 ml HCl (6N) üzeri 500ml'ye tamamlanacak şekilde distile su eklenir ve pH'ı 6,7'e ayarlanır.

1X Running Buffer (1L): 100 ml 10X Runnig Buffer, 900 ml Distile su (pH: 8,6)

10X TBS (1L): 30,2 g Tris-base, 43,8 g NaCl, 932 mg KCl

1X TBS-t (1L) :100 ml 10X TBS, 900 ml Distile su, 1 ml Tween 20

% 6' lık Süt Tozu (Skim Milk) Solüsyonu: 20 ml 1X TBS-t, 1,2 g Skim Milk

% 5'lik Bovin Serum Albümin (BSA) Solüsyonu: 10 ml 1X TBS-t, 0,5 g BSA

PBS: 8 g NaCl, 1.43 g of $N_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 0.2 g of KCl, 0.2 g KH_2PO_4 , distile su ile 1L'ye tamamlanır ve pH: 7,5 olacak şekilde ayarlanır.

3.2.6.2. Annexin V/7AAD apoptozis testi

Hücrenin sitozolik kısmında bulunan fosfotidilserin, apoptotik hücrelerde çift zarlı membran yapısının ekstrasellüler kısmına doğru flip-flop hareketi yapmaktadır. Annexin V testi, ekstrasellüler kısma lokalize olan fosfotidilserinlere Annexin V boyasının bağlanması ile apoptotik hücre sayısını belirlemeye yarayan bir analizdir. Apoptotik ve sağlıklı hücrelerin kantitatif analizi Muse hücre analizörü kullanılarak yapılmaktadır.

Bölüm 3.2.6.'da anlatıldığı üzere MCF-7 hücreleri Eto ve Cq ile belirtilen sürelerde muamele edildikten sonra hücrelerin üzerlerindeki besi yerleri ependorflara toplanmıştır. Hücreler 1X PBS ile yıkanıp, PBS uzaklaştırılmıştır. Her kuyucuğa 100µl 1X tripsin eklenerek 37°C'de 3 dk. inkübe edilmiştir. Besi yerleri aracılığı ile tripsin aktivitesine son verilerek hücreler kaldırılmış ve ependorflara toplanmıştır. Ependorflara toplanan hücreler 300xg'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatanttan 100 µl kalacak şekilde alınmıştır. Her bir örneğin üzerine 100 µl Annexin V solüsyonu eklendikten sonra pelletler pipetaj yardımıyla yavaşça süspanse edilmiştir. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dk. inkübe edildikten sonra Muse hücre analiz cihazında ölçümü yapılmıştır. Ölçüm sonucunda elde edilen sonuçların 'Graphpad ve Origin 2019b' programı ile istatistik analizleri yapılmıştır.

3.2.6.3. İmmünfluoresan Boyama ve Konfokal Mikroskopi

Bölüm 3.2.6.'da anlatıldığı üzere MCF-7 hücreleri Eto ve Cq ile belirtilen sürelerde muamele edildikten sonra hücrelerin üzerlerindeki besi yerleri uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklar 1X PBS ile yıkanıp ardından hücreler % 100'lük soğuk metanol ile 20°C'de 5 dakika fikse edilmiştir. Sürenin sonunda metanol ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücreler 1X PBS ile yıkanmıştır. Ardından bloklama basamağı için 1X PBS'te çözülmüş % 2'lik BSA solüsyonu hazırlanmıştır. Kuyucukların üzerlerini kaplayacak kadar BSA solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından LC3 immün floresan boyası 1X PBS'te çözülmüş % 1'lik BSA 'da 200:1 oranında dilüe edilmiştir. Ardından her bir kuyucuğa 50 µl antikor konulduktan sonra 16 saat +4°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün antikor ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücreler 1X PBS ile 3 kez yıkanmıştır.

Lizozomlar, atık maddeleri ve hücre kalıntıları parçalamak için asit hidrolaz enzimleri içeren hücre organelleridir ve içerisinde bulunan sindirim enzimlerinin pH 4,5'te çalışmasını sağlar. *LysoBrite*, canlı hücrelerin lizozomlarını boyamak için kullanılan ve asidik pH'da çalışan florojenik bir boyadır. LC3 boyaması tamamlandıktan sonra hücreler HBSS ile 500:1 oranında dilüe edilen *LysoBrite* ile 37°C'de 30 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından *LysoBrite* boyası uzaklaştırılıp, hücreler 1X PBS ile 3 kez yıkanmıştır.

Bu basamağın ardından DAPI boyamasına geçilmiştir. (dH₂O ile 1:2000 dilüsyon yapılmıştır). Kuyucukların üzerlerini kaplayacak kadar DAPI konulduktan sonra oda sıcaklığında karanlıkta 5 dk. inkübe edilmiştir. Ardından DAPI ortamdan uzaklaştırılmış ve lameller ters olarak lam üzerine *mounting* medium kullanılarak yapıştırılmış ve konfokal mikroskopta görüntü alınmıştır.

3.2.6.4. DCFDA ROS Analizi

Genotoksik stres aracılı otofaji indüksiyonu ve modülasyonunun reaktif oksijen türlerinde (ROS) artışa neden olup olmadığını belirlemek için 2'-7'-Dikloridhidroflorosein diasetat (DCFDA) ölçümü yapılmıştır. MCF-7 hücreleri 3.2.6.' da belirtilen konsantrasyonlarda ve sürede Eto ve Cq ile muamele edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücre ortamı uzaklaştırılıp, 1X PBS ile hücreler yıkanmıştır. DMSO içerisinde 100 mM stok olarak hazırlanmış DCFDA solüsyonundan 10 µM olacak şekilde (PBS içerisinde) hücrelerin üzerine eklenmiştir. 10 µM DCFDA solüsyonu ile hücreler 60 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından DCFDA içeren ortam uzaklaştırılıp, hücrelerin üzerine DMEM besiyeri eklenerek 30 dk. daha inkübasyona devam edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlanınca *flow* sitometri ile ölçüm yapılmıştır (Eruslanov ve Kusmartsev 2010).

3.2.7.1. Koşullandırılmış Ortam (Conditioned medium: CM) toplanması

Kemoterapi indüklü otofajiye bağlı sekretom elde etmek için MCF-7 hücreleri 3.2.6.' da belirtilen konsantrasyonlarda ve sürede Eto ve Cq ile muamele edilmiştir. Ancak sekretom analizi için LC-MS/MS ve sitokin array analizlerinde FBS kaynaklı sorun yaşanabileceği düşünüldüğünden FBS oranı bu uygulamalarda %1' e düşürülerek aynı konsantrasyonlarda

Eto ve Cq uygulaması yapılmıştır. Otofaji indüksiyonu sağlandıktan sonra kültür kaplarından alınan ortamlar 10,000'g de 4°C'de 30 dk. santrifüjlenerek kültür kalıntıları ve yüzer diğer maddeler uzaklaştırılmıştır. Supernatantlar tekrar 20,000'g de 4°C'de 70 dk. daha santrifüjlenerek mikrovessiküller uzaklaştırılmıştır. Son olarak da 100,000'g de 4°C'de 70 dk. daha santrifüj yapıp, çöken eksozomlar uzaklaştırılmıştır. Son aşamada elde edilen süpernatantlar LC-MS/MS ve sitokin array analizlerinde kullanılmıştır (Infante ve Rodrigez 2018).

3.2.7.2. LC-MS/MS Analizi

3.2.7.2.1. Protein Özütlerinin Hazırlanması

MCF-7 hücrelerinin 3.2.6'da anlatıldığı şekilde Eto ve Cq ile muamele edilmesinin ardından 3.2.7.1.'de anlatıldığı şekilde MCF-7 hücrelerinden süpernatantlar toplanmıştır. Süpernatantlar liyofilizatör yardımıyla liyofilize hale getirilip ve PBS içerisinde çözülerek elde edilen protein özütlerinin konsantrasyonları Bradford yöntemi ile belirlendi ve örneklerin SDS-PAGE analizleri yapılarak protein üretimi ve kalitesi kontrol edilmiştir.

3.2.7.2.2. Proteinlerin Çözelti İçi Kesimi

Proteinlerin LC-MS/MS analizleri için yapılacak proteolitik kesimi için triptik kesim ve guanidinyasyon kiti (#89895, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. Kesim işlemi üretici firma tarafından önerilen protokole göre yapılmıştır. Yapılan ilk LC-MS/MS analizlerinde protein sayısının beklenilenden çok az olması ve triptik kesimin efektif olmamasından dolayı triptik kesim işlemleri için FASP (Filtre yardımcı örnek hazırlama, abcam, ab270519) kullanımına karar verilmiştir. FASP kesimi için izlenen protokol şu şekilde özetlenebilir: 100 µg protein özütü (30 µl aşmayan hacim içerisinde) 200 µl 8 M üre solüsyonu ile karıştırılarak 30 kDa'lık membran filtre üzerine aktarılmıştır. Filtreler temiz bir Eppendorf marka tüp içerisine yerleştirildikten sonra 10 dakika 14.000 x g'de santrifüj edilmiştir. Filtrelerin üzerine 8 M üre solüsyonundan 100 µl daha eklenerek santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Ardından üre yardımcı ile kırılan disülfid bağlarının tekrar oluşumunun engellenmesi için 8M üre tamponu ile hazırlanan iyodoasetamid solüsyonu ile karıştırılan

örnekler karanlık ortamda 20 dakika bekletilmiştir. Bu işlem sonrasında santrifüj işlemi yapıp, örneklerin yıkanması için filtre üzerine 2 kez 100 50 mM AmBic solüsyonu eklenerek santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Temizlenen örnekler üzerine 50 mM AmBic içinde tripsin solüsyonu hazırlanarak eklenip, örnekler triptik kesim işlemi için gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kesim işleminden sonra örnekler SpeedVac santrifüjü (Eppendorf, ABD) ile kuruyana kadar konsantre edilip peptitler, nLC-MS/MS analizi için % 0.1'lik Formik Asit çözeltisi (FA) içinde yeniden süspanse edilmiştir.

3.2.7.2.3. Nano-sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi (nLC-MS/MS) Analizi

Peptitler, Q-Exactive kütle spektrometresine (Thermo Scientific, ABD) bağlı Ultimate 3000 RSLC nano sistemi (Dionex, Thermo Scientific, CA, ABD) kullanılarak nLC-MS/MS sistemi ile analiz edilmiştir. Tüm sistem Xcalibur 4.0 yazılımı (Thermo Fisher Scientific, CA, ABD) aracılığıyla kontrol edilmiştir. A (% 0.1 Formik Asit) ve B (%80 Asetonitril + % 0.1 Formik Asit) mobil fazları kullanılarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ayırımı yapılmıştır. Kesilmiş peptitler, bir tuzak (trap) kolonu üzerinden geçirilerek konsantre edildi ve tuzlardan arındırılmıştır. Daha sonra peptidler bir Acclaim PepMap RSLC C18 analitik kolonuna (75 um x 15 cm x 2 um, 100 Å çap, Thermo Scientific, CA, ABD) aktarılarak kromatografik ayırılma işlemine tabi tutulmuştur. Bu süreçte aşağıda özetlenen ayırma gradyanı kullanılmıştır. On dakika için % 6 B, 60 dakika için % 6-10 B, 150 dakika için %10-30 B, 40 dakika için % 30-50 B, 20 dakika için % 50-90, 10 dakika için % 90, 10 dakika için % 90-6 B ve 5 dakika için % 6 B olacak şekilde 300 dakikalık toplam çalışma süresinde 300 nL/dak akış hızıyla analizler gerçekleştirilmiştir. Tam tarama MS1 spektrumları aşağıdaki parametrelerle elde edilmiştir: çözünürlük 70.000, tarama aralığı 400-2000 m/z, hedef otomatik kazanç kontrolü (AGC) 3×E6, maksimum enjeksiyon süresi 60 ms, püskürtme voltajı 2.3 kV. MS/MS analizi, ilk on öncü iyonun seçilmesiyle veriye bağlı edinim yoluyla gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki parametrelerle çarpışma kaynaklı ayrışmadan (yüksek enerjili çarpışmalı ayrışma (higher-energy collisional dissociation- HCD)) oluşan MS2 analizi; çözünürlük 17.500, AGC 1E6; maksimum enjeksiyon süresi 100 ms, izolasyon penceresi 2.0 m/z normalleştirildi ve çarpışma enerjisi (NCE) 27. Cihaz, her analizden önce standart bir pozitif kalibratör ile (LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution 88323, Pierce, ABD) kalibre edilmiştir.

3.2.7.2.4. nLC-MS/MS Veri Analizi

Ham verilerin analizi ve protein tanımlaması için Proteom Discoverer 2.2 yazılımı (Thermo Scientific, ABD) kullanıldı ve analizler sırasında aşağıdaki parametreler uygulanmıştır; peptit kütle toleransı 10 ppm, MS/MS kütle toleransı 0.2 Da, kütle doğruluğu 2 ppm, toleranslı düşük 1, minimum peptit uzunluğu 6 amino asit, sabit değişiklikler sistein karbamidometilasyonu, kararsız değişiklikler metionin oksidasyonu ve asparajin deaminasyonu. Her protein için tanımlanan minimum özgün peptit sayısı 1 olarak alınıp, elde edilen veriler Uniprot veri tabanında aranmıştır.

3.2.7.2.5. Biyoinformatik Analizler

nLC-MS/MS analizi sonucu elde edilen proteinlerin karşılaştırmalı analizi label-free quantifikasyon yöntemi kullanılarak Proteom Discoverer 2.2 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Eto ve Cq grubu karşılaştırıldığında zenginleştirme oranı 2'den büyük olan protein erişimleri bioMart ve org.Hs.eg.db R paketleri kullanılarak; HSPA5, KRT10, KRT2, GDF15, VTN, SERPINF1, H2AC18, H2AC19, KRT5 gen tanımlayıcılarıyla eşleştirilmiştir. clusterProfiler R paketinin enrichGO fonksiyonu kullanılarak q-değeri 0,05 olarak belirlenmiş, genler GO terimleriyle eşleştirilmiş ve ggplot2 paketi kullanılarak dotplot ile çizilmiştir (Wu ve diğerleri, 2021). Bu gen tanımlayıcıları için 0.1 q-değeri ile anlamlı bir KEGG yolu bulunmamıştır.

Eto+Cq ile Cq grubu karşılaştırıldığında zenginleştirme oranı 2'den büyük olan protein erişimleri bioMart ve org.Hs.eg.db R paketleri kullanılarak HSPA5, VTN, H2AC18, H2AC19, KRT10, SERPINF1, HSPE1-MOB4, COL1A2, GDF15, C4A, C4B, LDHA, EIF4A2 gen tanımlayıcılarıyla eşleştirilmiştir. Gen listeleri üzerinde R ortamında cluster Profiler ile fonksiyonel analiz enrichGO (q-değeri = 0.05) ve enrichKEGG (q-değeri = 0.1) fonksiyonları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Wu ve diğerleri, 2021). En çok seçilen GO terimleri ve KEGG yolları clusterProfiler ve ggplot2 paketlerinin dotplot, barplot ve cnetplot fonksiyonları kullanılarak çizilmiştir.

3.2.7.2.6. LC-MS/MS Sonuçlarının Analizi

LC-MS/MS analiz sonuçlarının doğrulanması için analiz edilen proteinlerden anlamlı farklılık gosteren N-Cadherin ve VDAC-1 proteinleri seçilmiştir. Hem negatif kontrol hem de biyotinile örneklerden 20 µl protein rneği alınarak % 10'luk jellerde yürütüldü ve ardından nitroselüloz membranlara transfer edilen proteinlerin western blot analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.3. Sitokin Array Analizi

MCF-7 hücrelerinin 3.2.6'da anlatıldığı şekilde Eto ve Cq ile muamele edilmesinin ardından 3.2.7.1.'de anlatıldığı şekilde MCF-7 hücrelerinden süpernatantlar toplanmıştır. Kullanılan tüm solüsyon ve membranlar *Raybiotech* sitokin array kit içerisinde yer almaktadır. Öncelikle kit içerisinde bulunan sitokin/kemokin ve büyüme faktörü içeren membranlar 2 ml bloklama solüsyonu ile 30 dk. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından bloklama solüsyonu membranların üzerinden uzaklaştırılıp, her bir membranın üzerine 1 ml koşullandırılmış ortam eklenerek gece boyu 4°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından koşullandırılmış ortam membranların üzerinden uzaklaştırılıp, membranlar yıkama solüsyonu I ile 3 kez 5'er dk. ve yıkama solüsyonu II ile de 2 kez 5'er dk. yıkanmıştır. Yıkamaların ardından membranlar 1 ml biyotinlenmiş antikor kokteyli ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Yıkamalar 2. kez tekrarlanmıştır. Daha sonra membranlar 2 ml HRP-Streptavidin ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 2 saatin sonunda HRP-Streptavidin uzaklaştırılarak membranlar 3. kez yıkanmıştır. Son aşamada da membranlar 1:1 oranında karıştırılan deteksiyon solüsyonu I ve II ile muamele edilerek kemilüminesans görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

3.2.7.4. ELISA Analizleri

MCF-7 hücrelerinin 3.2.6'da anlatıldığı şekilde Eto ve Cq ile muamele edilmesinin ardından 3.2.7.1.'de anlatıldığı şekilde MCF-7 hücrelerinden süpernatantlar toplanmıştır. Kullanılan tüm solüsyonlar ELK ELISA kiti içerisinde yer almaktadır. 0,16 ile 10 ng

aralığında 7 adet standart hazırlanmıştır. Standart kuyucuklarına 100 µl standart solüsyonu, örnek kuyucuklarına da 100 µl örnek konulup, 80 dk 37 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından tüm kuyucuklar 1X yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkamanın ardından tüm kuyucuklara 100 µl biyotinlenmiş antikor solüsyonu eklenip, 50 dk 37 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından tüm kuyucuklar 1X yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkamanın ardından tüm kuyucuklara 100 µl streptoavidin HRP solüsyonu eklenip 50 dk 37 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından tüm kuyucuklar 1X yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkanmıştır. Yıkamanın ardından tüm kuyucuklara 90 µl TMB substrat solüsyonu eklenip, 20 dk 37 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından tüm kuyucuklara 50 µl reaksiyonu durdurma solüsyonu eklenip, örnekler 450 nm’de mikropilaya okuyucuda ölçülmüştür.

3.2.8. Kemoterapi İndüklü Otofajinin, NK Hücrelerinin Anti-tümör İmmün Cevabına Etkisi

MCF-7 hücreleri 24 saat 150 µM Eto ve 10 µM Cq ile muamele edilmiştir. 24 saatin sonunda toplanan koşullandırılmış ortam ile IG2pro-NK92 (burdan sonra kontrol olarak anılacaktır), DNAM1-NK92 ve NKG2D-NK92 hücreleri 8 saat süre ile muamele edilmiştir. Koşullandırılmış ortamla muamele edilen kontrol-NK92, DNAM1-NK92 ve NKG2D-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu yapılmış MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasitesi degranülasyon analizi ile ve kontrol ve DNAM1-NK92 hücrelerinin DNAM1 ekspresyonundaki değişim de flow sitometri analizi ile belirlenmiştir.

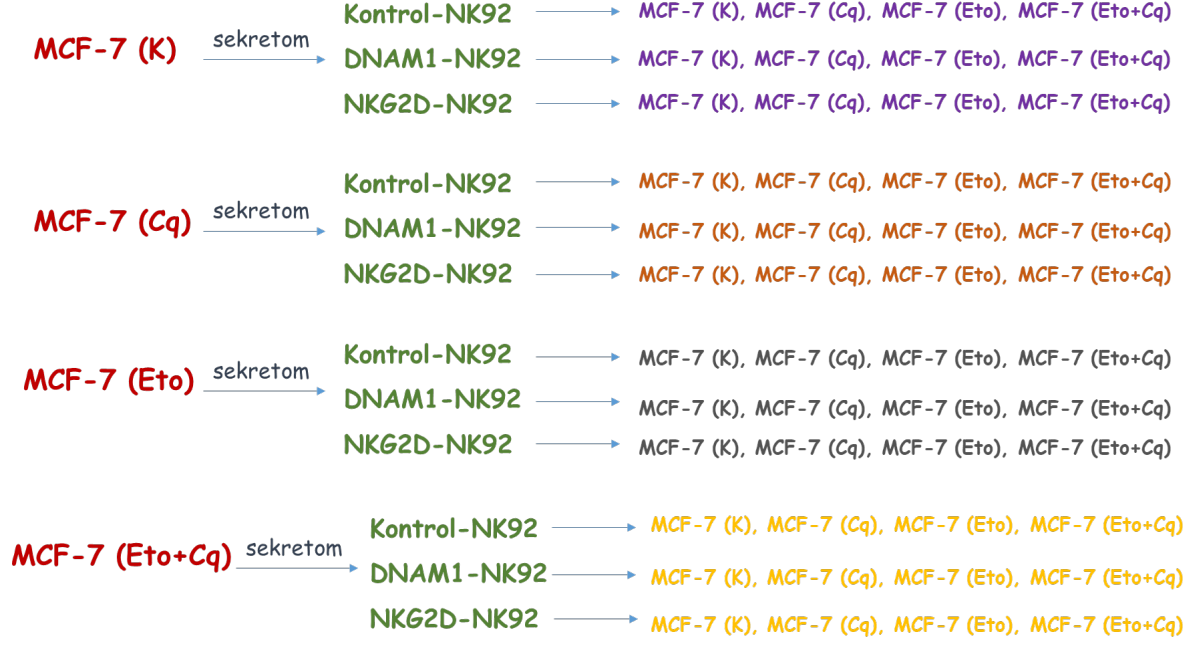
3.2.8.1. NK-92’nin Tümör Hücrelerini Hedefleme Kapasitesinin Belirlenmesi

3.2.8.1.1. Degranülasyon Analizi (*Degranulation assay*)

MCF-7 hücreleri 24 saat 150 µM Eto ve 10 µM Cq ile muamele edilmiştir. 24 saatin sonunda toplanan koşullandırılmış ortam ile kontrol-NK92, DNAM1-NK92 ve NKG2D-NK92 hücreleri 8 saat süre ile muamele edilmiştir. Koşullandırılmış ortam ile muamele edilen kontrol-NK92, DNAM1-NK92 ve NKG2D-NK92 hücreleri ile 24 saat boyunca 150 µM Eto

ve 10 µM Cq ile muamele edilmiş MCF-7 hücreleri 4 saat boyunca ko-kültüre edilmiştir. Otofajik sekretom ile muamele edilen kontrol-NK92, DNAM1-NK92 ve NKG2D-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasitesi degranülasyon analizi ile gösterilmiştir. Degranülasyon analizinin detayları aşağıda yer almaktadır.

Otofajik sekretom (MCF-7 (K/Cq/Eto/Eto+Cq)) ile muamele edilen kontrol-NK92, DNAM1-NK92 ve NKG2D-NK92 hücreleri 100 µl $2.10^5/well$ olacak şekilde otofaji indüksiyonu ve modülasyonu yapılan MCF-7 hücreleri ile 1:1 oranında 96 kuyucuklu plakalarda ko-kültüre edilmiştir. Kontrol grupları olarak; otofajik sekretomla muamele edilmemiş kontrol-NK92, DNAM1-NK92 ve NKG2D-NK92 hücreleri (*non target*), NK hücrelerini uyarmak için K562 hücreleri ve phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA: 0,5 µl) ve kalsiyum iyonofor (Ca^{2+} -iyonofor: 0,5 µl) kullanılmıştır. Her kuyucuğa 1 µl CD107a antikoru eklenmiştir. 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. 1 saat inkübasyonun ardından her kuyucuğa 0,5 µl *monensin* (golgiden sitotoksik granüllerin salınımı durduran kimyasal) eklenip, 3 saat daha 37°C'de inkübasyona devam edilmiştir. İnkübasyonun ardından 96 kuyucuklu plaka 400xg'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp, hücreler 1:50 oranında dilüe edilen 50 µl CD56 antikoru ile muamele edilerek 30 dk. 4 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından 96 kuyucuklu plaka 400xg'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Hücrelerin üzerine 300 µl PBS eklenerek *FACS* tüpüne alınıp, *flow* sitometride ölçüm yapılmıştır (Shabrish ve diğerleri, 2016).



Şekil 6. Kontrol-NK92, DNAM1-NK92 ve NKG2D-NK92 hücrelerinin otofaji indikasyonu ve inhibisyonu yapılan MCF-7 hücrelerinden elde edilen sekretomlar ile muamele edilmesinin ardından otofaji indikasyonu ve inhibisyonu yapılan MCF-7 hücreleri ile ko-kültüre edilmesi

3.2.8.1.2. DNAM1 Ekspresyonunun Flow Sitometri ile Analizi

3.2.8.1.1.'de anlatıldığı şekilde otofajik sekretom ile muamele edilen DNAM1 ve kontrol NK92 hücrelerinde DNAM1 ekspresyonunun otofajik sekretoma bağlı olarak nasıl değiştiği *flow* sitometri ile analiz edilerek belirlenmiştir.

Otofajik sekretomlar ile muamele edilen kontrol ve DNAM-1 NK-92 hücreleri PBS ile bir kez yıkanıp, santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından hücreler 10 µl DNAM1 antikoru ile muamele edilmiştir. 20 dk 4 °C'de karanlıkta inkübe edildikten sonra 100 µl PBS eklenip, flow sitometri ile DNAM1 ekspresyon seviyesi belirlenmiştir.

3.2.9. Grafiklerin Hazırlanışı ve İstatistiksel Analizlerin Belirlenmesi

Grafikler birbirinden bağımsız 3 tekrardan oluşan ölçüm sonuçlarının ortalamaları alınarak standart sapmaları hesaplanarak 'Graphpad' programıyla hazırlanmıştır. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde 'Origin 2019b' programı kullanılarak gruplar arasındaki anlamlı farklılıklar 'One-Way ANOVA' ve 'Student's T test' ile belirlenmiş olup $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

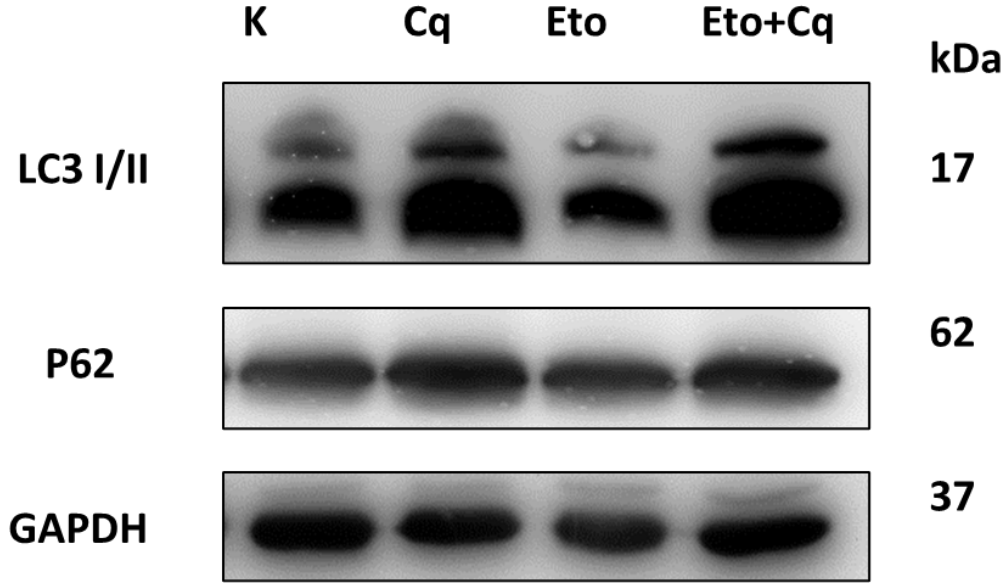
4.1. Genotoksik Stres Aracılı Otofaji İndüksiyonu ve Modülasyonu

4.1.1. MCF-7 Hücrelerinde Genotoksik Stres İndüksiyonu Sonrası Otofaji Belirteçlerindeki (LC3I/II ve p62) Değişim

Otofaji genotoksik stres de dahil olmak üzere birçok stres faktörü tarafından uyarılabilmektedir. Son çalışmalar otofajinin; metabolik stresle, endoplazmik retikulum stresiyile ve anti kanser terapiler ile de indüklenebileceğini göstermiştir (Eren, 2020).

MCF-7 hücrelerinde genotoksik stres aracılı otofaji indüksiyonu için 150 µM etoposid (Eto) ve otofaji inhibisyonu için de 10 µM klorokin (Cq) kullanılmıştır. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu LC3I/II dönüşümü ve p62 degradasyonu WB analizi yapılarak gösterilmiştir.

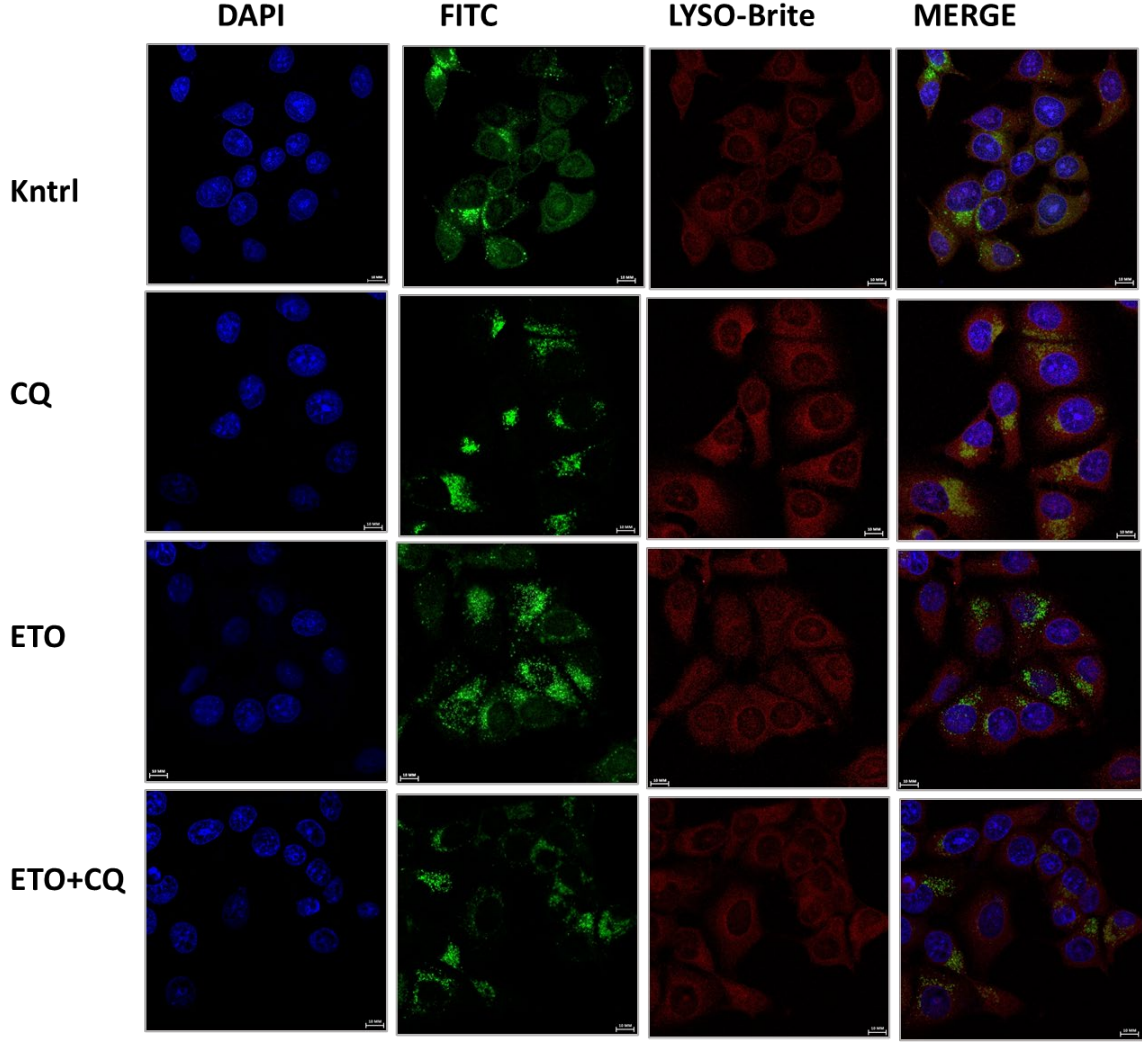
Şekil 7’de MCF-7 hücrelerinde kontrol grubunda bazal otofaji varlığında LC3I/II dönüşümü ve p62 degradasyonu görülmektedir. 150 µM Eto uygulanan gruplarda da LC3I/II dönüşümünde ve p62 degradasyonu görülmektedir. 10 µM Cq uygulanan gruplarda ise LC3I/II dönüşümünün arttığı ve p62’nin de akümüle olduğu görülmektedir. Eto+Cq uygulanan grupta ise LC3I/II dönüşümünde kontrole göre artış görülmektedir. MCF-7 hücrelerinde LC3I/II dönüşümü ve p62’deki degradasyon 150 µM Eto ile otofaji indüksiyonu olduğunu ve yine LC3I/II dönüşümü ve p62 akümüasyonu da 10 µM Cq ile otofaji inhibisyonu olduğunu göstermektedir (Şekil 7).



