



**BAKTERİLERDEN SALGILANAN
NANOKESECİKLERİN İMMÜN STİMÜLAN
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE
İMMÜNOTERAPÖTİK UYGULAMALARI**

Proje No: 113S305

Doç.Dr. Mayda GÜRSEL
Esin Alpdünder

KASIM 2015
ANKARA

ÖNSÖZ

Sentetik ya da saflaştırılmış TLR ligantlarının doğal bağışıklık sistemini doğrudan etkinleştirdiklerinin anlaşılmasıyla birlikte bu ajanların anti-tümör, anti-allergen ve aşı adjuvantı olarak kullanıldığı pek çok pre-klinik deney yapılmış ve alınan başarılı sonuçlar sonucu bu ajanlar klinik faz deneylerde test edilmeye başlanmıştır. Ancak klinik faz sonuçları CpG ODN'ler gibi bazı TLR ligantlarının insanlarda farelere göre daha az etkin olduklarını göstermektedir. Bu sebeple terapideki etkinliklerinin artırılması için alternatif stratejilerin geliştirilmesi önemli bir araştırma alanı yaratmıştır. Son yıllarda birden fazla TLR ligantının bir arada uygulanmasının daha etkin ve uzun vadeli bir immün yanıtı yol açtığını gösteren makaleler bulunmaktadır. Ayrıca, bu ligantların in vivo uygulamadaki stabilitelerinin artırılması için lipozom ve mikrokapsül gibi ilaç taşıyıcı sistemler kullanılmıştır. Bu yöntemler bir çok kimyasal sentez ve saflaştırma aşaması içermeleri bakımından terapötik ajan geliştirmeye yönelik çok pratik olmayan yöntemlerdir. Bu bakımdan, bakterilerin sıvı kültürde sürekli olarak TLR ligantları açısından zengin nanokesecek salgılıyor olmaları, yukarıda bahsedilen çoklu TLR ligantını bir arada bulundurmaları bakımından ve bu ligantların membran yapıdaki keseciklerde bulundurulmasıyla stabilitelerinin artmış olması açısından ilginçtir. Kısaca, bu bakteri kökenli membran veziküllerini (MV) doğanın hazır olarak sunduğu TLR ligantları içeren farmasötik formülasyonlar olarak da düşünmek mümkündür. Önceleri sadece Gram negatif bakterilerce salgılandığı düşünülen MV'lerin yakın zamanda kimi Gram pozitif bakterilerce de üretildikleri, bunun mikrobiyal yaşamın evrimsel olarak korunmuş ve araştırmalar bakımından biraz da ihmal edilmiş bir süreci olduğu ortaya çıkmıştır. Bu güne kadar sadece Meningokok gibi patojenik bakterilerden spesifik aşı üretimine yönelik olarak saflaştırılan MV'lerin immünterapiye yönelik aşı dışı uygulamaları bulunmamaktadır. Kısacası literatürde yer alan uygulamalar Gram negatif patojen kökenli MV'lerle sınırlıdır. Bu uygulamalar da MV'lerin içerdikleri antijenler sayesinde sadece elde edildikleri bakteriye karşı koruma amacı sağlamak için sadece o bakteriye has koruma sağlayabilecek aşı olarak kullanılmalarıyla sınırlı kalmıştır. MV'lerin içerdikleri farklı TLR ligantları bakımından doğal bağışıklık sistemini uyararak "genel aşı adjuvantı" olarak kullanım potansiyelleri test edilmemiştir. Aynı şekilde, çoklu TLR ligantı içeren bu keseciklerin tümör cidarına enjekte edilerek tümör mikroçevresinde bulunan immün sistem hücrelerini TLR reseptörleri üzerinden uyararak etkinleştirmelerine yönelik de çalışma



bulunmamaktadır. Biz bu projede LPS içermeyecekleri için klinik kullanımda güvenli olacağını düşündüğümüz probiyotik olarak da değerlendirilen Gram pozitif kommensal bakteri suşlarının ve kontrol grubu olarak LPS içeren Gram negatif gruba örnek olarak patojen olmayan E.coli DH5 α suşunun salgıladığı MV'lerin immün düzenleyici özelliklerini belirlemeyi ve terapötik potansiyellerini test etmeyi amaçlamıştık.

Bu proje sonuç raporu, yukarıda belirtilen amaç doğrultusunda 2 yıllık proje süresi boyunca elde ettiğimiz ana bulguları özetlemektedir.

TÜBİTAK SBAG kapsamında desteklenmiş olan 113S305 No'lu bu proje kapsamında yapılan çalışmalardan bir adet Yüksek Lisans tezi tamamlanmış ve sonuçların bir kısmı devam etmekte olan doktora tezinin bir bölümünü oluşturmuştur. Bir kısmı 113S305 No'lu TÜBİTAK desteği ile gerçekleştirilen ve olumlu sonuçlar elde ettiğimiz çalışmamızı, Springer serisi Vaccine Design isimli kitapta ayrı bir bölüm olarak yayına hazırlamış bulunmaktayız (basım yılı 2017 olarak kesinleştirilmiştir). Ayrıca çalışmamızı araştırma makalesi olarak da yayına hazırlama aşamasındayız. Bu kapsamda ülkemizdeki bilimsel faaliyetlerin en büyük destekçisi olan TÜBİTAK'a bu projenin gerçekleştirilmesini olanaklı kıldığı ve araştırmalarımıza destek olduğu için çok teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

Tablo ve Şekil Listeleri	5
Özet	7
Abstract	8
1. Giriş	9
2. Literatür Özeti	11
3. Gereç ve Yöntem	17
3.1. MV'lerin saflaştırılması.....	17
3.2. MV'lerin Fiziksel karakterizasyonu.....	17
3.3. MV'lerin Biyokimyasal karakterizasyonu.....	17
3.4. MV'lerin immün stimulan özelliklerinin belirlenmesi.....	18
3.5. MV'lerin hücre içine alımlarının kantitatif olarak belirlenmesi ve biyodağılım çalışmaları.....	18
3.6. MV'lerin sitotoksitesinin belirlenmesi.....	19
3.7. MV'lerin adjuvant olarak kullanıldığı fare aşı deneyleri.....	19
3.8. MV'lerin fare EG7 timoma modelindeki anti-kanser immün yanıtı modüle etme potansiyellerinin belirlenmesi.....	20
3.9. İstatistiksel Analiz.....	21
4. Bulgular	22
4.1. MV'lerin saflaştırılması.....	22
4.2. MV'lerin Fiziksel karakterizasyonu.....	24
4.3. MV'lerin Biyokimyasal karakterizasyonu.....	26
4.4. MV'lerin immün stimulan özelliklerinin belirlenmesi.....	30
4.5. MV'lerin hücre içine alımlarının kantitatif olarak belirlenmesi ve biyodağılım çalışmaları.....	35
4.6. MV'lerin in vivo'da biyodağılımları.....	38
4.7. MV'lerin sitotoksite tayinleri.....	41
4.8. MV'lerin adjuvant olarak kullanıldığı fare aşı deneyleri.....	42
5.Sonuç	54

TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

Tablo 1. Deneyleerde kullanılan bakteri suşları.....	22
Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan bakteri suşlarının büyüme eğrileri.....	23
Şekil 4.2. Saflaştırılmış MV pelletinin görünümü.....	23
Şekil 4.3. MV'lerin hidrodinamik parçacık boyutları.....	24
Şekil 4.4. MV'lerin zeta potansiyelleri.....	25
Şekil 4.5. MV'lerin Atomik Kuvvet Mikroskopisi görüntüleri.....	26
Şekil 4.6. MV'lerin SDS-PAGE jel elektroforez görüntüleri.....	27
Şekil 4.7. MV'lerin agaroz jel elektroforezi görüntüleri.....	28
Şekil 4.8. MV'lerin AO ile boyanma özellikleri.....	30
Şekil 4.9. Farklı doz MV örnekleriyle uyarılan fare dalak hücrelerinin IFN- γ ve IL-10 yanıtları.....	32
Şekil 4.10. MV'lerle uyarılma sonrası antijen sunum hücrelerindeki olgunlaşma belirteçleri ifadesi.....	33
Şekil 4.11. MV'lerin makrofaj ve dendritik hücre kökenli TNF α üretimine etkileri..	34
Şekil 4.12. MV'lerin in vitro'da fare dalak hücrelerine alımları.....	36
Şekil 4.13. MV'lerin in vitro'da fare dalak B-hücrelerine alımları.....	37
Şekil 4.14. MV'lere CFSE boya yükleme verimi.....	38
Şekil 4.15. CFSE işaretli MV'lerin i.p enjeksiyon sonrası biyodağılımları.....	39
Şekil 4.16. i.p enjeksiyondan 4 ve 24 saat sonra PEC'te MV'lerle etkileşen hücre tiplerinin analizi.....	40
Şekil 4.17. i.p enjeksiyondan 4 saat sonra PEC'te MV'lerle etkileşen ana hücre tipinin analizi.....	41
Şekil 4.18. Farklı doz MV'lerle inkübe edilmiş kemik iliği kökenli fare makrofajlarındaki canlılık oranları.....	42
Şekil 4.19. Kommensal ve E.coli kökenli MV'lerin aşılama çalışmalarındaki kullanım şekilleri ve aşılama çizelgesi bilgileri.....	43
Şekil 4.20. İmmünizasyon gruplarına göre ELISA ile tayin edilen anti-FMDV total IgG yanıtları.....	44



Şekil 4.21. İmmünizasyon gruplarına göre ELISA ile tayin edilen anti-FMDV IgG1 yanıtları.....	45
Şekil 4.22. İmmünizasyon gruplarına göre ELISA ile tayin edilen anti-FMDV IgG2a yanıtları.....	46
Şekil 4.23. Tüm gruplardan elde edilen ortalama anti-FMDV total IgG, IgG1 ve IgG2a yanıtları.....	47
Şekil 4.24. Şap aşısı serotip O antijenine karşı gelişen bellek B hücre yanıtları..	48
Şekil 4. 25. İmmünizasyon gruplarına göre ELISA ile tayin edilen anti-OVA IgG1 ve IgG2c yanıtları.....	51
Şekil 4. 26. OVA ile aşılanmış farelerin EG7 fare timoma hücre hattı ile uyarımından 14 gün sonraki tümör hacimleri.....	53

ÖZET

Hücre-dışı membran keseciği salgılanma olgusu, arkeler, bakteriler ve ökaryotlar dahil olmak üzere tüm hücresel yaşam türlerinde gözlenen ortak bir özelliktir. Gram negatif bakteri kökenli dış membran keseciklerinin hastalık patogenezinin katkısına dair çok sayıda çalışma olmasına rağmen kommensal bakterilerin bu tür kesecikler salgılayıp salgılamadıkları henüz bilinmemektedir. Mikrobiyotanın immün homeostaz düzenlemesindeki önemi bilindiğinden bu çalışmada 5 farklı insan kommensal bakteri izolatının salgıladığı keseciklerin immüdüzenleyici etkilerini E.coli kökenli dış membran kesecikleriyle karşılaştırmalı olarak incelemeyi hedefledik. AKM mikroskopisi, dinamik ışık saçılımı ve zeta potansiyeli ölçümleri kommensal kökenli membran keseciklerinin (MV'ler) yaklaşık 50-300 nm ebatlarında ve yüksek eksi yük yoğunluğuna (-40 mV) sahip olduklarını gösterdi. Bazı kommensal MV'lerle uyarılan fare dalak hücrelerinin E.coli keseciklerinin aksine daha az miktarda pro-enflamatuar sitokin (IFN γ ve TNF α) salgıladıkları bulundu. Aynı şekilde kommensal kökenli MV'ler antijen sunum hücresi olgunlaşmasında etkisiz kaldılar. E.coli keseciklerinin aksine lactobasil ve pediokok kökenli kommensal keseciklerin varlığında inaktive şap aşısı ile aşılanmış farelerdeki şapa özgü IgG2a yanıtlarında baskılanma olduğu gösterildi. Aynı şekilde pediokok kökenli kommensal MV'lerin OVA antijeni ile aşılanmış farelerdeki anti-OVA antikor yanıtında azalmaya ve EG.7 tümör hücresi uygulama sonrası tümör gelişiminde şiddetlenmeye yol açtıkları, Th-1 ağırlıklı enflamatuar yanıtı azalttıkları gözlemlendi. Bu sonuçlar, projede seçilip kullanılan insan kökenli bazı kommensal membran keseciklerinin E.coli kesecikleri kadar etkin olmasa da immün uyarıcı olabileceğini, bazı komensal keseciklerinin de immün baskılayıcı etkileri olabileceğini önermektedir.

Anahtar kelimeler: Membran kesecikleri, kommensal bakteriler, immün düzenleme, aşı adjuvantı

ABSTRACT

Constitutive secretion of extracellular membrane vesicles is a common feature of cells from all domains of life including Archaea, Bacteria, and Eukarya. Although the contribution of gram negative bacterial outer membrane vesicles in disease pathogenesis has been extensively studied, whether commensal bacteria constitutively secrete such vesicles is still unknown. Given the importance of microbiota as regulators of immune homeostasis, we aimed to assess the immunomodulatory properties of extracellular vesicles secreted from 5 different human commensal bacteria isolates in comparison to E.coli derived outer membrane vesicles (MVs). AFM microscopy, dynamic light scattering and zeta potential measurements revealed that commensal-derived membrane vesicles (MVs) were ~50- 300 nm in diameter and had high negative charge densities (-40 mV). Mouse spleen cells stimulated with commensal derived MVs secreted lower levels of pro-inflammatory cytokines (IFN γ and TNF α) and higher levels of IL-10 when compared to E.coli derived MVs. Similarly, commensal derived MVs failed to stimulate the maturation of antigen presenting cells. Mice immunized with an inactivated viral vaccine against the foot and mouth disease virus showed suppressed FMD-specific IgG2a response when the vaccine contained MVs derived from commensals but not from E.coli. Similarly, commensal MVs suppressed anti-OVA antibody responses in OVA immunized mice and exacerbated tumor progression following challenge with EG.7 tumor cells, suggesting that commensal-derived MVs ameliorate Th-1 dominated inflammatory responses. These results indicate that the some of the selected human commensal bacteria-derived membrane vesicles could induce immunomodulatory effects and can have potential therapeutic applications as novel anti-inflammatory agents.

Keywords: Membrane vesicles, commensal bacteria, immune modulation, vaccine adjuvant

1. GİRİŞ

Hücre-dışı membran keseciği salgılanma olgusu, arkeler, bakteriler ve ökaryotlar dahil olmak üzere tüm hücrel yaşam türlerinde gözlenen ortak bir özelliktir. Gram negatif bakteri kökenli dış membran keseciklerinin hastalık patogenezinin katkısına dair çok sayıda çalışma olmasına rağmen kommensal bakterilerin salgıladıkları membran keseciklerinin (MV) immün sistem üzerindeki etkileri henüz bilinmemektedir.