Şekil 7. MCF-7 hücrelerinde LC3I/II ve p62 ekspresyonlarının WB analizi

4.1.2. MCF-7 Hücrelerinde Genotoksik Stres İndüklü Otofajide LC3 Punkta Oluşumunun Belirlenmesi

4.1.1.'de yapılan WB analizine ek olarak, MCF-7 hücrelerinde 24 saat süre ile 150 μ M Eto ile otofaji indüksiyonu ve 10 μ M Cq ile de otofaji inhibisyonu sonrası LC3 punkta formasyonu immünfluoresan boyama yapılarak konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir. Kontrole göre Eto, Cq ve Eto+Cq uygulanan gruplarda LC3 punkta oluşumunda artış olduğu görülmüştür. Yapılan lizozom boyaması ile de LC3'ün lizozomal bölgelerde lokalize olduğu görülmektedir (Şekil 8).



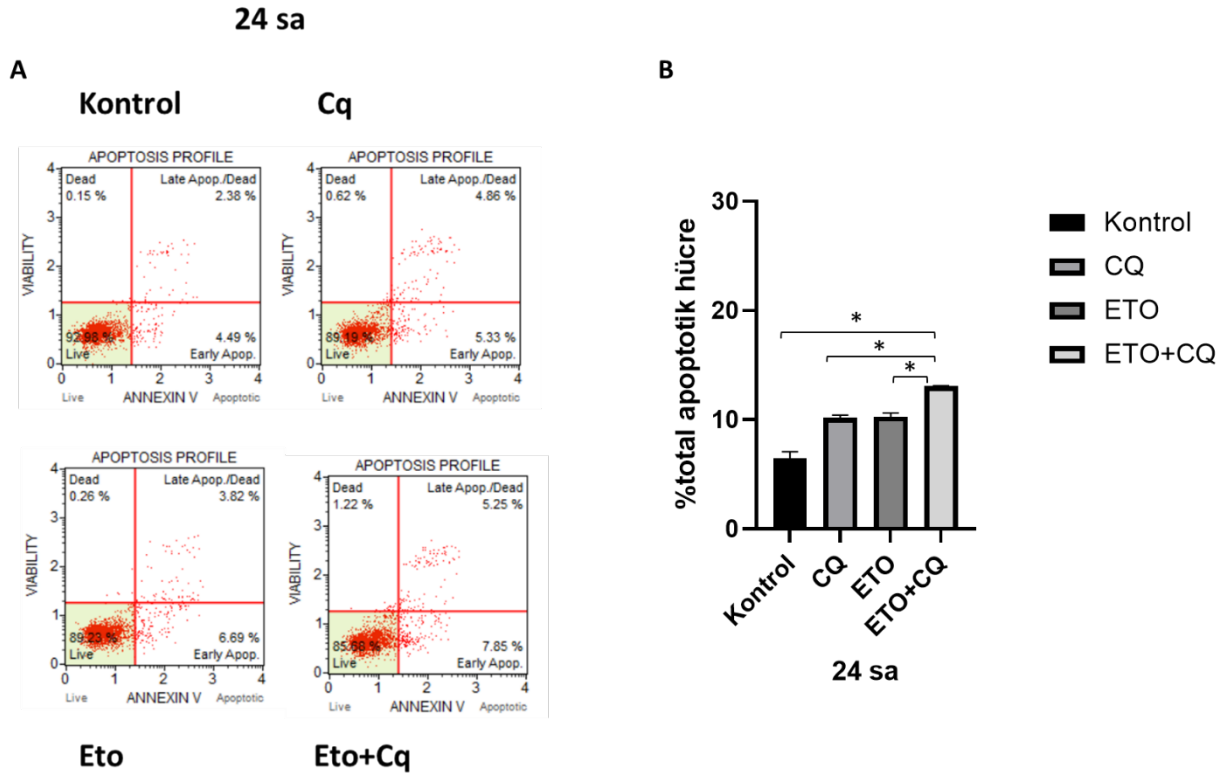
Şekil 8. MCF-7 hücrelerinde genotoksik stres aracılı otofaji indüksiyonunun ve klorokin ile otofaji inhibisyonunun LC3 punkta formasyonuna etkisinin immün boyama analizi ile gösterilmesi (Dapi: Nukleus, FITC: LC3, Lysobrite: Lizozom)

4.1.3. MCF-7 Hücrelerinde Genotoksik Strese Bağlı Hücre Ölümünün Belirlenmesi

MCF-7 hücrelerinde etoposide bağlı genotoksik stresin otofajiyle birlikte hücre ölümüne neden olup olmadığı Annexin V/7 AAD apoptoz analizi yapılarak belirlenmiştir.

24 saat süre ile 150 μ M Eto ve 10 μ M Cq uygulanan MCF-7 hücrelerinde, kontrolde % 6.87, Cq uygulanan grupta % 10.19, Eto uygulanan grupta % 10.51 ve Eto + Cq uygulanan grupta ise % 13,10 oranında total apoptoz görülmüştür (Şekil 9). Yapılan istatistik analizlere göre, Eto, Cq ve Eto+Cq uygulanan gruplar kontrole göre istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca Eto+Cq grubu da Cq ve Eto gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). (Kontrol: DMSO Kontrol)

MCF-7 hücrelerinde 24 saat süre ile 150 μ M Eto ve 10 μ M Cq uygulamalarının önemli oranda apoptotik hücre ölümüne neden olmadığı görülmüştür.

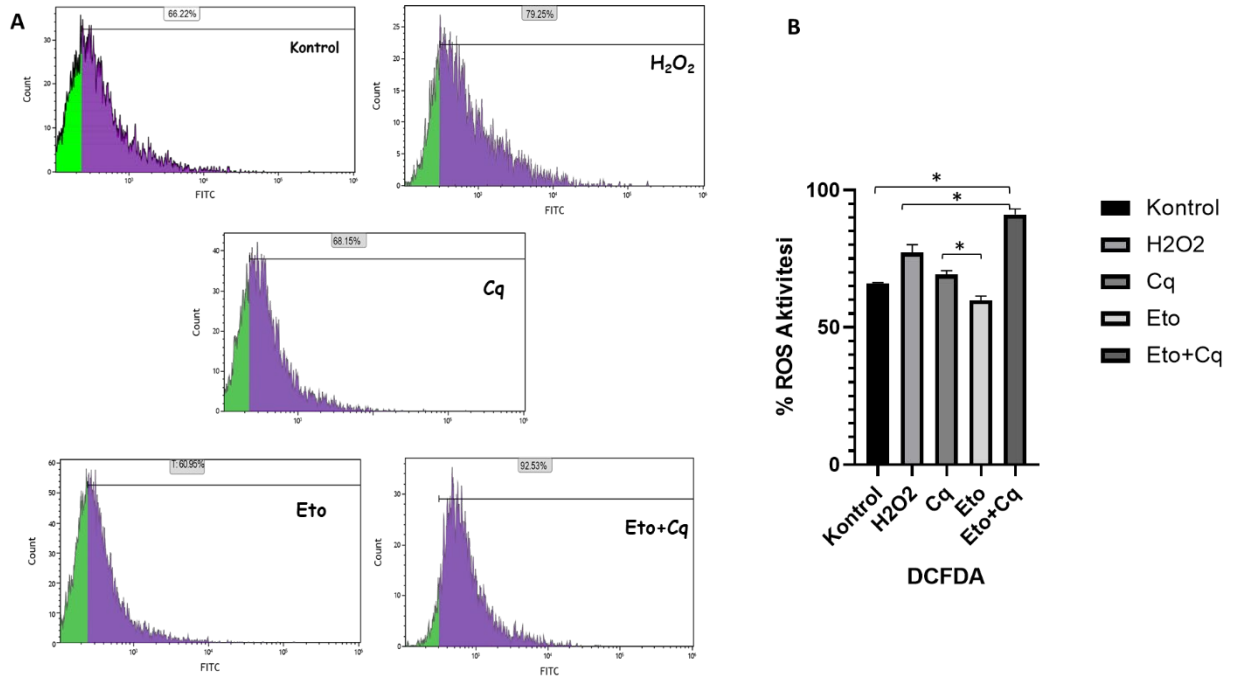


Şekil 9. MCF-7 hücrelerinde genotoksik stres indüklü otofaji varlığında total apoptoz profilleri (A) ve total apoptoz grafiği (B) (24 sa) ($p \leq 0.05$) (K vs Cq, Eto, Eto+Cq, Eto+Cq vs Cq, Eto).

4.1.4. MCF-7 Hücrelerinde Genotoksik Stres İndüklü Otofajinin Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Düzeyine Etkileri

ROS (süperoksit, serbest radikaller vb.) hızlıca radikellere (H₂O₂, vb.) dönüşerek DNA’da hasara yol açarak mutasyonlara, protein ve organel hasarlarına vb. neden olmaktadır. Meydana gelen bu hücresel hasarlar inflamasyona neden olarak tümörigeneze katkı sağlarlar (Czarny ve diğerleri, 2015). Tümörlerde intraselüler ROS seviyeleri otofaji ile de doğrudan ilişkilidir (Aggarwal ve diğerleri, 2019). MCF-7 hücrelerinde genotoksik stres indüklü otofaji induksiyonu ve klorokin ile inhibisyonunun ROS düzeylerine etkisi 2'-7'-Dikloridhidroflorosein diasetat (DCFDA) floresan prop kullanılarak flow sitometri ile ölçülmüştür.

24 saat süre ile 150 µM Eto ve 10 µM Cq uygulanan MCF-7 hücrelerinde kontrolde % 66.04, H₂O₂ pozitif kontrol grubunda % 74,7, Cq uygulanan grupta % 70,68, Eto uygulanan grupta % 58,4 ve Eto + Cq uygulanan grupta ise % 91,03 oranında ROS düzeyleri ölçülmüştür (Şekil 10). Yapılan istatistiksel analizlere göre Eto uygulanan grup dışında diğer gruplar kontrole göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p≤0.05). Gruplar arası yapılan karşılaştırmada ise Eto ve Eto+Cq uygulanan grupların H₂O₂ pozitif kontrol grubuna, Eto uygulanan grubunda Cq uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (p≤0.05).

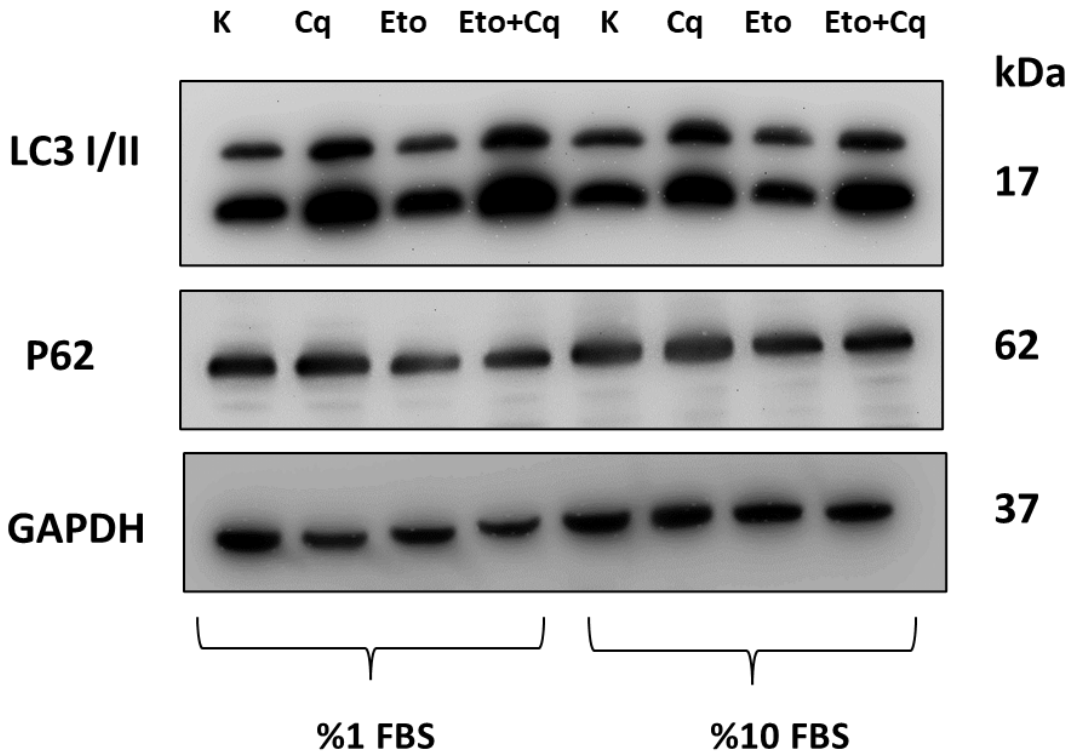


Şekil 10. MCF-7 hücrelerinin DCFDA ile ROS analizi histogram (A) ve grafiği (B) (24 sa), (H₂O₂ vs Eto, H₂O₂ vs Eto+Cq, Eto vs Cq) (p≤0.05).

4.2. Genotoksik Stres Aracılı Otofaji İndüksiyonu ve İnhibisyonu Sonrası Otofajik Sekrotom Karakterizasyonu

MCF-7 hücreleri 150 μ M Eto ve 10 μ M Cq ile 24 saat muamele edildi. Ancak hem sitokin array hem de LC/MS-MS analizlerinde FBS kaynaklı sorunlar yaşanabileceği için FBS oranı bu uygulamalarda %1'e düşürülerek deneyler yapılmıştır.

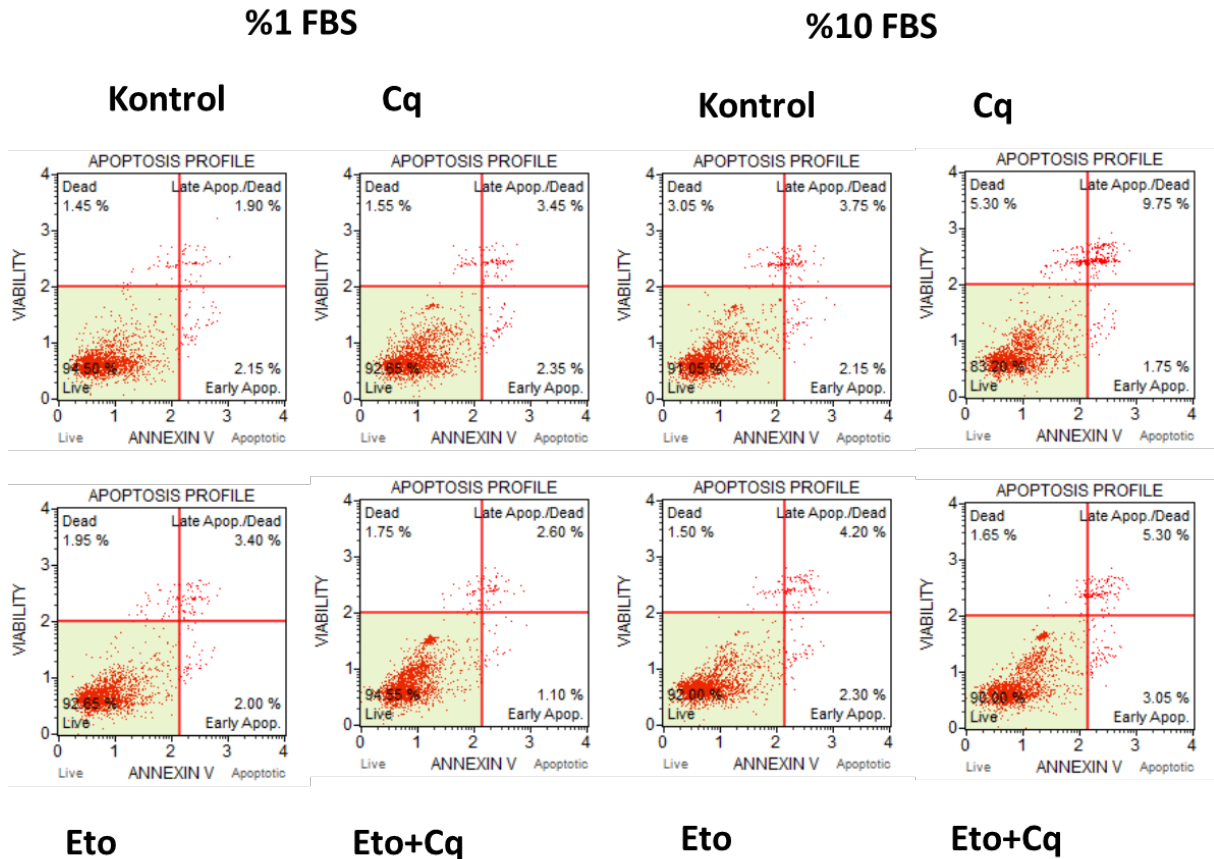
MCF-7 hücreleri %1 ve %10 FBS içeren ortamlarda 24 saat süre ile 150 μ M Eto ve 10 μ M Cq ile muamele edildi. 24 saatin ardından yapılan western blot analizlerine göre %1 ve %10 FBS içeren ortamlarda Eto gruplarında LC3 I/II dönüşümü ve p62 degradasyonu görülürken, Cq uygulanan gruplarda da LC3 I/II dönüşümü ve p62 akümüasyonu benzer şekilde görülmüştür. Sonuçlar %1 FBS kullanımının otofaji artışına neden olmadığını göstermektedir (Şekil 11).



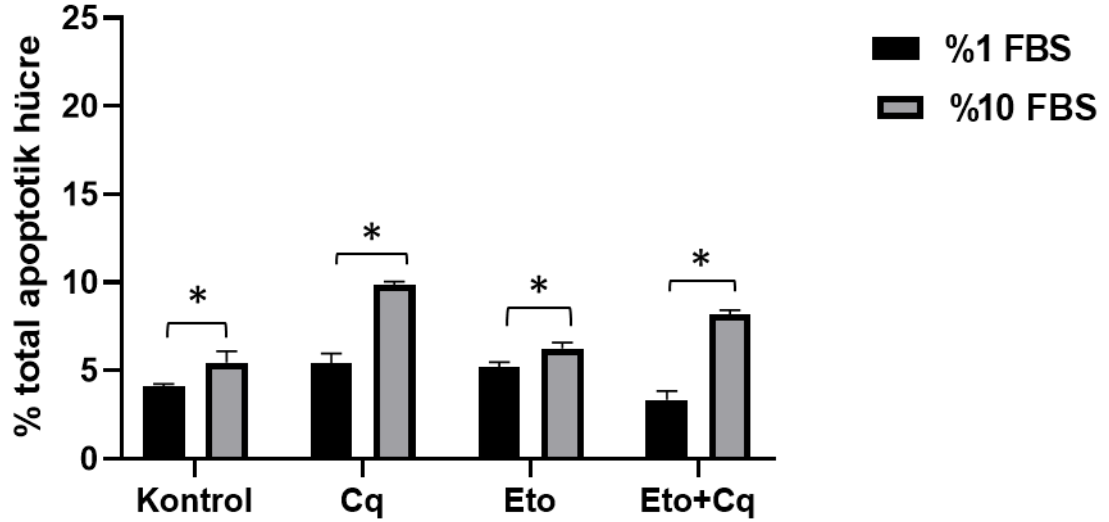
Şekil 11. MCF-7 hücrelerinde %1 ve %10 FBS içeren ortamlarda genotoksik stres aracılı otofaji indüksiyonunun ve klorokin ile otofaji inhibisyonunun WB analizi ile gösterilmesi

4.2.1. %1 FBS Ortamının Hücre Ölümüne Etkileri

FBS oranının düşürülmesinin otofaji artışına neden olmamasının yanısıra apoptotik hücre ölümünde de artışa neden olup olmadığını göstermek için Annexin V/7 AAD apoptoz analizi yapıldı. %1 FBS içeren ortamda büyüyen MCF-7 hücreleri 24 saat süre ile 150 μ M Eto ve 10 μ M Cq ile muamele edildiğinde kontrolde % 4.05, Cq uygulanan grupta % 5.8, Eto uygulanan grupta % 5.40 ve Eto + Cq uygulanan grupta ise % 3.70 oranında total apoptoz görülmüştür (Şekil 12-13). %10 FBS içeren ortamda büyüyen MCF-7 hücrelerinde ise kontrolde % 5.9, Cq uygulanan grupta % 11.5, Eto uygulanan grupta % 6.50 ve Eto + Cq uygulanan grupta ise % 8.35 oranında total apoptoz görülmüştür (Şekil 12-13). Yapılan istatistik analizlere göre, her iki FBS oranında da (%1 ve %10) Eto, Cq ve Eto+Cq uygulanan gruplar kontrole göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). Ayrıca %1 ve %10 FBS içeren gruplar karşılaştırıldığında da gruplar birbirine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$) (Şekil 14).



Şekil 12. MCF-7 hücrelerinde %1 ve %10 FBS varlığında apoptoz profilleri (24 sa)



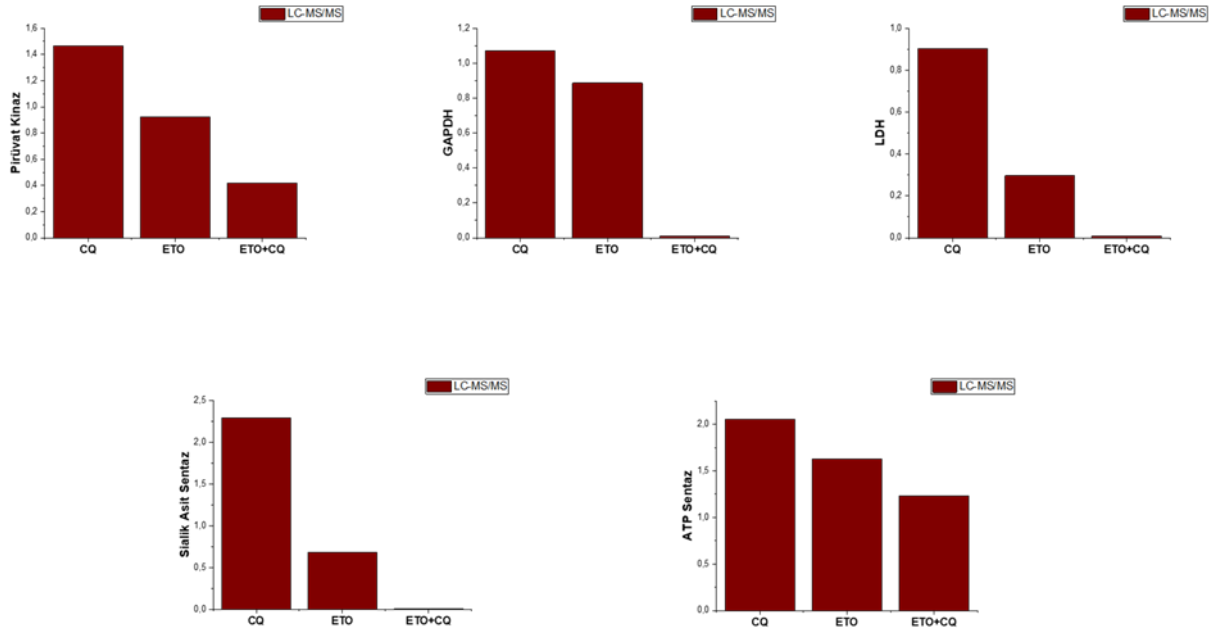
Şekil 13. MCF-7 hücrelerinde %1 ve %10 FBS varlığındaki total apoptoz grafiği (24 sa) ($p \leq 0.05$) (%1 FBS K vs %10 FBS K, %1 FBS Cq vs %10 FBS Cq, %1 FBS Eto vs %10 FBS Eto, %1 FBS Eto+Cq vs %10 FBS Eto+Cq).

4.2.2. MCF-7 Hücrelerinde Genotoksik Stres İndüklü Otofajik Sekretom İçeriğinin LC-MS/MS ile Belirlenmesi

MCF-7 hücreleri %1 FBS içeren ortamda 150 μ M Eto ve 10 μ M Cq ile 24 saat muamele edildi. 24 saatin sonunda her bir gruptan (Kontrol, Cq, Eto, Eto+Cq) toplanan koşullandırılmış ortamlar kullanılarak LC-MS/MS analizi yapıldı. LC-MS/MS sonuçlarına göre otofaji indüksiyonu ve modülasyonu ile oluşan otofajik sekretom içerisinde dikkat çeken oranlarda metabolik enzimlere, tümör antijenlerine, şaperonlara ve metastaz ilişkili proteinlere rastlanılmıştır. LC-MS/MS verileri Cq, Eto ve Eto+Cq sonuçlarının kontrole göre normalize edilmesi ile elde edilmiştir.

LC-MS/MS sonuçlarına göre pirüvat kinaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), laktat dehidrogenaz (LDH), sialik asit ve ATP sentaz öne çıkan metabolik enzimlerdendir. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu ile oluşan otofajik

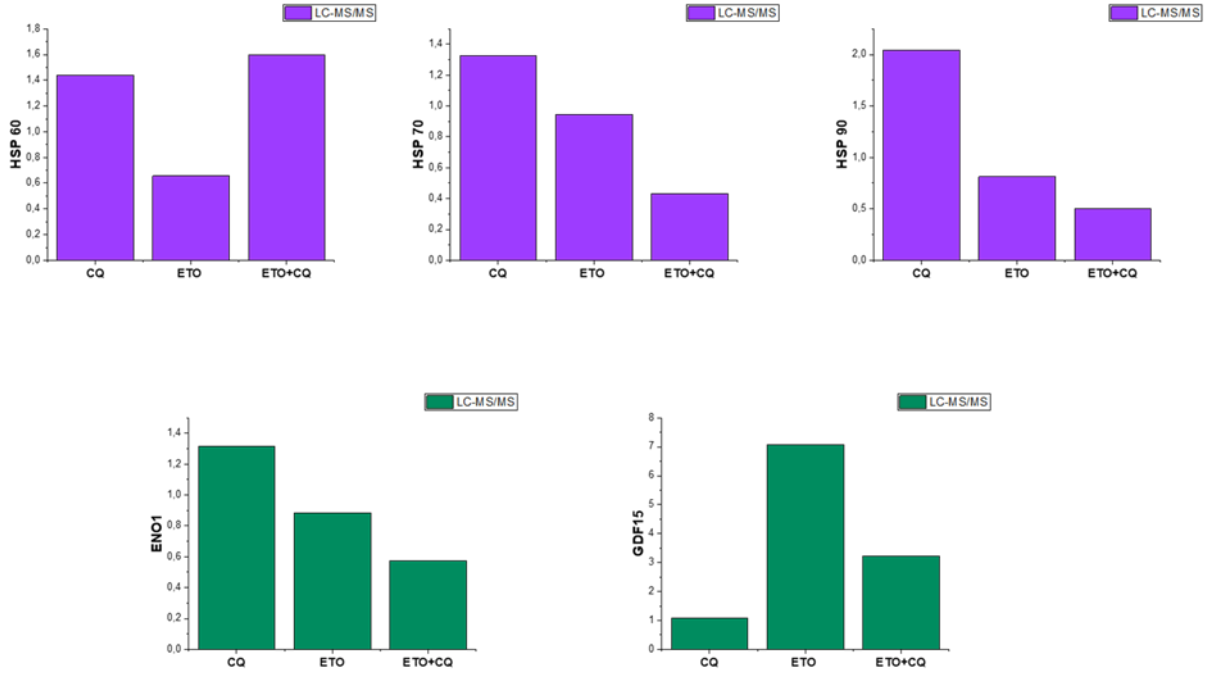
sekretomda yapılan LC-MS/MS analizinde pirüvat kinazın Cq uygulanan grupta arttığı, Eto ve Eto+Cq uygulanan gruplarda azaldığı, GAPDH, LDH ve sialik asidin Cq uygulanan grupta arttığı, Eto uygulanan grupta azaldığı ve Eto+Cq uygulanan grupta ise çok düşük seviyelerde olduğu ve ATP sentazın da Cq uygulanan grupta arttığı, Eto ve Eto+Cq uygulanan gruplarda ise azaldığı görülmüştür (Şekil 14).



Şekil 14. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu sonucu otofajik sekretom içeriğinde LC-MS/MS analizi ile belirlenen metabolik enzimler (sonuçlar kontrole göre normalize edilmiştir)

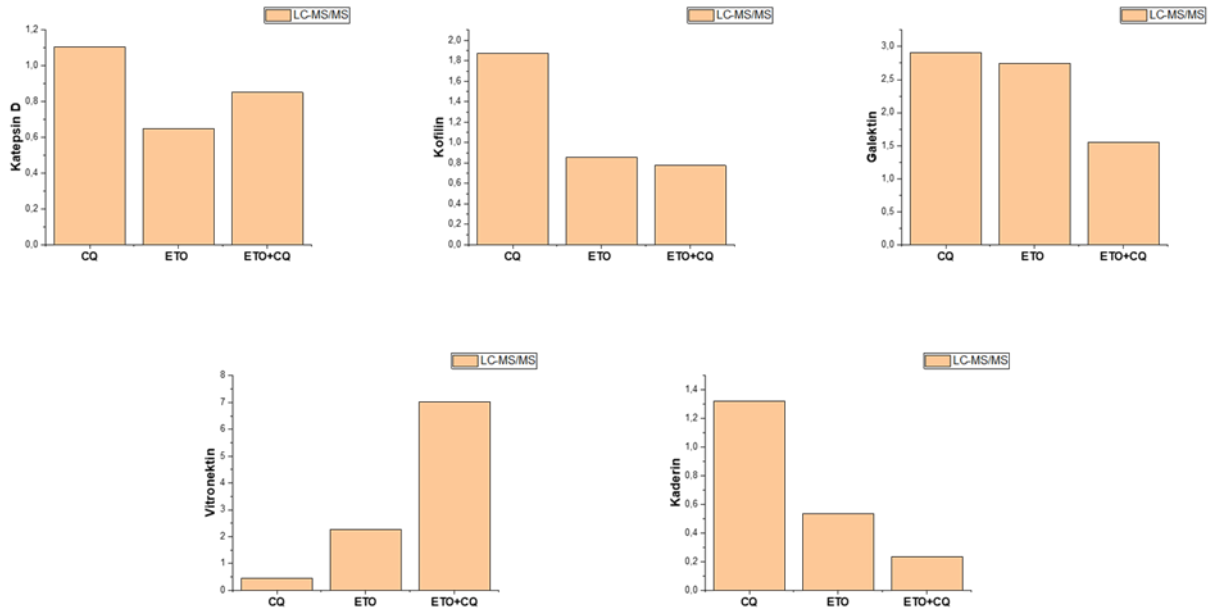
LC-MS/MS sonuçlarında bir diğer dikkat çeken proteinler ise ısı şoku proteinleri (Hsp60, Hsp70, Hsp90) ve tümör biyobelirteçleri olarak bilinen büyüme farklılaşma faktörü 15 (GDF15) ve α -Enolaz (ENO1)'dir. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu ile oluşan otofajik sekretomda yapılan LC-MS/MS analizinde HSP60'ın Cq ve Eto+Cq uygulanan gruplarda arttığı, Eto uygulanan grupta azaldığı, HSP70 ve HSP90'ın Cq uygulanan grupta arttığı, Eto ve Eto+Cq uygulanan gruplarda ise azaldığı görülmüştür (Şekil 15).

ENO1'in Cq uygulanan grupta arttığı, Eto ve Eto+Cq uygulanan gruplarda azaldığı, GDF15'in Cq ve Eto+Cq uygulanan gruplarda azaldığı, Eto uygulanan grupta ise arttığı görülmüştür (Şekil 15).



Şekil 15. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve modülasyonu ile oluşan otofajik sekretom içeriğinde LC-MS/MS analizi ile belirlenen şaperon proteinleri ve tümör antijenleri (sonuçlar kontrole göre normalize edilmiştir)

LC-MS/MS sonuçlarında dikkat çeken diğer proteinler ise kathepsin D (Cat-D), kofilin, galektinler, vitronektin ve kadherin gibi hücre isketinde bulunan, hücre-hücre adezyonunda görev alan ve metastaz ilişkili olduğu bilinen proteinlerdir. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu ile oluşan otofajik sekretomda yapılan LC-MS/MS analizinde Cat D'nin Cq ve Eto+Cq uygulanan gruplarda arttığı, Eto uygulanan grupta azaldığı, kofilinin Cq uygulanan grupta arttığı, Eto ve Eto+Cq uygulanan gruplarda azaldığı, galektinin Cq ve Eto uygulanan gruplarda arttığı, Eto+Cq uygulanan grupta azaldığı, vitronektinin Cq ve Eto uygulanan gruplarda azaldığı, Eto+Cq uygulanan grupta arttığı ve kadherinin de Cq uygulanan grupta arttığı, Eto ve Eto+Cq uygulanan grupta ise azaldığı görülmüştür (Şekil 16).

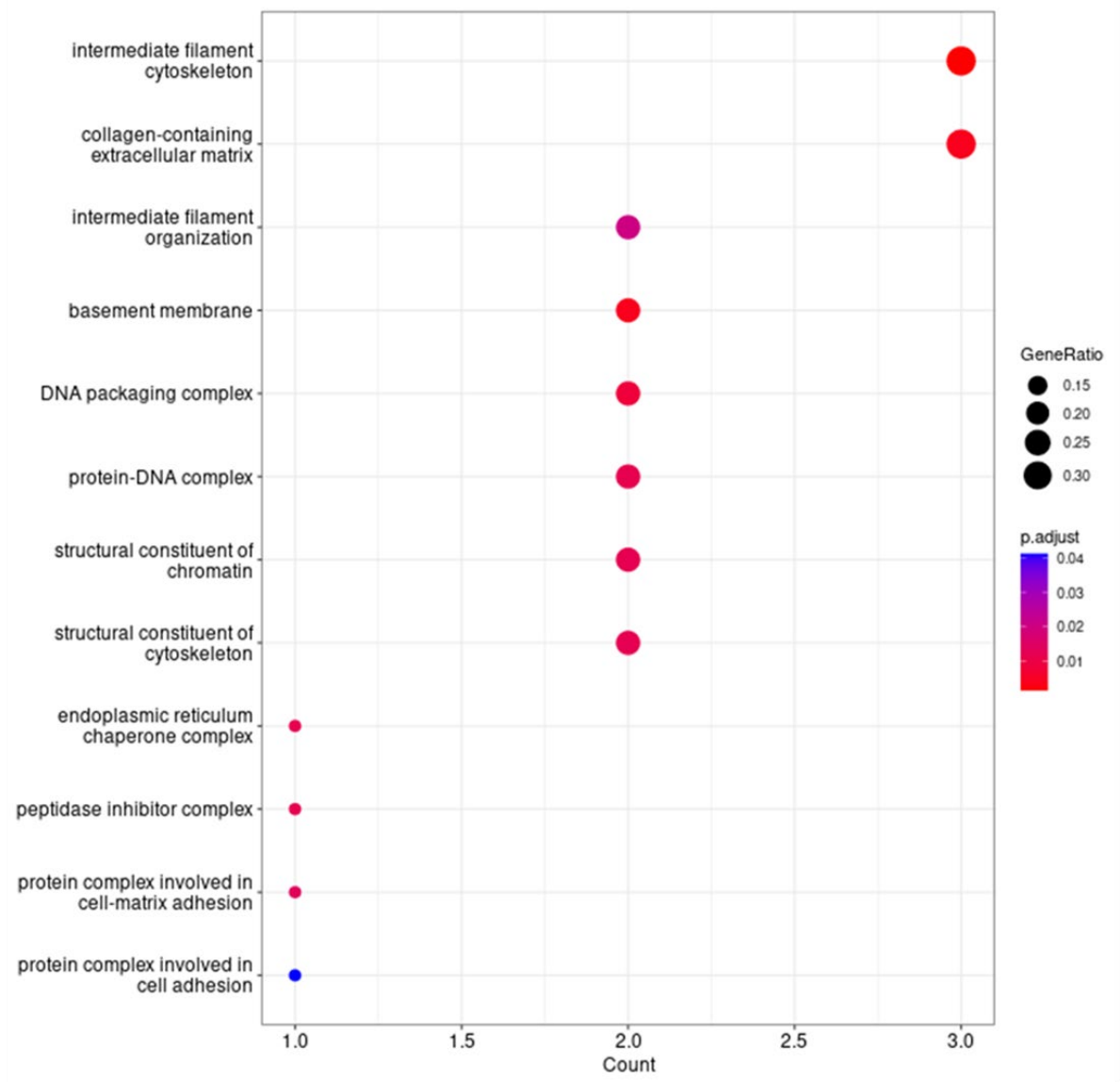


Şekil 16. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve modülasyonu ile oluşan otofajik sekretom içeriğinde LC-MS/MS analizi ile belirlenen metastaz ilişkili proteinler (sonuçlar kontrole göre normalize edilmiştir)

4.2.2.1. LC-MS/MS Verilerinin Biyoinformatik Analiz Sonuçları

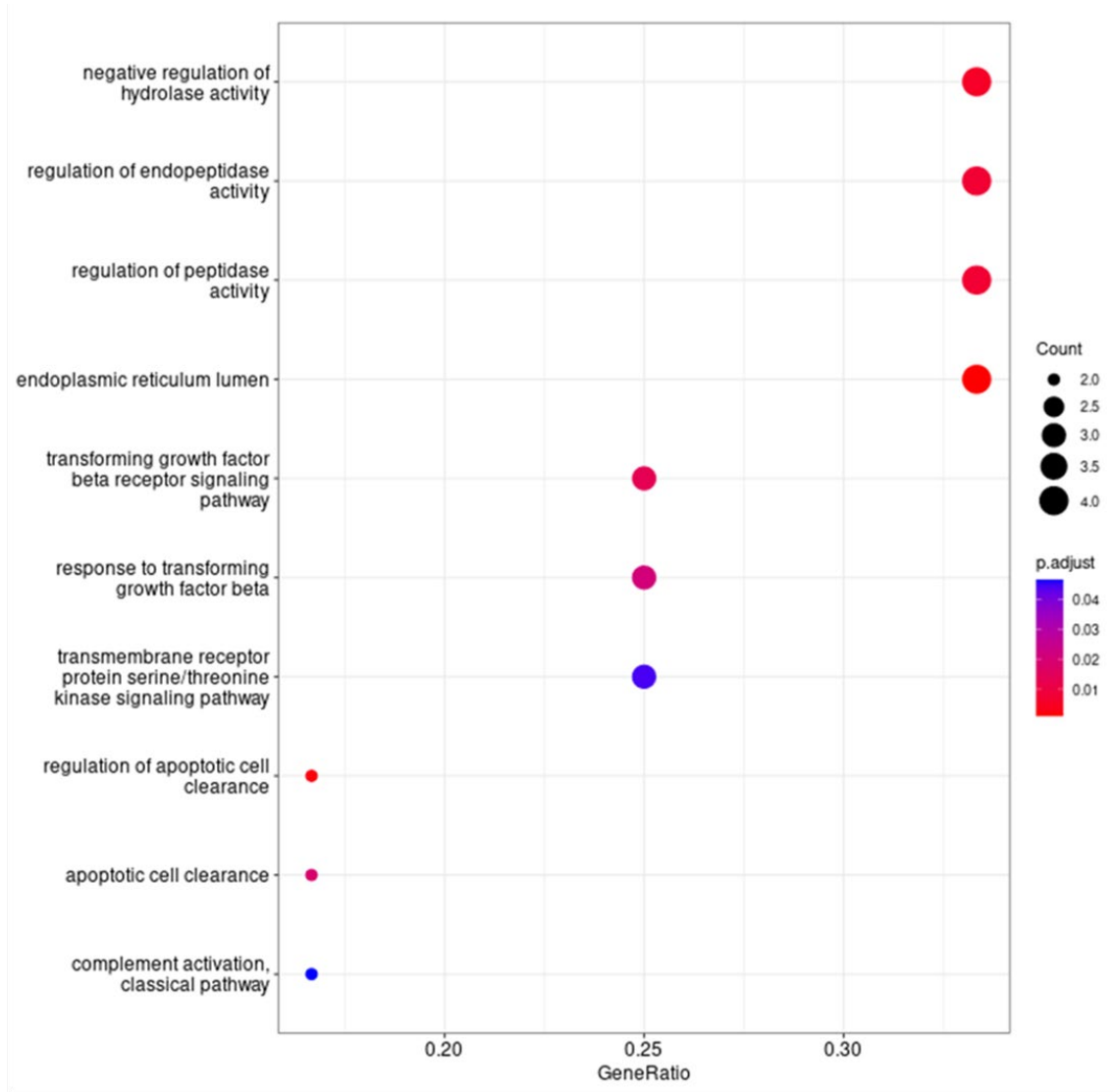
MCF-7 hücrelerinin 150 μ M Eto ve 10 μ M Cq ile 24 saat muamele edilmesinin ardından her bir gruptan (Kontrol, Cq, Eto, Eto+Cq) toplanan koşullandırılmış ortamlar kullanılarak yapılan LC-MS/MS analizi sonuçları ayrıca biyoinformatik analizlerle değerlendirilmiştir. Gruplardan elde edilen sonuçlar (Eto grubu vs Cq grubu, Eto+Cq grubu vs Cq grubu) ‘Gen Ontoloji’ analizi yapılarak karşılaştırıldı. Gen Ontoloji analizi ile proteinlerin; biyolojik proses, moleküler fonksiyon ve hücresel bileşen dahil olmak üzere üç tamamlayıcı biyolojik özelliğine göre sınıflandırılması yapılmaktadır.

Eto grubu ile Cq grubunun karşılaştırılması sonucunda sekretomda, Eto grubunda Cq grubuna göre ifadesi 2 kat ve üzeri artış gösteren proteinler; gen ontoloji analizi sonuçlarına göre sitoskelet proteinleri, ekstrasellüler matris proteinleri, membran proteinleri, kromatin yapısal proteinleri, şaperon kompleks proteinleri ve hücre adezyon proteinleri olarak sınıflandırıldı (Şekil 17).



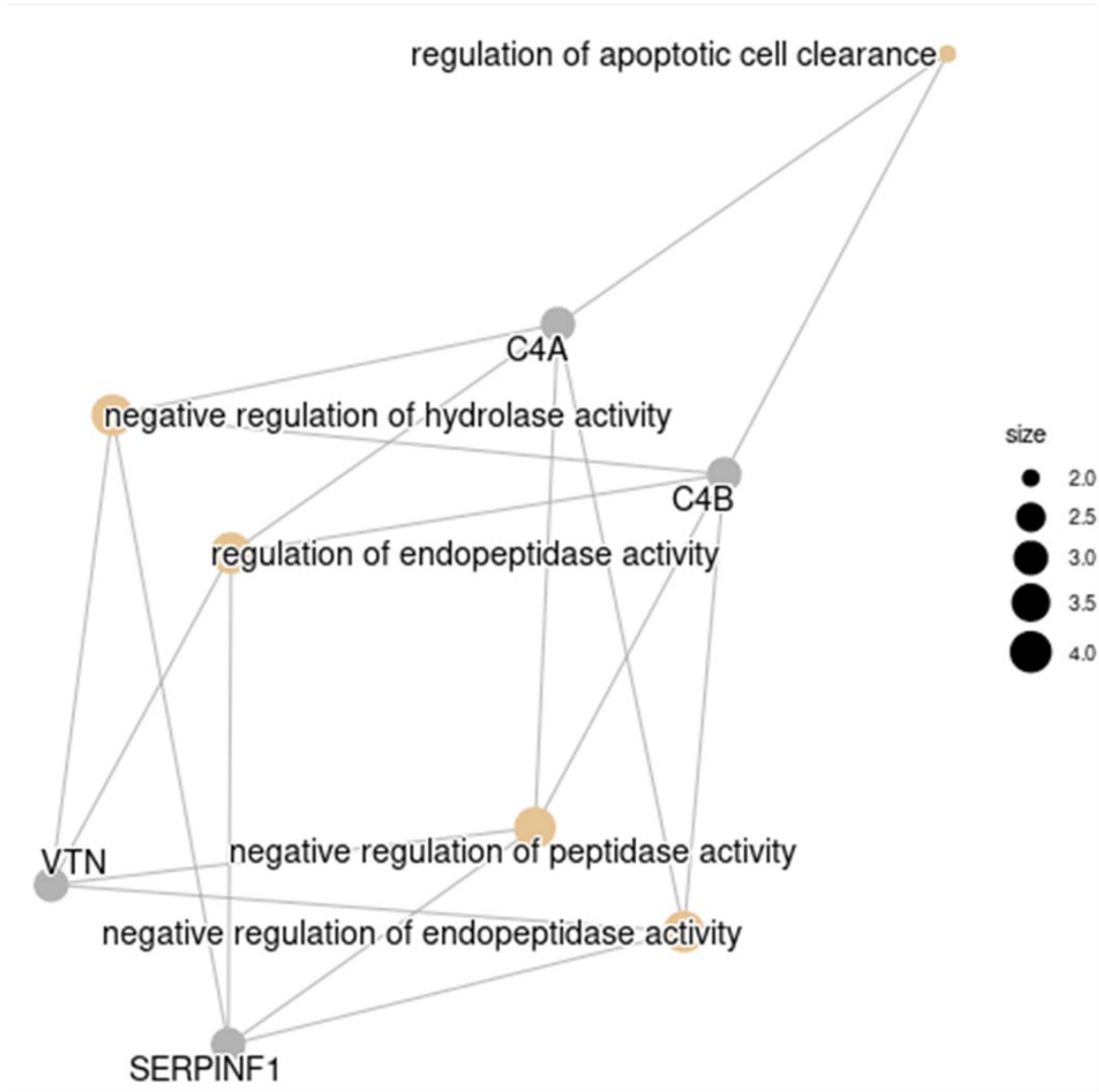
Şekil 17. MCF-7 hücrelerinin Eto ile Cq gruplarının karşılaştırılması ile proteinlerin zenginleştirme skoru 2 olan kümeler halinde Gen Ontolojisi analizine göre gruplandırılması (dotplot) (X eksen: p değeri, Y eksen: ontoloji kategorisi)

Eto+Cq grubu ile Cq grubunun karşılaştırılması sonucunda sekretomda, Eto+Cq grubunda Cq grubuna göre ifadesi 2 kat ve üzeri artış gösteren proteinler ise; hidrolaz aktivitesini negatif düzenleyen proteinler, endopeptidaz aktivitesini düzenleyen proteinler, peptidaz aktivitesini düzenleyen proteinler, TGF- β reseptör sinyal yolağını düzenleyen proteinler, apoptotik hücre kleransını düzenleyen proteinler olarak sınıflandırıldı (Şekil 18).



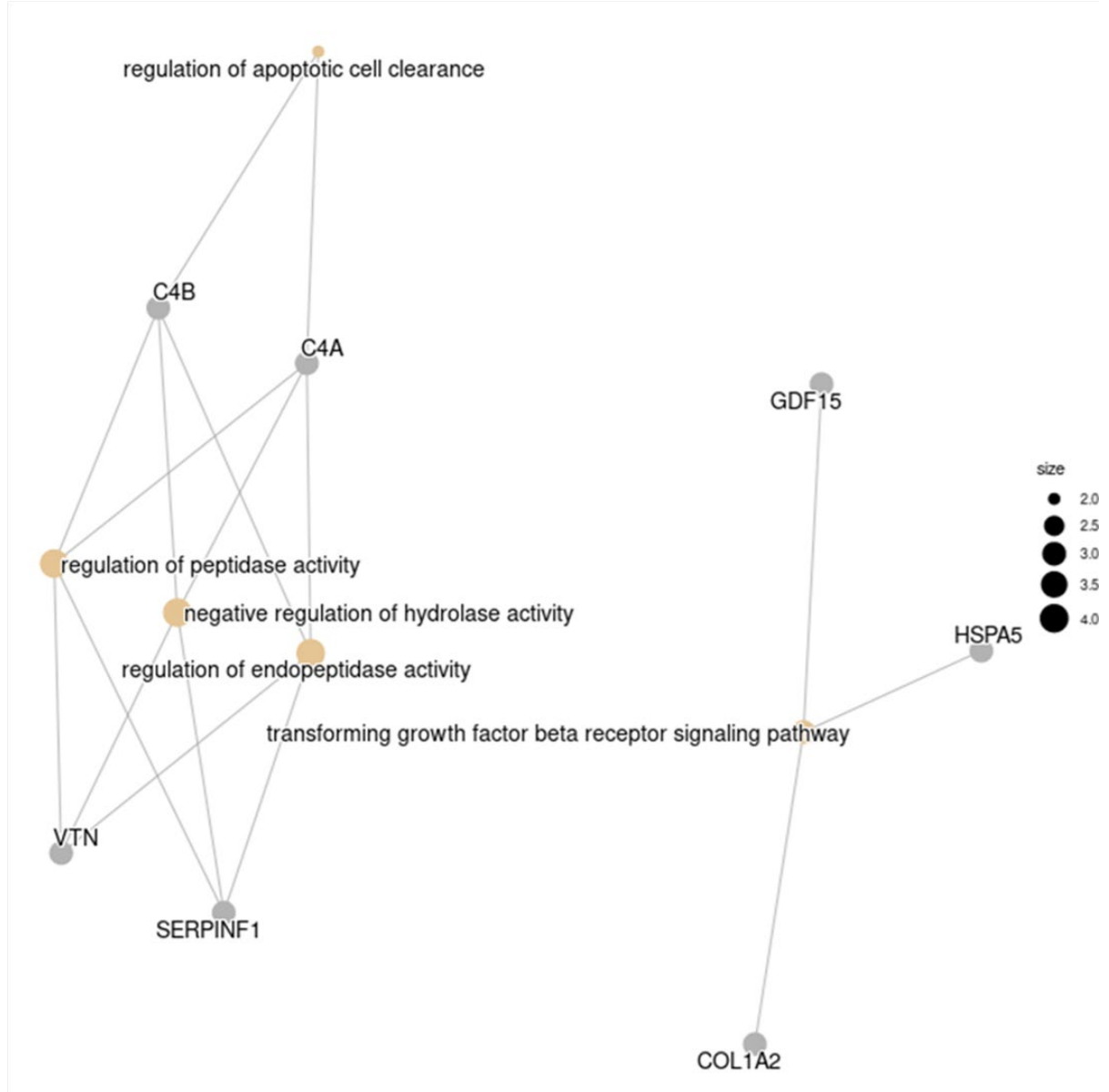
Şekil 18. MCF-7 hücrelerinin Eto+Cq ile Cq gruplarının karşılaştırılması ile proteinlerin zenginleştirme skoru 2 olan kümeler halinde Gen Ontolojisi analizine göre gruplandırılması (dotplot) (X eksen: p değeri, Y eksen: ontoloji kategorisi)

Gen Ontoloji analizi aynı zamanda cnetplot olarak da gösterildi. Cnetplot ile sekretomda bulunan proteinleri kodlayan genler ve ilgili yollar arasındaki interaksiyon gösterilmektedir. Eto grubu ile Cq grubu karşılaştırıldığında, vitronektin kodlayan VTN geninin hidrolaz aktivitesinin negatif düzenlenmesi, endopeptidaz aktivitesinin düzenlenmesi ve peptidaz aktivitesinin düzenlenmesi ile ilişkili yollarda görev aldığı görülmüştür (Şekil 19).



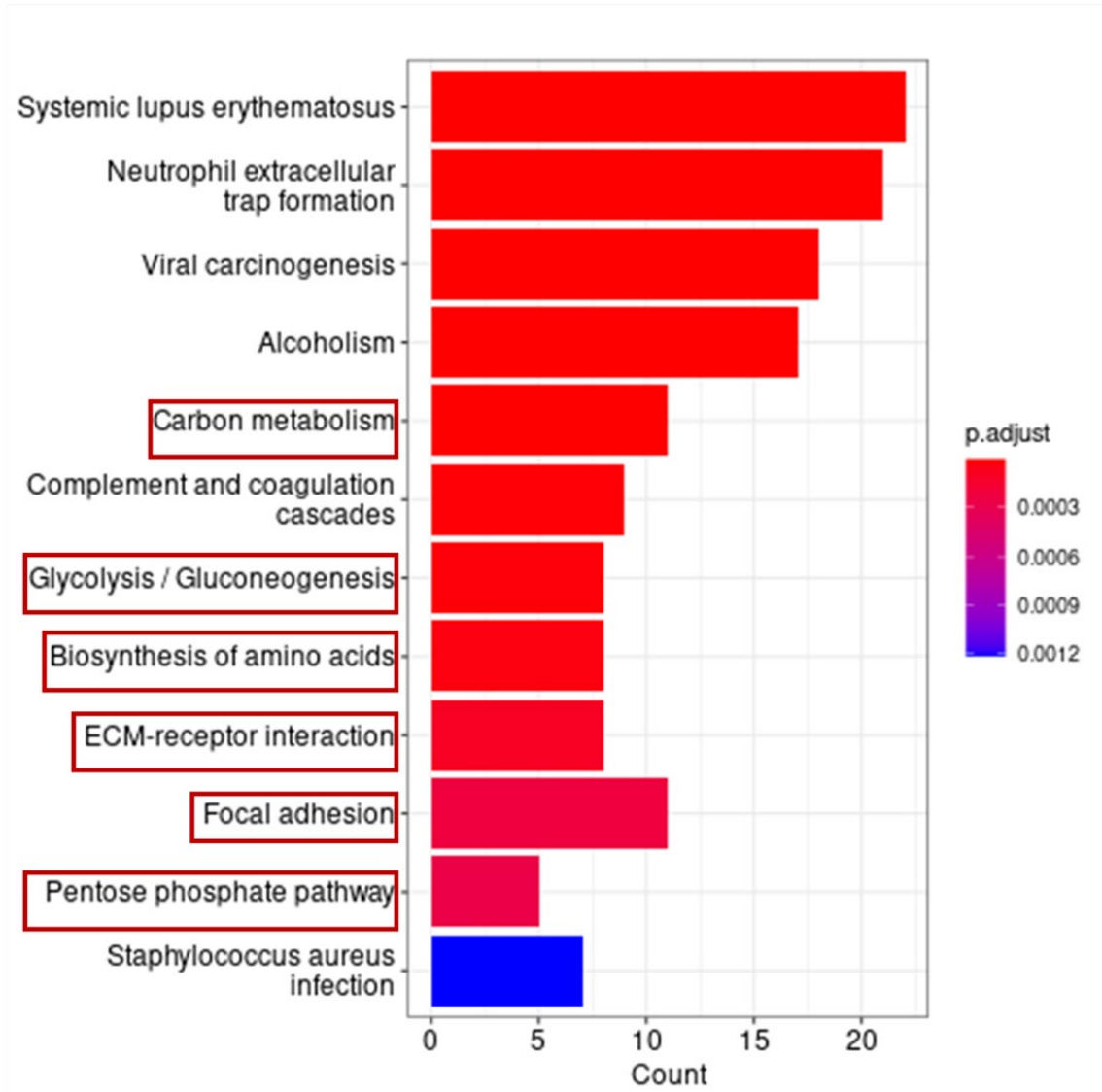
Şekil 19. MCF-7 hücrelerinin Eto ile Cq gruplarının karşılaştırılması ile proteinlerin zenginleştirme skoru 2 olan kümeler halinde Gen Ontolojisi analizine göre gruplandırılması (cnetplot)

Eto+Cq grubu ile Cq grubu karşılaştırıldığında, VTN geni ile ilişkili yolların dışında, büyüme farklılaşma proteini 15'i kodlayan GDF15, ısı şoku proteini 70'i kodlayan HSPA5 ve tip1 kollojen kodlayan COL1A2 genlerinin TGF- β sinyal yolağında görev aldığı görülmüştür (Şekil 20).



Şekil 20. MCF-7 hücrelerinin Eto+Cq ile Cq gruplarının karşılaştırılması ile proteinlerin zenginleştirme skoru 2 olan kümeler halinde Gen Ontolojisi analizine göre gruplandırılması (cnetplot)

Eto grubu ile Cq grubu kegg pathway analizi yapılarak karşılaştırıldı. Kegg analizi proteinlerin rol aldıkları yolların belirlenmesinde kullanılır (Wu ve diğerleri, 2021). Kegg analizi sonucunda sekretomda tespit edilen proteinlerin; karbon metabolizması, glikoliz/glukoneogenezis, amino asit biyosentezi, ekstrasellüler matriks reseptör interaksyonu, adezyon ve pentoz fosfat yolağı gibi tümör hücrelerinde önemli etkileri olan yollarda görev aldığı görüldü (Şekil 21).

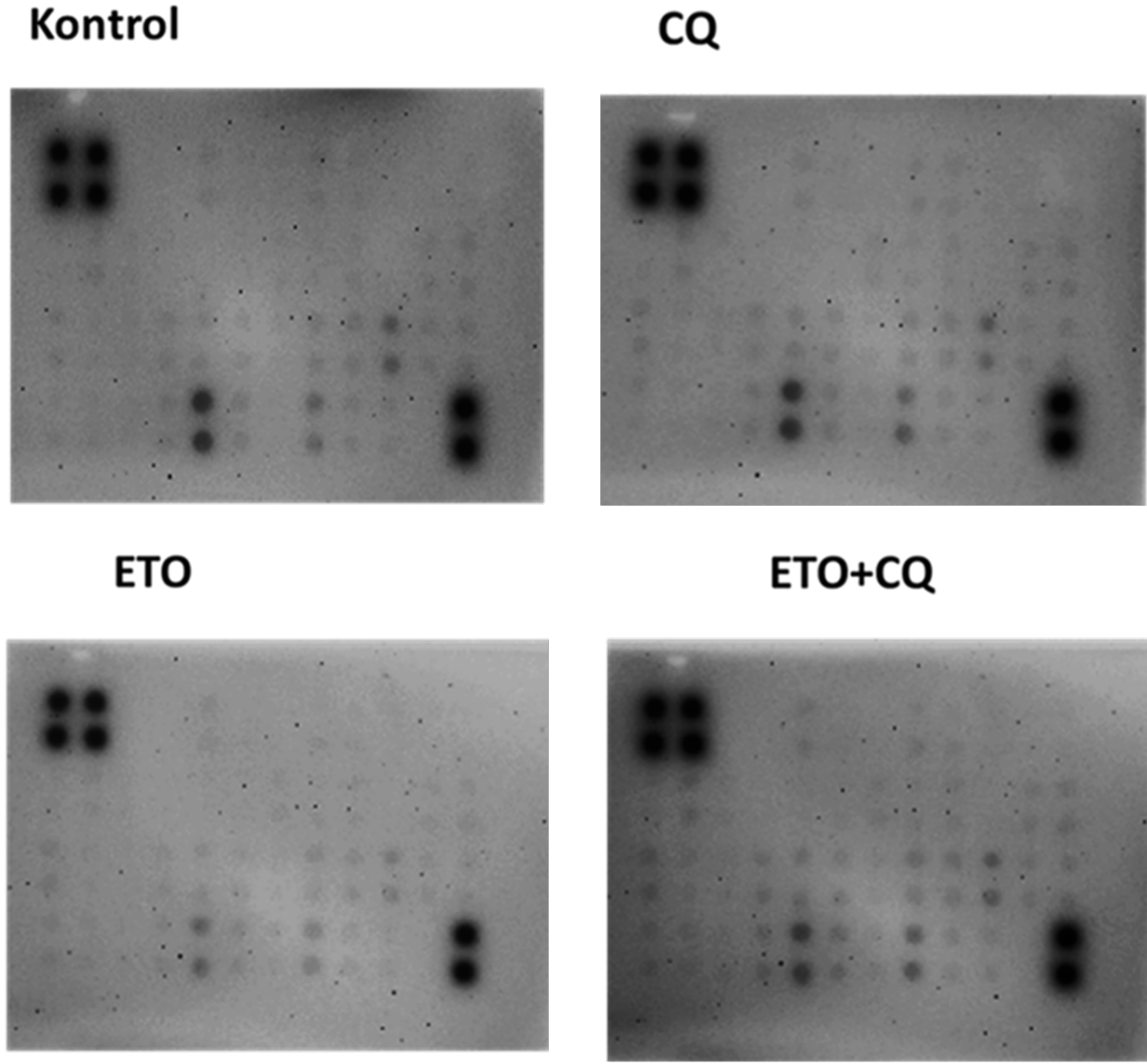


Şekil 21. MCF-7 hücrelerinin Eto ve Cq gruplarının karşılaştırılması ile proteinlerin zenginleştirme skoru 2 olan kümeler halinde Kegg analizine göre gruplandırılması

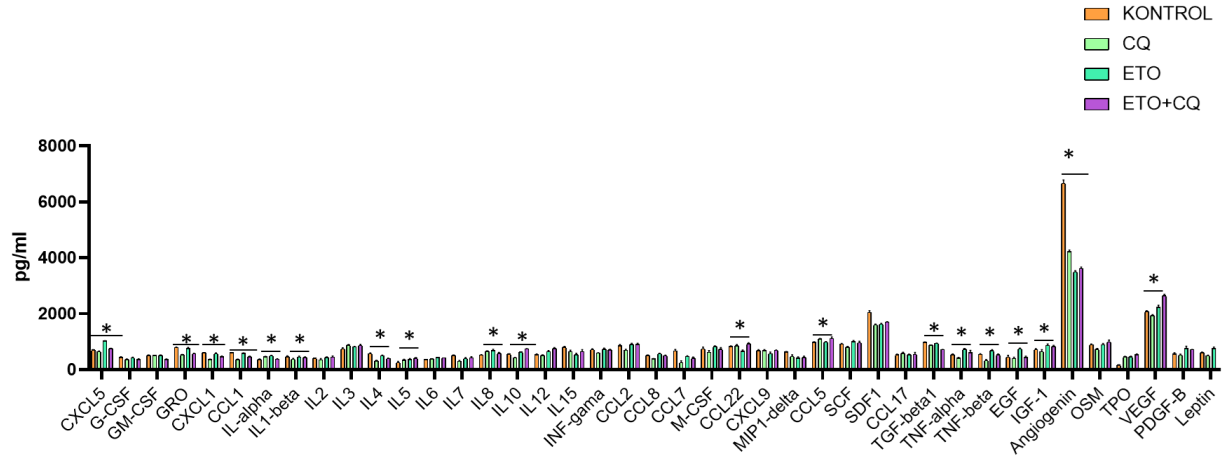
4.2.3. Genotoksik Stes İndüklü Otofajik Sekretomda Sitokin/Kemokin ve Büyüme Faktörlerinin Belirlenmesi

MCF-7 hücrelerinde genotoksik stres sonucu indüklenen otofajik sekretomda bulunan sitokin/kemokin ve büyüme faktörlerinin belirlenmesi için sitokin *array* analizi yapıldı.