Bu proje, Gram pozitif kommensal bakterilerden salgılanan nanokeseciklerin saflaştırılıp karakterize edilmelerini ve immünoterapötik uygulamalara yönelik potansiyellerinin belirlenmesini hedeflemektedir. Gram negatif bakterilerin MV salgıladıkları ve bu MV'lerin konak immün sistemini modüle edebildikleri uzun süreden beri bilinmektedir. Buna karşın Gram pozitif bakterilerin de MV ürettikleri yönünde literatürde çok az bulgu vardır. Gram pozitif kommensallerin ise MV üretilip üretilmediği bilinmemektedir.

Biz bu projede LPS içermeyecekleri için klinik kullanımda güvenli olacağını düşündüğümüz probiyotik olarak da değerlendirilen Gram pozitif kommensal bakteri suşlarının ve kontrol grubu olarak LPS içeren Gram negatif gruba örnek olarak patojen olmayan E.coli DH5 α suşunun salgıladığı MV'lerin immün stimulan özelliklerini belirlemeyi ve terapötik potansiyellerini test etmeyi amaçlamıştık.

Bu amaca yönelik olarak projenin ilk ara-rapor döneminde bakterilerden MV izolasyonu tamamlanmış, MV'lerin biyokimyasal ve fiziksel karakterizasyonları protein ve nükleik asit jel elektroforezi, dinamik ışık saçılımı, zeta potansiyel ölçümü, atomik kuvvet mikroskopisi ve akış sitometrik yöntemlerle yapılmıştır. Saflaştırılan MV'lerin in vitro immün stimulan özellikleri belirlenmiştir.

İlk rapor döneminde elde edilen bulgular, kommensal kökenli membran keseciklerinin (MV'ler) yaklaşık 50-300 nm ebatlarında ve yüksek eksi yük yoğunluğuna (-40 mV) sahip olduklarını göstermiştir. Kommensal MV'lerle uyarılan fare dalak hücrelerinin E.coli keseciklerinin aksine daha az miktarda pro-inflamatuar sitokin (IFN γ ve TNF α) ve daha yüksek miktarda IL-10 salgıladıkları bulunmuştur. Kommensal kökenli MV'lerin antijen sunum hücresi olgunlaşmasında etkisiz kaldıkları görülmüştür. Bu bulgular, kommensal kökenli



MV'lerin E.coli kökenli MV'lerin aksine immün düzenleyici olabileceklerini ve immün yanıtı baskılayabileceklerini düşündürmüştür.

Projenin ikinci rapor döneminde MV'lerin hücre içine alım ve in vivo biyodağılım çalışmaları gerçekleştirilmiş, sitotoksosite tayinleri tamamlanmıştır. Ayrıca MV'ler Şap aşısı komponenti olan O-antijenle bir arada farelere verilmiş ve gelişen immün yanıt serotip O antijene özgü IgG altgrup yanıtlarının ölçümüyle analiz edilmiştir. Gelişen antijene özgü bellek hücre yanıtları ELISPOT yöntemiyle immünizasyondan 150 gün sonra tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, E.coli MV'lerinin hayvan aşılarında kullanılabilecek iyi adjuvant özelliklere sahip olduklarını, komensal MV'lerin ise immün düzenleyici etkilerinin bulunduğunu ve özellikle Th1 tipi immün yanıtı baskılayarak anti-enflamatuar ajan olarak uygulamalarının olabileceğini düşündürmüştür.

Projenin son döneminde ise MV'lerin anti-tümör etkileri, C57/Bl6 farelerinde EG7 timoma (T-hücre kanseri) tümör modelinde denenmiş ve komensal kökenli keseciklerin yine Th1 tipi immün yanıtı baskılayarak tümör oluşum şiddetini arttırdığı gözlenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Doğal bağışıklık sistemi patojenlere özgü olan sınırlı sayıdaki “korunmuş” moleküler yapıları tanıyabilme yeteneğine sahiptir (1). Kısaltılmış şekliyle PAMP olarak da isimlendirilen bu “patojene özgü moleküler örüntüler” temel olarak immün sistem hücrelerinde ifade edilen “patojen tanıma reseptörleri” (PRRs) tarafından tanınmaktadır. Bu güne kadar dört ana PRR ailesi belirlenmiştir: Toll-benzeri reseptörler (TLR ler), nükleotid bağlayan oligomerizasyon domain (NOD)-benzeri reseptörler (NLR ler), retinoik asitle indüklenebilen gen-I (RIG-I)-benzeri reseptörler (RLR ler), ve DNA sensörleri (2-3). Bu reseptörlerin membranlar (TLR) ya da sitozoldeki (NLR, RLR ve DNA sensörleri) lokalizasyonları, tanıdıkları PAMP’ın doğasıyla yakından ilişkilidir (4). Örneğin bakteri ve mantarların tanınmasından sorumlu TLR ler (1,2,4,5 ve 6) hücre yüzeyinde ifade edilirken patojen kökenli nükleik asitleri tanıyabilen TLR ler (3,7,8 ve9) endozomların içerisinde yer alırlar (5). TLR ler dışında virüslerin tanınmasından sorumlu iki yeni sitozolik sensör ailesi tanımlanmıştır: RNA helikazlar ve sitozolik DNA reseptörleri (DAI, AIM2, ve IFI16/p204) (6). Sitozolik RNA helikazları (RIG-I ve MDA5) ve DDX1/DDX21/DHX36 kompleks (7) sitozolde replike eden RNA veya DNA virüslerini aracı RNA üzerinden tanırlar. DNA sensörleri ise virüs ve sitozolik bakteri kökenli DNA ları ve bakterilere özgü siklik-di-GMP gibi ikincil mesajcıları tanırlar (8-9). Memeli genomunda 20nin üzerinde üyesi bulunan NLR ler ise temelde sitozolde bulunan mikrobiyal kökenli molekülleri algılamaktadırlar (10-11).

Yukarıda özetlenen PRR lerin PAMP larla aktivasyonu, NF- κ B, MAP kinazlar ve tip I interferon yanıtı gibi çoklu sinyal iletim yollarının etkinleşmesine, pro-enflamatuvar sitokin/kemokin salımına ve anti-mikrobiyal yanıt oluşumuna sebep olurlar. Bunların yanı sıra PRR aktivasyonu özellikle dendritik hücrelerdeki MHC sınıf I ve II molekülleriyle ko-stimülatör moleküllerin ifadelerini arttırarak T hücre yanıtının da başlatılmasında çok önemli bir role sahiptir (12).

Patojen tanıma reseptörlerinin özgül ligantlarla uyarılması immün sistem hücrelerinde çeşitli sinyal iletim yollarını etkinleştirerek adaptif bağışıklığı destekleyen güçlü bir doğal bağışıklığın oluşmasına yol açar. Özellikle TLR ligantlarının uyardığı doğal bağışıklık yanıtının fare modellerinde kanserden kurtarıcı, allerji engelleyici, enfeksiyondan koruyucu ve aşılardan immünojenik özelliklerini arttırıcı etkileri bir çok bağımsız deneyle kanıtlanmıştır (13-20). Bu



bulguların ışığında TLR ligantlarının kullanıldığı pek çok klinik deney başlatılmıştır (21).

Son yıllarda ise birden çok TLR ligantının bir arada kullanılmasıyla daha güçlü ve kalıcı bir immün yanıtın oluştuğuna dair makaleler yayınlanmaya başlanmıştır (22-23). Bu bağlamda, farklı patojen tanıma reseptörü ligantlarını bir arada bulundurmaları bakımından bakteriler klinik

uygulamalara yönelik zengin kaynaklar olarak değerlendirilebilirler. Bakterilerin bir başka ilginç özelliği de hücreler arası iletişimi ve ortama uyumu sağlamak için konstitütif olarak ekstraselüller küçük kesecikler salgılamalarıdır (24). 20-200 nm çapında nanokesecikler olarak düşünülebilecek olan bu membran vezikülleri (MV), bakteriler tarafından bütün büyüme fazlarında salgılanırlar. Gram negatif bakteri kökenli MV'lerin, fosfolipidler, virülans faktörleri, enzimler ve peptidoglikan, lipoproteinler, LPS, nükleik asit gibi TLR ligantları içerdiklerinden konak organizmanın bağışıklık sistemini etkinleştirebildikleri gösterilmiştir (25-28). Yine Gram negatif bakteri kökenli MV'ler antijen de içerdikleri için insana yönelik sadece elde edilen bakteriye karşı koruyucu olacak spesifik aşı olarak uygulama alanı bulmuşlar ve "güvenli" olarak değerlendirilmişlerdir (29-30). Gram pozitif bakterilerin ürettiği membran keseciklerine yönelik ise çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Gram pozitif bakterilerin de dış ortama membran kesecikleri salgıladıkları ancak son yıllarda anlaşılmıştır (24, 31-33). Dolayısıyla Gram pozitif kökenli MV'lerin immün sistemi nasıl etkiledikleri de henüz bilinmemektedir. Öte yandan Gram negatif MV'lere yönelik özellikle köken aldıkları mikroorganizmaya has aşı geliştirme çalışmalarına büyük bir ilgi olmasına rağmen bu keseciklerin anti-tümör uygulamalara yönelik terapötik potansiyelleri henüz hiç denenmemiştir. 1900'lü yılların başında Dr. William Coley'nin malin tümörlere *Streptococcus pyogenes* enjekte ederek regresyon sağlamasıyla başlayan aktif immünoterapi konseptinin altında TLR agonistleri aracılığıyla immün baskılayıcı tümör mikroçevresinin modifikasyonu yatmaktadır (34-35). Preklinik çalışmalar, TLR aracılı uyarılmanın tümör antijenlerinin dendritik hücreler tarafından T lenfositlere sunumunu arttırdığını, immün baskılayıcı mikroçevrenin üstesinden gelinerek koruyucu bir anti-tümör yanıtının oluştuğunu göstermektedir (36-38). Tüm bu bilgiler ışığında biz bu projede bakteri kökenli MV'lerin kanser immünoterapisindeki etkinliklerini denemeyi öneriyoruz. Bu, daha önce literatürde hiç yer almamış bir çalışma olması bakımından özgün değeri yüksek bir çalışma olacaktır. Gram negatif MV'ler için dahi böyle bir uygulama literatürde yoktur.



Ayrıca MV'lerin çoklu TLR ligantı içermeleri bakımından dışarıdan hazır aşılara katılarak adjuvant olarak kullanılabilirliklerini de test etmeyi öneriyoruz.

MV kullanımının bir başka avantajının bakterilerin kendilerinin aksine konak hücre membranıyla füzyon sonucu içeriklerini konak hücrenin sitozolüne doğrudan aktarma özellikleri olduğunu düşünüyoruz (39). Bu özellik sayesinde MV'de yer alan ligantların, endozom yollu hücre-içine alım sayesinde endozomda yer alan TLR reseptörleri üzerinden uyarılmanın yanı sıra sitozolde yer alan DNA sensörleri, NOD-benzeri reseptörler üzerinden de etki göstermesi mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR:

1. Kumar H, Kawai T, Akira S. (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.* 30(1):16-34
2. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783–801
3. Barber GN (2011) Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. *Curr Opin Immunol* 23:10–20
4. Barton GM, Kagan JC (2009) A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol* 9:535–542
5. Kumar H, Kawai T, Akira S. (2009) Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J.* 420(1):1-16
6. Barber GN (2011) Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. *Curr Opin Immunol* 23:10–20
7. Zhang Z, Kim T, Bao M, Facchinetti V, Jung SY, Ghaffari AA et al (2011) DDX1, DDX21, and DHX36 helicases form a complex with the adaptor molecule TRIF to sense dsRNA in dendritic cells. *Immunity* 34:866–878
8. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN (2009) STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461:788–792;
9. Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, Hyodo M, Hayakawa Y, Vance RE. (2011) STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* 478(7370):515-8.



10. Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G. (2009) Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev.* 227(1):106-28;
11. Franchi L, Muñoz-Planillo R, Núñez G. (2012) Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol.* 13(4):325-32
12. Iwasaki A, Medzhitov R (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5:987–995
13. Krieg A.M., (2004) Antitumor applications of stimulating toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides. *Curr.Oncol.Rep.*, 6(2) 88-95.
14. Gupta G.K. Agrawal DK., (2010) CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists: therapeutic application in allergy and asthma. *BioDrugs*, 24(4), 225-35.
15. Jurk M. Vollmer J., (2007) Therapeutic applications of synthetic CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists for immune modulation. *BioDrugs*, 21(6), 387-401.
16. Dunne A, Marshall NA, Mills KH., (2011) TLR based therapeutics. *Curr.Opin.Pharmacol.* 11(4):404-11.
17. Vollmer J. Krieg AM., (2009) Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61(3), 195-204.
18. Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA (2010) Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?. *Nat Rev Drug Discov.* , 9(4):293-307.
19. Klinman D.M. Klaschik S, Sato T, Tross D., CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61(3), 248-55, 2009.
20. Krieg A.M., Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J.Clin.Invest.*, 117(5), 1184-94, 2007.
21. Steinhagen, F., T. Kinjo, C. Bode, and D. M. Klinman. (2011). TLR-based immune adjuvants. *Vaccine* 29: 3341-3355.
22. Kasturi SP, Skountzou I, Albrecht RA, Koutsouanos D, Hua T, Nakaya HI, Ravindran R, Stewart S, Alam M, Kwissa M, Villinger F, Murthy N, Steel J, Jacob J, Hogan RJ, García-Sastre A, Compans R, Pulendran B. (2011) Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* 470(7335):543-7.
23. Nourizadeh M, Masoumi F, Memarian A, Alimoghaddam K, Moazzeni SM, Hadjati J. (2012) Synergistic effect of Toll-like receptor 4 and 7/8 agonists is



necessary to generate potent blast-derived dendritic cells in Acute Myeloid Leukemia. *Leuk. Res.* 36(9):1193-9.

24. Deatherage BL, Cookson BT (2012) Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun.* ;80(6):1948-57
25. Lee JC, Lee EJ, Lee JH, Jun SH, Choi CW, Kim SI, Kang SS, Hyun S. (2012) *Klebsiella pneumoniae* secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. *FEMS Microbiol Lett.* 331(1):17-24.
26. Kuehn MJ, Kesty NC. (2005) Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.*19(22):2645-55.
27. Yoon H, Ansong C, Adkins JN, Heffron F. (2011) Discovery of *Salmonella* virulence factors translocated via outer membrane vesicles to murine macrophages. *Infect Immun.* 79(6):2182-92.
28. Ellis TN, Leiman SA, Kuehn MJ. (2010) Naturally produced outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* elicit a potent innate immune response via combined sensing of both lipopolysaccharide and protein components. *Infect Immun.*78(9):3822-31.
29. Keiser PB, Biggs-Cicatelli S, Moran EE, Schmiel DH, Pinto VB, Burden RE, Miller LB, Moon JE, Bowden RA, Cummings JF, Zollinger WD. (2011) A phase 1 study of a meningococcal native outer membrane vesicle vaccine made from a group B strain with deleted *lpxL1* and *synX*, over-expressed factor H binding protein, two *PorAs* and stabilized *OpcA* expression. *Vaccine.* 29(7):1413-20.
30. Collins BS. (2011) Gram-negative outer membrane vesicles in vaccine development. *Discov Med.* 12(62):7-15
31. Lee EY, Choi DY, Kim DK, Kim JW, Park JO, Kim S, Kim SH, Desiderio DM, Kim YK, Kim KP, Gho YS. (2009) Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics* 9(24):5425-36.
32. Rivera J, Cordero RJ, Nakouzi AS, Frases S, Nicola A, Casadevall A. (2010) *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(44):19002-7
33. MacDonald IA, Kuehn MJ. (2012) Offense and defense: microbial membrane vesicles play both ways. *Res Microbiol.* 163(9-10):607-18.



34. Coley WB. Clin Orthop Relat Res. (1991); The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. 262:3-11.
35. Goutagny N, Estornes Y, Hasan U, Lebecque S, Caux C. (2012) Targeting pattern recognition receptors in cancer immunotherapy. Target Oncol. 7(1):29-54.
36. Grauer, O. M., J. W. Molling, E. Bennink, L. W. Toonen, R. P. Suttmuller, S. Nierkens and G. J. Adema; (2008) TLR ligands in the local treatment of established intracerebral murine gliomas. J Immunol 110: 6720-9.
37. Davis, M.B; D .Vasquez-Dunddel, E. Albesiano, D.M. Pardoll, Y.J. Kim (2011) Intratumoral administration of TLR4 agonist absorbed into a cellular vector improves anti-tumor responses. Clin Cancer Res. 17(12):3984-92.
38. Adams S. (2009) Toll-like receptor agonists in cancer therapy. Immunotherapy.1(6):949-64.
39. Bomberger JM, Maceachran DP, Coutermarsh BA, Ye S, O'Toole GA, Stanton BA. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by Pseudomonas aeruginosa outer membrane vesicles. PLoS Pathog.5(4):e1000382



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. MV'lerin saflaştırılması:

MV saflaştırma metodu literatürde tanımlandığı üzere aşağıdaki aşamalar kullanılarak yapılmıştır:

İnsan florasından elde edilmiş 5 değişik kommensal bakteri suşu (Norveç Üniversitesi Kimya, Biyoteknoloji ve Gıda Bilimi Bölümü öğretim üyesi Prof. Ingolf F.Nes'ten temin edilmiştir) MRS ortamında, E.coli DH5 α suşu ise LB ortamında 37°C'da 18 saat büyütülmüş ve bakteriler önce 6,000 rpmde 20 dakika santrifüj edilerek kültür sıvısından uzaklaştırılmıştır. Kültür sıvıları sırasıyla 0.45 ve 0.2 μ m'lik filtrelerden geçirildikten sonra 100,000xg'de 1 saat santrifüj edilmiş, elde edilen MV pelletleri 1 ml PBS'te çözülüp tekrar 100,000xg'de döndürüldükten sonra 500 μ l PBS içerisinde çözülerek deneylerde kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.

3.2. MV'lerin Fiziksel karakterizasyonu:

MV'lerin büyüklüğü hem atomik kuvvet mikroskopisi (AKM) hem de dinamik ışık saçınımı (DLS) yöntemleriyle tayin edilmiştir. AKM MV morfolojisi ve ebatı bakımından bilgi verirken DLS hidrodinamik büyüklük açısından bilgi verici olmuştur. Ayrıca MV'lerin net yükleri zeta potansiyelleri ölçülerek tayin edilmiştir. Hidrodinamik büyüklük ve zeta potansiyeli ölçümlerinde Malvern Marka Zetasizer (ZS model) cihazı kullanılmıştır. Her MV tipi için üçlü örnekler en az 3 kez okunarak elde edilen ortalamaları kayıt edilmiş ve ortalama boyut değerleri ve zeta potansiyelleri bu verilere göre belirlenmiştir. AKM için örneklerden alınan 5 μ l'lik bir miktar mika yapraklara uygulanmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Görüntüler XE-100E model AKM'de kontak-olmayan mod kullanılarak alınmıştır. Uç rezonans frekansı 75 kHz, kuvvet sabiti ise 3 N/m olacak şekilde ayarlar yapılmış, tarama hızı 0.73-0.79 Hz ile sınırlandırılmıştır. Elde edilen görüntüler XEI 1.6 yazılımı ile incelenmiştir.

3.3. MV'lerin Biyokimyasal karakterizasyonu:

MV'lerin protein miktarları Nanodrop kullanılarak OD 280'de ölçülmüş ve tüm MV'lerin konsantrasyonu birbirlerine eşitlenmiştir. Protein bantları kuyucuk başına 5 μ g protein olacak şekilde % 5-10'luk gradient SDS-PAGE jelde ayrıştırılmış, bantlar Coomassie mavisıyla boyanarak görüntülenmiştir. Burada



amaç MV'ler arası farklı protein içeriklerinin genel bir görüntüsünü almaktır. Çalışma bu proteinlerin kimliğini tanımlamayı hedeflememektedir. Sonuçlar başarılı bulunursa MV kökenli proteinlerin kimliği proteomiks yöntemlerle ayrı bir projede incelenecektir.

Literatürde bazı MV'lerin nükleik asit içerdiklerine yönelik bulgular olduğundan MV'lerin nükleik asit içerip içermedikleri iki farklı yöntemle araştırılmıştır. Birinci yöntemde MV'ler yapısal olarak bütün olarak veya SDS içeren liziz tampon çözeltisinde parçalanmış olarak % 1'lik agaroz jellere yüklenip içerdikleri nükleik asitler etidyum bromür le boyanmıştır. Bu yöntem kabaca nükleik asitin kesecik yüzeyinde ya da kesecik içerisinde mi olduğunu anlamaya yardımcı olmuştur. İkinci yöntemde ise MV'lerdeki nükleik asitler akridin turuncusu (AO) ile boyanmıştır. AO membrandan geçebilen ve bağlı olduğu nükleik asitin tipine göre farklı floresan kanallarda ışımaya gösteren bir boyadır. Çift sarmallı DNA'ya bağlı AO yeşil kanalda (525nm) ışımaya verirken RNA ya da tek sarmallı DNA'ya bağlı AO kırmızı kanalda (>630nm) ışımaya vermektedir. AO ile boyanmış kesecikler akış sitometresi ile incelenmiştir.

3.4. MV'lerin immün stimulan özelliklerinin belirlenmesi:

MV'lerin immün stimulan özellikleri fare dalak hücrelerinde test edilmiştir. Kısaca $2-4 \times 10^6$ /ml tek hücre süspansiyonu haline getirilmiş fare dalakları % 5 FBS içeren RPMI-1640 ortamında 96 kuyucuklu plakalara, her kuyucuktaki sıvı miktarlarının son hacmi 200µl olacak şekilde dağıtılmış, hücreler 3 farklı doz MV kullanılarak stimüle edilmiştir (0.2, 1.0 ve 5.0 µg/ml final konsantrasyon). Hücre kültür sıvıları 24 saat sonra toplanmış ve salgılanan sitokin miktarları ELISA yöntemiyle tayin edilmiştir. Bazı deneylerde sitokin tayini hücre içi sitokin boyaması ve akış sitometri kullanılarak yapılmıştır. Uyarılan hücrelerdeki MHC Sınıf II molekülü ve CD86 ko-stimulan yüzey belirteç ifadeleri floresan işaretli antikor kullanımı ve akış sitometri ile tayin edilmiştir.

3.5. MV'lerin hücre içine alımlarının kantitatif olarak belirlenmesi ve biyodağılım çalışmaları:

MV'ler SpDiOC floresan lipid boyasıyla yarım saat oda sıcaklığında boyanmış, PBS ile yıkamayı takiben in vitro hücre içine alım deneylerinde kullanılmıştır. Hücreler boyalı ve boyanmamış kontrol MV'lerle 37°C'da 1 saat bekletilmiş,



yıkamayı takiben B-hücreleri, ve diğer antijen sunum hücrelerince alınan MV miktarları floresan işaretli antikolar kullanılarak yüzey boyamasını takiben akış sitometrede belirlenmiştir.

In vivo biyodağılım deneyleri için ise MV'ler yarım saat 5 μ M CFSE (karboksimetil saksinimidil ester) boyası ile yüklenmiş ve 100 μ g boyalı kesecik preparatı Balb/c fareler intraperitoneal olarak verilmiştir. Enjeksiyondan 4 veya 24 saat sonra farelerden dalaklar, periton hücreleri (PEC), mesenterik lenf düğümleri ve kemik iliği toplanmış, dokulardan serbest hücre örnekleri hazırlanmış ve bu organlara dağılan MV keseciklerinin miktarı CFSE floresanının akış sitometrik tayiniyle belirlenmiştir.

3.6. MV'lerin sitotoksitesinin belirlenmesi:

Sitotoksite tayini için fare kemik iliği hücreleri toplanmış ve bu hücreler 1 hafta boyunca L929 hücre hattı kültür sıvısında bekletilerek kemik iliğinden başkalaşmış makrofaj (BMDM) eldesi gerçekleştirilmiştir. BMDM'ler farklı doz MV'lerle 24 saat boyunca inkübe edilmiş, bu sürenin sonunda hücreler eppendorf tüplerde toplanıp yıkanmış ve 1 μ l 2 mg/ml propidium iodide (2 μ g/ml final) ilavesiyle (1 ml PBS içerisinde) 5 dakika bekletilmiştir. Bu deneylerde ayrıca kommensal MV'lerinden saflaştırılan ve MV'lerin yapısında var olduğu düşünülen egzopolisakkaritler de kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar akış sitometresinde analiz edilmiş ve parlak boyanmış ölü hücre/boyanmamış canlı hücre oranları belirlenmiştir.

3.7. MV'lerin adjuvant olarak kullanıldığı fare aşı deneyleri:

Balb/c tipi fareler (6-10 haftalık, dişi veya erkek) Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü hayvan evinde kontrollü iklim koşullarında, sürekli kuru yem ile beslenerek enfeksiyondan uzak ve Veteriner hekim kontrolünde barındırılmıştır.

Aşılama çalışmalarında in vitro deneylerde test edilen ve en tipik kommensal MV özelliğini taşıdığını düşündüğümüz MV tipleri (MV1, MV2 ve MV3 olarak adlandırılmıştır) ile E.coli kökenli MV'ler karşılaştırılmıştır. Kısaca, Balb/c fareler her grupta en az 5 fare olacak şekilde 0 ve 14. günlerde aşağıda gösterilen gruplara göre 3 μ g/fare adjuvant içermeyen monovalent inaktive şap aşısı



(FMDV) ve 10 µg/fare MV preparatı kullanılarak intraperitoneal olarak aşılanmıştır:

1. Sadece Saline (Aşısız, Kontrol Grubu)
2. FMDV
3. FMDV + E.Coli DH5α suşu
4. FMDV + MV1 (Pediokok suş1)
5. FMDV + MV2 (Laktobasil suş2)
6. FMDV + MV3 (Laktobasil suş3)

13. ve 27. günlerde hayvanların anti-FMDV antikor titrelerinin belirlenebilmesi amacıyla fareler kuyruktan kanatılmış, serumları toplanmıştır. Anti-FMDV total IgG, IgG1 ve IgG2a titreleri FMDV O-antijeni ile kaplanmış mikropalakalarda ELISA yöntemiyle tayin edilmiştir.

Aşılanan farelerde oluşan FMDV'ye özgü bellek B hücre yanıtlarının ölçümü ELISPOT yöntemiyle yapılmıştır. Bu amaçla, aşılamadan 150 gün sonra tüm denek hayvanları sakrifiye edilip dalak hücreleri elde edilmiştir. Her gruptan 10 x 10⁶ hücre/ml 6-kuyulu plakalarda bellek hücrelerinin proliferasyonunu sağlamak amacıyla 6 gün boyunca LPS (2µg/ml) ve CpG ODN (0.5µg/ml) eşliğinde bekletilmiştir. 4 farklı hücre konsantrasyonu FMDV O-antijeni ile kaplanmış mikropalakalara aktarılmış ve hücreler bu plakalarda 18 saat boyunca bekletilmiştir. Yıkamayı takiben plakalar goat anti-fare IgG1/alkalin fosfataz antikorunu ile inkübe edilmiş, son yıkamayı takiben plakalara 70 µl BCIP-low melting agarose substrat solüsyonu eklenmiştir. Benek oluşumu için 24 saat beklenmiş kuyucuklardaki benek/nokta sayıları binoküler mikroskop altında sayılarak tayin edilmiştir.

3.8. MV'lerin fare EG7 timoma modelindeki anti-kanser immün yanıtı modüle etme potansiyellerinin belirlenmesi:

EG7 fare timoma hücre hattı tavuk ovalbümin (OVA) proteinini stabil olarak ifade eden ve dolayısıyla OVA proteininin tümör antijeni olarak da kullanılabilirdiği bir hücre hattıdır. Yani OVA proteini ile immünizasyona da açık bir modeldir. İmmünizasyon sonrası oluşacak OVA-spesifik immün yanıt, sitotoksik T-lenfosit uyarımı olmuşsa aşılanmış fareleri tümör challenge dan koruyacaktır.

Bu bilgilerden yola çıkarak MV'lerin model tümör antijeni OVA'ya has anti-tümör immün yanıt oluşumunu etkileyip etkilemediğini aşağıda belirttiğimiz yöntemle ölçmeyi amaçlamıştık:

C57/BL6 fareler her grupta 5 fare olacak şekilde 0 ve 14. günlerde 100 µl PBS içerisinde 7.5 µg OVA içeren aşağıdaki formülasyonlarla immünize edilmişlerdir:

1. OVA (7.5 µg/fare)
2. OVA (7.5 µg/fare) + MV1 (10 µg/fare)
3. OVA (7.5 µg/fare) MV1 içerisinde tutuklanmış (10 µg/fare)
4. OVA (7.5 µg/fare) + adjuvant (cyclic-di-GMP; 15 µg/fare)
5. OVA (7.5 µg/fare) + (cyclic-di-GMP; 15 µg/fare) + MV1
6. OVA (7.5 µg/fare) + (cyclic-di-GMP MV1 içerisinde tutuklanmış 15 µg/fare)
7. Hem OVA (7.5 µg/fare) hem cyclic-di-GMP (15 µg/fare) MV1 içerisinde tutuklanmış

13. ve 27. günlerde hayvanların anti-OVA antikor titrelerinin belirlenebilmesi amacıyla fareler kuyruktan kanatılarak serumları saklanmıştır. OVA'ya karşı gelişen total IgG, IgG1 ve IgG2a yanıtları önceki bir yayınímızda anlatıldığı gibi ELISA yöntemiyle belirlenmiştir (Gursel I. et al, J. Immunol. 2001 Sep 15;167(6):3324-8).

Yukarıdaki gruplarla immüze edilmiş bu farelere 30. günde $1-5 \times 10^6$ EG7 fare timoma hücre hattı 150 µl PBS içerisinde sırt bölgelerine deri altı olarak enjekte edilmiş ve hayvanlarda oluşan tümör hacimleri kaliper'le her 3 günde bir ölçülmüştür. Terapötik etki günlere karşı tümör hacmi eğrileri kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.9. İstatistiksel Analiz:

Gruplar arası istatistiksel farkın anlaşılması için i) students t-testi (ikili karşılaştırmalarda) veya ii) Kruskal Wallis ya da iii) Mann-Whitney U-testlerinden (çoklu grupların birbirleri arasındaki farkın belirlenmesi için) faydalanılmıştır.