MCF-7 hücreleri %1 FBS içeren ortamda 150 μ M Eto ve 10 μ M Cq ile 24 saat muamele edildi. 24 saatin sonunda her bir gruptan (Kontrol, Cq, Eto, Eto+Cq) toplanan koşullandırılmış ortamlar 5000 rpm'de 2 dk. santrifüjlenip hücresel debrislerin uzaklaştırılmasından sonra sitokin *array* analizinde kullanıldı. Sitokin *array* ile sekretom içerisinde 41 farklı sitokin/kemokin ve büyüme faktörü (CXCL5, GCSF, GM-CSF, GRO, CXCR1, CCL1, IL1 α , IL1 β , IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL10, IL12, IL13, IL15, INF γ , CCL2, CCL8, CCL7, M-CSF, CCL22, CXCL9, MIP1 δ , CCL5, SCF, SDF1, CCL17, TGF β , TNF α , TNF β , EGF, IGF-1, Anjiogenin, OSM, TPO, VEGF α , PDGF-BB, Leptin) tespit edildi. Sekretom içerisinde bulunan her bir sitokin/kemokin ve büyüme faktörü miktarları gruplar arasında farklılık göstermektedir (Şekil 22, 23). CXCL5, GRO, CXCL1, IL1 α , IL1 β , IL4, IL5, IL8, IL10, CCL22, CCL5, TGF β , TNF α , TNF β , EGF, IGF1, VEGF gibi sitokin/kemokin ve büyüme faktörleri kontrole göre diğer gruplar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$) (Şekil 23).



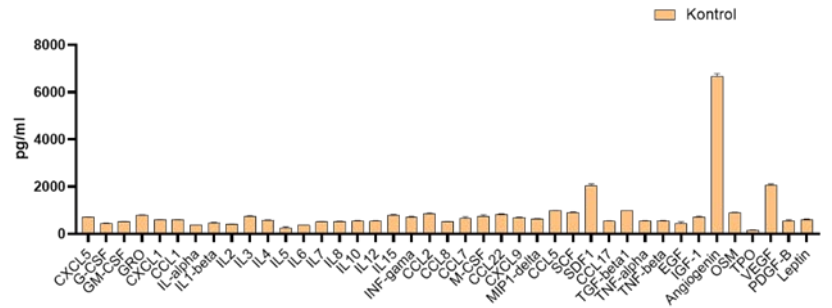
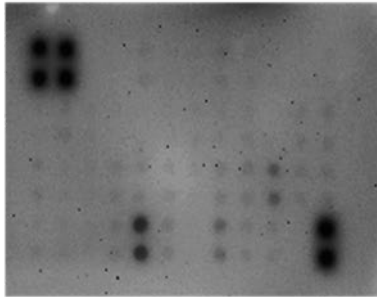
Şekil 22. MCF-7 hücrelerinde kontrol, Cq, Eto, Eto+Cq gruplarına ait sitokin array membranının ECL görüntüleme sonucu ve grafiksel gösterimi



Şekil 23. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu ile oluşan otofajik sekretomda bulunan sitokin/kemokin ve büyüme faktörlerinin grafığı ($p \leq 0.05$).

Sitokin array sonuçlarında her bir grupta tespit edilen sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin grafikleri ve miktarlarını gösteren tablolar aşağıda yer almaktadır (Tablo 10-13, Şekil 24-27).

Kontrol

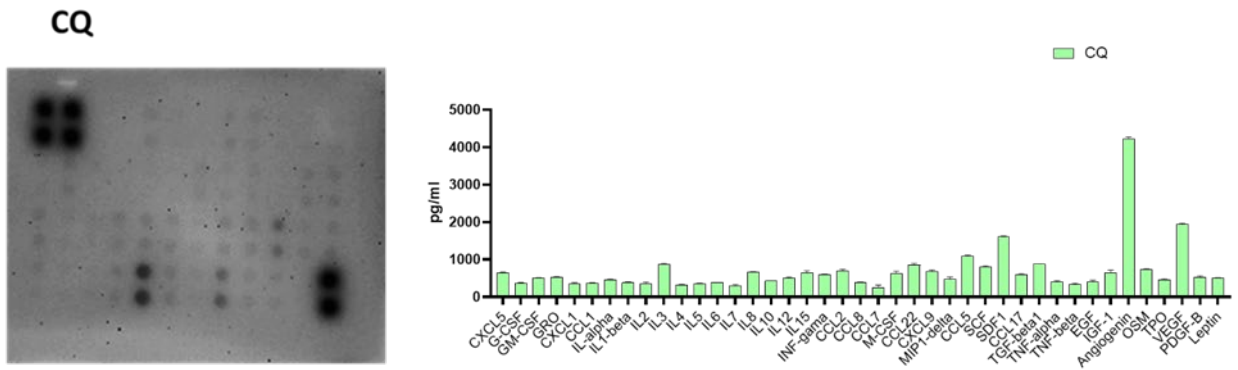


Şekil 24. MCF-7 hücrelerinde kontrol grubuna ait sitokin array membranının ECL görüntüleme sonucu ve grafiksel gösterimi

Tablo 8. Kontrol grubunda bulunan sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin miktarları (pg/ml)

CXCL5	GCSF	GMCSF	GRO	CXCL1	CCL1	IL1 α	IL1 β	IL2	IL3
712,5 pg/ml	456 pg/ml	524 pg/ml	808 pg/ml	610,5 pg/ml	610,5 pg/ml	379,5 pg/ml	488 pg/ml	414,5 pg/ml	769,5 pg/ml
IL4	IL5	IL6	IL7	IL8	IL10	IL12	IL15	INF γ	CCL2

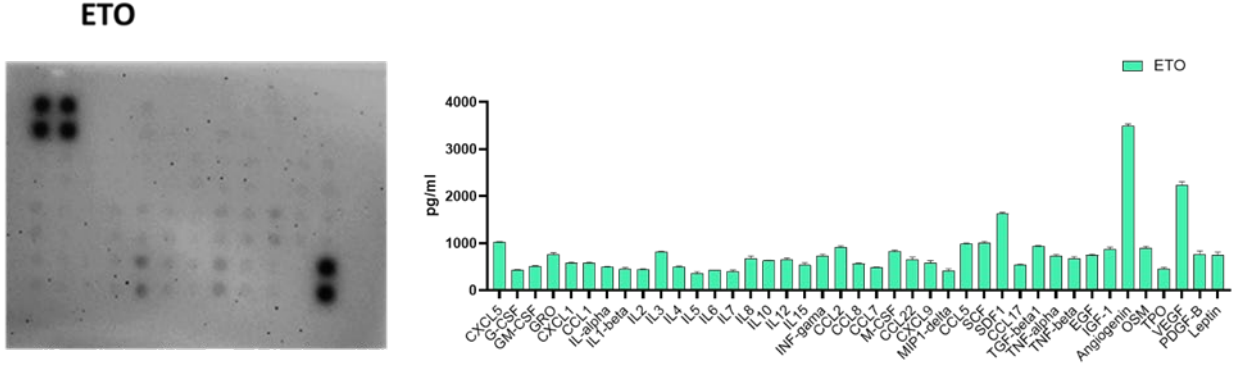
590 pg/ml	285 pg/ml	372,5 pg/ml	518,5 pg/ml	530 pg/ml	564 pg/ml	555 pg/ml	821 pg/ml	740,5 pg/ml	884,5 pg/ml
CCL8	CCL7	MCSF	CCL22	CXCL9	MIP1delta	CCL5	SCF	SDF1	CCL17
521,5 pg/ml	709,5 pg/ml	701 pg/ml	845 pg/ml	711 pg/ml	610 pg/ml	994 pg/ml	931,5 pg/ml	2089,5 pg/ml	552,5 pg/ml
TGFβ	TNFα	TNFβ	EGF	IGF	Anjiogenin	OSM	VEGFα	PDGF	Leptin
986 pg/ml	555 pg/ml	565,5 pg/ml	409 pg/ml	741 pg/ml	6746,5 pg/ml	910,5 pg/ml	2052,5 pg/ml	590 pg/ml	627,5 pg/ml



Şekil 25. MCF-7 hücrelerinde Cq grubuna ait sitokin array membranının ECL ile görüntüleme sonucu ve grafiği

Tablo 9. Cq grubunda bulunan sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin miktarları (pg/ml)

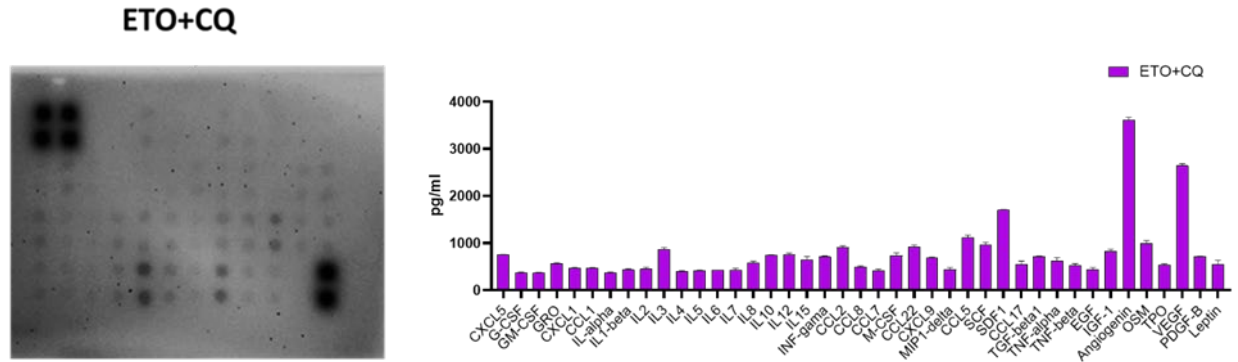
CXCL5 642 pg/ml	GCSF 365 pg/ml	GMCSF 505 pg/ml	GRO 539,21 pg/ml	CXCL1 371,89 pg/ml	CCL1 371,89 pg/ml	IL1α 470,31 pg/ml	IL1β 395,85 pg/ml	IL2 381,73 pg/ml	IL3 865,31 pg/ml
IL4 329,95 pg/ml	IL5 360,76 pg/ml	IL6 393,28 pg/ml	IL7 321,39 pg/ml	IL8 667,17 pg/ml	IL10 435,22 pg/ml	IL12 497 pg/ml	IL15 682,58 pg/ml	INFγ 603,4 pg/ml	CCL2 721,95 pg/ml
CCL8 394,14 pg/ml	CCL7 198 pg/ml	MCSF 665,89 pg/ml	CCL22 884,14 pg/ml	CXCL9 707,4 pg/ml	MIP1delta 514,39 pg/ml	CCL5 1113,95 pg/ml	SCF 791 pg/ml	SDF1 1623,63 pg/ml	CCL17 613,25 pg/ml
TGFβ 883,71 pg/ml	TNFα 391 pg/ml	TNFβ 353,91 pg/ml	EGF 432,23 pg/ml	IGF 697,13 pg/ml	Anjiogenin 4259,78 pg/ml	OSM 749,33 pg/ml	VEGFα 1959,14 pg/ml	PDGF 549,48 pg/ml	Leptin 510,11 pg/ml



Şekil 26. MCF-7 hücrelerinde Eto grubuna ait sitokin array membranının ECL ile görüntüleme sonucu ve grafiği

Tablo 10. Eto grubunda bulunan sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin miktarları (pg/ml)

CXCL5 1019 pg/ml	GCSF 435,5 pg/ml	GMCSF 520,93 pg/ml	GRO 785,64 pg/ml	CXCL1 593,59 pg/ml	CCL1 593,59 pg/ml	IL1 α 506,48 pg/ml	IL1 β 472,91 pg/ml	IL2 453,79 pg/ml	IL3 826,43 pg/ml
IL4 511,58 pg/ml	IL5 386,66 pg/ml	IL6 434,25 pg/ml	IL7 418,5 pg/ml	IL8 717,66 pg/ml	IL10 635,65 pg/ml	IL12 674,32 pg/ml	IL15 568,94 pg/ml	INF γ 758,87 pg/ml	CCL2 934,36 pg/ml
CCL8 577,86 pg/ml	CCL7 468 pg/ml	MCSF 841,73 pg/ml	CCL22 624,18 pg/ml	CXCL9 614,83 pg/ml	MIP1delta 446,57 pg/ml	CCL5 997,24 pg/ml	SCF 1032,51 pg/ml	SDF1 1648,19 pg/ml	CCL17 552,5 pg/ml
TGF β 949,23 pg/ml	TNF α 713 pg/ml	TNF β 705,76 pg/ml	EGF 761,42 pg/ml	IGF 900,79 pg/ml	Anjiogenin 3522 pg/ml	OSM 924,58 pg/ml	VEGF α 2284,26 pg/ml	PDGF 817,08 pg/ml	Leptin 790,31 pg/ml



Şekil 27. MCF-7 hücrelerinde Eto grubuna ait sitokin array membranının ECL ile görüntüleme sonucu ve grafiği

Tablo 11. Eto+Cq grubunda bulunan sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin miktarları (pg/ml)

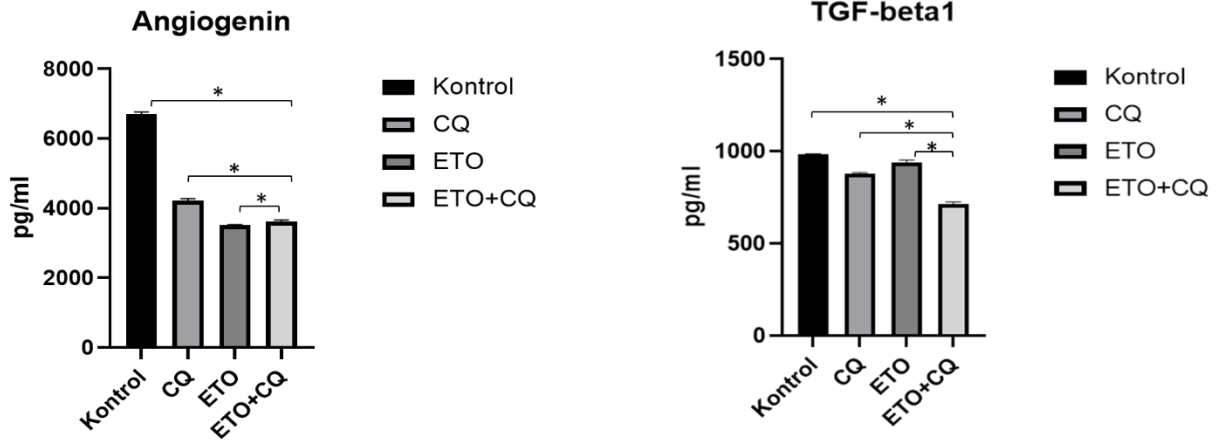
CXCL5 760,5	GCSF 383,5	GMCSF 377,3	GRO 581,62	CXCL1 481,44	CCL1 481,44	IL1 α 385,68	IL1 β 451,44	IL2 477,47	IL3 894,93
----------------	---------------	----------------	---------------	-----------------	----------------	------------------------	-----------------------	---------------	---------------

pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
IL4	IL5	IL6	IL7	IL8	IL10	IL12	IL15	INF γ	CCL2
411,72	423,19	432,02	454,97	606,33	750,63	744 pg/ml	699	722,39	934,36
pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml		pg/ml	pg/ml	pg/ml
CCL8	CCL7	MCSF	CCL22	CXCL9	MIP1delta	CCL5	SCF	SDF1	CCL17
511,45	387	775,34	950,09	702,09	470,41	1152,64	938	1711,75	599,27
pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
TGF β	TNF α	TNF β	EGF	IGF	Anjiogenin	OSM	VEGF α	PDGF	Leptin
722,83	567	555,14	470,85	860,07	3651,64	1036,58	2675,96	720,18	609,42
pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml

Sitokin *array* sonuçlarına göre tümörigenez, otofaji ve NK hücreleri ile ilişkisi açısından bazı sitokin/kemokin ve büyüme faktörleri öne çıkmaktadır. Şekil 28-30'da öne çıkan sitokin/kemokin ve büyüme faktörlerinin grafikleri yer almaktadır.

RNaz A süper ailesinin üyesi olan Angiogenin (ANG), birçok kanserde up-regüle halde olup kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilen anjiyojenik bir proteindir (Miyake ve diğerleri, 2015). Sitokin *array* sonuçları; kontrole göre Cq, Eto ve Eto+Cq uygulanan gruplarda Anjiogenin seviyesinin azaldığını göstermektedir ve sonuçlar hem kontrole göre hem de kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$) (Şekil 28).

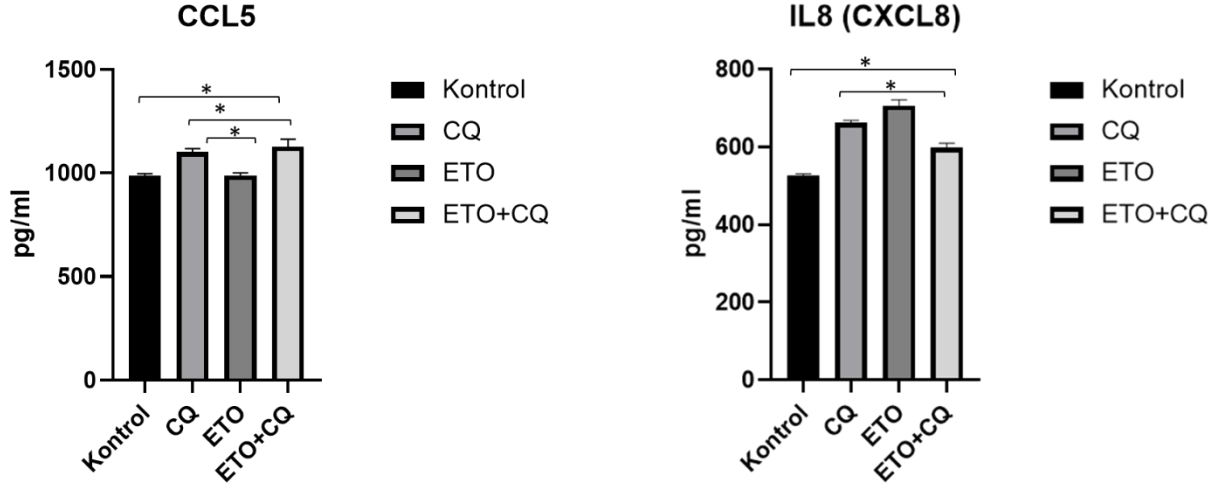
NK hücrelerinin aktivitesi hem doğuştan gelen hem de adaptif immün yanıtlarda önemli bir role sahip immünsupresif bir sitokin olan TGF- β tarafından güçlü bir şekilde etkilenmektedir. Özellikle TGF- β , IFN- γ üretiminin negatif bir düzenleyicisidir ve aktive edici reseptörler olan NKG2D ve NKp30'un ekspresyon seviyelerini düşürerek NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesini azaltır ve antitümör fonksiyonunu bozar (Regis ve diğerleri, 2020). Sitokin *array* sonuçları; kontrole göre Cq ve Eto+Cq uygulanan gruplarda TGF- β seviyesinin düştüğünü göstermektedir (Şekil 28). Sonuçlar hem kontrole göre hem de kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$).



Şekil 28. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu ile oluşan otofajik sekretomun sitokin array sonuçlarına göre büyüme faktörleri Angiogenin ve TGFβ1 grafikleri (K vs Cq, Eto, Eto+Cq, Eto vs Cq, Eto+Cq vs Cq, Eto+Cq vs Eto) ($p \leq 0.05$).

Kemokinler, bağışıklık hücrelerinin tümör yatağına infiltrasyonunda önemli bir rol oynayan kemotaktik sitokinlerdir ve bu nedenle tümör baskılayıcı bir rol oynarlar. Otofaji baskılanmış tümörlerde NK hücrelerinin tümör yatağına yönlendirilmesinin kemokin CCL5'in artışı ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Mgrditchian ve diğerleri, 2017). Sitokin *array* sonuçları; kontrole göre Cq ve Eto+Cq uygulanan gruplarda CCL5 seviyesinin arttığını göstermektedir (Şekil 29). Kontrole göre Cq ve Eto+Cq grupları, Eto+Cq grubuna göre de Cq ve Eto grupları istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$).

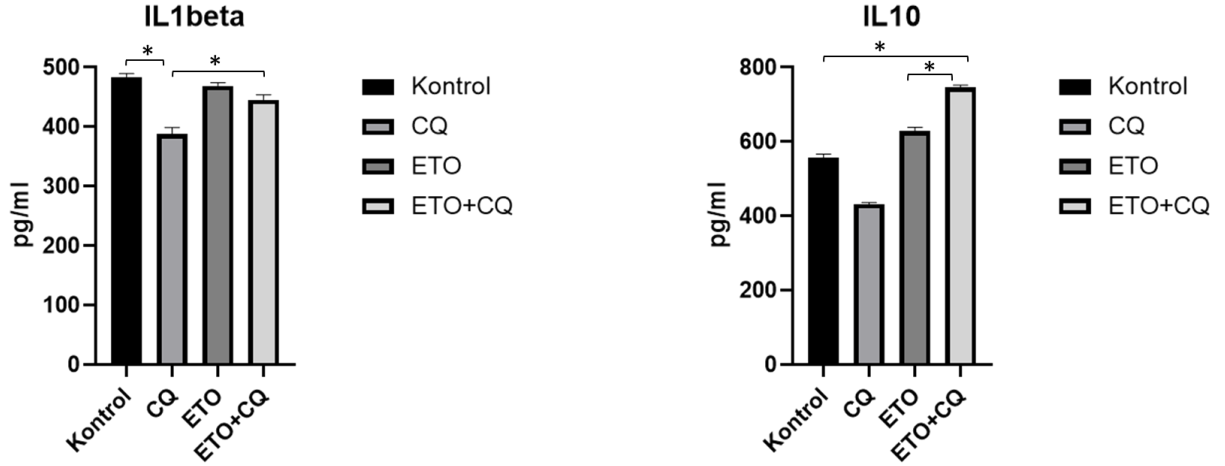
İnterlökin-8 (IL-8/CXCL8) kemokin ailesinde yer alan proinflamatuvar sitokinlerden biridir. IL8'in otofaji indüksiyonu sonucu tümör hücrelerinden ve CAF'dan sekrete edilerek tümörögenezi teşvik ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Yu ve diğerleri, 2022; Kraya ve diğerleri, 2015; New ve diğerleri, 2017). Sitokin array sonuçları; kontrole göre Eto uygulanan grupta IL-8 seviyesinin arttığını göstermektedir (Şekil 29). Kontrole göre Cq ve Eto+Cq grupları, Eto+Cq grubuna göre de Cq ve Eto grupları istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$).



Şekil 29. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu ile oluşan otofajik sekretomun sitokin array sonuçlarına göre kemokin CCL5 ve CXCL8 grafikleri (K vs Cq ve Eto, Eto+Cq vs Cq, Eto+Cq vs Eto) ($p \leq 0.05$).

IL-1 β , tümör hücrelerinde invazyon ve metastazı teşvik ederek tümör gelişimini ve anjiyogenezi indükler (Zhang ve Veeramachaneni, 2022). Ayrıca, IL-1 β 'nın salgısal otofaji mekanizması aracılığı ile salgılandığı ve bazal otofajinin IL-1 β salgılanmasını inhibe ederken, indüklenmiş otofajinin IL-1 β salgılanmasını artırdığı yapılan çalışmada gösterilmiştir (Dupont ve diğerleri, 2011; Claude-Taupin ve diğerleri, 2018). Sitokin *array* sonuçları; kontrole göre Cq uygulanan grupta IL-1 β seviyesinin azaldığını göstermektedir ve istatistiksel olarak anlamlıdır aynı zamanda Eto ve Eto+Cq grupları Cq grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$) (Şekil 30).

IL-10, birçok bağışıklık hücrelerinin işlevini düzenlediği bilinen önemli bir sitokindir. Özellikle IL-10'un sitotoksik T ve NK hücreleri üzerinde immünmodülatör etkileri olduğu bilinmektedir (Wang ve diğerleri, 2021). Sitokin *array* sonuçları; kontrole göre Eto ve Eto+Cq uygulanan gruplarda IL10 seviyesinin arttığını göstermektedir (Şekil 30). Kontrole göre tüm gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır aynı zamanda Eto+Cq grubu Eto grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$).



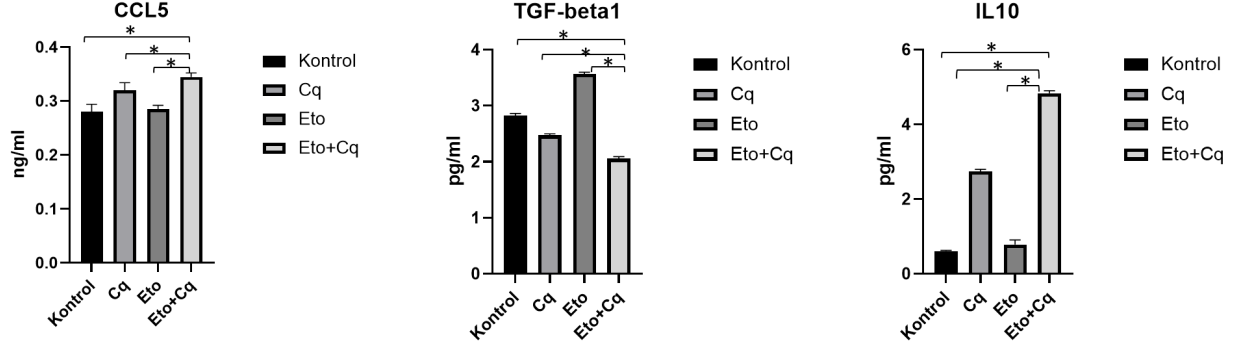
Şekil 30. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve modülasyonu ile oluşan otofajik sekretomun sitokin array sonuçlarına göre sitokin IL1 β ve IL10 grafikleri (IL1 β : K, Eto, Eto+Cq vs Cq, IL10: K vs Cq, Eto, Eto+Cq ve Eto+Cq vs Eto) ($p \leq 0.05$).

4.2.3.1. Otofajik Sekretomda Öne Çıkan Sitokin/Kemokin ve Büyüme Faktörlerinin ELISA ile Validasyonu

MCF-7 hücrelerinde kemoterapi aracılı otofaji indüksiyonu ve modülasyonu sonrası yapılan sitokin *array* analizinde tespit edilen bazı sitokin/kemokin ve büyüme faktörünün ELISA ile validasyonu yapıldı. MCF-7 hücreleri 150 μ M Eto ve 10 μ M Cq ile 24 saat muamele edildi. 24 saatin sonunda her bir gruptan (Kontrol, Cq, Eto, Eto+Cq) toplanan koşullandırılmış ortamlar kullanılarak CCL5, TGF β ve IL10 için ELISA analizleri yapıldı. ELISA analizleri sonucunda; CCL5'in kontrole göre Cq ve Eto+Cq uygulanan gruplarda arttığı görülmüştür. Kontrole göre Cq ve Eto+Cq grupları istatistiksel olarak anlamlıdır, aynı zamanda Eto ve Cq grupları Eto+Cq'ya göre anlamlıdır ($p \leq 0.05$) (Şekil 31).

TGF β 'nin kontrole göre Eto uygulanan grupta artıp Cq ve Eto+Cq uygulanan gruplarda azaldığı görülmüştür, sonuçlar kontrole göre ve kendi içinde istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$) (Şekil 31).

IL10'un ise kontrole göre Cq ve Eto+Cq uygulanan gruplarda arttığı görülmüştür, sonuçlar kontrole göre ve kendi içinde istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$) (Şekil 31).



Şekil 31. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve modülasyonu ile oluşan otofajik sekretomun ELISA sonuçlarına göre CCL5, IL10 ve TGFβ grafikleri (CCL5: K vs Cq, Eto+Cq, Eto ve Eto+Cq vs Cq ve Eto, TGFβ: K vs Cq, Eto, Eto+Cq, Eto+Cq vs Cq ve Eto, IL10: K vs Cq, Eto, Eto+Cq, Eto+Cq vs Cq ve Eto ($p \leq 0.05$)).