4. BULGULAR

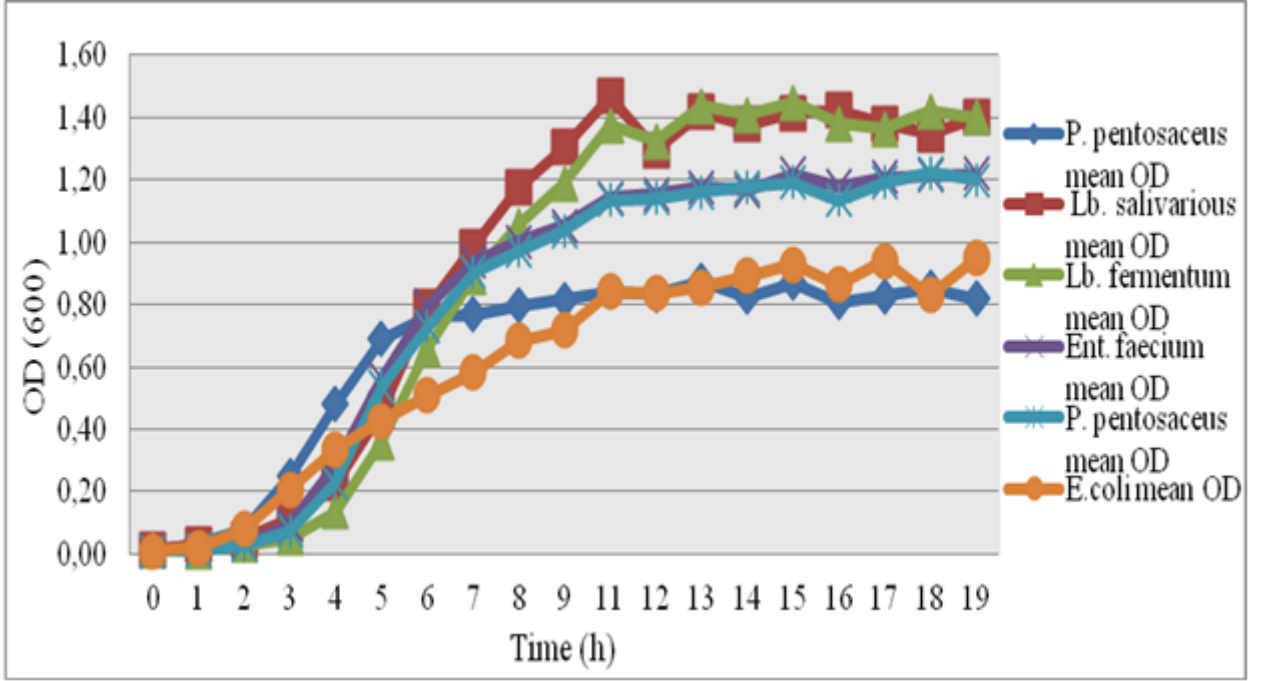
4.1. MV'lerin saflaştırılması:

MV'lerin saflaştırıldığı bakteri suşları ve proje kapsamında sonuçların takibini kolaylaştırmak amacıyla kullanacağımız kısaltılmış isimlendirme formatı Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Deneylerde kullanılan bakteri suşları

Kısaltma	Suş	Kaynak	Gram boyama
MV1	Pediococcus pentosaceus	Yeni doğan feçesi	+
MV2	Lactobacillus salivarius	Yeni doğan feçesi	+
MV3	Lactobacillus fermentum	Yeni doğan feçesi	+
MV6	Enterococcus faecium	Yeni doğan feçesi	+
MV7	Pediococcus pentosaceus	Anne sütü	+
E.coli MV	Escherichia coli	ATCC 67877	-

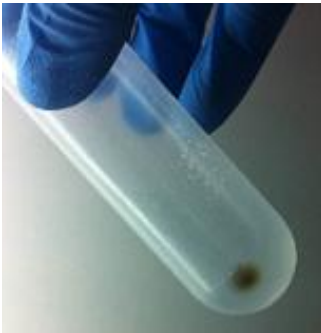
MV izolasyonunda bakterilerin sabit faza geçmiş olması gerektiğinden Tablo 1'de özetlenmiş bakteri suşlarının sabit faza geçme süreleri büyüme eğrilerinin belirlenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Suşların büyüme eğrileri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan bakteri suşlarının büyüme eğrileri. Suşlar ilk hücre konsantrasyonu OD₆₀₀ nm'de 0.01 olacak şekilde uygun sıvı kültür ortamına (500 ml) aktarılmıştır. Büyüme kinetiği 37 °C'ta saat başı OD₆₀₀ değerlerinin ölçümüyle elde edilmiştir.

Şekil 4.1'deki verilere göre MV izolasyonuna kültürlerin başlatılmasından 12-18 saat sonra geçilmesine karar verilmiştir.

Differansiyel santrifügasyon, filtrasyon ve ultrasantrifügasyon yöntemleriyle saflaştırılan MV'lerin son pellet görüntüsü örnek teşkil etmesi bakımından Şekil 4.2'de sunulmuştur.



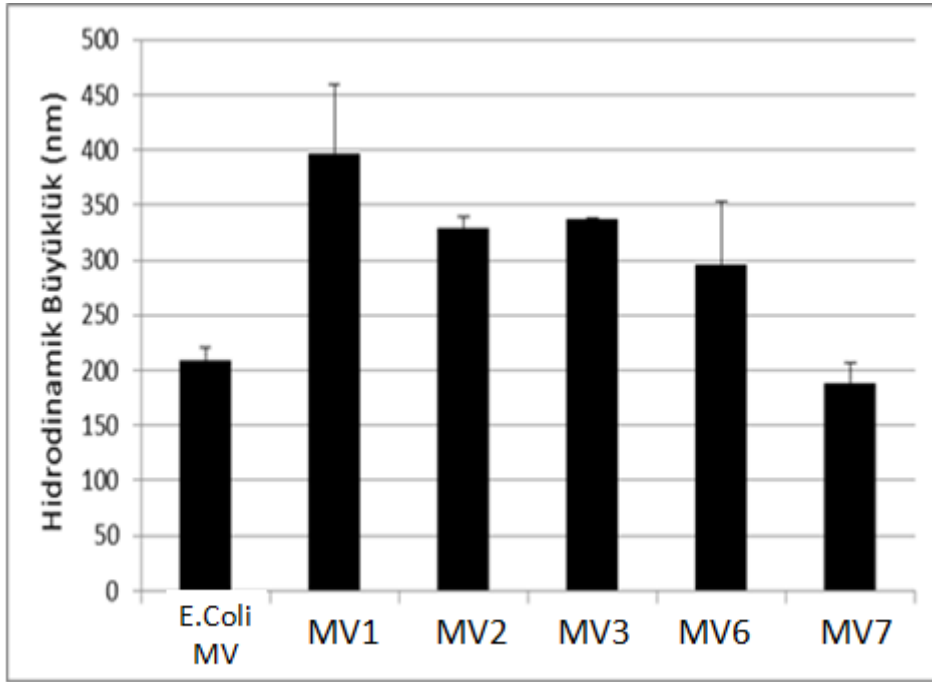
Şekil 4.2. Saflaştırılmış MV pelletinin görünümü

Negatif kontrol olarak bakteri içermeyen kültür ortamı da aynı işleme tabi tutulmuş, beklendiği üzere herhangi bir pellet eldesi gözlenmemiştir.

4.2. MV'lerin Fiziksel karakterizasyonu:

Yöntem bölümünde anlatıldığı üzere MV'lerin fiziksel özellikleri dinamik ışık saçınımı, zeta potansiyeli tayini ve atomik kuvvet mikroskopisi ile belirlenmiştir.

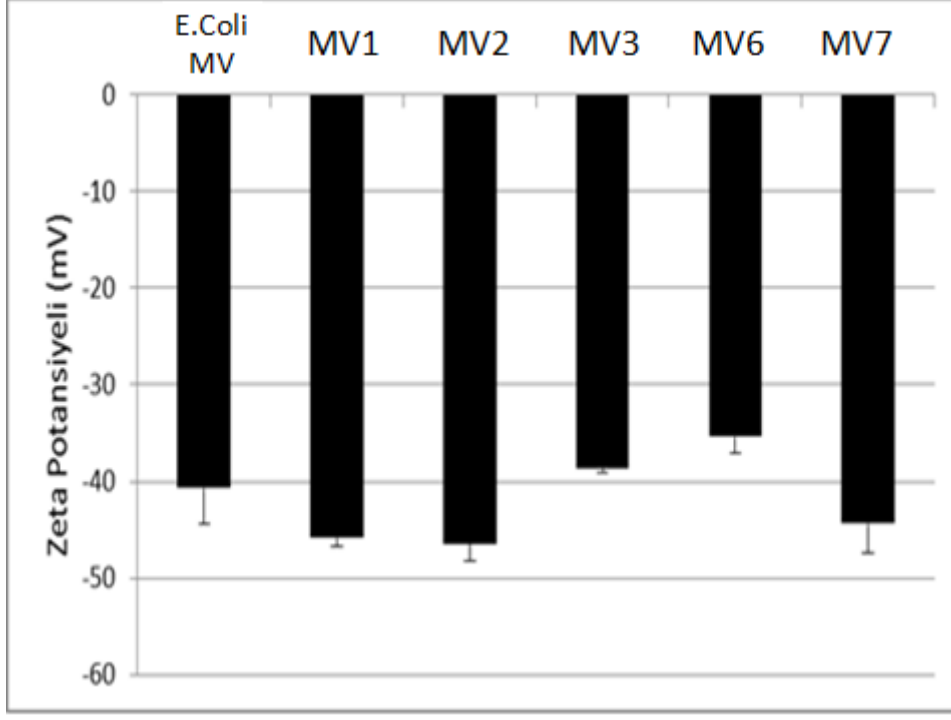
Şekil 4.3'te dinamik ışık saçınımı ile belirlenen MV hidrodinamik ebatları gösterilmiştir.



Şekil 4.3. MV'lerin hidrodinamik parçacık boyutları. Kesecikler 50X DNase/RNase yoksunu suda seyreltilmiştir. Sonuçlar 3 bağımsız ölçümün ortalaması \pm S.D olarak verilmiştir.

Şekil 4.3'teki verilere göre kommensal kökenli keseciklerin büyük bir çoğunluğunun E.coli den salgılanan keseciklere (~ 200 nm) göreceli olarak daha büyük oldukları (~ 200-400 nm) anlaşılmaktadır. Ancak hidrodinamik ebat hidrasyon kabuğunu da içerdiğinden bu verilerin fiziksel MV büyüklüğünden daha yüksek bulunduğu da göz önünde tutulmalıdır.

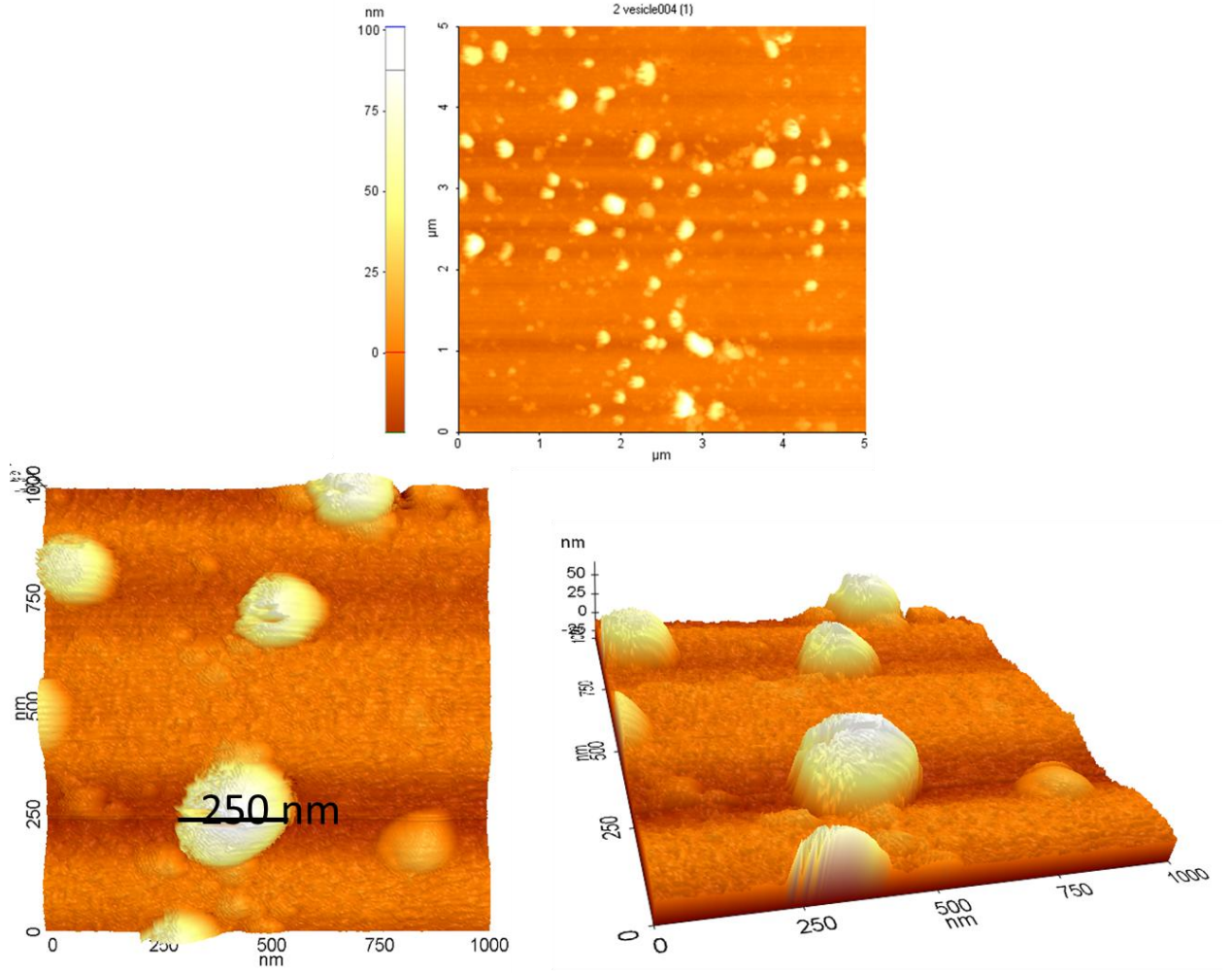
Hücrelerle etkileşimde yüzey yükü önemli olduğundan MV'lerin yüzey yükleri zeta potansiyellerinin ölçülmesiyle belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.4'te sunulmuştur.



Şekil 4.4. MV'lerin zeta potansiyelleri. Kesecikler 50X DNase/RNase yoksunu suda seyreltilmiştir. Zeta potansiyelleri şu parametreler kullanılarak belirlenmiştir: ortam kırılma indeksi 1.330, medium akışkanlığı 0.88 mPa s, dielektrik sabiti 78.54, derece 25°C. Sonuçlar 3 bağımsız ölçümün ortalaması \pm S.D olarak verilmiştir.

Şekil 4.4'ten de anlaşılacağı üzere genellikle tüm MV'lerin yaklaşık -40 mV civarında eksi yüklü yüzeye sahip olduğu anlaşılmaktadır. Daha önceki tecrübemiz memeli hücrelerinden salgılanan keseciklerin (eksozom) yüzey yükünün yaklaşık -10 mV olduğu yönündeydi. Eksozomlarla karşılaştırıldığında MV'lerin daha fazla eksi yüklü olduğu anlaşılmaktadır. Bakterilerin memeli hücrelere göreceli olarak daha fazla eksi yüke sahip oldukları bilinmektedir. Dolayısıyla bakteri kökenli MV'lerin de aynı şekilde yüksek eksi yüke sahip olmaları gerekir.

MV'lerin ebat ve morfolojilerini incelemek amacıyla atomik kuvvet mikroskopisi de kullanılmıştır. Bu yöntemle elde edilen örnek görüntüler Şekil 4.5'te sunulmuştur.

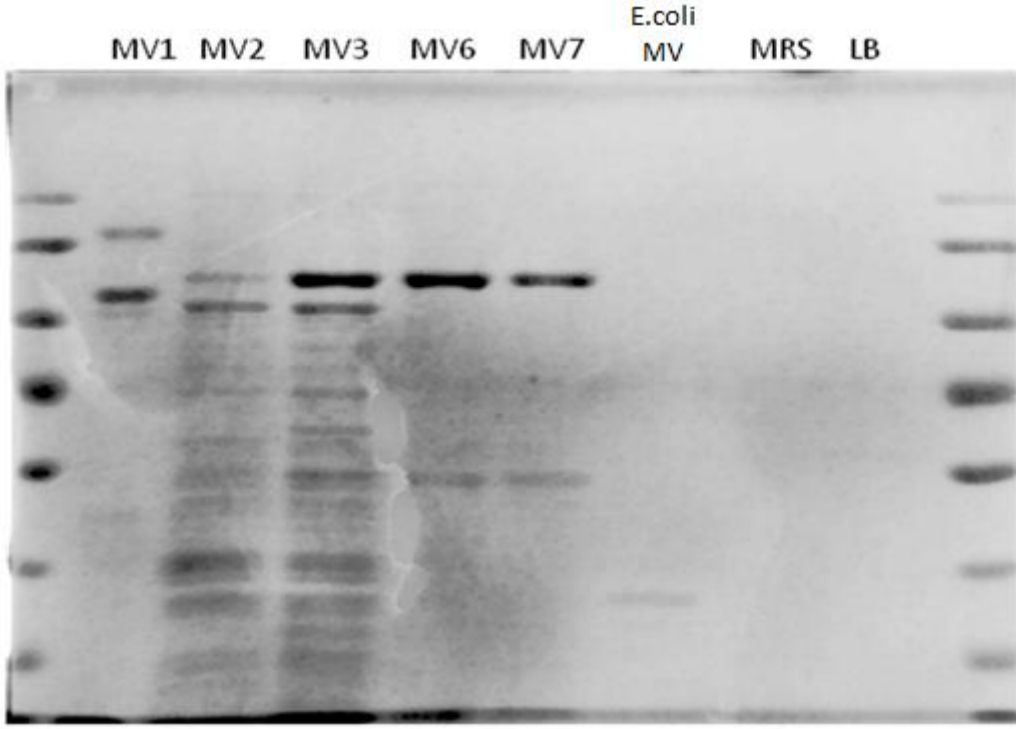


Şekil 4.5. MV'lerin Atomik Kuvvet Mikroskopisi görüntüleri. MV'ler suda 1000X seyreltilmiş, 5 μ l mika yüzeye yüklenerek kurutulmuştur. Görüntüler kontaksız mod kullanılarak elde edilmiştir.

Şekil 4.5 üst paneli 5x5 μ m'lik alandaki MV'lerin topografik görüntülerini göstermektedir. Alt paneller ise 1x1 μ m'lik alandaki MV'lerin 3 boyutlu görüntülerine aittir. Keseciklerin yuvarlak şekiller sergiledikleri ve örnek olarak seçilen bir keseciğin yaklaşık 250 nm civarında olduğu görülmektedir. Beklendiği üzere gerçek fiziksel ebatların dinamik ışık saçınımı verilerinden daha küçük olduğu anlaşılmaktadır.

4.3. MV'lerin Biyokimyasal karakterizasyonu:

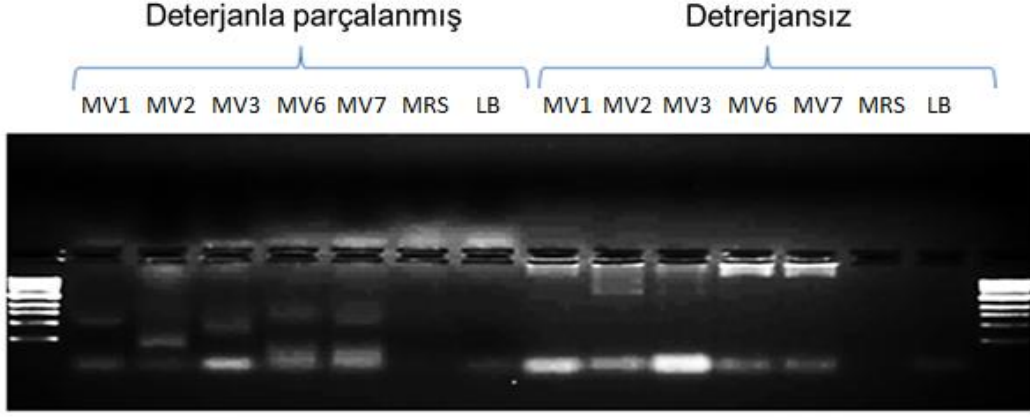
MV'lerin karakterizasyonunda birçok kriter kullanılmaktadır. Bunlardan bir tanesi, elde edilen MV'lerin birden fazla protein barındırmalarıdır. Bu amaçla saflaştırılan MV'ler SDS-PAGE jel elektroforezi yöntemiyle incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.6'da sunulmuştur.



Şekil 4.6. MV'lerin SDS-PAGE jel elektroforez görüntüleri. MV'ler (5 µg/kuyucuk) % 5-10'luk gradient jelde yürütülmüştür. En baş ve en son kuyucuklarda yer alan protein merdiveni 3.14 – 100 kDa MW aralığındadır.

Şekil 4.6'da görüldüğü üzere farklı bakterilerden izole edilen MV'lerin kendilerine has ve bazen de bazı ortak proteinleri içerebildikleri düşünülmüştür. Negatif kontrol olarak kullanılan ve MV izolasyon protokolüne tabi tutulmuş temiz MRS ve LB besi yerlerinden hiçbir protein bandı elde edilmemiştir. Bu sonuçlar bakteri süpernatantlarından elde edilen ürünün aktif olarak salgılanan MV'ler olduğuna işaret etmektedir.

Bakteri kökenli keseciklerin nükleik asit içerdikleri bilinmektedir. Bu sebeple elde edilen MV'lerde nükleik asit bulunup bulunmadığı MV'lerin deterjansız ve deterjanla işleme sonrası agaroz jel elektroforezi aracılığıyla incelenmesiyle araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

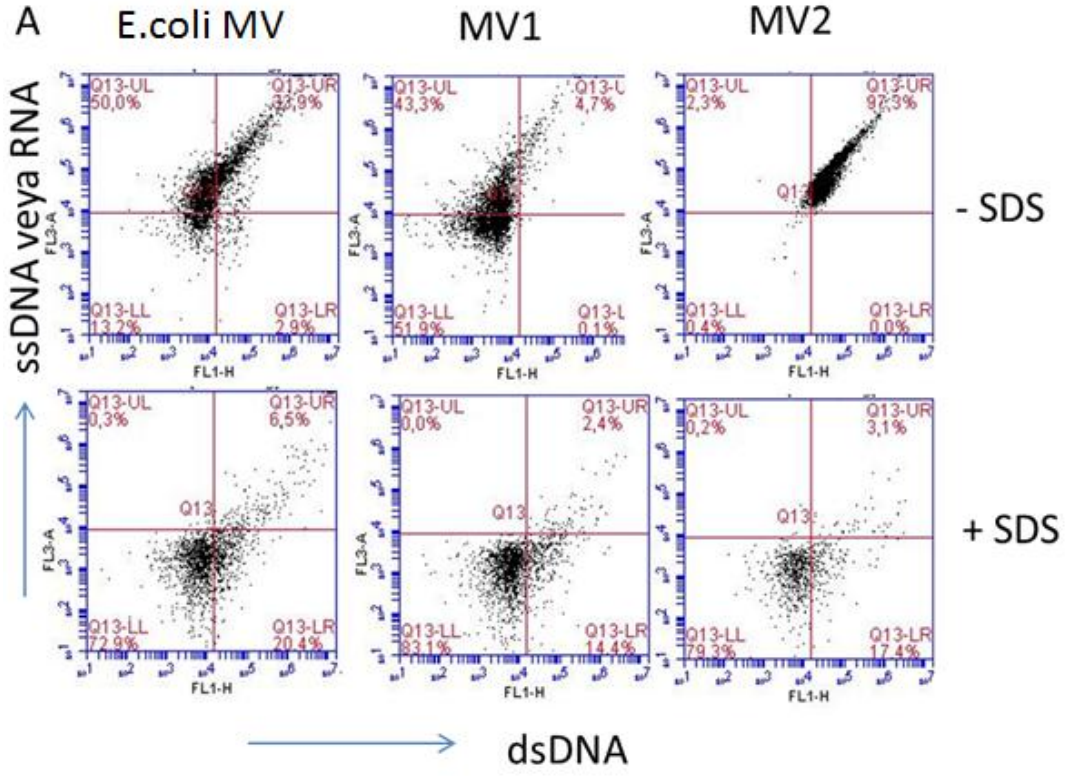


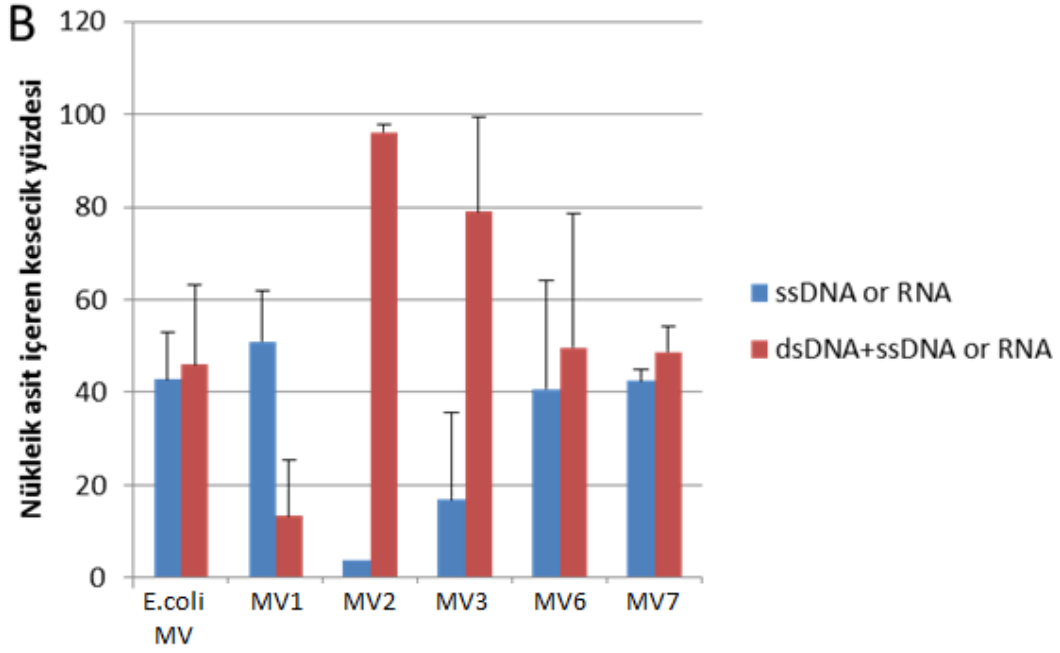
Şekil 4.7. MV'lerin agaroz jel elektroforezi görüntüleri. Deterjanla önceden işlenmiş ya da işlenmemiş MV'ler 0.2 µg/ml etidyum bromür içeren % 1'lik agaroz jele yüklenmiş ve yürütmeyi takiben UV altında görüntü alınmıştır. En baş ve en son kuyucuklarda yer alan DNA merdiveni 0.5-10 kb aralığındadır.

Şekil 4.7'deki verilere göre deterjanla parçalanmamış MV'lerde hepsi de 0.5 kb'den kısa olacak şekilde tek bir nükleik asit bantı görülmektedir. Aynı zamanda kuyucuklarda hapsolmuş nükleik asit boyaması da mevcuttur. Kuyucuklarda kalan bu nükleik asitlerin MV içerisinde yer aldıkları ve kesecikler parçalanmadığı için jelde yürüyemedikleri düşünülmüştür. Yürümüş olan bantların ise kesecik yüzeyine bağlı serbest nükleik asitlerden oluştuğu düşünülmüştür. Bu bulgu, deterjanla işlenmiş MV'lerden elde edilen bantlar incelendiğinde doğrulanmıştır: parçalanmış keseciklerden 2 farklı bant elde edilmiştir. Bunlardan ilki parçalanmamış keseciklerdeki bantın aynısıdır ve MV yüzeyindeki nükleik asitlerden kaynaklandığı düşünülmüştür. 0.5-2 kb aralığındaki ikinci bantların deterjanla lizis sonrası jelde yürüyebilen ve dolayısıyla kesecik içerisinde yer alan nükleik asitler olduğu anlaşılmaktadır. Bu sonuçlar, bakteri kökenli keseciklerin hem yüzeylerinde hem de içlerinde nükleik asit bulundurduklarını gösteren literatür bulgularıyla örtüşmektedir.

Keseciklerin nükleik asit içerikleri akridin turuncusu (AO) boyaması sonrası akış sitometrik yöntemle de incelenmiştir. AO çift sarmal DNA'ya bağlandığında (dsDNA) yeşil, tek sarmal DNA (ssDNA) veya RNA'ya bağlandığında ise kırmızı ışığa yayan bir boyadır. Şekil 4.8A, AO ile boyanan bazı örnek MV'lerin deterjanla parçalanmadan önce ve parçalandıktan sonraki flow sitometrik nükleik asit boyanma özelliklerini göstermektedir. Nokta plotlardan da anlaşılacağı üzere keseciklerin dsDNA ve ssDNA/ssRNA oranları elde edildikleri bakteri izolatına göre değişiklik göstermektedir. Deterjanla işleme sonrası nükleik-asit bağıntılı floresan sinyal kaybolmuştur (Şekil 4.8A, alt paneller). Aynı tür boyama deneyleri tüm MV'ler için tekrarlanmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.8B'de sunulmuştur.