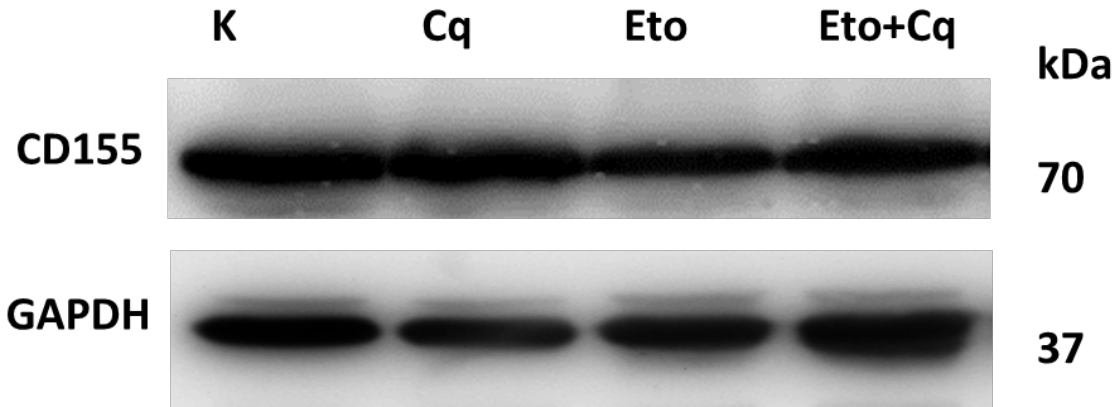
4.3. MCF-7 Hücrelerinde Genotoksik Stres Aracılı Otofaji ve Otofajik Sekretomun NK Hücrelerinin Anti-tümör İmmün Cevabına Etkileri

MCF-7 hücrelerinden otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu sonrası toplanan otofajik sekretomlar (koşullandırılmış ortam) ile muamele edilen kontrol-NK92, DNAM1-NK92 ve NKG2D-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve modülasyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasiteleri, kontrol ve DNAM1 NK92 hücrelerinin de DNAM1 reseptörünün ekspresyonundaki değişim gösterilmiştir. *wt*-NK92 hücrelerinin genetik modifikasyon yapılan NK92 hücrelerine göre hedefleme kapasiteleri daha düşüktür. Bu nedenle hedeflenen tümörde ekspresyonu diğer ligandlara göre daha yüksek olan bir ligand seçilir ve o liganda özgü reseptör modifikasyonu ile NK92 hücrelerinin hedefleme kapasitesi artırılır (Sayıtoğlu ve diğerleri 2020). Tez kapsamında, MCF-7’de CD155 ekspresyonunun yüksek olması nedeni ile DNAM1 reseptörü için genetik modifikasyon yapılan NK92 hücreleri kullanılmıştır. MCF-7 hücreleri 150 μ M Eto ve 10 μ M Cq ile 24 saat muamele edilmiştir ve MCF-7 hücrelerinden 24 saatin sonunda toplanan koşullandırılmış ortam ile kontrol, DNAM1 ve NKG2D NK92 hücreleri 8 saat süre ile muamele edilmiştir.

4.3.1. MCF-7 Hücrelerinde Genotoksik Stres’in CD155 Ligandına Etkisi

CD155, tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilen ve hücre adezyonu, migrasyon ve proliferasyon gibi birçok farklı süreçte rol alan bir adezyon molekülüdür. Bu pro-tümörjenik işlevlerinin aksine, CD155 aynı zamanda Natural Killer (NK) hücreleri de dahil olmak üzere sitotoksik lenfositlerde eksprese edilen ve anti-tümör immün yanıtta rol oynayan aktivatör reseptör DNAM-1'in ligandıdır (Molfetta ve diğerleri, 2020). Bu nedenle tez çalışmasında DNAM1 genetik modifikasyonu yapılmış NK92 hücreleri kullanılmıştır.

MCF-7 hücreleri 24 saat 150 μ M Eto ve 10 μ M Cq ile muamele edildi. 24 saatin sonunda MCF-7 hücrelerinde WB analizi ile CD155 protein ifadesi belirlenmiştir. WB sonuçlarına göre; tüm gruplarda eşit düzeyde CD155 ifadesinin olduğu görülmüştür. CD155 ifadesi 24 saat 150 μ M Eto veya 10 μ M Cq muamelesi ile değişmemiştir. (Şekil 32).



Şekil 32. MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve inhibisyon CD155 ligandına etkisinin WB analizi ile gösterilmesi

4.3.2. Otofajik Sekretomla Muamele Edilen DNAM1-NK92 ve Kontrol-NK92 Hücrelerinin MCF-7 Hücrelerini Hedefleme Kapasitesinin Analizi

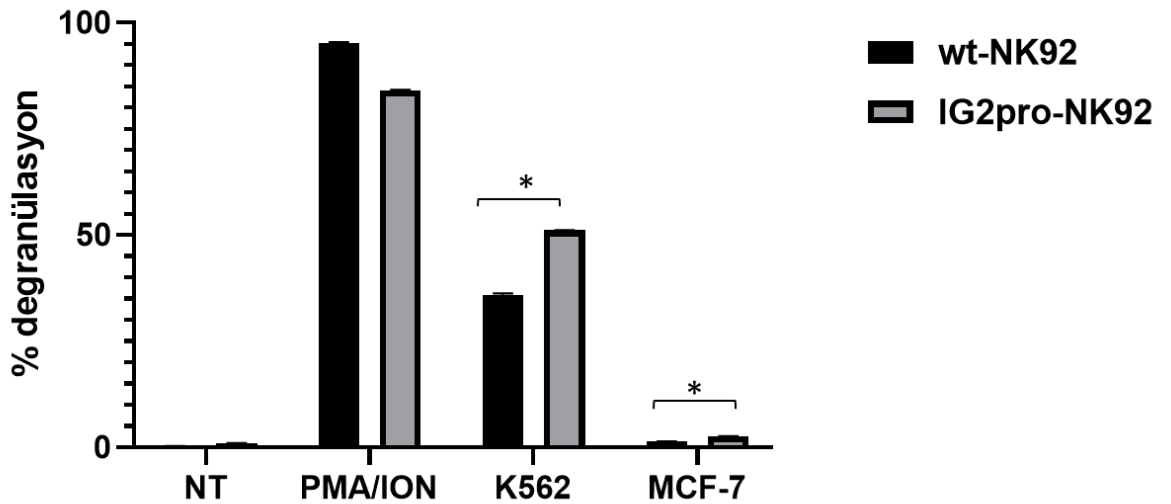
Degranülasyon sırasında (NK hücreleri ile tümör hücrelerinin etkileşimi sonucu sitolitik granüllerin salınımı) NK hücrelerindeki sitolitik granüller (Granzim, Perforin) serbest bırakılır ve sitolitik granül yüzeyinde bulunan lizozomla ilişkili membran protein-1 (LAMP-1, CD107a) hücre yüzeyine taşınır ve antikor bağlanması için erişilebilir hale gelir. Bu, aktive edilmiş NK hücrelerinin tanımlanmasını sağlayarak granül ekzositoz mekanizmasının

bütünlüğünü değerlendirmek için önemli bir biyobelirteçdir. Degranülasyonun analizinde NK hücrelerini uyarmak için K562 hücre hattı dışında phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) ve kalsiyum iyonofor (Ca^{2+} iyonofor) da kullanılmaktadır (Shabrish ve diğerleri, 2016).

Wt-NK92 hücreleri ile plazmit kontrol IG2pro-NK92 hücrelerinin MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasitesini belirlemek için degranülasyon analizi yapılmıştır. 4 saat kökültürasyonun ardından wt-NK92 hücrelerinin pozitif kontrol gruplarının sonuçlarına göre; PMA ile indüklenen wt-NK92 hücrelerinde % 95,4 oranında degranülasyon görülürken, wt-NK92 hücrelerinin K562 hücrelerini % 35,6 oranında hedeflediği ve wt-NK92 hücrelerinin MCF-7 kontrol grubunu da % 1,42 oranında hedeflediği görülmüştür (Şekil 33).

IG2pro-NK92 hücrelerinin (kontrol NK92) pozitif kontrol gruplarının sonuçlarına göre; PMA ile indüklenen IG2pro-NK92 hücrelerinde % 84 oranında degranülasyon görülürken, IG2pro-NK92 hücrelerinin K562 hücrelerini % 51,1 oranında hedeflediği ve IG2pro-NK92 hücrelerinin MCF-7 kontrol grubunu da % 2,64 oranında hedeflediği görülmüştür (Şekil 33).

IG2pro-NK92 hücrelerinin K562 ve MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasitesinin wt-NK92 hücrelerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$) (Şekil 33). Bu nedenle deneylerde kontrol grubu olarak plazmit kontrol IG2pro-NK 92 hücreleri kullanılmıştır.

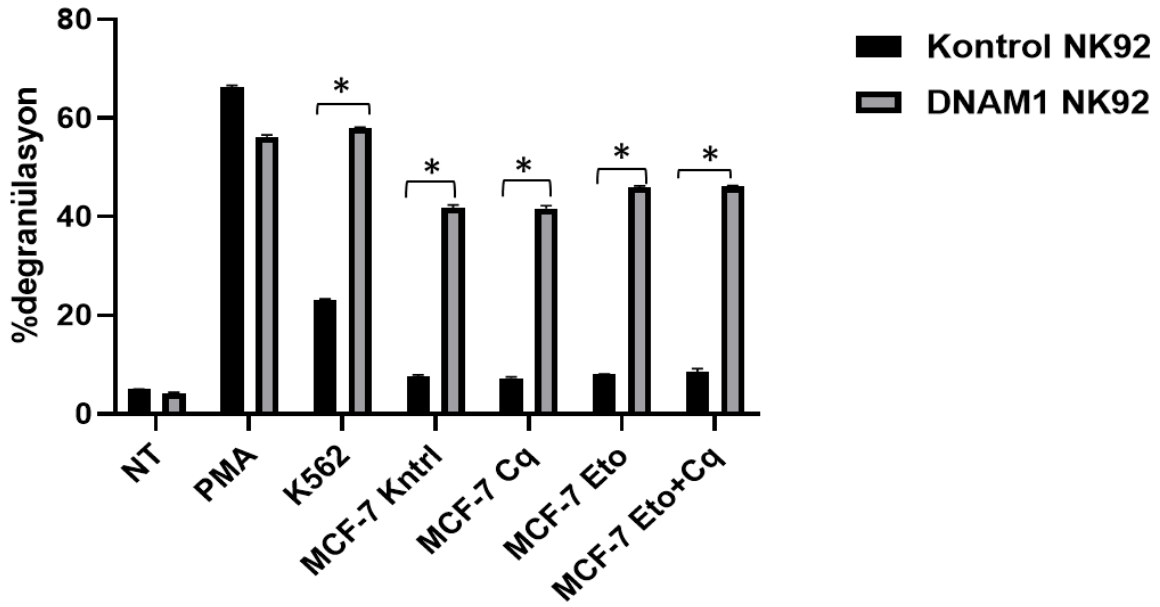


Şekil 33. wt-NK92 ve IG2pro-NK92 hücrelerinin MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasitesinin degranülasyon analizi sonuçlarının grafiği ($p \leq 0.05$).

Kontrol-NK92 ve DNAM1-NK92 hücrelerinin, 150 µM Eto ile genotoksik stres aracılı otofaji indüksiyonu ve 10 µM klorokin ile otofaji inhibisyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasitesi degranülasyon analizi ile gösterildi. 4 saat ko-kültürasyonun ardından kontrol-NK92 hücrelerinin pozitif kontrol gruplarının sonuçlarına göre; PMA ile indüklenen kontrol-NK92 hücrelerinde %66,5 oranında degranülasyon görülürken, kontrol-NK92 hücrelerinin K562 hücrelerini %23,25 oranında hedeflediği görülmüştür. Kontrol-NK92 hücrelerinin MCF-7 kontrol grubunu % 7,81, MCF-7 Cq grubunu % 7,44, MCF-7 Eto grubunu % 8, MCF-7 Eto+Cq grubunu da % 9 oranında hedeflediği bulunmuştur (Şekil 34).

DNAM1-NK92 hücrelerinin pozitif kontrol gruplarının sonuçlarına göre; PMA ile indüklenen DNAM1-NK92 hücrelerinde % 56,5 oranında degranülasyon görülürken, DNAM1-NK92 hücrelerinin K562 hücrelerini % 58 oranında hedeflediği görülmüştür. DNAM1-NK92 hücrelerinin MCF-7 kontrol grubunu % 42,2, MCF-7 Cq grubunu % 42,05, MCF-7 Eto grubunu % 46,15, MCF-7 Eto+Cq grubunu da % 46,25 oranında hedeflediği görülmüştür (Şekil 34).

Degranülasyon analizi sonuçları kontrol-NK92 hücrelerine kıyasla DNAM1-NK92 hücrelerinin MCF-7 hücrelerini daha yüksek oranda hedeflediğini göstermektedir. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). Buna göre MCF-7 hücrelerinde eksprese olan CD155 ligandının reseptörü olan DNAM1'i genetik modifikasyon aracılığıyla aşırı ifade eden NK92 hücreleri, MCF-7 hücrelerini kontrol-NK-92 hücrelerine göre daha yüksek oranda hedefleyebilmiştir.

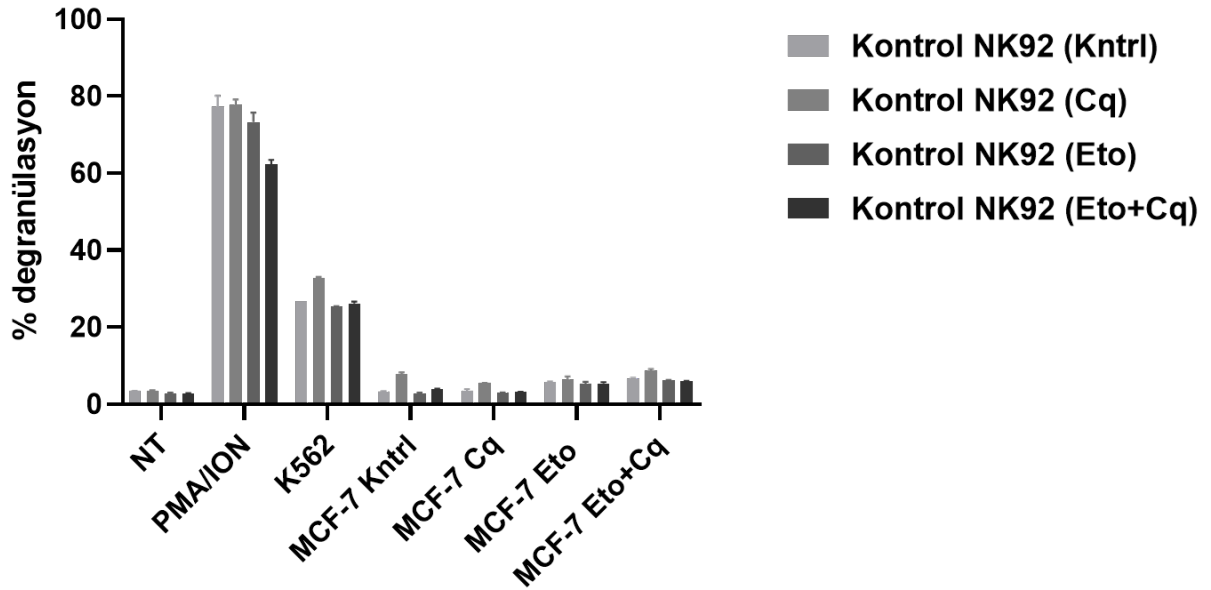


Şekil 34. DNAM1-NK92 ve kontrol-NK92 hücrelerinin genotoksik stres aracılı otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasitesinin degranülasyon analizi sonuçlarının grafiği ($p \leq 0.05$).

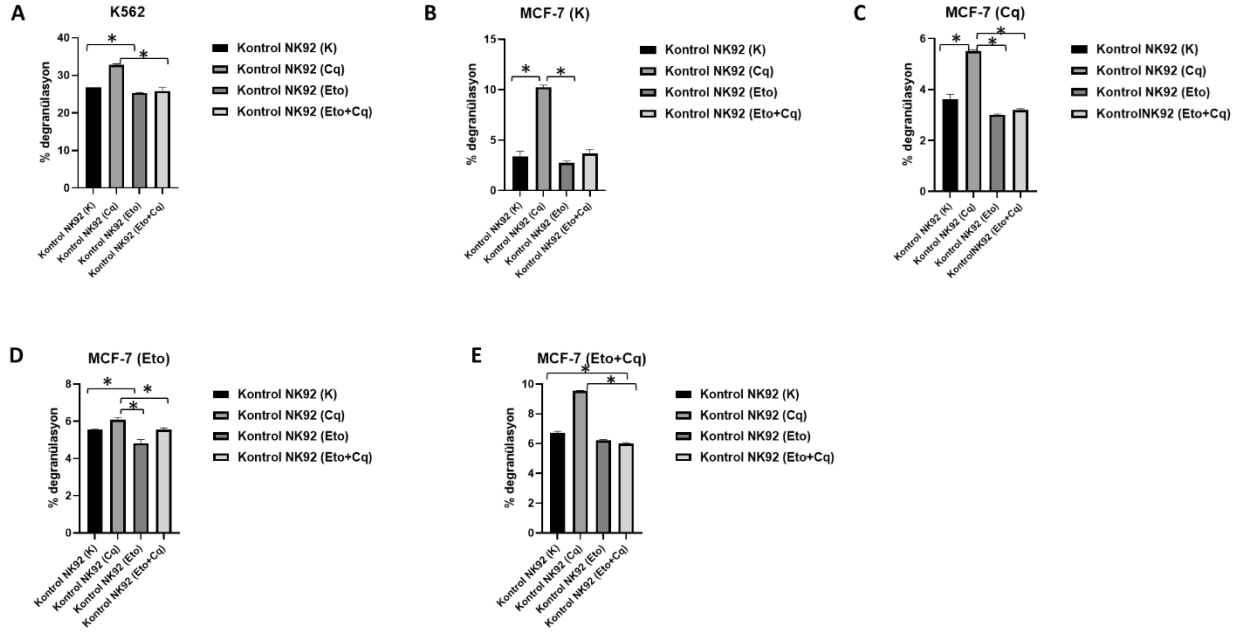
Tablo 12’de yer alan sonuçlara göre; otofajik sekretomlar ile muamele edilen kontrol NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasitelerinde gruplar arasında büyük farklar görülmemektedir. Her bir sekretom (K, Cq, Eto, Eto+Cq) ile muamele edilen kontrol-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasiteleri gruplar arası karşılaştırıldığında; K562 hücrelerinde kontrole göre Cq ve Eto grupları, Cq’ya göre de Eto ve Eto+Cq grupları istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). MCF-7 kontrol grubunda, kontrole göre Cq ve Cq’ya göre de Eto grubu istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). MCF-7 Cq grubunda, kontrole göre Cq ve diğer gruplarda kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). MCF-7 Eto grubunda, kontrole göre Cq, Eto grupları ve diğer gruplarda kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). MCF-7 Eto+Cq grubunda ise kontrole göre tüm gruplar ve Cq’ya göre de Eto grubu istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). (Şekil 35,36).

Tablo 12. Otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu sonucu oluşan koşullandırılmış ortamlar ile muamele edilen kontrol-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme yüzdeleri

	Kontrol NK92 (K)	Kontrol NK92 (Cq)	Kontrol NK92 (Eto)	Kontrol NK92 (Eto+Cq)
Kontrol NK92 (Non Target)	% 3,26	% 3,57	% 2,62	% 2,65
PMA/Ion	% 75,2	% 76,8	% 71,5	% 61,4
K562	% 26,7	% 32,8	% 25,35	% 25,8
MCF7 (K)	% 3,29	% 7,43	% 2,61	% 3,67
MCF7 (Cq)	% 3	% 5,46	% 2,98	% 3,15
MCF7 (Eto)	% 5,54	% 6,99	% 4,56	% 5,62
MCF7 (Eto+Cq)	% 6,74	% 9,04	% 6,14	% 5,98



Şekil 35. Otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu sonucu oluşan otofajik sekretomlar ile muamele edilen kontrol-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve modülasyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasitesinin degranülasyon analizi sonuçlarının grafiği ($p \leq 0.05$).



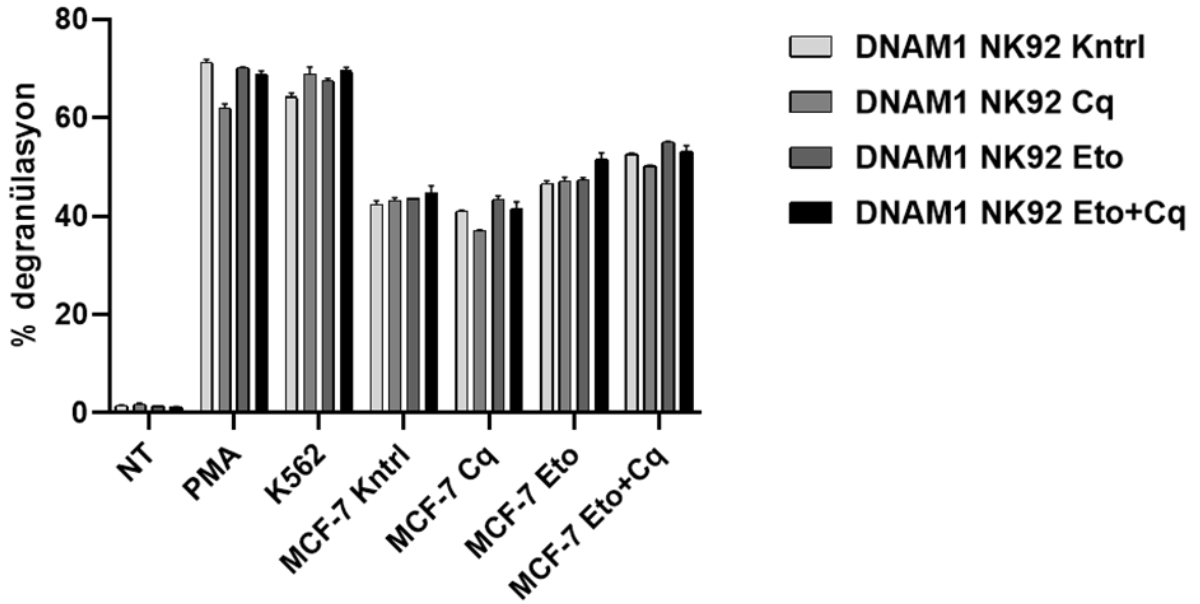
Şekil 36. (A): K562pozitif kontrol, (B): MCF-7 kontrol, (C): MCF-7 Cq, (D): MCF-7 Eto, (E): MCF-7 Eto+Cq gruplarına karşı Kontrol NK92 (K, Cq, Eto, Eto+Cq) hücrelerinin degranülasyon grafikleri ($p \leq 0.05$).

Tablo 13’de yer alan sonuçlara göre; her bir sekretom (K, Cq, Eto, Eto+Cq) ile muamele edilen DNAM1-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasiteleri gruplar arası karşılaştırıldığında; K562 hücrelerinde kontrole göre tüm gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). MCF-7 kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar görülmemiştir. MCF-7 Cq grubunda, kontrole göre Cq, Cq’ya göre Eto ve Eto+Cq grupları istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). MCF-7 Eto grubunda, kontrole göre tüm gruplar, Eto+Cq’ya göre Cq ve Eto grupları istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). MCF-7 Eto+Cq grubunda ise kontrole göre tüm gruplar Eto+Cq’ya göre Cq ve Eto grupları istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). (Şekil 37,38).

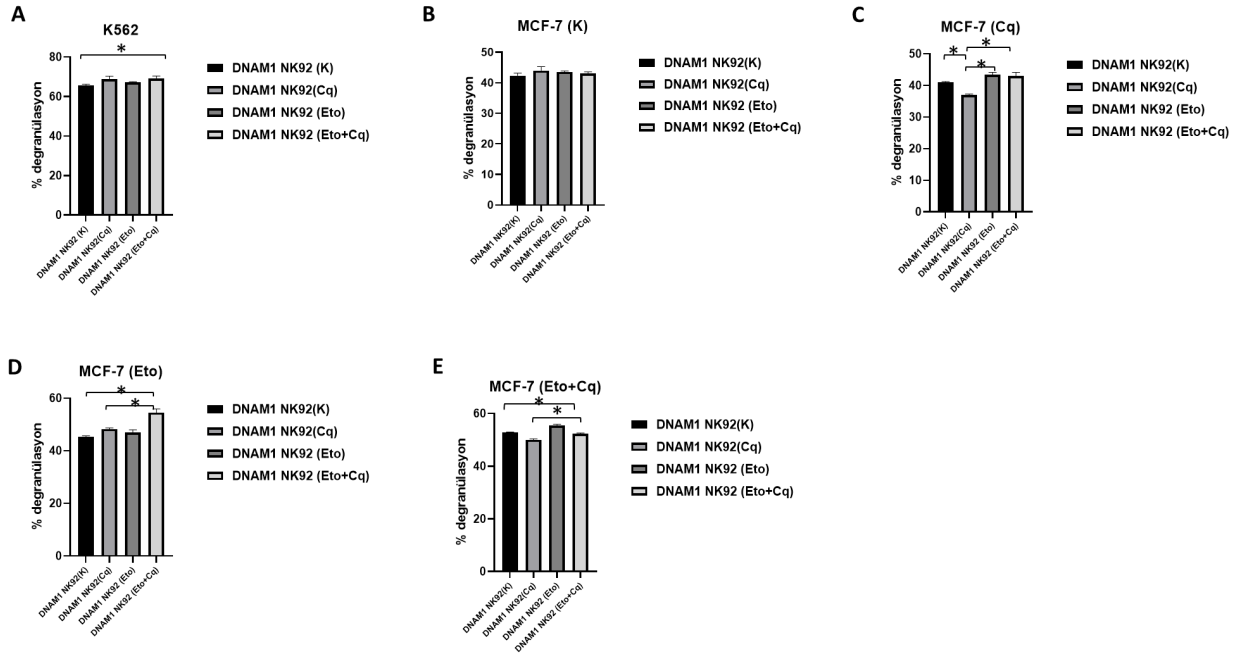
Sonuç olarak, Cq ile otofaji inhibisyonu yapılan MCF-7 hücreleri en iyi Eto sekretomu ile muamele edilen DNAM1-NK92 hücrelerinin, Eto ile otofaji indüksiyonu yapılan MCF-7 hücreleri en iyi Eto+Cq sekretomu ile muamele edilen DNAM1-NK92 hücrelerinin ve Eto+Cq ile muamele edilen MCF-7 hücrelerini ise en iyi Eto sekretomu ile muamele edilen DNAM1-NK92 hücrelerinin hedeflediği görülmüştür (Şekil 37,38).

Tablo 13. Otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu sonucu oluşan koşullandırılmış ortamlar ile muamele edilen DNAM1-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme yüzdeleri

	DNAM1 NK92 (K)	DNAM1 NK92 (Cq)	DNAM1 NK92 (Eto)	DNAM1 NK92 (Eto+Cq)
DNAM1 NK92 (Non Target)	% 1,48	% 1,56	% 1,38	% 1,27
PMA/Ion	% 71,7	% 62,6	% 70,2	% 69,35
K562	% 64,8	% 67,9	% 67,4	% 69
MCF7 (K)	% 41,8	% 43,5	% 43,55	% 43,4
MCF7 (Cq)	% 41,05	% 37	% 42,8	% 40,5
MCF7 (Eto)	% 46,3	% 46,6	% 47,05	% 50,55
MCF7 (Eto+Cq)	% 52,75	% 50	% 55	% 52,3



Şekil 37. Otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu sonucu oluşan otofajik sekretomlar ile muamele edilen DNAM1-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme yüzdeleri ($p \leq 0.05$).



Şekil 38. (A): K562pozitif kontrol, (B): MCF-7 kontrol, (C): MCF-7 Cq, (D): MCF-7 Eto, (E): MCF-7 Eto+Cq gruplarına karşı DNAM1 NK92 (K, Cq, Eto, Eto+Cq) hücrelerinin degranülasyon grafikleri ($p \leq 0.05$).

Tez kapsamında, DNAM1 genetik modifikasyonu dışında başka bir genetik modifikasyona sahip NK92 hücrelerinde etkisini görmek için NKG2D genetik modifikasyonu yapılmış NK92 hücreleride kullanılmıştır.

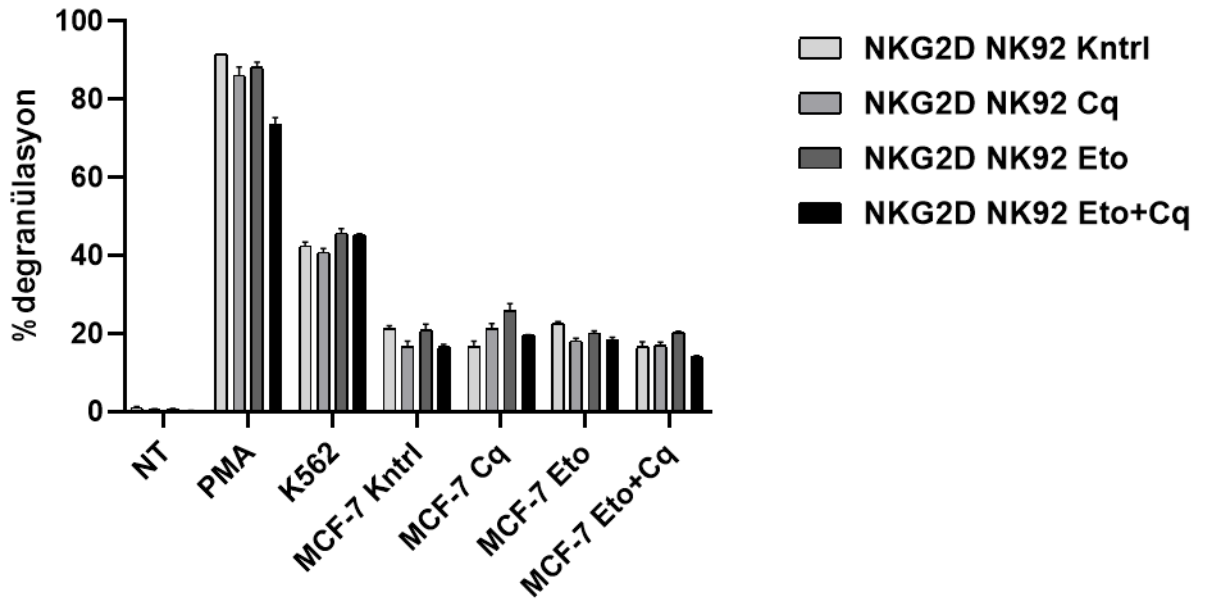
Tablo 14’da yer alan sonuçlara göre her bir sekretom (K, Cq, Eto, Eto+Cq) ile muamele edilen NKG2D-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasiteleri gruplar arası karşılaştırıldığında; K562 hücrelerinde kontrole göre tüm gruplar ve Eto+Cq’ya göre Cq ve Eto grupları istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). MCF-7 kontrol grubunda, kontrole göre Cq, Eto+Cq ve Eto’ya göre Eto+Cq grubu istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). MCF-7 Cq grubunda, kontrole göre tüm gruplar, Eto+Cq’ya göre Cq ve Eto grupları istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). MCF-7 Eto grubunda kontrole göre tüm gruplar, Eto+Cq’ya göre Eto grubu istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). MCF-7 Eto+Cq grubunda ise kontrole göre tüm gruplar Eto+Cq’ya göre Cq ve Eto grupları istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$). (Şekil 39, 40).