Sonuçlar, MV nükleik asit içeriklerinin bakteri tipine göre büyük değişiklik gösterdiğine işaret etmektedir.



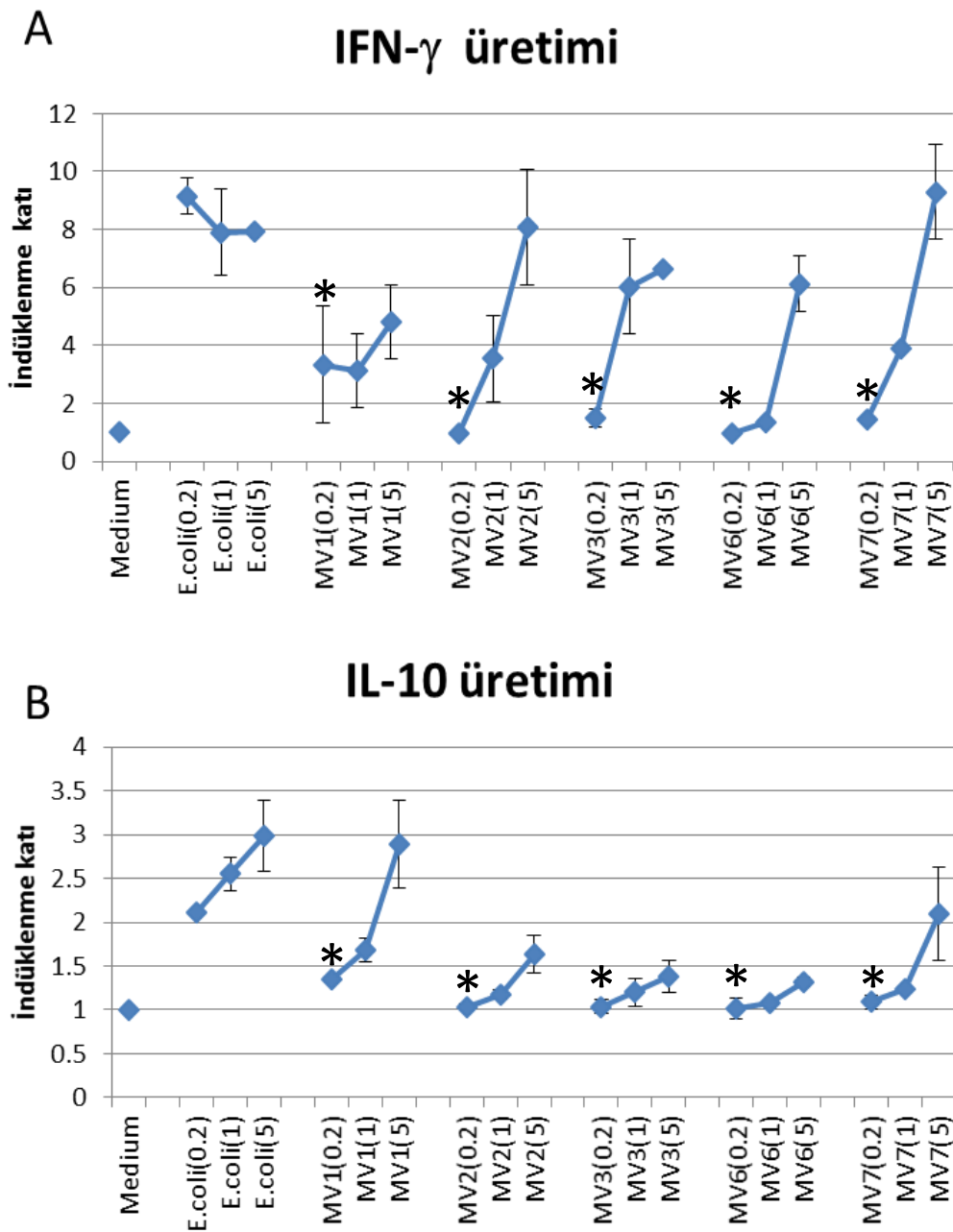


Şekil 4.8. MV'lerin AO ile boyanma özellikleri. 50 µl kesecik 13 µM AO ile boyanmış ve akış sitometresi ile analiz edilmiştir. (A) Üst paneller deterjanla parçalanmamış, alt paneller ise deterjanla parçalanmış örnek iki kesecikle elde edilen nükleik asit boyama nokta-plot çizimlerini göstermektedir. (B) Çalışmada kullanılan tüm MV tiplerinin nükleik asit içeriklerini gösteren grafikler. Sonuçlar 2 farklı batch MV'nin düblike çalışıldıktan sonra çizilen ortalama ± S.D değerlerini göstermektedir.

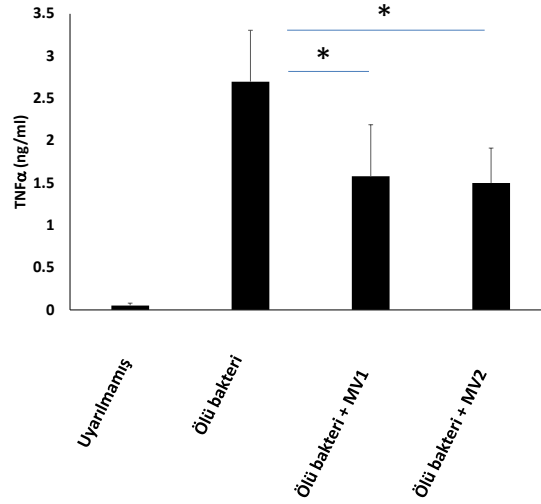
4.4. MV'lerin immün düzenleyici özelliklerinin belirlenmesi:

Patojen kökenli (Gr- karakterli) MV'lerin muhtelif TLR ligantları içerdikleri ve immün uyarıcı özelliğe sahip oldukları bilinmektedir. Ancak komensal kökenli MV'lerin immün sistem üzerine nasıl bir immün etkiye sahip oldukları henüz bilinmemektedir. Bu sebeple özellikle komensal (Gr+ karakterli) MV'lerin nasıl bir immün yanıt tetiklediklerini incelemeye yönelik bir dizi in vitro deney planlanmıştır. Bu çalışmalarla; komensal Gr+ MV'lerin, i) her zaman immün baskılayıcı mı, ii) yoksa Ecoli MV'leri gibi her zaman immün uyarıcı mı, iii) yoksa bazı durumlarda immün baskılayıcı, bazı durumlarda da immün uyarıcı davranarak aslında bu MV'ler immün düzenleyici karaktere mi sahip olup olmadıklarını anlamaya çalıştık. Kısaca, farek dalak hücreleri farklı doz MV'lerle değişik sürelerle ya kendi başlarına ya da bazı uyarımlarla birlikte uyarılmış salgılanan farklı sitokin ve ifadesi değişen bazı yüzey belirteçleri ELISA ve/veya FACS ile analiz edilmiştir. PCR çalışmalarından çok daha anlamlı ve protein düzeyine yönelik bilgiler vermesi açısından öncül PCR sonuçlarına bu raporda değinilmemiştir.

Şekil 4.9A ve 4.9B’de fare dalak hücrelerinden üretilen stimülasyon belirteci olarak IFN γ (A) ve immün-modülatör olarak IL-10 (B) seviyeleri gösterilmiştir. E.coli kökenli keseciklerin en düşük ilk iki dozda kullanıldıklarında bile yüksek miktarda IFN- γ salgısına yol açtığı (8-9 kat) görülmektedir. Bunun aksine komensal kökenli keseciklerin aynı dozlarda ancak MV1 tarafından ancak 3-3,5 kat IFN- γ üretimine yol açarken, diğer MV tiplerinin uyarılmamış hücreler düzeyinde ya da en fazla 3-3,5 kata kadar ulaşabilen IFN- γ ürettirdikleri gözlemlenmiştir. Dolayısıyla E.coli MV’lerinin, komensal MV’lere göreceli olarak daha etkin immün uyarıcı ajan olarak davrandıkları iddiasını destekler bir sonuç ortaya çıkmıştır.



C

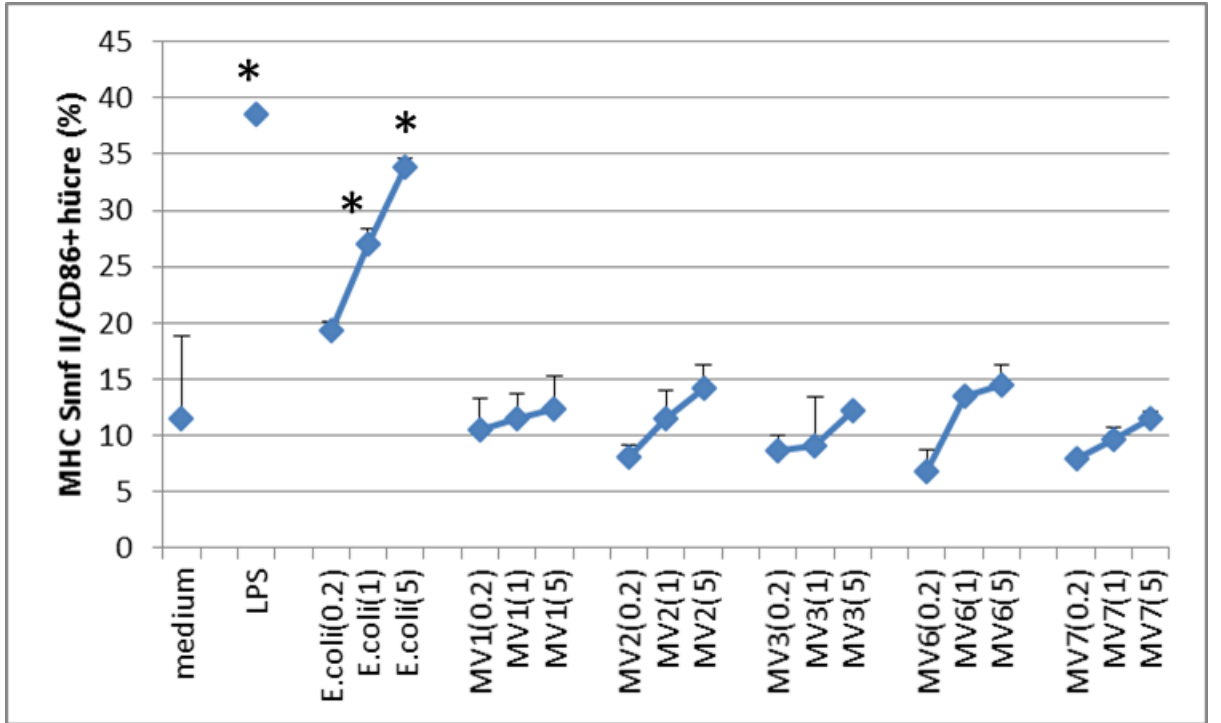


Şekil 4.9. Farklı doz MV örnekleriyle uyarılan fare dalak hücrelerinin IFN- γ (A) ve IL-10 (B) yanıtları. MV1 ve MV2'nin Bakterinin yol açtığı TNF α salımını baskılama düzeyi (C). 3-5 farklı fareden elde edilen 4×10^6 /ml dalak hücresi 0.2 μ g/ml, 1 μ g/ml ve 5 μ g/ml MV ile 24 saat uyarılmış, sitokin yanıtları kültür sıvılarından ELISA ile belirlenmiştir. Çalışmada uyarıcılar triplike kuyucuklarda uygulanmış ve deney en az iki kez tekrarlanmıştır (E.coli MV'ye, ya da ölü bakteriye göreceli olarak * $P < 0.05$)

Kommensal bakterilerin genelde immün düzenleyici etkileri olduğu bildirildiğinden, komesallerden elde edilen MV'lerin de benzer etkileri olup olmadıkları ve immün düzenleyici etkilerinin bulunup bulunmadıklarını anlamak için bilinen etkin bir immün modülatör sitokin olan IL-10'un miktar tayini ile belirlenmeye çalışılmıştır. İncelenen tüm MV'lerin az miktarda IL-10 yanıtına sebep olduğu görülmüştür. Komensal suşlardan en etkin IL-10 indükleyici adayın MV1 olduğu saptanmıştır.

Bir sonraki çalışmada ise MV'lerin immün baskılayıcı özelliğini araştırdık (Bkz. Şekil 4.9C). Eğer MV'ler IL-10 üretmiyorsa, acaba fare dalakları üzerine konan bir uyarın etkisini engelleyebilecek kabiliyeti var mı diye düşünüp, fare dalak hücrelerini ya i) heatkilled E.coli bakterisiyle (1×10^6 /kuyucuk/ 2×10^5 dalak hücresi), ii) ya da Ecoli ile karıştırılmış MV1 veya MV2 (1 μ g/ml) ile 24 saat inkübe ederek TNFa salım düzeylerini ELISA ile takip ettik. Şekil 4.9C'den de anlaşılacağı gibi MV1 ve MV2 aynı düzeyde Ecoli'nin yol açtığı TNFa miktarının yaklaşık %50'sini inhibe etmiştir.

İmmün düzenleyici karakterizasyon çalışmalarının bir başka önemli ögesi de antijen sunum hücrelerinin etkinleşmesine veya ko-stimulan molekül ifade edebilmesine, yani bir başka deyişle antijen sunum fonksiyonuna komensal kökenli MV'lerin etkisinin ne olduğunu belirlemektir. Özellikle bu tip nano-kesecikleri i) aşı veya ii) immün tedavilerde taşıyıcı ajan olarak kullanmak amacı güdülyorsa antijen sunum hücreleriyle MV'lerin ilişkisinin anlaşılması önemli doneler olacaktır. Bu nedenle, MV'lerin antijen sunum hücrelerini etkinleştirip etkinleştirmedikleri, MHC Sınıf II ve CD86 ifade eden hücrelerin akış sitometrik analiziyle takip edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.10'da özetlenmektedir.