Sonuç olarak, MCF-7 kontrol grubunu en iyi Eto sekretomu ile muamele edilen NKG2D-NK92 hücrelerinin, Cq ile otofaji inhibisyonu yapılan MCF-7 hücreleri en iyi Eto sekretomu ile muamele edilen NKG2D-NK92 hücrelerinin, Eto ile otofaji indüksiyonu

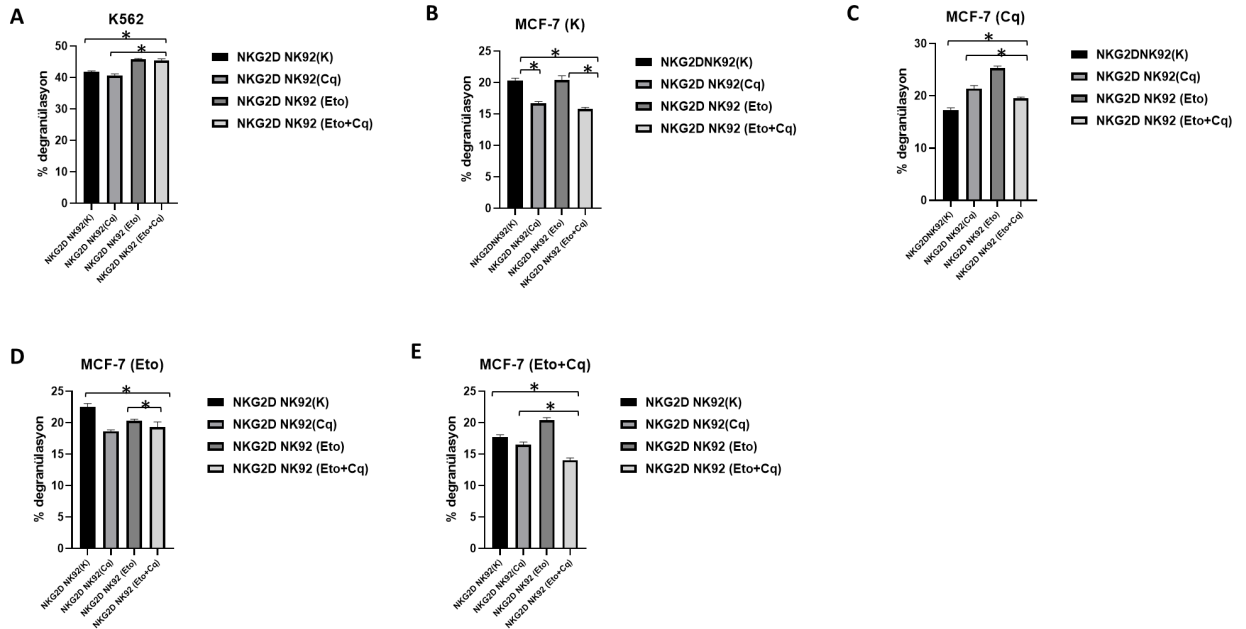
yapılan MCF-7 hücreleri en iyi kontrol sekretomu ile muamele edilen NKG2D-NK92 hücrelerinin ve Eto+Cq ile muamele edilen MCF-7 hücrelerini ise en iyi Eto sekretomu ile muamele edilen NKG2D-NK92 hücrelerinin hedeflediği görülmüştür (Şekil 39, 40).

Tablo 14. Otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu sonucu oluşan koşullandırılmış ortamlar ile muamele edilen NKG2D-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve modülasyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme yüzdeleri

	NKG2D NK92 (K)	NKG2D NK92 (Cq)	NKG2D NK92 (Eto)	NKG2D NK92 (Eto+Cq)
NKG2D NK92 (Non Target)	% 0,96	% 0,59	% 0,51	% 0,20
PMA/Ion	% 91,45	% 86,1	% 88,15	% 79,85
K562	% 42,45	% 40,8	% 45,6	% 45,4
MCF7 (K)	% 21,15	% 16,55	% 20,8	% 16,15
MCF7 (Cq)	% 25,4	% 21,1	% 25,85	% 19,5
MCF7 (Eto)	% 22,5	% 19,4	% 22,05	% 18,8
MCF7 (Eto+Cq)	% 17	% 16,85	% 20,1	% 14,05



Şekil 39. Otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu sonucu oluşan otofajik sekretomlar ile muamele edilen NKG2D-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme yüzdeleri ($p \leq 0.05$).



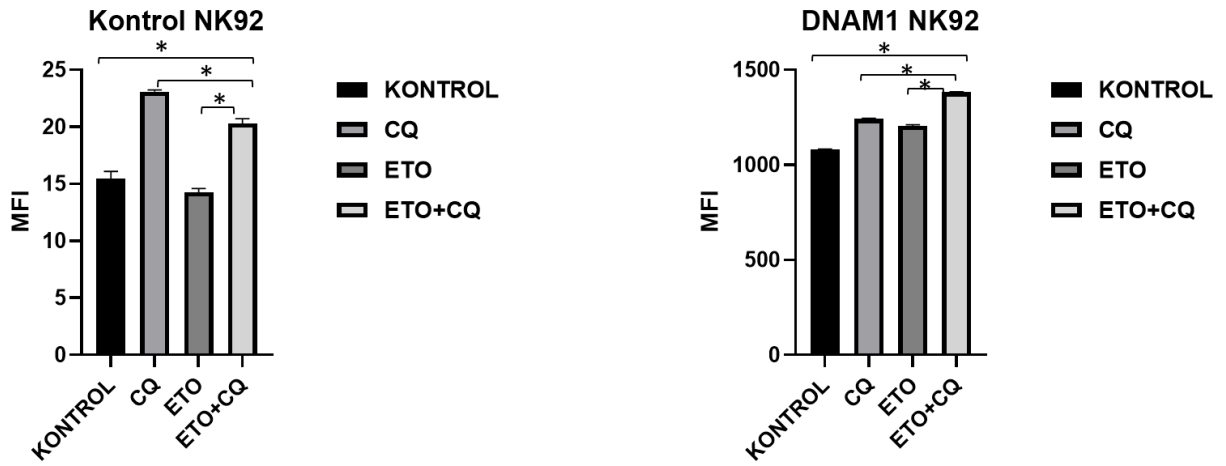
Şekil 40. (A): K562pozitif kontrol, (B): MCF-7 kontrol, (C): MCF-7 Cq, (D): MCF-7 Eto, (E): MCF-7 Eto+Cq gruplarına karşı NKG2D NK92 (K, Cq, Eto, Eto+Cq) hücrelerinin degranülasyon grafikleri ($p \leq 0.05$).

4.3.3. Otofajik Sekretomla Muamele Edilen DNAM1-NK92 ve Kontrol-NK92 Hücrelerinde DNAM1 İfadesinin Flow Sitometri ile Analizi

Tümör veya enfekte hücrelerin NK hücreleri tarafından tanınmasına NKG2D ve aksesuar molekül DNAX (DNAM-1, CD226) gibi spesifik aktive edici reseptörler aracılık eder (Focaccetti ve diğerleri, 2022). *wt*-NK92 hücrelerinin reseptör ekspresyonlarının düşük olması nedeni ile koşullandırılmış ortamlar ile muamele edilen kontrol ve DNAM1 NK92 hücrelerinde otofajik sekretomun DNAM1 ekspresyonu üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

MCF-7 hücreleri 24 saat 150 μ M Eto ve 10 μ M Cq ile muamele edildi. 24 saatin sonunda toplanan koşullandırılmış ortam ile DNAM1-NK92 ve kontrol NK92 hücreleri 8 saat

süre ile muamele edilmiştir. Koşullandırılmış ortamla muamele edilen DNAM1-NK92 ve kontrol hücrelerinde DNAM1 ekspresyonundaki değişim *flow* sitometri ile analiz edilmiştir. *Flow* sitometri sonuçlarına göre; Kontrol NK92 hücrelerinde kontrole göre Cq ve Eto+Cq uygulanan gruplarda DNAM1 ifadesinin arttığı, Eto uygulanan grupta ise DNAM1 ifadesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 41). DNAM1-NK92 hücrelerinde ise kontrole göre Cq, Eto ve Eto+Cq uygulanan gruplarda DNAM1 ifadesinin arttığı görülmüştür (Şekil 41). Her iki hücrede de DNAM1 ifadesindeki değişimin sonuçları hem kontrole göre hem de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$).



Şekil 41. MCF-7 hücrelerinden otofaji indüksiyonu ve modülasyonu sonucu oluşan otofajik sekretomlar ile muamele edilen DNAM1-NK92 ve IG2pro-NK92 hücrelerinde DNAM1 ifadesinin MFI değerinin flow sitometri analizi ile gösterilmesi ($p \leq 0.05$) (K vs Cq, Eto, Eto+Cq, Eto+Cq vs Cq ve Eto).

MFI: ortalama flouresan yoğunluk; antikoru eksprese eden hücrelerin yüzdesinin o hücrelerin sayısına bölünmesi ile elde edilen değer)

5. TARTIŞMA

Otofaji; homeostaz, farklılaşma, gelişim ve hayatta kalmayı desteklemek için lizozom aracılı bozunma yoluyla nükleik asitler, proteinler, lipitler ve organeller dahil olmak üzere birçok molekülün degradasyonunda etkili temel bir hücre sel süreçtir (Aman ve diğerleri, 2021).

Kanser biyolojisinde otofaji, tümörü indükleyici veya baskılayıcı olmak üzere iki farklı rol oynar. Bazı antikanser ilaçlar otofajiyi indükleyebilir ve bu nedenle, kemoterapi ile indüklenen otofaji kanser hücre sinin hayatta kalmasında rol oynayabilmektedir. Ek olarak, otofajinin düzenlenmesi tümör baskılayıcı proteinlerin veya onkogenlerin ekspresyonuna da katkıda bulunur. Tümör baskılayıcı faktörler, mTOR ve AMPK tarafından negatif olarak düzenlenerek otofajinin indüklenmesine ve kanser başlangıcının baskılanmasına neden olur. Buna karşılık, onkogenler ise mTOR, sınıf I PI3K ve AKT tarafından aktive edilebilir, bu da otofajinin baskılanmasına ve kanser oluşumunun artmasına neden olmaktadır (Yun ve Lee, 2018).

Otofajik sekretom, proteinlerin otofagozom içinde salgı lizozomlarına taşınarak salgılanmasında rol aldığı süreci tanımlar ve böylece otofagozomal kargo degradasyonunu indüklemek yerine, salgısal otofaji otofagozomal içeriğ in hücre dışı boşluğa atılmasına yol açar (Cotzomi-Ortega ve diğerleri, 2018). Hipoksi yada metabolik stres indüklü otofajiye bağlı salgılar pro/anti enflamatuar sitokinlerden kemokinlere, büyüme faktörlerine vb. kadar çok sayıda hücre dışı faktörler içerir (New ve Thomas, 2019).

Otofaji indüksiyonunun immün cevapta rol alan hücrelerin aktivasyonunu engellediği, antijen sunumunu bozduğu, dentritik hücre aktivitesini inhibe ettiği ve böylece tümör büyümesinin teşvik edilmesine yol açtığı bilinmektedir (Duan ve diğerleri, 2021). Otofajinin NK hücreleri üzerindeki etkisini araştıran az sayıda çalışmada ise Granzim B'nin otofajik degradasyona uğraması sonucu NK hücrelerinin tümör hücrelerini öldürme kabileyetini azalttığı gösterilmiştir (Baginska ve diğerleri, 2013; Mgrditchian ve diğerleri, 2017; Yan ve diğerleri, 2022).

Tez kapsamında meme kanserinde kemoterapi aracılı otofaji indüksiyonu ile ilişkili sekretomun karakterizasyonu ve ayrıca NK hücreleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla MCF-7 hücrelerinde etoposid ile otofaji indüksiyonu ve klorokin ile de otofaji inhibisyonu yapılmıştır. Otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu ardından öncelikle otofajik sekretom içeriğini

belirlemek amacıyla LC-MS/MS ve sitokin array ve ELISA analizleri yapılmıştır. İkinci olarak ise kemoterapi indüklü otofajik sekretomun kontrol ve DNAM1 modifiye edilmiş NK92 hücrelerinin MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasitesini nasıl etkilediği ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar, MCF-7 hücrelerinde kemoterapi aracılığıyla otofaji indüksiyonunun gerçekleştiği otofajinin indüklenmesi yada baskılanması sonucu oluşan otofajik sekretom içeriğinin farklılaşabileceğini ve sekretom içeriklerinin DNAM1-NK92 hücrelerinin hedefleme kapasitesini de farklı oranlarda etkileyebileceğini göstermiştir.

5.1. MCF-7 Hücrelerinde Kemoterapi Aracılı Otofaji İndüksiyonu

Otofaji; besin veya büyüme faktörü yoksunluğu, hipoksi, reaktif oksijen türleri, DNA hasarı, protein agregatları, hasarlı organeller veya hücre içi patojenler dahil olmak üzere çeşitli hücrel stres biçimleri tarafından uyarılabilir (Kroemer ve diğerleri, 2010). Ayrıca otofajinin kemoterapötikler aracılı olarak da indüklenbildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

MCF-7 ve MDA-MB231 meme kanseri hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada siklofosfamid, docetaxel ve 5-FU gibi kemoterapi ajanları ile bu iki hücre hattından sadece MCF-7’de otofajinin indüklendiği gösterilmiştir (Garbar ve diğerleri, 2017).

Kemorapi indüklü otofaji ile ilgili bir diğer çalışmada, etoposid ile mumele edilen HepG2 karaciğer kanseri hücrelerinde otofajinin indüklendiği görülmüştür. Ayrıca, otofajinin klorokin ile baskılanması etoposid ile indüklenen hücre ölümünü artırmıştır. Bu sonuçlara dayanarak, etoposid ile indüklenen otofajinin kanser hücrelerinin hayatta kalımında işlev gördüğü ve AMPK aktivitesi ile yakından ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (Xie ve diğerleri, 2011).

Tez kapsamında da literatür ile uyumlu olarak MCF-7 hücrelerinde kemoterapi ajanı olan etoposid ile otofaji indüksiyonu olduğu LC3 I/II dönüşümü ve p62 degradasyonu ile ve de LC3 punkta formasyonu oluşumu da konfokal mikroskopi ile görüntülenerek doğrulanmıştır (Şekil 7 ve 8).

Oksidatif stres temel olarak hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminden kaynaklanır ve normal fizyolojik homeostaz ve hastalıkların patogenezi ile yüksek oranda ilişkilidir. Otofaji, oksitlenmiş hücrel bileşenleri ortadan kaldıran ve hücrel ROS seviyelerini düzenleyen mekanizmadır. ROS, otofaji aktivitesini transkripsiyonel ve

posttranslasyonel mekanizmalar yoluyla modüle edebilir (Chang ve diğeri, 2022). Bazı antikanser tedavileri ilaç direncini artırabilen ROS kaynaklı otofajiyi de indüklemektedir. Bu durumda, kemoterapi ajanlarıyla birlikte otofaji inhibitörlerinin kullanılması tedaviye olan duyarlılığın geri kazanılmasına yardımcı olabilmektedir (Hasan ve diğeri, 2022). ROS ve otofaji ilişkisi açısından sonuçlar değerlendirildiğinde; MCF-7 hücrelerinde bazal seviyede ROS birikimi olduğu, H₂O₂ ile ROS seviyesinin arttığı ve otofajinin Cq ile baskılanması sonucunda da ROS seviyesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 10). Elde edilen sonuçlar tümör hücrelerinde bazal otofaji varlığında da ROS birikimi olduğunu ve anti-kanser terapilerde ROS seviyelerini düşürmek için otofaji inhibitörü kullanımının gerekli olduğunu göstermektedir.

5.2. MCF-7 Hücrelerinde Kemoterapi İndüklü Otofajik Sekretom

Son dönemlerde, otofajinin sadece hasarlı proteinlerin hücre içi yıkımında değil, aynı zamanda klasik olmayan protein salgılanmasında da önemli bir rol oynadığı ortaya çıkarılmıştır (Kraya ve diğeri, 2015). Otofajiye bağlı salgılar çok sayıda hücre dışı faktör içermekte ve çeşitlilik göstermektedir (New ve Thomas, 2019). Otofajiye bağlı bu salgı bileşenleri arasında en sık görülenler; IL1 β , IL6, CXCL8, TGF β vb. gibi hem enflamasyonda hem de tümör mikroçevresinde görülen sitokin, kemokin ve büyüme faktörleridir.

Bu faktörlerden biri olan İnterlökin 1 beta (IL-1 β)'nın bazal otofaji varlığında salgılanması inhibe olurken, açlık indüklü otofajide IL-1 β salgılanmasının arttığı yapılan çalışmada gösterilmiştir (Dupont ve diğeri, 2011). Başka bir çalışmada ise Atg7 aracılı olarak otofajinin baskılanması sonucu da IL1 β sekresyonu azalmıştır (Qiang ve diğeri, 2017). IL1 β dışında, IL6 ve CXCL8'in de otofaji ile önemli bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir. MDA-MB-468 meme kanseri hücrelerinde Atg7'nin baskılanması sonucu IL-6 salınımının azaldığı ve buna bağlı olarak hücre sağkalımının da azaldığı görülmüştür (Maycotte ve diğeri, 2015). Lipopolisakkarit (LPS) ile TLR4 ve TLR3'ün uyarılması akciğer kanseri hücrelerinde otofajiyi indüklemiştir. Bunun sonucunda akciğer kanseri hücrelerinden salınan IL6, CCL2/MCP-1 CCL20/MIP-3 α , VEGFA (vasküler endotelial büyüme faktörü A) ve MMP2 seviyelerinde artış görülmüştür (Zhan ve diğeri, 2014).

Literatürde kemoterapi indüklü otofajik sekretomun tümüyle karakterize edildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Tez kapsamında kemoterapi indüklü otofajik sekretom içeriğinin belirlenmesinde kullanılan sitokin array analizi ile 41 farklı sitokin/kemokin ve büyüme

faktörü tespit edilmiştir (Şekil 22). Bu faktörler arasında bir çoğu ilk kez belirlenmiş olup (CXCL1, CXCL5, CCL1, CCL22, TNF α , TNF β , EGF, IGF1, VEGF vb.) bazılarıda literatür ile uyumlu olarak öne çıkmaktadır. Bahsi geçen faktörlerin kemoterapi indüklü otofaji ile arttığı görülmektedir (Şekil 23,24).

TGF β , epitelyal mezenkimal geçişe (EMT) ve migrasyona neden olarak tümör oluşumunu uyarır. Yapılan çalışmada, klorokin veya otofaji ile ilişkili genleri (ATG5 ve ATG7) hedefleyen siRNA kullanarak küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde otofajiyi inhibe edilmiş ve otofajinin inhibe edilmesi sonucunda TGF β salınımının ve buna bağlı olarak EMT transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarının da azaldığı görülmüştür (Trelford ve Di Guglielmo, 2022). Sitokin array sonuçlarında öne çıkan faktörlerden biri olan TGF β seviyesinin klorokin ile otofajinin baskılanması sonucu azaldığı ayrıca klorokin ile birlikte kemoterapötik ilaç etopositin kullanıldığı grupta da TGF β seviyesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 28). TGF β seviyesinin otofajinin baskılanmasıyla ve otofaji inhibitörü ile birlikte kemoterapötik ilaç kullanılması sonucunda azalması tümör hücrelerinde migrasyon/invazyon ve metastaz gelişimi üzerinde etkili bir yaklaşım geliştirmede önemli bir tedavi stratejisi gelişimini sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Bir çalışmada, IL-10'un JAK/STAT3 ve PI3K/Akt/mTORC1 yollarını aktive ederek otofajiyi inhibe ettiği bildirilmiştir (Jiang ve diğerleri, 2019). Literatürden farklı olarak elde ettiğimiz sitokin array verisinde otofajinin klorokin ile baskılanması sonucunda IL10 seviyesinin azaldığı ve ayrıca klorokin ile birlikte etopositin kullanıldığı grupta ise IL10 seviyesinin arttığı görülmüştür (Şekil 30). Ayrıca IL-10, özellikle sitotoksik T ve NK hücreleri üzerinde immünmodülatör etkileri olduğu bilinen bir sitokindir (Wang ve diğerleri, 2021). IL10'un, klorokin ile etopositin birlikte kullanılması ile artış göstermesi NK hücrelerinin tümör hücrelerine karşı immün yanıtında etkili bir kemo-immünoterapi yaklaşımı geliştirilmesine aracılık edebilmektedir.

Ribonükleaz A süper ailesinin bir üyesi olan Anjiyogenin (ANG), tümör anjiyogenezini indüklemenin yanısıra hücre sağkalımını, çoğalmasını migrasyonunu teşvik eder (Li ve diğerleri, 2019). Otofaji ve anjiyogenez ilişkisine yönelik yapılan çalışmalarda iki farklı etki olduğu ortaya konmuştur. Bir çalışmada endotel hücrelerde Atg5 inhibisyonunun tümör vaskülatüründe fonksiyonel anormalliğe neden olduğu (Maes ve diğerleri, 2014) bir diğer çalışmada ise Rapamisin ile indüklenen otofajinin HUVEC'lerde pro-anjiyogenik etkilere aracılık ettiği bulunmuştur (Liang ve diğerleri, 2018). Sitokin array ile elde edilen veriler ise otofajinin baskılanması ile de otofaji inhibitörü ve etoposidin birlikte kullanımıyla da

anjiogenin seviyesinin azaldığını göstermektedir (Şekil 28). Elde edilen sonucun, MCF-7 hücrelerinde kemoterapiye ek olarak otofajinin de hedeflenmesinin anjiogenez üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Tez kapsamında sitokin array ile belirlenen faktörler kemoterapi indüklü otofajik sekretom açısından ilk kez gösterilmiştir. Özellikle tümör lehine rol oynayan bir büyüme faktörü olan TGF β 'nın otofaji indüksiyonu ile arttığı, NK hücrelerinin tümöre yönelimini ve sitotoksik fonksiyonunu arttırmada görevli kemokin ve sitokinlerden olan CCL5 ve IL10'un otofaji baskılandığında ve inhibitör ile birlikte kemoterapötik ilaç kullanıldığında arttığı, anjiogenezden sorumlu faktör anjiogeninin ise inhibitör ile birlikte kemoterapötik ilaç kullanıldığında azaldığı görülmüştür. Elde edilen veriler bu faktörlerin metastaz, anjiogenez ve özellikle immün yanıt açısından önemli etkileri olduğuna dikkat çekmektedir.

Kemoterapi indüklü otofajik sekretom içeriği sitokin array analiz yanısıra LC-MS/MS ile de analiz edilmiştir. LC-MS/MS sonuçlarına göre kemoterapi ile otofaji indüksiyonu ve klorokin ile otofaji modülasyonu sonucu oluşan otofajik sekretom içerisinde özellikle metabolik enzimler, tümör antijenleri ve metastaz ilişkili proteinler dikkat çekmektedir. Metabolik enzimlerin, tümör antijenlerinin ve metastaz ilişkili proteinlerin otofaji inhibitörü ile birlikte etopositin kullanıldığı grupta azaldığı görülmüştür. LC-MS/MS verilerinin biyoinformatik analizi yapılarak sekretomda yer alan proteinler 'gen ontoloji' ve 'Kegg' analizleri ile gruplandırılmıştır (Şekil 17-21). LC-MS/MS verileri ile ilk kez kemoterapi indüklü otofajik sekretomda bulunan proteinler belirlenmiştir.

Tümör hücrelerinde aerobik glikolizin tercih edilmesi nedeniyle laktat birikir. Laktat homeostazını sağlamak için, tümör hücreleri laktatı, laktat dehidrojenaz (LDH) yoluyla bir enerji kaynağı olarak geri dönüştürür. Laktat ayrıca metabolik simbiyoz için komşu oksidatif tümör hücrelerine de taşınabilir. LDH'nın hem glikolitik hem de oksidatif kanser hücrelerinde bazal otofajiyi desteklediği bildirilmektedir. Mekanistik olarak, LDH katalizli laktatın piruvata dönüşümü, V-ATPase bağımlı lizozom asidifikasyonunu teşvik etmek için proton üretir, böylece lizozom işlevini ve otofagozom olgunlaşmasını artırır (Yan ve Chen 2022). LC-MS/MS sonuçlarına göre otofaji inhibitörü ile etopositin birlikte kullanılması sonucu LDH miktarının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Şekil 14). Literatür bilgisi de göz önüne alındığında, tümör hücrelerinde yüksek oranda bulunan ve bazal otofajiyi indükleyen LDH'nın düşürülmesinde, kemoterapiye ek olarak otofaji inhibitörü kullanımının kanser metabolizması açısından da önemi vurgulanmaktadır.

Gen ontoloji analizi sonuçları Eto ile Cq grubunu ve Eto+Cq ile Cq grubunun kıyaslanması ile oluşturulmuştur. Buna göre Eto grubunda Cq grubuna göre anlamlı olarak 2 kat artış gösteren proteinler; sitoskelet proteinleri, ekstrasellüler matriks proteinleri, membran proteinleri, kromatin yapısal proteinleri, şaperon kompleks proteinleri ve hücre adezyon proteinleri olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 17-18). Eto+Cq grubunda Cq grubuna göre anlamlı 2 kat artış gösteren proteinler ise; hidrolaz aktivitesini negatif düzenleyen proteinler, endopeptidaz aktivitesini düzenleyen proteinler, peptidaz aktivitesini düzenleyen proteinler, TGF- β reseptör sinyal yolağını düzenleyen proteinler, apoptotik hücre kleransını düzenleyen proteinler olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 17-18). Sonuç olarak otofaji inhibitörü ve etopositin birlikte kullanımının endopeptidaz ve peptidaz aktivitesi, TGF- β reseptör sinyal yolağı, apoptoz ile ilişkili proteinler vb. gibi hücresel prosesleri düzenleyen proteinlerin miktarını arttırması, antikanser terapilere cevap oluşturmada kemoterapi ajanına ek olarak otofaji inhibitörü kullanımının gerekliliğini göstermektedir.

Gen ontolojisi analizi verileri sekretomda bulunan proteinlerin büyük bir kısmını hücre iskeleti proteinlerinin, ekstrasellüler matriks proteinlerinin ve hücre adezyon proteinlerinin oluşturduğunu göstermektedir (Şekil 17-18). Etoposin ile otofaji indüklenen grupta hücre iskeleti proteinlerinin, ekstrasellüler matriks proteinlerinin ve hücre adezyon proteinlerinin miktarlarının klorokin ile otofaji baskılanan gruba göre arttığı görülmüştür. Bu veriler otofajinin, kemoterapi aracılı indüklenmesinin MCF-7 meme kanseri hücresi özelinde, özellikle metastatik aktivite açısından önemli etkileri olduğunu göstermektedir.

Gen ontoloji analizi cnetplot yapılarak Eto ile Cq grubu karşılaştırılmış ve böylece sekretomda bulunan proteinlerin birbirleri ile interaksiyonu analiz edilmiştir. Analiz sonucunda, Vitronektin proteininin (VTN: gen sembolü) peptidaz, endopeptidaz ve hidrolaz aktivitesinden sorumlu proteinlerle etkileşimde olduğu görülmüştür (Şekil 16). Vitronektin, çeşitli tümörlerde hücre büyümesi, anjiyogenez ve metastaz gibi süreçlerde hücre adhezyonundaki rolü ile bilinen bir glikoproteindir (Burgos-Panadero ve diğerleri, 2019). MCF-7 tümör hücrelerindeki otofaji indüksiyonu sonucunda, Vitronektinin özellikle peptidaz aktivitesi gösteren proteinlerle olan etkileşiminin tümör hücresinin migrasyon/invazyon kapasitesi üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Eto+Cq ile Cq grubu karşılaştırıldığında ise, büyüme farklılaşma proteini 15'i kodlayan GDF15, ısı şoku proteini 70'i kodlayan HSPA5 genlerinin TGF- β sinyal yolağında görev aldığı görülmüştür (Şekil 20). GDF15 çeşitli malignitelerde (melanom, prostat, meme, gastrointestinal, pankreas ve kolorektal kanserler), over-eksprese olan, kötü prognozla ilişkili

ve kanser progresyonu için bir belirteç olduğu düşünölen bir proteindir (Siddiqui ve diğerleri, 2022). 70-kDa ısı şok proteinleri (HSP70'ler) kanser hücrelerinde bol miktarda bulunur, apoptozu baskılayarak, immün yanıtı engelleyerek, anjiyogenezi ve metastazı teşvik ederek malign hücrelere seçici avantaj sağlar ve böylece tümörün hayatta kalmasını ve büyümesini destekler (Albakova ve diğerleri, 2020). LC-MS/MS sonucuna göre GDF15 protein seviyesi Cq uygulaması ile ve Hsp70 protein seviyesi ise hem Cq hem de Eto+Cq uygulaması ile azalmaktadır (Şekil 15). Tümör hücrelerinin progresyonu için bir biyobelirteç olan GDF15'in otofajinin inhibe edilmesi ile azalması otofajinin kanser gelişiminde rol oynayan bir faktör olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda Hsp70'in otofaji inhibitörü ile birlikte etopositin kullanılması ile azalması kemoterapiye ek olarak otofaji inhibitörü kullanımının anti-kanser terapilerin yararını arttırabileceğini göstermektedir.

5.3. Kemoterapi İndüklü Otofaji ve Otofajik Sekretomun DNAM1-NK92 Hücreleri Üzerindeki Etkisi

Yapılan çalışmalar, hipoksik stres, metabolik stres ve genotoksik stres gibi çeşitli faktörlerin tümör hücrelerinde otofaji de dahil olmak üzere çok sayıda direnç mekanizmasını aktive ettiğini göstermektedir. Tümör mikroçevresinde en çok çalışılan hipoksi kaynaklı otofaji, NK ve sitotoksik T lenfositlerin aracılık ettiği anti-tümör bağışıklık yanıtlarına etkili bir şekilde karşı koyan çeşitli tümör kaçış mekanizmalarını aktive etmektedir. Bu nedenle, diğer terapötik stratejilerle birlikte kanser hücrelerinde otofajiyi hedeflemeyi amaçlayan stratejiler, immünolojik toleransın üstesinden gelmek ve tümör gerilemesini teşvik etmek için önemli bir ilgi uyandırmıştır (Janji ve diğerleri, 2018).

Tümör hücrelerinde otofaji aktivasyonunun NK hücresi üzerindeki etkisini araştıran az sayıdaki çalışma, NK hücrelerinden salınan sitotoksik granül granzim B'nin seçici olarak degradasyonu yolu ile NK aracılı tümör lizisini engellediğini göstermektedir. Özellikle hipoksi ve metabolik stres üzerine yoğunlaşan bu çalışmalarda, hipoksik tümör hücrelerinde Beclin1 inhibisyonu ile otofajiyi hedeflemek, hipoksik hücrelerdeki granzim B seviyesini arttırmış ve NK aracılı tümör lizisini geri kazandırmıştır (Viry ve diğerleri, 2014). Başka bir çalışmada yine Beclin1'in hedeflenmesinin periferal kan kökenli NK hücrelerinin melanomlara infiltrasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. BECN1'in hedeflenmesinin tümör büyümesini engellemesinin yanı sıra, fonksiyonel NK hücrelerinin melanom tümörlerine

infiltrasyonunu arttırdığı görülmüştür. Otofaji baskılanmış tümörlerde NK hücrelerinin tümör yatağına yönlendirilmesinin CCL5 artışı ile ilgili olduğu bulunmuştur. BECN1'e benzer şekilde, ATG5, p62/SQSTM1 gibi diğer otofaji genlerinin hedeflenmesi veya otofajinin farmakolojik olarak klorokin ile inhibe edilmesi de melanom hücrelerinde CCL5 ekspresyonunu indüklemiştir (Mgrditchian ve diğerleri, 2017).

Tez kapsamında ilk kez kemoterapi indüklü otofajik sekretomun kontrol-NK-92 ve DNAM1-NK92 hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. MCF-7 meme kanseri hücrelerinin Cq, Eto ve Eto+Cq ile muamele edilmesinin ardından toplanan koşullandırılmış ortamlar ile kontrol ve DNAM1 NK92 hücreleri muamele edilmiştir. Otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu yapılan gruplardan toplanan sekretomlarla muamele edilen NK92 hücrelerinin, otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu yapılan MCF-7 hücrelerini farklı oranlarda hedeflediği yapılan degranülasyon analizi ile gösterilmiştir. NK92 hücrelerinin MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasitesindeki farklılıkların, her bir gruptan toplanan sekretom içeriğinin farklılığından ve NK92 hücrelerindeki farklı genetik modifikasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

MCF-7 hücrelerinde otofajinin klorokin ile baskılanması ve otofaji inhibitörü ile etopositin birlikte kullanılması sonucu yapılan sitokin array sonuçlarında CCL5 seviyelerinde artış görülmüştür (Şekil 29). Mgrditchian ve ark. yaptığı çalışmada da otofajinin genetik ve farmakolojik inhibisyonu sonucu CCL5 seviyesinin arttığı bildirilmiştir (Mgrditchian ve diğerleri, 2017). Degranülasyon analizi sonuçlarına göre, Cq ve Eto+Cq ile muamele edilen DNAM1-NK92 hücrelerinin otofaji indüksiyonu ve modülasyonu yapılan MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasitesinin yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 37,38). Elde edilen sonuçlar, sekretomda bulunan faktörlerden biri olan CCL5'in seviyesindeki artış ile NK92 hücrelerinin tümör hücrelerini hedefleme kapasitesi arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir.

IL-10, birçok immün hücre fonksiyonunu düzenlediği bilinen önemli bir sitokindir. IL-10 ayrıca NK hücrelerinde aktivasyon ve sitotoksitesite ile ilgili genlerin ekspresyonunu artırır ve NK hücreleri tarafından tümör lizisini destekler. IL-15 veya IL-18 ile birlikte kullanıldığında IL-10, NK hücrelerinin çoğalmasını, sitotoksitesitesini ve sitokin üretimini artırır (Wang ve diğerleri, 2021). Sitokin array sonuçlarına göre IL10 miktarının klorokin ve etopositin birlikte kullanıldığı grupta kontrole göre attığı görülmektedir. Eto+Cq sekretomu ile muamele edilen DNAM1-NK92 hücrelerinin MCF-7 hücrelerini %40-50 oranlarında hedefleyebildiğini göstermektedir (Şekil 37,38). Bu sonuçlar, kanser terapilerinde kemoterapötik ajan ile otofaji inhibitörü kullanımının kemo-immünoterapi açısından etkili olabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca, MCF-7 hücrelerinde otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu sonucu indüklenen otofajik sekretomda tespit edilen 41 farklı sitokin/kemokin ve büyüme faktörünün sadece tek başına değil bu faktörlerin bir arada da sinerjik etki göstererek NK92 hücrelerinin hedefleme kapasitesini etkileyebileceği de düşünülmektedir.

Otofajik sekretomun DNAM1 ifadesini etkilediği yapılan flow sitometri analizi ile gösterilmiştir. Analiz sonucunda kontrol NK92 hücrelerindeki DNAM1 ifadesi sekretomla muamale edilmemiş kontrol grubuna göre Cq ve Eto+Cq uygulanan gruplarda artarken tek başına Eto uygulanan grupta azalmıştır (Şekil 41). DNAM1-NK92 hücrelerinde ise kontrole göre diğer tüm gruplarda hücrelerde DNAM1 ifadesinin arttığı görülmektedir (Şekil 41). Bu sonucun hem DNAM1 ile CD155 ligandı interaksiyonundan hem de sekretom içeriğinin DNAM1 ifadesini etkilemiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

CD155, NK aktive edici reseptör DNAM-1'in bir ligandır, sağlıklı dokularda düşük oranda eksprese olduğu ve çeşitli malignitelerde ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Triki ve diğerleri, 2019). Multipl miyelom hastalarında kullanılan bazı kemoterapötiklerin CD155 ekspresyonunun arttırdığı ve ayrıca reaktif oksijen türlerinin de DNA hasarı yanıtı yoluyla CD155 ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Gao ve diğerleri, 2017). Sonuçlar, MCF-7 hücrelerinde hem kontrolde, hem de Cq, Eto ve Eto+Cq uygulanan gruplarda eşit oranda CD155 protein seviyesinin olduğunu göstermektedir (Şekil 31).

CD155'in MCF-7 hücrelerinde yüksek oranda ifade edilmesi kontrol NK-92'ye göre DNAM1-NK92 hücreleri tarafından hedeflenmesini arttırmaktadır (Şekil 34). Bu sonuç, NK92 hücrelerinin tümörü hedeflemesinde genetik modifikasyonun önemini göstermektedir. Ayrıca NK92 hücrelerinin muamele edildiği sekretomun içeriği ve MCF-7 hücrelerinde de yapılan otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu NK92 hücrelerinin hedefleme kapasitesini etkilemektedir. Eto ve Eto+Cq sekretomları ile muamele edilen DNAM1-NK92 hücrelerinin otofaji inhibisyonu yapılan MCF-7 hücrelerini diğer gruplara göre daha iyi hedeflediği, Eto+Cq sekretomu ile muamele edilen DNAM1-NK92 hücrelerinin Eto ile muamele edilen MCF-7 hücrelerini diğer gruplara göre daha iyi hedeflediği, Eto sekretomu ile muamele edilen DNAM1-NK92 hücrelerinin ise Eto+Cq ile muamele edilen MCF-7 hücrelerini diğer gruplara göre daha iyi hedeflediği görülmüştür (Şekil 37,38). Alınan bu sonuçlar kemoterapi ajanı ve otofaji inhibitörünün ayrı ve birlikte kullanımının farklı sekretom içeriği oluşturduğunu ve hem sekretom içeriğinin hem de MCF-7 hücrelerinde yapılan otofaji indüksiyonu ve inhibisyonunun NK92 hücrelerinin tümörü hedefleme kapasitesini etkilediğini göstermektedir.

NKG2D-NK92 hücrelerinde ise, tüm MCF-7 gruplarını en iyi hedeflemenin Eto sekretomu ile muamele edilen NKG2D-NK92 hücrelerinde olduğu görülmüştür (Şekil 39,40). Sekretom içerikleri ve hedef hücrede yapılan otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu NK92 hücrelerinin reseptörlerini farklı şekillerde etkilediğini ve bu durumun NK92 hücrelerinin tümör hücrelerini hedefleme kapasitesini de değiştirdiğini göstermektedir.

Tüm bu sonuçlar kemoterapi ile otofaji indüksiyonunun, farmakolojik olarak otofaji inhibisyonunun ve inhibitör ile birlikte kemoterapötik ilaç kullanımının farklı sekretom içeriği oluşturduğunu ve NK92 hücrelerinin hedefleme kapasitesini de farklı oranlarda etkilediğine işaret etmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında MCF-7 meme kanseri hücrelerinde kemoterapi indüklü otofajik sekretomun karakterizasyonu ve otofajik sekretomun DNAM1-NK92 hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Kemoterapi ile indüklenen otofaji ilişkili sekretom ilk kez tümüyle karakterize edilmiştir ve MCF-7 hücrelerinden otofaji indüksiyonu ve inhibisyonu sonrası elde edilen sekretomun DNAM1-NK92 hücreleri üzerindeki etkisi de ilk kez bu tez kapsamında gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlar;

- Etoposid gibi genotoksik etki yaratan kemoterapi ilaçlarının kanser hücrelerinde otofajiyı indükleyebileceğini,
- Kemoterapi ile otofaji indüklendiğinde ve inhibe edildiğinde gruplarda farklı sekretom içeriğinin oluştuğunu,
- Sekretomda sitokin, kemokin ve büyüme faktörü (CCL5, IL10, IL15, IL4, IL12, TNF α vb.) gibi özellikle NK hücrelerinin immün cevabında görev alan faktörler tespit edilmiştir
- Sekretomda sitokin, kemokin ve büyüme faktörleri yanısıra tümör hücrelerinin proliferasyonunda (GDF15, Hsp70, ENO1), tümör metabolizmasında (pirüvat kinaz, GAPDH, LDH vb.) ve invazyon/metastazda (vitronektin, kadherin vb.) görev alan proteinler de tespit edilmiştir.
- Oluşan sekretomun hem kontrol hem de genetik modifikasyon yapılan NK92 hücrelerinin hedefleme kapasitelerini farklı oranlarda etkilediğini göstermiştir.

Elde edilen veriler doğrultusunda özellikle LC-MS/MS analizi, otofaji indüksiyonu ve inhibisyonunun MCF-7 hücrelerinde metastatik aktiviteyi ve tümör metabolizmasını etkilediğini göstermektedir. Bu doğrultuda, metastaz ve tümör metabolizmasının otofaji ile ilişkisine yönelik yeni çalışmalara ihtiyaç duyulabilir. LC-MS/MS sonuçlarının farklı yöntemler ile validasyonu yapılabilir. Bu doğrultuda, MCF-7 hücrelerinde metastatik proteinler, tümör metabolizması ile ilişkili proteinler yada ısı şoku proteinleri kültür ortamına rekombinant olarak verildiğinde de benzer sonuçların alınıp alınmayacağı yada ilişkili genlerin susturulmasının sonuçları nasıl etkileyeceği test edilebilir. Ayrıca kültür ortamına sitokin array sonucunda öne çıkan sitokin/kemokin yada büyüme faktörlerinin rekombinant proteinleri de verilerek benzer bir validasyon yapılabilir ve bu faktörlere yönelik kültür

ortamına anti-sitokin/kemokin yada büyüme faktörü antikorunu verilerek bu faktörlerin etkileri azaltılabilir.

Otofaji indüksiyonu ve inhibisyonunun sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin bulunduğu bir sekretom oluşturması tümöre yönelik immün yanıtlar açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle otofajik sekretomun etkisi sadece NK hücreleri kapsamında değil, diğer immün hücrelere olan etkisi açısından da araştırılabilir.

Ayrıca hem sitokin array hem de LC-MS/MS analizleri sonuçlarından elde edilen verilere ve sekretom muamelesi sonrası NK92 hücrelerinin MCF-7 hücrelerini hedefleme kapasitesi de göz önüne alınarak NK92 hücreleri için yeni genetik modifikasyonlar tasarlanabilir.

Sonuç olarak ilk kez bu tez kapsamında kemoterapi indüklü otofajik sekretomun karakterizasyonu ve DNAM1-NK92 hücreleri üzerindeki etkisi araştırılarak literatüre önemli bir katkı yapılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abel, A. M., Yang, C., Thakar, M. S., Malarkannan, S. (2018). Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol*, 9, 1869. doi:10.3389/fimmu.2018.01869
- Albakova, Z., Armeev, G. A., Kanevskiy, L. M., Kovalenko, E. I., Sapozhnikov, A. M. (2020). HSP70 Multi-Functionality in Cancer. *Cells*, 9(3). doi:10.3390/cells9030587
- Alfaro, I. E., Albornoz, A., Molina, A., Moreno, J., Cordero, K., Criollo, A., Budini, M. (2018). Chaperone Mediated Autophagy in the Crosstalk of Neurodegenerative Diseases and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 778. doi:10.3389/fendo.2018.00778
- Aman, Y., Schmauck-Medina, T., Hansen, M., Morimoto, R. I., Simon, A. K., Bjedov, I., . . . Fang, E. F. (2021). Autophagy in healthy aging and disease. *Nat Aging*, 1(8), 634-650. doi:10.1038/s43587-021-00098-4
- Amaravadi, R., Kimmelman, A. C., White, E. (2016). Recent insights into the function of autophagy in cancer. *Genes Dev*, 30(17), 1913-1930. doi:10.1101/gad.287524.116
- Amaravadi, R. K., Kimmelman, A. C., Debnath, J. (2019). Targeting Autophagy in Cancer: Recent Advances and Future Directions. *Cancer Discov*, 9(9), 1167-1181. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-0292
- Baginska, J., Viry, E., Berchem, G., Poli, A., Noman, M. Z., van Moer, K., . . . Janji, B. (2013). Granzyme B degradation by autophagy decreases tumor cell susceptibility to natural killer-mediated lysis under hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(43), 17450-17455. doi:10.1073/pnas.1304790110
- Bar-Peled, L., Sabatini, D. M. (2014). Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol*, 24(7), 400-406. doi:10.1016/j.tcb.2014.03.003
- Baranowska, K., Misund, K., Starheim, K. K., Holien, T., Johansson, I., Darvekar, S., . . . Sundan, A. (2016). Hydroxychloroquine potentiates carfilzomib toxicity towards myeloma cells. *Oncotarget*, 7(43), 70845-70856. doi:10.18632/oncotarget.12226
- Barrow, A. D., Martin, C. J., Colonna, M. (2019). The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Front Immunol*, 10, 909. doi:10.3389/fimmu.2019.00909

- Bera, A., Subramanian, M., Karaian, J., Eklund, M., Radhakrishnan, S., Gana, N., . . . Srivastava, M. (2020). Functional role of vitronectin in breast cancer. *PLoS One*, *15*(11), e0242141. doi:10.1371/journal.pone.0242141
- Berrien-Elliott, M. M., Jacobs, M. T., Fehniger, T. A. (2023). Allogeneic natural killer cell therapy. *Blood*, *141*(8), 856-868. doi:10.1182/blood.2022016200
- Bhutia, S. K., Mukhopadhyay, S., Sinha, N., Das, D. N., Panda, P. K., Patra, S. K., . . . Fisher, P. B. (2013). Autophagy: cancer's friend or foe? *Adv Cancer Res*, *118*, 61-95. doi:10.1016/B978-0-12-407173-5.00003-0
- Bosnjak, M., Ristic, B., Arsikin, K., Mircic, A., Suzin-Zivkovic, V., Perovic, V., . . . Harhaji-Trajkovic, L. (2014). Inhibition of mTOR-dependent autophagy sensitizes leukemic cells to cytarabine-induced apoptotic death. *PLoS One*, *9*(4), e94374. doi:10.1371/journal.pone.0094374
- Burgos-Panadero, R., Noguera, I., Canete, A., Navarro, S., vd.Noguera, R. (2019). Vitronectin as a molecular player of the tumor microenvironment in neuroblastoma. *BMC Cancer*, *19*(1), 479. doi:10.1186/s12885-019-5693-2
- Camuzard, O., Trojani, M. C., Santucci-Darmanin, S., Pagnotta, S., Breuil, V., Carle, G. F., Pierrefite-Carle, V. (2020). Autophagy in Osteosarcoma Cancer Stem Cells Is Critical Process which Can Be Targeted by the Antipsychotic Drug Thioridazine. *Cancers (Basel)*, *12*(12). doi:10.3390/cancers12123675
- Cantoni, C., Wurzer, H., Thomas, C., Vitale, M. (2020). Escape of tumor cells from the NK cell cytotoxic activity. *J Leukoc Biol*, *108*(4), 1339-1360. doi:10.1002/JLB.2MR0820-652R
- Chang, K. C., Liu, P. F., Chang, C. H., Lin, Y. C., Chen, Y. J., Shu, C. W. (2022). The interplay of autophagy and oxidative stress in the pathogenesis and therapy of retinal degenerative diseases. *Cell Biosci*, *12*(1), 1. doi:10.1186/s13578-021-00736-9
- Chen, Y., Zhao, Y., Mishra, P. K. (2022). Editorial: Autophagy-Mediated Cell Survival and Death in Disease Progression and Treatment. *Front Cell Dev Biol*, *10*, 916347. doi:10.3389/fcell.2022.916347
- Cherrier, D. E., Serafini, N., Di Santo, J. P. (2018). Innate Lymphoid Cell Development: A T Cell Perspective. *Immunity*, *48*(6), 1091-1103. doi:10.1016/j.immuni.2018.05.010
- Chiossone, L., Dumas, P. Y., Vienne, M., Vivier, E. (2018). Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat Rev Immunol*, *18*(11), 671-688. doi:10.1038/s41577-018-0061-z

- Chollat-Namy, M., Ben Safta-Saadoun, T., Haferssas, D., Meurice, G., Chouaib, S., Thiery, J. (2019). The pharmacological reactivation of p53 function improves breast tumor cell lysis by granzyme B and NK cells through induction of autophagy. *Cell Death Dis*, *10*(10), 695. doi:10.1038/s41419-019-1950-1
- Chou, F. C., Chen, H. Y., Kuo, C. C., Sytwu, H. K. (2018). Role of Galectins in Tumors and in Clinical Immunotherapy. *Int J Mol Sci*, *19*(2). doi:10.3390/ijms19020430
- Clark, C. A., Gupta, H. B., Curiel, T. J. (2017). Tumor cell-intrinsic CD274/PD-L1: A novel metabolic balancing act with clinical potential. *Autophagy*, *13*(5), 987-988. doi:10.1080/15548627.2017.1280223
- Claude-Taupin, A., Bissa, B., Jia, J., Gu, Y., Deretic, V. (2018). Role of autophagy in IL-1beta export and release from cells. *Semin Cell Dev Biol*, *83*, 36-41. doi:10.1016/j.semcdb.2018.03.012
- Cotzomi-Ortega, I., Aguilar-Alonso, P., Reyes-Leyva, J., Maycotte, P. (2018). Autophagy and Its Role in Protein Secretion: Implications for Cancer Therapy. *Mediators Inflamm*, *2018*, 4231591. doi:10.1155/2018/4231591
- Czarny, P., Pawlowska, E., Bialkowska-Warzecha, J., Kaarniranta, K., Blasiak, J. (2015). Autophagy in DNA damage response. *Int J Mol Sci*, *16*(2), 2641-2662. doi:10.3390/ijms16022641
- Daher, M., Basar, R., Gokdemir, E., Baran, N., Uprety, N., Nunez Cortes, A. K., . . . Rezvani, K. (2021). Targeting a cytokine checkpoint enhances the fitness of armored cord blood CAR-NK cells. *Blood*, *137*(5), 624-636. doi:10.1182/blood.2020007748
- Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., . . . White, E. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell*, *10*(1), 51-64. doi:10.1016/j.ccr.2006.06.001
- Duan, Y., Tian, X., Liu, Q., Jin, J., Shi, J., Hou, Y. (2021). Role of autophagy on cancer immune escape. *Cell Commun Signal*, *19*(1), 91. doi:10.1186/s12964-021-00769-0
- Dupont, N., Jiang, S., Pilli, M., Ornatowski, W., Bhattacharya, D., Deretic, V. (2011). Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1beta. *EMBO J*, *30*(23), 4701-4711. doi:10.1038/emboj.2011.398
- Eren, M. (2020). DNA Damage Response and Autophagy: An Exclusive Meeting in Cancer. *International Journal of Innovative Approaches in Science Research*, 191-204. doi.org/10.29329/ijiasr.2020.312.7
- Eruslanov E., Kusmartsev S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol*. *594*:57-72. doi: 10.1007/978-1-60761-411-1_4.

- Fan YJ., Zong WX. (2013). The cellular decision between apoptosis and autophagy. *Chin J Cancer*. 32(3):121-9. doi: 10.5732/cjc.012.10106
- Feng, Y., He, D., Yao, Z., Klionsky, D. J. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Res*, 24(1), 24-41. doi:10.1038/cr.2013.168
- Feng, Y., Xiong, Y., Qiao, T., Li, X., Jia, L., Han, Y. (2018). Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. *Cancer Med*, 7(12), 6124-6136. doi:10.1002/cam4.1820
- Fimia, G. M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., . . . Cecconi, F. (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*, 447(7148), 1121-1125. doi:10.1038/nature05925
- Focaccetti, C., Benvenuto, M., Pighi, C., Vitelli, A., Napolitano, F., Cotugno, N., . . . Cifaldi, L. (2022). DNAM-1-chimeric receptor-engineered NK cells, combined with Nutlin-3a, more effectively fight neuroblastoma cells in vitro: a proof-of-concept study. *Front Immunol*, 13, 886319. doi:10.3389/fimmu.2022.886319
- Gabai, V. L., Shifrin, V. I. (2014). Feasibility analysis of p62 (SQSTM1)-encoding DNA vaccine as a novel cancer immunotherapy. *Int Rev Immunol*, 33(5), 375-382. doi:10.3109/08830185.2014.954699
- Galati, S., Boni, C., Gerra, M. C., Lazzaretti, M. Buschini, A. (2019). Autophagy: A Player in response to Oxidative Stress and DNA Damage. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 5692958. doi:10.1155/2019/5692958
- Galavotti, S., Bartesaghi, S., Faccenda, D., Shaked-Rabi, M., Sanzone, S., McEvoy, A., . . . Salomoni, P. (2013). The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells. *Oncogene*, 32(6), 699-712. doi:10.1038/onc.2012.111
- Gao, J., Zheng, Q., Xin, N., Wang, W., Zhao, C. (2017). CD155, an onco-immunologic molecule in human tumors. *Cancer Sci*, 108(10), 1934-1938. doi:10.1111/cas.13324
- Garbar, C., Mascaux, C., Giustiniani, J., Merrouche, Y., Bensussan, A. (2017). Chemotherapy treatment induces an increase of autophagy in the luminal breast cancer cell MCF7, but not in the triple-negative MDA-MB231. *Sci Rep*, 7(1), 7201. doi:10.1038/s41598-017-07489-x

- Granzin, M., Wagner, J., Kohl, U., Cerwenka, A., Huppert, V., Ullrich, E. (2017). Shaping of Natural Killer Cell Antitumor Activity by Ex Vivo Cultivation. *Front Immunol*, 8, 458. doi:10.3389/fimmu.2017.00458
- Grimaldi, A., Santini, D., Zappavigna, S., Lombardi, A., Misso, G., Boccellino, M., . . . Caraglia, M. (2015). Antagonistic effects of chloroquine on autophagy occurrence potentiate the anticancer effects of everolimus on renal cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 16(4), 567-579. doi:10.1080/15384047.2015.1018494
- Guo, J. Y., Chen, H. Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A. M., Karsli-Uzunbas, G., . . . White, E. (2011). Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev*, 25(5), 460-470. doi:10.1101/gad.2016311
- Hahn, T., Akporiaye, E. T. (2013). alpha-TEA as a stimulator of tumor autophagy and enhancer of antigen cross-presentation. *Autophagy*, 9(3), 429-431. doi:10.4161/auto.22969
- Hao, C., Liu, G., Tian, G. (2019). Autophagy inhibition of cancer stem cells promotes the efficacy of cisplatin against non-small cell lung carcinoma. *Ther Adv Respir Dis*, 13, 1753466619866097. doi:10.1177/1753466619866097
- Hasan, A., Rizvi, S. F., Parveen, S., Pathak, N., Nazir, A., Mir, S. S. (2022). Crosstalk Between ROS and Autophagy in Tumorigenesis: Understanding the Multifaceted Paradox. *Front Oncol*, 12, 852424. doi:10.3389/fonc.2022.852424
- He, C., Klionsky, D. J. (2007). Atg9 trafficking in autophagy-related pathways. *Autophagy*, 3(3), 271-274. doi:10.4161/auto.3912
- He, Y. H., Tian, G. (2020). Autophagy as a Vital Therapy Target for Renal Cell Carcinoma. *Front Pharmacol*, 11, 518225. doi:10.3389/fphar.2020.518225
- Heipertz, E. L., Zynda, E. R., Stav-Noraas, T. E., Hungler, A. D., Boucher, S. E., Kaur, N., Vemuri, M. C. (2021). Current Perspectives on "Off-The-Shelf" Allogeneic NK and CAR-NK Cell Therapies. *Front Immunol*, 12, 732135. doi:10.3389/fimmu.2021.732135
- Huang, C. K., Sun, Y., Lv, L., Ping, Y. (2022). ENO1 and Cancer. *Mol Ther Oncolytics*, 24, 288-298. doi:10.1016/j.omto.2021.12.026
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., Mizushima, N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*, 151(6), 1256-1269. doi:10.1016/j.cell.2012.11.001

- Janji, B., Berchem, G., Chouaib, S. (2018). Targeting Autophagy in the Tumor Microenvironment: New Challenges and Opportunities for Regulating Tumor Immunity. *Front Immunol*, 9, 887. doi:10.3389/fimmu.2018.00887
- Jiang, G. M., Tan, Y., Wang, H., Peng, L., Chen, H. T., Meng, X. J., . . . Shan, H. (2019). The relationship between autophagy and the immune system and its applications for tumor immunotherapy. *Mol Cancer*, 18(1), 17. doi:10.1186/s12943-019-0944-z
- Joo, M., Kim, D., Lee, M. W., Lee, H. J., Kim, J. M. (2023). GDF15 Promotes Cell Growth, Migration, and Invasion in Gastric Cancer by Inducing STAT3 Activation. *Int J Mol Sci*, 24(3). doi:10.3390/ijms24032925
- Kaushik S., Cuervo AM. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 19(6):365-381. doi: 10.1038/s41580-018-0001-6
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13(2), 132-141. doi:10.1038/ncb2152
- Kimmelman, A. C. (2011). The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev*, 25(19), 1999-2010. doi:10.1101/gad.17558811
- Klionsky, D. J., Schulman, B. A. (2014). Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 21(4), 336-345. doi:10.1038/nsmb.2787
- Kloess, S., Oberschmidt, O., Dahlke, J., Vu, X. K., Neudoerfl, C., Kloos, A., . . . Morgan, M. A. (2019). Preclinical Assessment of Suitable Natural Killer Cell Sources for Chimeric Antigen Receptor Natural Killer-Based "Off-the-Shelf" Acute Myeloid Leukemia Immunotherapies. *Hum Gene Ther*, 30(4), 381-401. doi:10.1089/hum.2018.247
- Kong, D., Ma, S., Liang, B., Yi, H., Zhao, Y., Xin, R., . . . Liu, X. (2012). The different regulatory effects of p53 status on multidrug resistance are determined by autophagy in ovarian cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 66(4), 271-278. doi:10.1016/j.biopha.2011.12.002
- Koyama-Honda, I., Itakura, E., Fujiwara, T. K., Mizushima, N. (2013). Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy*, 9(10), 1491-1499. doi:10.4161/auto.25529
- Kraya, A. A., Piao, S., Xu, X., Zhang, G., Herlyn, M., Gimotty, P., . . . Speicher, D. W. (2015). Identification of secreted proteins that reflect autophagy dynamics within tumor cells. *Autophagy*, 11(1), 60-74. doi:10.4161/15548627.2014.984273

- Kroemer, G., Marino, G., Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 40(2), 280-293. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.023
- Kumar, S. (2018). Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors. *Immunology*, 154(3), 383-393. doi:10.1111/imm.12921
- Kundu, S., Gurney, M., O'Dwyer, M. (2021). Generating natural killer cells for adoptive transfer: expanding horizons. *Cytotherapy*, 23(7), 559-566. doi:10.1016/j.jcyt.2020.12.002
- Lamoureux, F., Thomas, C., Crafter, C., Kumano, M., Zhang, F., Davies, B. R., . . . Zoubeidi, A. (2013). Blocked autophagy using lysosomotropic agents sensitizes resistant prostate tumor cells to the novel Akt inhibitor AZD5363. *Clin Cancer Res*, 19(4), 833-844. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3114
- Law, R. H., Lukoyanova, N., Voskoboinik, I., Caradoc-Davies, T. T., Baran, K., Dunstone, M. A., . . . Whisstock, J. C. (2010). The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature*, 468(7322), 447-451. doi:10.1038/nature09518
- Lee, C. T., Mace, T., Repasky, E. A. (2010). Hypoxia-driven immunosuppression: a new reason to use thermal therapy in the treatment of cancer? *Int J Hyperthermia*, 26(3), 232-246. doi:10.3109/02656731003601745
- Levine B., Klionsky DJ. (2017). Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. *Proc Natl Acad Sci*. 10;114(2):201-205. doi: 10.1073/pnas.1619876114
- Li, C. J., Liao, W. T., Wu, M. Y., Chu, P. Y. (2017). New Insights into the Role of Autophagy in Tumor Immune Microenvironment. *Int J Mol Sci*, 18(7). doi:10.3390/ijms18071566
- Li, J., Yang, D., Wang, W., Piao, S., Zhou, J., Saiyin, W., . . . Li, Y. (2015). Inhibition of autophagy by 3-MA enhances IL-24-induced apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 34(1), 97. doi:10.1186/s13046-015-0211-0
- Li, S., Shi, X., Chen, M., Xu, N., Sun, D., Bai, R., . . . Xu, Z. (2019). Angiogenin promotes colorectal cancer metastasis via tiRNA production. *Int J Cancer*, 145(5), 1395-1407. doi:10.1002/ijc.32245
- Liang, P., Jiang, B., Li, Y., Liu, Z., Zhang, P., Zhang, M., . . . Xiao, X. (2018). Autophagy promotes angiogenesis via AMPK/Akt/mTOR signaling during the recovery of heat-denatured endothelial cells. *Cell Death Dis*, 9(12), 1152. doi:10.1038/s41419-018-1194-5