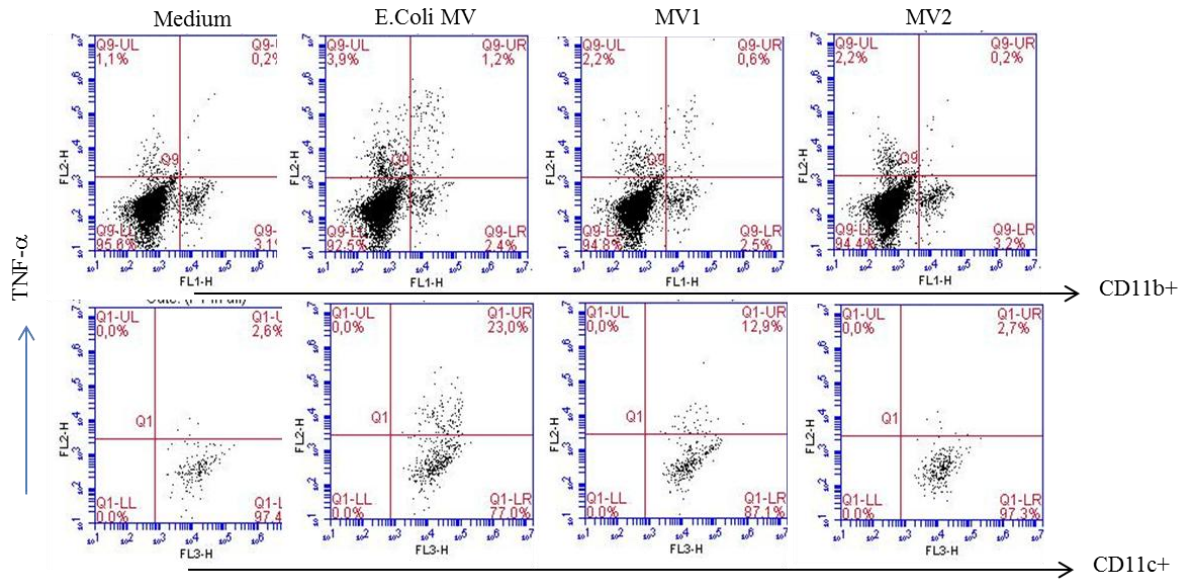


Şekil 4.10. MV'lerle uyarılma sonrası antijen sunum hücrelerindeki olgunlaşma belirteçleri ifadesi. 3-5 fare dalak hücresi örneği (4×10^6 /ml), 0.2 μ g/ml, 1 μ g/ml veya 5 μ g/ml MV ile 24 saat uyarılmış, hücreler daha sonra floresan işaretli antikolarla boyanıp akış sitometresinde analiz edilmiştir. (Uyarılmamış gruba göreceli olarak* $P < 0.05$).

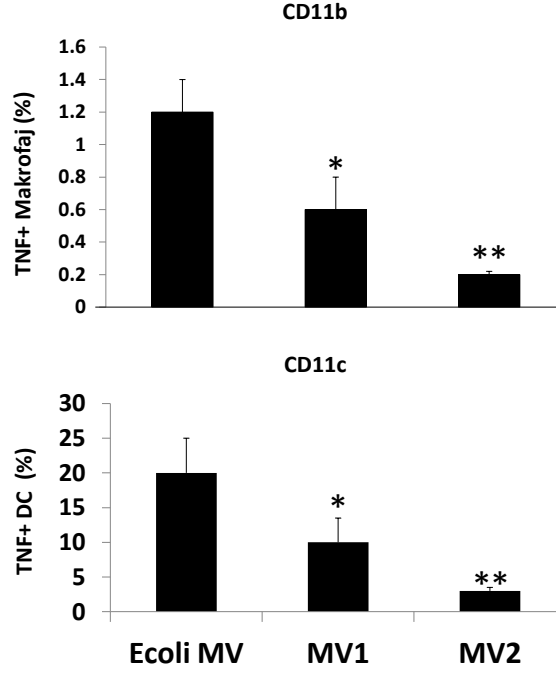
Şekil 4.10'dan da anlaşılacağı üzere beklendiği gibi, E.coli kökenli kesecikler pozitif kontrol olarak kullandığımız LPS gibi antijen sunum hücrelerinin etkinleşmesine yol açarken, komensal kökenli MV'lerin bu tür bir etki oluşturamadıkları saptanmıştır. Dahası, bazı MV tipleri, istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen uyarılmamış antijen sunum hücrelerin MHC-II/CD86 düzeylerini bazal seviyenin de altına indirdiği gözlenmiştir.

E.coli MV'lerinin hangi antijen sunum hücrelerini etkinleştirdiklerini anlamaya yönelik ve komensal MV'lerin bu hücrelerde uyarıcı bir etki yapıp yapmadıklarını analiz etmek için stimülasyon sonucu makrofajlar ve dendritik hücrelerden üretilen TNF α sitokini hücre içi sitokin boyama yöntemiyle tayin edilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.11'de sergilenmiştir.

A)



B)



Şekil 4.11. MV'lerin makrofaj ve dendritik hücre kökenli TNF α üretimine etkileri (A). Üç kez triplike kuyucuklarda çalışılan deney komensal MV'lerin baskılayıcı etkilerini özetlemektedir (B). (Ecoli MV'ye göreceli olarak, * $P < 0.05$ ve ** $P < 0.01$).

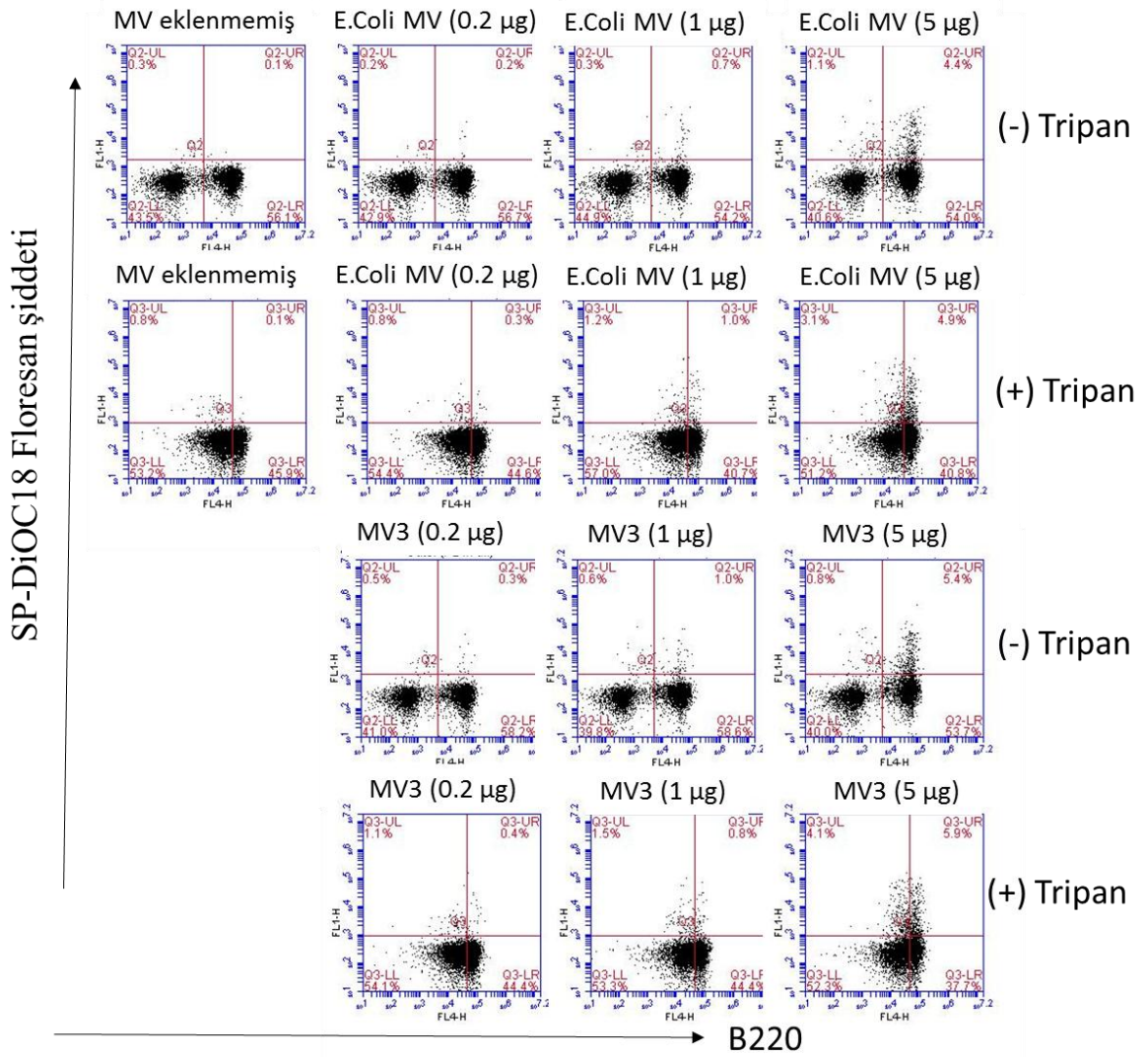
Hücre içi TNF α boyaması verileri ışığında, i) E.coli MV'leri uyarılması sonunda makrofajlar 6 kat, dendritik hücrelerde yaklaşık 7 kat daha fazla TNF α üretirirken, ii) komensal kökenli MV1'in ise Ecoli MV düzeyinden az ancak istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde makrofajlardan ve dendritik hücrelerden TNF α üretimine yol açmıştır. iii) Öte yandan MV2 ise pro-enflamatuar yanıtı tetiklememiştir. göstermiştir.

Bu sonuçlar komensal MV'lerin takip edilen immün parametreye bağlı olarak immün düzenleyici (uyarıcı ve/veya baskılayıcı) etkilerinin olabileceğini işaret etmektedir.

4.5. MV'lerin hücre içine alımlarının kantitatif olarak belirlenmesi ve biyodağılım çalışmaları:

Boyalı MV'leri yüzeylerine bağlayan ya da içlerine alan hücre tiplerinin analizi için fare dalak hücreleri 3 farklı doz SP-DiOC18 işaretli E.coli veya komensal MV'si ile 37°C'de 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. SP-DiOC18 sinyali farklı yüzey belirteçleri eşliğinde analiz edilmiştir. Hücre yüzeyine bağlanan MV sinyalinin hücre içine alınan sinyalden ayrıştırılmasına yönelik olarak tüm örnekler tripan mavisi yokken ve tripan mavisi eklenmesi sonrası analiz edilmiştir. Tripan mavisi hücre yüzeyine bağlanan sinyali etkisiz hale getirirken hücre içine alınmış

örneklerinin sinyalini etkilememektedir. Böylece MV'lerin ne kadarının hücre yüzeyine bağlandığını ve ne kadarının tamamen hücre içine alındığını anlamak mümkün olabilmektedir. İlk analizlerde MV'lerin neredeyse tamamının B220 pozitif B hücreleriyle etkileştiği gözlenmiştir (Şekil 4.12).

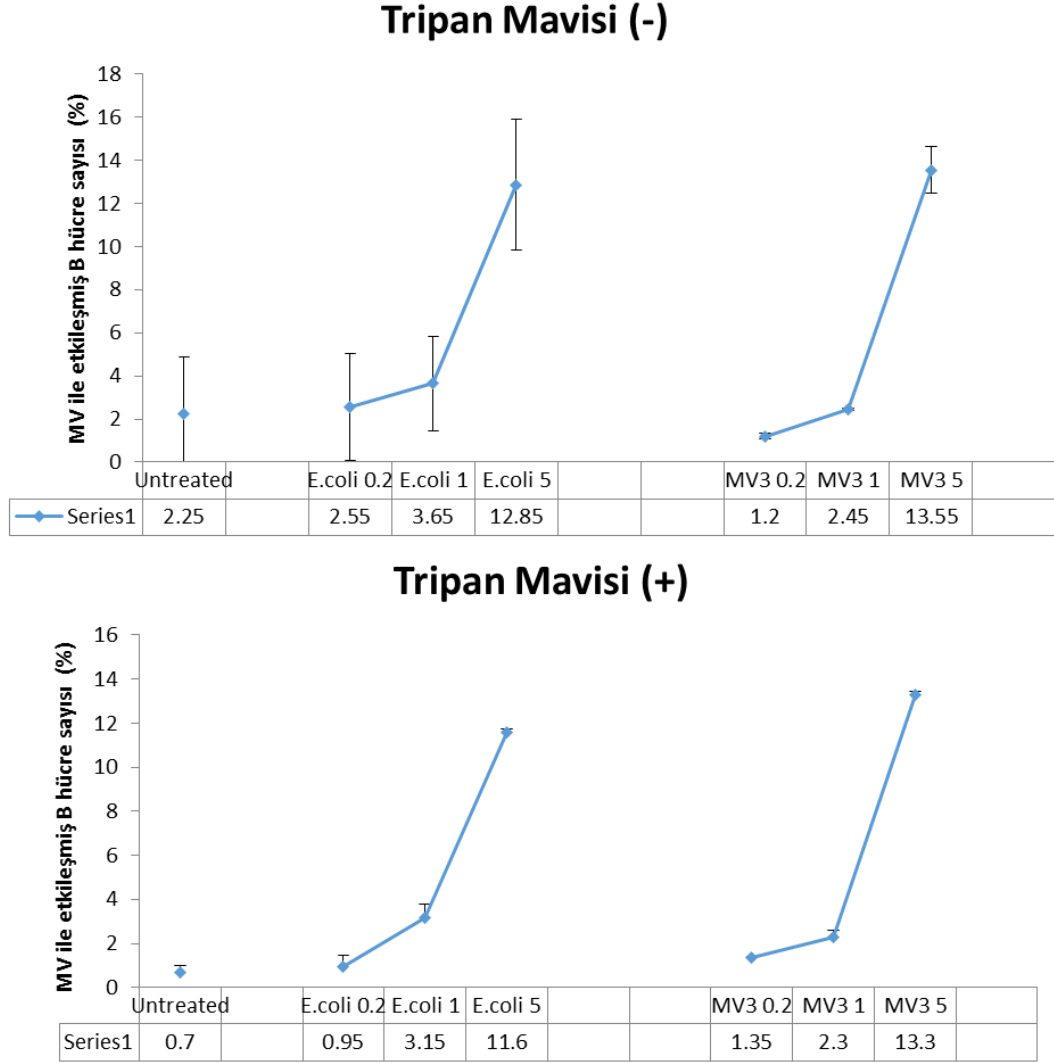


Şekil 4.12. MV'lerin *in vitro*'da fare dalak hücrelerine alımları. SP-DiOC18 işaretli MV pozitif hücre yüzdeleri B220 B hücre belirteğine karşı akış sitometride belirlenmiştir. Örnekler tripan mavisiz ya da sadece hücre içine alınan miktarların tayini için tripan mavisini eşliğinde okunmuştur. En az iki kez tekrarlanan deney benzer sonuç vermiştir.

Şekil 4.12'den de anlaşılacağı üzere MV'ler doza bağlı olarak büyük oranda B220+ B hücre popülasyonunca tanınmaktadır. Ayrıca MV'lere bağlı sinyalini tamamı

hücre içinden gelmektedir çünkü tripan mavisini SP-DiOC18 sinyalinin floresan şiddetini etkilememiştir.

Bu bulgular 2-3 farklı fareden dalak hücreleri elde edilerek tekrarlanmış ve analizler B hücre popülasyonuna hedeflenilerek yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.13'de gösterilmiştir.