- Liang, X., De Vera, M. E., Buchser, W. J., Romo de Vivar Chavez, A., Loughran, P., Beer Stolz, D., . . . Lotze, M. T. (2012). Inhibiting systemic autophagy during interleukin 2 immunotherapy promotes long-term tumor regression. *Cancer Res*, *72*(11), 2791-2801. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0320
- Lim, S. M., Mohamad Hanif, E. A., Chin, S. F. (2021). Is targeting autophagy mechanism in cancer a good approach? The possible double-edge sword effect. *Cell Biosci*, *11*(1), 56. doi:10.1186/s13578-021-00570-z
- Liu, T., Zhang, J., Li, K., Deng, L., Wang, H. (2020). Combination of an Autophagy Inducer and an Autophagy Inhibitor: A Smarter Strategy Emerging in Cancer Therapy. *Front Pharmacol*, *11*, 408. doi:10.3389/fphar.2020.00408
- Liu, X., Sun, K., Wang, H., Dai, Y. (2016). Inhibition of Autophagy by Chloroquine Enhances the Antitumor Efficacy of Sorafenib in Glioblastoma. *Cell Mol Neurobiol*, *36*(7), 1197-1208. doi:10.1007/s10571-015-0318-z
- Lock, R., Kenific, C. M., Leidal, A. M., Salas, E., Debnath, J. (2014). Autophagy-dependent production of secreted factors facilitates oncogenic RAS-driven invasion. *Cancer Discov*, *4*(4), 466-479. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0841
- Longley, D. B., Harkin, D. P., Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, *3*(5), 330-338. doi:10.1038/nrc1074
- Lu, G., Wang, Y., Shi, Y., Zhang, Z., Huang, C., He, W., . . . Shen, H. M. (2022). Autophagy in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic target. *MedComm (2020)*, *3*(3), e150. doi:10.1002/mco2.150
- Ma, S., Kong, D., Fu, X., Liu, L., Liu, Y., Xue, C., . . . Liu, X. (2021). p53-Induced Autophagy Regulates Chemotherapy and Radiotherapy Resistance in Multidrug Resistance Cancer Cells. *Dose Response*, *19*(4), 15593258211048046. doi:10.1177/15593258211048046
- Macintosh, R. L., Ryan, K. M. (2013). Autophagy in tumour cell death. *Semin Cancer Biol*, *23*(5), 344-351. doi:10.1016/j.semcancer.2013.05.006
- Maes, H., Kuchnio, A., Peric, A., Moens, S., Nys, K., De Bock, K., . . . Carmeliet, P. (2014). Tumor vessel normalization by chloroquine independent of autophagy. *Cancer Cell*, *26*(2), 190-206. doi:10.1016/j.ccr.2014.06.025
- Majeed, S. T., Majeed, R., Andrabi, K. I. (2022). Expanding the view of the molecular mechanisms of autophagy pathway. *J Cell Physiol*, *237*(8), 3257-3277. doi:10.1002/jcp.30819

- Mantesso, S., Geerts, D., Spanholtz, J., Kucerova, L. (2020). Genetic Engineering of Natural Killer Cells for Enhanced Antitumor Function. *Front Immunol*, 11, 607131. doi:10.3389/fimmu.2020.607131
- Marei HE., Althani A., Afifi N., Hasan A., Caceci T., Pozzoli G., Morrione A., Giordano A., Cenciarelli C. (2021). p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell Int.*24;21(1):703. doi: 10.1186/s12935-021-02396-8.
- Marinkovic, M., Sprung, M., Buljubasic, M., Novak, I. (2018). Autophagy Modulation in Cancer: Current Knowledge on Action and Therapy. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 8023821. doi:10.1155/2018/8023821
- Martens, S., Fracchiolla, D. (2020). Activation and targeting of ATG8 protein lipidation. *Cell Discov*, 6, 23. doi:10.1038/s41421-020-0155-1
- Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., White, E. (2007). Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*, 7(12), 961-967. doi:10.1038/nrc2254
- Maycotte, P., Jones, K. L., Goodall, M. L., Thorburn, J., Thorburn, A. (2015). Autophagy Supports Breast Cancer Stem Cell Maintenance by Regulating IL6 Secretion. *Mol Cancer Res*, 13(4), 651-658. doi:10.1158/1541-7786.MCR-14-0487
- Mgrditchian, T., Arakelian, T., Paggetti, J., Noman, M. Z., Viry, E., Moussay, E., . . . Janji, B. (2017). Targeting autophagy inhibits melanoma growth by enhancing NK cells infiltration in a CCL5-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(44), E9271-E9279. doi:10.1073/pnas.1703921114
- Michaud, M., Martins, I., Sukkurwala, A. Q., Adjemian, S., Ma, Y., Pellegatti, P., . . . Kroemer, G. (2011). Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science*, 334(6062), 1573-1577. doi:10.1126/science.1208347
- Miyake, M., Goodison, S., Lawton, A., Gomes-Giacoia, E., Rosser, C. J. (2015). Angiogenin promotes tumoral growth and angiogenesis by regulating matrix metalloproteinase-2 expression via the ERK1/2 pathway. *Oncogene*, 34(7), 890-901. doi:10.1038/onc.2014.2
- Molejon, M. I., Ropolo, A., Re, A. L., Boggio, V., Vaccaro, M. I. (2013). The VMP1-Beclin 1 interaction regulates autophagy induction. *Sci Rep*, 3, 1055. doi:10.1038/srep01055
- Molfetta, R., Zitti, B., Lecce, M., Milito, N. D., Stabile, H., Fionda, C., . . . Paolini, R. (2020). CD155: A Multi-Functional Molecule in Tumor Progression. *Int J Mol Sci*, 21(3). doi:10.3390/ijms21030922

- Myers, J. A., Miller, J. S. (2021). Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 18(2), 85-100. doi:10.1038/s41571-020-0426-7
- New, J., Arnold, L., Ananth, M., Alvi, S., Thornton, M., Werner, L., . . . Thomas, S. M. (2017). Secretory Autophagy in Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Head and Neck Cancer Progression and Offers a Novel Therapeutic Target. *Cancer Res*, 77(23), 6679-6691. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1077
- New, J., Thomas, S. M. (2019). Autophagy-dependent secretion: mechanism, factors secreted, and disease implications. *Autophagy*, 15(10), 1682-1693. doi:10.1080/15548627.2019.1596479
- Noman, M. Z., Janji, B., Berchem, G., Mami-Chouaib, F., Chouaib, S. (2012). Hypoxia-induced autophagy: a new player in cancer immunotherapy? *Autophagy*, 8(4), 704-706. doi:10.4161/auto.19572
- Noman, M. Z., Parpal, S., Van Moer, K., Xiao, M., Yu, Y., Viklund, J., . . . Janji, B. (2020). Inhibition of Vps34 reprograms cold into hot inflamed tumors and improves anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy. *Sci Adv*, 6(18), eaax7881. doi:10.1126/sciadv.aax7881
- Pan, Y. Z., Wang, X., Bai, H., Wang, C. B., Zhang, Q., Xi, R. (2015). Autophagy in drug resistance of the multiple myeloma cell line RPMI8226 to doxorubicin. *Genet Mol Res*, 14(2), 5621-5629. doi:10.4238/2015.May.25.14
- Patergnani S., Missiroli S., Morciano G., Perrone M., Mantovani CM., Anania G.,.....Giorgi C. (2021). Understanding the Role of Autophagy in Cancer Formation and Progression Is a Real Opportunity to Treat and Cure Human Cancers. *Cancers (Basel)*. 10;13(22):5622. doi: 10.3390/cancers13225622.
- Paul, S., Lal, G. (2017). The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, 8, 1124. doi:10.3389/fimmu.2017.01124
- Peng, Y. F., Shi, Y. H., Ding, Z. B., Ke, A. W., Gu, C. Y., Hui, B., . . . Fan, J. (2013). Autophagy inhibition suppresses pulmonary metastasis of HCC in mice via impairing anoikis resistance and colonization of HCC cells. *Autophagy*, 9(12), 2056-2068. doi:10.4161/auto.26398
- Prager, I., Watzl, C. (2019). Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J Leukoc Biol*, 105(6), 1319-1329. doi:10.1002/JLB.MR0718-269R
- Qiang, L., Sample, A., Shea, C. R., Soltani, K., Macleod, K. F., He, Y. Y. (2017). Autophagy gene ATG7 regulates ultraviolet radiation-induced inflammation and skin tumorigenesis. *Autophagy*, 13(12), 2086-2103. doi:10.1080/15548627.2017.1380757

- Qiang, L., Wu, C., Ming, M., Viollet, B., He, Y. Y. (2013). Autophagy controls p38 activation to promote cell survival under genotoxic stress. *J Biol Chem*, 288(3), 1603-1611. doi:10.1074/jbc.M112.415224
- Quintarelli, C., Sivori, S., Caruso, S., Carlomagno, S., Falco, M., Boffa, I., . . . Locatelli, F. (2020). Efficacy of third-party chimeric antigen receptor modified peripheral blood natural killer cells for adoptive cell therapy of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 34(4), 1102-1115. doi:10.1038/s41375-019-0613-7
- Regis, S., Dondero, A., Caliendo, F., Bottino, C., Castriconi, R. (2020). NK Cell Function Regulation by TGF-beta-Induced Epigenetic Mechanisms. *Front Immunol*, 11, 311. doi:10.3389/fimmu.2020.00311
- Ren, X., Li, T., Zhang, W., Yang, X. (2022). Targeting Heat-Shock Protein 90 in Cancer: An Update on Combination Therapy. *Cells*, 11(16). doi:10.3390/cells11162556
- Robainas, M., Otano, R., Bueno, S., Ait-Oudhia, S. (2017). Understanding the role of PD-L1/PD1 pathway blockade and autophagy in cancer therapy. *Onco Targets Ther*, 10, 1803-1807. doi:10.2147/OTT.S132508
- Sasaki, K., Tsuno, N. H., Sunami, E., Tsurita, G., Kawai, K., Okaji, Y., . . . Nagawa, H. (2010). Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. *BMC Cancer*, 10, 370. doi:10.1186/1471-2407-10-370
- Sayitoglu, E. C., Georgoudaki, A. M., Chrobok, M., Ozkazanc, D., Josey, B. J., Arif, M., . . . Duru, A. D. (2020). Boosting Natural Killer Cell-Mediated Targeting of Sarcoma Through DNAM-1 and NKG2D. *Front Immunol*, 11, 40. doi:10.3389/fimmu.2020.00040
- Schmidts, A., Ormhoj, M., Choi, B. D., Taylor, A. O., Bouffard, A. A., Scarfo, I., . . . Maus, M. V. (2019). Rational design of a trimeric APRIL-based CAR-binding domain enables efficient targeting of multiple myeloma. *Blood Adv*, 3(21), 3248-3260. doi:10.1182/bloodadvances.2019000703
- Schuck, S. (2020). Microautophagy - distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes. *J Cell Sci*, 133(17). doi:10.1242/jcs.246322
- Shabrish, S., Gupta, M., Madkaikar, M. (2016). A Modified NK Cell Degranulation Assay Applicable for Routine Evaluation of NK Cell Function. *J Immunol Res*, 2016, 3769590. doi:10.1155/2016/3769590
- Shen, T., Zhu, W., Yang, L., Liu, L., Jin, R., Duan, J., . . . Ai, H. (2018). Lactosylated N-Alkyl polyethylenimine coated iron oxide nanoparticles induced autophagy in mouse dendritic cells. *Regen Biomater*, 5(3), 141-149. doi:10.1093/rb/rbx032

- Shukla, S. A., Bachireddy, P., Schilling, B., Galonska, C., Zhan, Q., Bango, C., . . . Wu, C. J. (2018). Cancer-Germline Antigen Expression Discriminates Clinical Outcome to CTLA-4 Blockade. *Cell*, *173*(3), 624-633 e628. doi:10.1016/j.cell.2018.03.026
- Siddiqui, J. A., Pothuraju, R., Khan, P., Sharma, G., Muniyan, S., Seshacharyulu, P., . . . Batra, S. K. (2022). Pathophysiological role of growth differentiation factor 15 (GDF15) in obesity, cancer, and cachexia. *Cytokine Growth Factor Rev*, *64*, 71-83. doi:10.1016/j.cytogfr.2021.11.002
- Stagni, V., Cirotti, C., Barila, D. (2018). Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase in the Control of Oxidative Stress, Mitochondria, and Autophagy in Cancer: A Maestro With a Large Orchestra. *Front Oncol*, *8*, 73. doi:10.3389/fonc.2018.00073
- Stjepanovic, G., Baskaran, S., Lin, M. G., Hurley, J. H. (2017). Unveiling the role of VPS34 kinase domain dynamics in regulation of the autophagic PI3K complex. *Mol Cell Oncol*, *4*(6), e1367873. doi:10.1080/23723556.2017.1367873
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., Ohsumi, Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J*, *20*(21), 5971-5981. doi:10.1093/emboj/20.21.5971
- Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cuaing, H. D., Sun, M., Sato, Y., . . . Wang, H. G. (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol*, *9*(10), 1142-1151. doi:10.1038/ncb1634
- Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., . . . Mizushima, N. (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev*, *25*(8), 795-800. doi:10.1101/gad.2016211
- Tang, Y., Zhou, Y., Fan, S., Wen, Q. (2022). The multiple roles and therapeutic potential of HSP60 in cancer. *Biochem Pharmacol*, *201*, 115096. doi:10.1016/j.bcp.2022.115096
- Tong, H., Yin, H., Hossain, M. A., Wang, Y., Wu, F., Dong, X., . . . He, W. (2019). Starvation-induced autophagy promotes the invasion and migration of human bladder cancer cells via TGF-beta1/Smad3-mediated epithelial-mesenchymal transition activation. *J Cell Biochem*, *120*(4), 5118-5127. doi:10.1002/jcb.27788
- Torii S., Honda S., Murohashi M., Yamaguchi H., Shimizu S. (2020). Autophagy involvement in oncogenesis. *Cancer Sci*. *111*(11):3993-3999. doi: 10.1111/cas.14646
- Trelford, C. B., Di Guglielmo, G. M. (2022). Autophagy regulates transforming growth factor beta signaling and receptor trafficking. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, *1869*(9), 119284. doi:10.1016/j.bbamcr.2022.119284

- Triki, H., Charfi, S., Bouzidi, L., Ben Kridis, W., Daoud, J., Chaabane, K., . . . Cherif, B. (2019). CD155 expression in human breast cancer: Clinical significance and relevance to natural killer cell infiltration. *Life Sci*, *231*, 116543. doi:10.1016/j.lfs.2019.116543
- Tsukada, M., Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, *333*(1-2), 169-174. doi:10.1016/0014-5793(93)80398-e
- Viry, E., Baginska, J., Berchem, G., Noman, M. Z., Medves, S., Chouaib, S., Janji, B. (2014). Autophagic degradation of GZMB/granzyme B: a new mechanism of hypoxic tumor cell escape from natural killer cell-mediated lysis. *Autophagy*, *10*(1), 173-175. doi:10.4161/auto.26924
- Wang, M., Zhang, J., Huang, Y., Ji, S., Shao, G., Feng, S., . . . Wu, A. (2017). Cancer-Associated Fibroblasts Autophagy Enhances Progression of Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Med Sci Monit*, *23*, 3904-3912. doi:10.12659/msm.902870
- Wang, Q., He, W. Y., Zeng, Y. Z., Hossain, A., Gou, X. (2018). Inhibiting autophagy overcomes docetaxel resistance in castration-resistant prostate cancer cells. *Int Urol Nephrol*, *50*(4), 675-686. doi:10.1007/s11255-018-1801-5
- Wang, T., Ma, F., Qian, H. L. (2021). Defueling the cancer: ATP synthase as an emerging target in cancer therapy. *Mol Ther Oncolytics*, *23*, 82-95. doi:10.1016/j.omto.2021.08.015
- Wang, Z., Guan, D., Huo, J., Biswas, S. K., Huang, Y., Yang, Y., . . . Lam, K. P. (2021). IL-10 Enhances Human Natural Killer Cell Effector Functions via Metabolic Reprogramming Regulated by mTORC1 Signaling. *Front Immunol*, *12*, 619195. doi:10.3389/fimmu.2021.619195
- Wei, H., Wang, C., Croce, C. M., Guan, J. L. (2014). p62/SQSTM1 synergizes with autophagy for tumor growth in vivo. *Genes Dev*, *28*(11), 1204-1216. doi:10.1101/gad.237354.113
- Wei, H., Wei, S., Gan, B., Peng, X., Zou, W., Guan, J. L. (2011). Suppression of autophagy by FIP200 deletion inhibits mammary tumorigenesis. *Genes Dev*, *25*(14), 1510-1527. doi:10.1101/gad.2051011
- White, E. (2015). The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest*, *125*(1), 42-46. doi:10.1172/JCI73941
- Williams, B. A., Law, A. D., Routy, B., denHollander, N., Gupta, V., Wang, X. H., . . . Keating, A. (2017). A phase I trial of NK-92 cells for refractory hematological malignancies relapsing after autologous hematopoietic cell transplantation shows

- safety and evidence of efficacy. *Oncotarget*, 8(51), 89256-89268. doi:10.18632/oncotarget.19204
- Wu, B., Zhong, C., Lang, Q., Liang, Z., Zhang, Y., Zhao, X., . . . Tian, Y. (2021). Poliovirus receptor (PVR)-like protein cosignaling network: new opportunities for cancer immunotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*, 40(1), 267. doi:10.1186/s13046-021-02068-5
- Xie, B. S., Zhao, H. C., Yao, S. K., Zhuo, D. X., Jin, B., Lv, D. C., . . . Ai, Z. L. (2011). Autophagy inhibition enhances etoposide-induced cell death in human hepatoma G2 cells. *Int J Mol Med*, 27(4), 599-606. doi:10.3892/ijmm.2011.607
- Xu, J., Huang, Y., Zhao, J., Wu, L., Qi, Q., Liu, Y., . . . Wu, H. (2021). Cofilin: A Promising Protein Implicated in Cancer Metastasis and Apoptosis. *Front Cell Dev Biol*, 9, 599065. doi:10.3389/fcell.2021.599065
- Yan, R. L., Chen, R. H. (2022). Autophagy and cancer metabolism-The two-way interplay. *IUBMB Life*, 74(4), 281-295. doi:10.1002/iub.2569
- Yan, X., Yao, C., Fang, C., Han, M., Gong, C., Hu, D., . . . Zhu, S. (2022). Rocaglamide promotes the infiltration and antitumor immunity of NK cells by activating cGAS-STING signaling in non-small cell lung cancer. *Int J Biol Sci*, 18(2), 585-598. doi:10.7150/ijbs.65019
- Yang, B., Liu, H., Shi, W., Wang, Z., Sun, S., Zhang, G., . . . Jiao, S. (2013). Blocking transforming growth factor-beta signaling pathway augments antitumor effect of adoptive NK-92 cell therapy. *Int Immunopharmacol*, 17(2), 198-204. doi:10.1016/j.intimp.2013.06.003
- Yu, L., Zhou, G., Shi, Z., Guo, J., Yu, S., Yu, C., Shen, C. (2022). Interleukin-8 Regulates the Autophagy and Apoptosis in Gastric Cancer Cells via Regulating PI3K/Akt Signaling Pathway. *Dis Markers*, 2022, 7300987. doi:10.1155/2022/7300987
- Yu, W., Yang, L., Li, T., Zhang, Y. (2019). Cadherin Signaling in Cancer: Its Functions and Role as a Therapeutic Target. *Front Oncol*, 9, 989. doi:10.3389/fonc.2019.00989
- Yu, Y. F., Hu, P. C., Wang, Y., Xu, X. L., Rushworth, G. M., Zhang, Z., . . . Zhang, J. W. (2017). Paclitaxel induces autophagy in gastric cancer BGC823 cells. *Ultrastruct Pathol*, 41(4), 284-290. doi:10.1080/01913123.2017.1334019
- Yun, C. W., Lee, S. H. (2018). The Roles of Autophagy in Cancer. *Int J Mol Sci*, 19(11). doi:10.3390/ijms19113466
- Zahra, K., Dey, T., Ashish, Mishra, S. P., Pandey, U. (2020). Pyruvate Kinase M2 and Cancer: The Role of PKM2 in Promoting Tumorigenesis. *Front Oncol*, 10, 159. doi:10.3389/fonc.2020.00159

- Zamame Ramirez, J. A., Romagnoli, G. G., Kaneno, R. (2021). Inhibiting autophagy to prevent drug resistance and improve anti-tumor therapy. *Life Sci*, 265, 118745. doi:10.1016/j.lfs.2020.118745
- Zhan, Z., Xie, X., Cao, H., Zhou, X., Zhang, X. D., Fan, H., Liu, Z. (2014). Autophagy facilitates TLR4- and TLR3-triggered migration and invasion of lung cancer cells through the promotion of TRAF6 ubiquitination. *Autophagy*, 10(2), 257-268. doi:10.4161/auto.27162
- Zhang, J., Veeramachaneni, N. (2022). Targeting interleukin-1beta and inflammation in lung cancer. *Biomark Res*, 10(1), 5. doi:10.1186/s40364-021-00341-5
- Zhang, J. Y., Zhang, F., Hong, C. Q., Giuliano, A. E., Cui, X. J., Zhou, G. J., . . . Cui, Y. K. (2015). Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. *Cancer Biol Med*, 12(1), 10-22. doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2014.0019
- Zhang, L., Meng, Y., Feng, X., Han, Z. (2022). CAR-NK cells for cancer immunotherapy: from bench to bedside. *Biomark Res*, 10(1), 12. doi:10.1186/s40364-022-00364-6
- Zhang, W., Gou, P., Dupret, J. M., Chomienne, C., Rodrigues-Lima, F. (2021). Etoposide, an anticancer drug involved in therapy-related secondary leukemia: Enzymes at play. *Transl Oncol*, 14(10), 101169. doi:10.1016/j.tranon.2021.101169
- Zhou, X., Yang, G., Guan, F. (2020). Biological Functions and Analytical Strategies of Sialic Acids in Tumor. *Cells*, 9(2). doi:10.3390/cells9020273
- Zhu, H., Kaufman, D. S. (2019). An Improved Method to Produce Clinical-Scale Natural Killer Cells from Human Pluripotent Stem Cells. *Methods Mol Biol*, 2048, 107-119. doi:10.1007/978-1-4939-9728-2_12
- Zhu, H., Wang, D., Zhang, L., Xie, X., Wu, Y., Liu, Y., . . . Su, Z. (2014). Upregulation of autophagy by hypoxia-inducible factor-1alpha promotes EMT and metastatic ability of CD133+ pancreatic cancer stem-like cells during intermittent hypoxia. *Oncol Rep*, 32(3), 935-942. doi:10.3892/or.2014.3298
- Zhu, H., Wang, W., Li, Y. (2022). Molecular Mechanism and Regulation of Autophagy and Its Potential Role in Epilepsy. *Cells*, 11(17). doi:10.3390/cells11172621
- Zingoni, A., Molfetta, R., Fionda, C., Soriani, A., Paolini, R., Cippitelli, M., . . . Santoni, A. (2018). NKG2D and Its Ligands: "One for All, All for One". *Front Immunol*, 9, 476. doi:10.3389/fimmu.2018.00476

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

‘Genotoksik Stres İndüklü Otofaji İlişkili Sekretom’un Doğal Öldürücü Hücre Aracılı Antitümör İmmün Yanıt Üzerine Etkisinin Araştırılması’ başlıklı doktora tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Ayfer KARLITEPE

26.07.2023

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Adı	: Karlıtepe, Ayfer
Uyruk	: T.C.
Doğum yeri ve tarihi	: Aydın / 17.04.1991
Telefon	: 0 506 784 43 51
E-posta	: ayfer.karlitepe@hotmail.com
Yabancı dil	: İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Adnan Menders Üni. Tıbbi Biyoloji AD.	2023
Y. Lisans	Ege Üni. Tıbbi Biyokimya AD.	2016
Lisans	Ege Üni. Biyoloji Bölümü	2014

BURSLAR ve ÖDÜLLER

- **YÖK 100/2000 Doktora Bursu**, Moleküler Onkoloji (2019-2023)
- **Yurtiçi Doktora Sonrası Araştırmacı Bursu**, TÜBİTAK 2218 (2023-2024)
- **Lisansüstü Proje Performans Bursu**, TÜBİTAK 2250 (2023)
- **TÜBİTAK 1001 Proje Bursu**, 119S135 (2020-2022)
- **TÜBİTAK 3001 Proje Bursu**, 214S650 (2015-2016)

Genç Araştırmacı Ödülü: Karlıtepe A, VATANSEVER S, Özpolat B, ERCAN G. Adipoz Doku Kökenli MKH'lerden Elde Edilen NK Hücrelerinin Pankreas Kanseri Hücreleri ve Pankreas Kanseri Kök Hücreleri Üzerindeki İn Vitro Etkinliği.8-10 Ekim 2015: The

International Symposium with International Participation: Control of cancer and cancer stem cells, Celal Bayar Üniversitesi, Manisa.

AKADEMİK YAYINLAR

MAKALELER

Nural Öztürk, Ayfer Karlıtepe,* Bengü Depboylu, Mehtap Kılıç Eren. Immunomodulatory Effects of Ionized Radiation on Peripheral Blood Mononuclear Cells, 2023, International of Radiation Research, 21(1): 73-78.

Ayfer Karlıtepe, Ebru Demir Altın, Ceylan Ak, Sureyya Bilmen, Mehtap K. Eren. Wip1 phosphatase inhibition enhances etoposide mediated apoptosis by increasing p53 phosphorylation in Rhabdoid tumor cells, Gene Reports, 31(2023) 101784.

Ersin Gür, Yiğit Özer Tiftikcioğlu, Gülinnaz Ercan, Hafize Seda Vatansever, Yakup Işık, Hilal Kabadayı, Ayfer Karlıtepe, Ecmel Songür. Feasibility of Microsurgery in Burn Injury and the Effect of Stem Cell Application, 2022, Turk J Plast Surg, doi: 10.4103/tjps.tjps_25_22.

Ayfer KARLITEPE, Tolga ATAKUL, Mehtap KILIÇ EREN. Cytotoxic Effect of Cord Blood Derived Natural Killer Cells on Breast Cancer Cells, 2021, Turkish Journal of Oncology, 1300-7467, 36, 2, 146-153.

Mehtap Kılıç Eren, Hatice Pilevneli, Ceylan Ak, Ayfer Karlıtepe, Nazlican Kaygusuz. Therapy Induced Senescent Breast Cancer Cells Display High Levels of Death Receptors Expression. 2021, Journal of Innovative Approaches in Medicine, 2757-7589, 1 (1), 1-10.

Karlıtepe A. & M. Kılıç Eren, Dogal Öldürücü (Natural Killer: NK) Hücreler ve Kanser Immunoterapisi, 2018, Journal of Innovative Approaches in Science Research, 2602-4810, Vol. 2 (4), 152-161.

Akdemir, E. Taylan, C. Sahin, B. Ozgurel, A. Karlıtepe, O. Zekioglu & G. Ercan. The Impact of Carbon Dioxide Pneumoperitoneum on Ovarian Ischemia- Reperfusion Injury during Laparoscopic Surgery: A Preliminary Study, 2018, Journal of Minimally Invasive Gynecology, 1553-4650, 25, 4, 638-643.

A. Karlitepe, H. Kabadayi, S. Vatansever, M. Gurdal, C. Gunduz, G. Ercan. Anticancer Efficiency of Natural Killer Cells Differentiated from Human Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cell and Transfected with miRNA150. 2017, Exp Oncol. 212–218.

Ercan G, Karlitepe A, Ozpolat B. Pancreatic Cancer Stem Cells and Therapeutic Approaches, 2017, Anticancer Research, 37: 2761-2775.

Ayfer Karlitepe, Ozgun Ozalp, Cigir Biray Avcı. New approaches for cancer immunotherapy. 2015, Tumor Biol. 1010-4283, 36, 6, 4075-4078.

2. PROJELER

Kemoterapi İndüklü Otofaji Aktivasyonu ile Salınan Pro/Anti-İnflamatuvar Faktörlerin Belirlenmesi TÜBİTAK 1002, 2022-2023. (Yürütücü).

PPM1D/WIP1 fosfatazın bazal ve genotoksik stres indüklü otofajideki rolünün araştırılması TÜBİTAK 1001, (119S135) 2020-2022. (Bursiyer)

Pankreas Kanseri Hücreleri ile Ko-Kültüre Edilen Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerden Farklılaştırılan Doğal Öldürücü Hücrelerin Anti-Kanser Etkinliğinin Araştırılması TÜBİTAK 3001, 2015-2016. (Bursiyer)

Farklı Kültür Ortamlarında Kültüre Edilen Kordon Kanı Doğal Öldürücü Hücrelerinin Normoksik ve Hipoksik Koşullarda Triple Negatif Meme Kanseri Üzerindeki Antikanser Etkinliğinin İn Vitro Araştırılması 2018-2021, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Kurumu (Araştırmacı)

İyonlaştırıcı Radyasyonun Periferik Kandaki Doğal Öldürücü Hücreler ve T Lenfositler Üzerine Etkisinin Araştırılması 2020-2021, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Kurumu (Araştırmacı)

Genotoksik Stresin İndüklü Otofaji İlişkili Sekretomun Doğal Öldürücü Hücre Aracılı Anti-Tümör İmmün Yanıt Üzerindeki Etkinliğinin Araştırılması 2021-2023, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Kurumu (Doktora Tezi)

Pankreas Kanseri Kök Hücreleri ile Ko-Kültüre Edilen Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerden Farklılaştırılan Doğal Öldürücü Hücrelerin Anti-Kanser Etkinliğinin Araştırılması 2016-2017, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Kurumu (Yüksek Lisans Tezi).

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler

Karlıtepe A, Kabadayı H, Vatansever S, Ercan G. Effect of MiRNA150 Transfection on Anti-Cancer Efficiency of Natural Killer Cells Differentiated from Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Co-cultured with Pancreatic Cancer Cells, III. International Stem Cell Symposium - New Approaches in Stem Cell Applications in Personalized Treatment, 2017: Celal Bayar University, Manisa (Oral Presentation)

Karlıtepe A, ERCAN G, Özpolat B. The Effects of Propolis and CAPE in Pancreatic Cancer. 4-7 Mayıs 2016: 1st International Cell Death Research Congress Dokuz Eylül University, İzmir (Oral Presentation)

Ayfer Karlıtepe, Elif Çelik, Tolga Sütü, Mehtap Kılıç Eren. The effect autophagy-associated secretome on Natural Killer cell activity, 5th International Molecular Immunology and Immunogenetics Congress (MIMIC-V), 2022, İzmir/Turkey (Poster)

Ceylan AK, Ayfer KARLITEPE, Hatice PİLEVNELİ, Nazlıcan KAYGUSUZ, Mehtap K. EREN, Role of PPM1D/WIP1 in Regulation of Basal and Genotoxic Stressed-Induced Autophagy, IUBMB-FEBS-PABMB 2022 Lisbon/Portugal (Poster)

Nazlıcan KAYGUSUZ, Hatice PİLEVNELİ, Ayfer KARLITEPE, Ceylan AK, Mehtap K. EREN, Role of oncogenic WIP1 Phosphates in induction of autophagy in neuroblastoma, XVIII. Medical Biology and Genetic Congress, 2021, Bodrum/Turkey (Poster)

ERCAN G, Karlıtepe A, Özpolat B. Therapeutic Approaches for Pancreatic Cancer Stem Cells. 4-7 May 2016: 1st International Cell Death Research Congress Dokuz Eylül University, İzmir (POSTER)

B) Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

Karlıtepe A, Kılıç Eren M. Natural Killer Cells and Tumor Microenvironment, International Agriculture, Environment, Health Congress, 2018: Adnan Menderes University Aydın (Sözlü Sunum)

Ayfer KARLITEPE, Mehtap K. EREN. Analysis of cell death receptors in therapy induced senescent cancer/tumor cells, XVII. Medical Biology and Genetic Congress, 2019, Bodrum/Turkey (Poster)