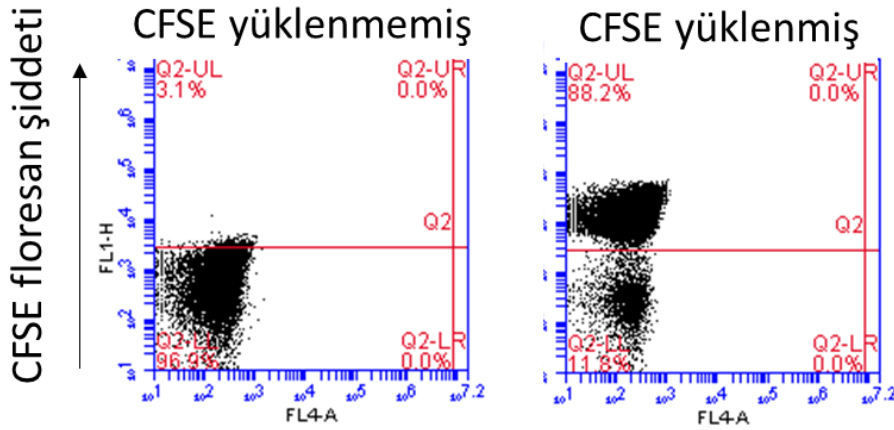


Şekil 4.13. MV'lerin *in vitro*'da fare dalak B-hücrelerine alımları. SP-DiOC18 işaretli MV pozitif hücre yüzdeleri B220 B hücre belirteçi pozitif hücrelerden akış sitometri ile belirlenmiştir. Örnekler tripan mavisiz ya da sadece hücre içine alınan miktarların tayini için tripan mavisini eşliğinde okunmuştur. Sonuçlar 2-3 farenin değerlerini özetlemektedir.

Yukarıda özetlenen deneyler E.coli veya komensal kökenli MV'lerin genelde fare dalak B hücrelerince doza bağlı olarak içeriye alındığını göstermektedir. Dolayısıyla bakteri kökenli MV'lerin kommensal-kommensal olmayan ayrımı gözetilmeden genelde aynı mekanizmalar kullanılarak doza bağlı bir biçimde hücrelere alındıklarını önermektedir.

4.6. MV'lerin in vivo'da biyodağılımları:

İşaretli MV'lerin in vivo'da farklı hücreler tarafından tanınabilme ihtimalleri ve biyodağılımlarına yönelik literatürde hiçbir bulgunun yer almaması sebebiyle MV'ler (MV1) intraperitoneal (i.p) olarak farelere uygulanmış ve biyodağılımları analiz edilmiştir. Bu deneylerde MV'lere floresan şiddeti daha yüksek olan CFSE boyası yüklenmiştir. Keseciklere boya yükleme verimi yine akış sitometride belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.14'te gösterilmiştir.

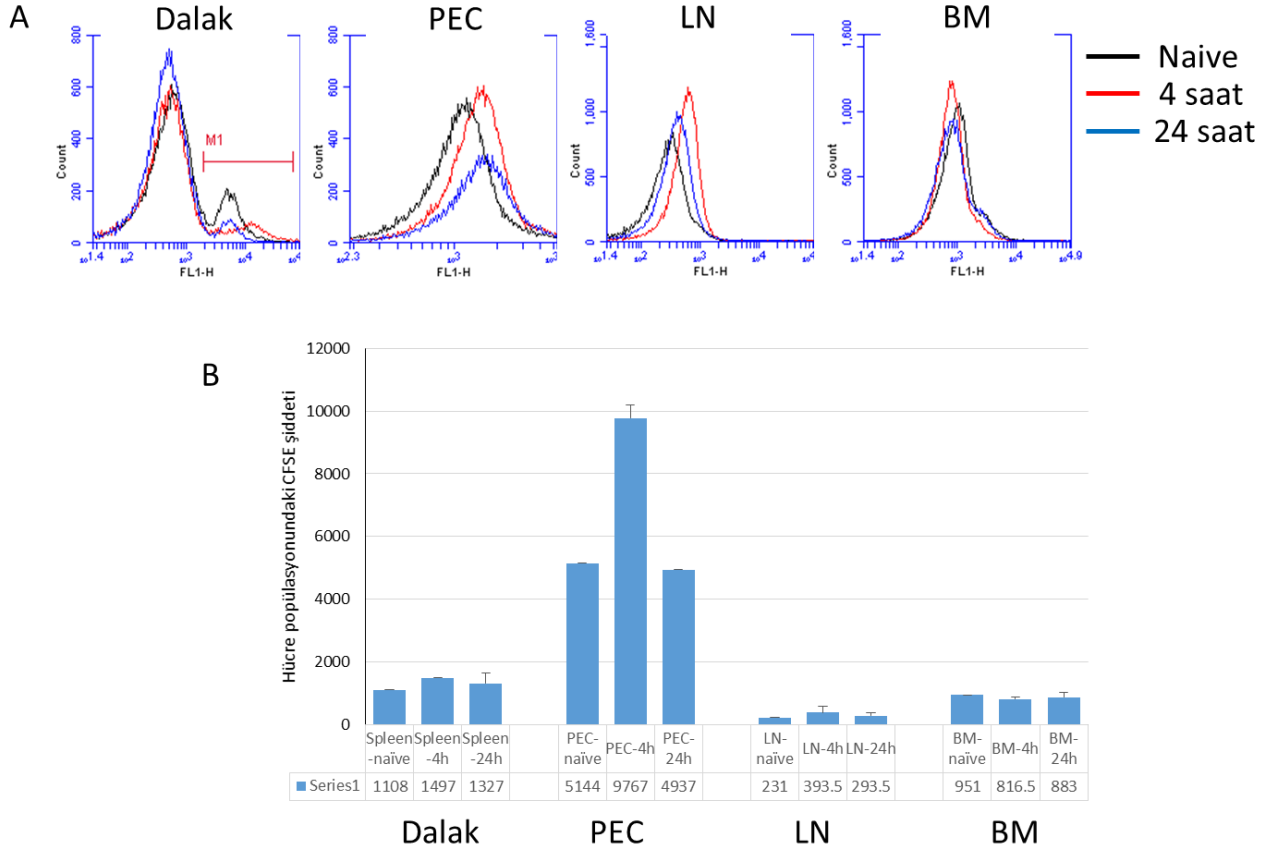


Şekil 4.14. MV1'lere CFSE boya yükleme verimi. 3 değişik denemede benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Şekil 4.14, MV1'lere CFSE yükleme verimini göstermektedir. Buna göre keseciklerin % 88±0,5'inin başarıyla işaretlendiği görülmektedir.

In vivo dağılımı belirlemek amacıyla 100 µg CFSE işaretli kesecik i.p olarak toplam 4 fareye enjekte edilmiş, 2 fareden immün sistem bağıntılı dokular 4 saat sonra, 2 diğer 2 fareden ise 24 saat sonra toplanmış ve bu organlardan gelen MV bağıntılı floresan sinyali akış sitometrisiyle tayin edilmiştir.

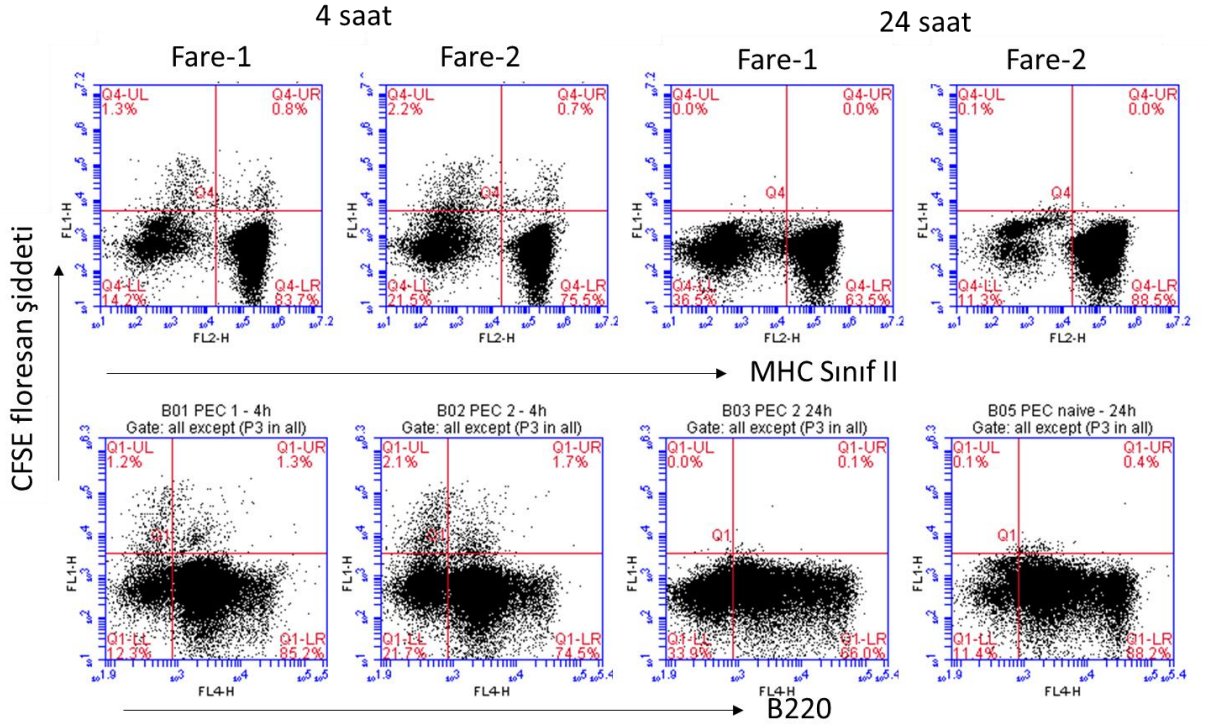
Sonuçlar, kesecik enjekte edilmemiş naif farelerle karşılaştırılmıştır. Şekil 4.15A, 4 saat ve 24 saat gruplarından elde edilen MV floresan sinyalin dalak, peritoneal eksüdat hücreler (PEC), mezenterik lenf düğümleri (LN) ve kemik iliğindeki (BM) şiddetini MV enjekte edilmemiş naif fareye göre göstermektedir. Şekil 4.15B aynı grupların 2'şer fareden elde edilmiş floresan şiddet ölçümü ortalamalarını (MFI) göstermektedir.



Şekil 4.15. CFSE işaretli MV1'lerin i.p enjeksiyon sonrası biyodağılımları. (A) 100 µg CFSE işaretli kommensal MV1'inin 2'şer fareye enjeksiyonundan 4 saat (kırmızı) veya 24 saat (mavi) sonra floresan sinyal dalak, periton hücreleri (PEC), mezenterik lenf düğümleri (LN) ve kemik iliği hücrelerinden (BM) akış sitometre ile belirlenmiş ve sonuçlar naif fare düzeyleri (siyah) ile karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. (B) 2 fareden elde edilen floresan şiddet ortalamalarının dalak, PEC, LN ve BM'ye göre dağılımları gösterilmiştir.

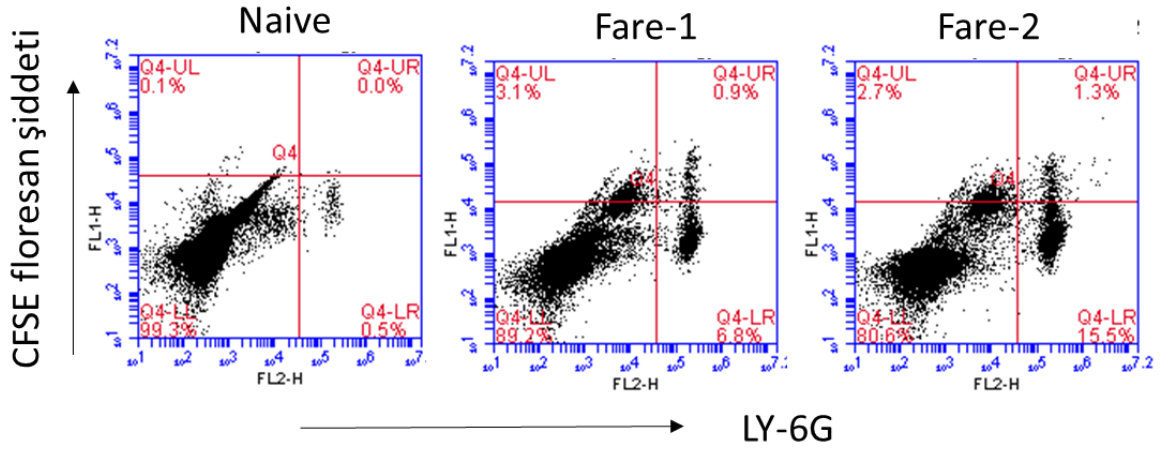
Şekil 4.15'ten de anlaşılacağı gibi kommensal kökenli MV1'lerin büyük bir çoğunluğu 4 saat içerisinde PEC hücrelerinde toplanmakta ve sinyal 24 saatte kaybolmaktadır. dalak ve LN'lerde de 4 saatte PEC'lere göreceli olarak çok daha az da olsa sinyal görülmekte ve 24 saatte yine azalma gözlenmektedir. MV'lerin 4 veya 24 saatte kemik iliğine gitmedikleri anlaşılmaktadır.

Peritonda bulunan hücre tiplerine göre MV1'lerin hücre içine alımları da 4 ve 24 saat grubunda incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.16. i.p enjeksiyondan 4 ve 24 saat sonra PEC'te MV'lerle etkileşen hücre tiplerinin analizi.

Şekil 4.16, enjeksiyondan 4 saat sonra MV1'lerle etkileşen hücre gruplarının bir kısmının MHC Sınıf II molekülü ifade ettiklerini ve bunlardan bir kısmının B220+ B hücreleri olduklarını göstermektedir (üst ve alt paneller). Ancak MV'leri içlerine alan ve MHC Sınıf II ifade etmeyen hücrelerin de çoğunlukta olduğu görülmektedir. Yani MV'lerle etkileşen hücrelerin önemli bir kısmının klasik antijen sunum hücresi olmadıkları anlaşılmaktadır. Bu hücrelerin hangi hücreler olduğuna yönelik ek yüzey belirteçleri kullanılmış ve MV'lerle etkileşen peritondaki hücrelerin çoğunluğunun Ly-6G ifade ettikleri gözlenmiştir (Şekil 4.17).



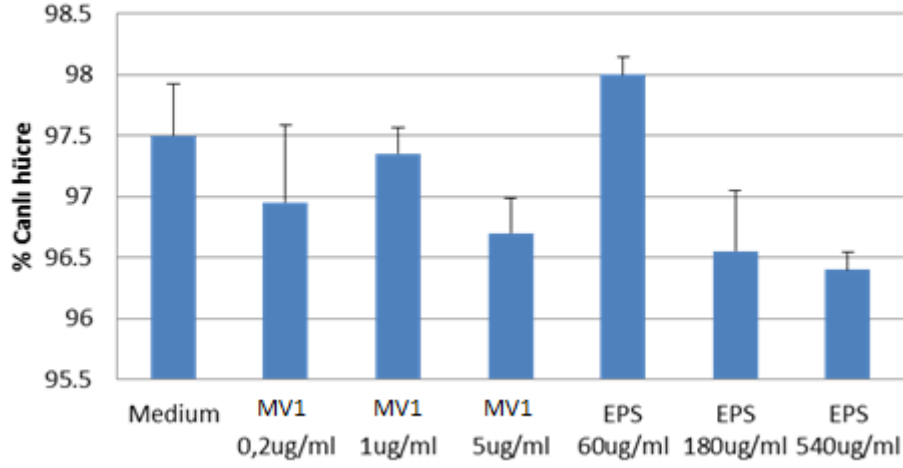
Şekil 4.17. *i.p* enjeksiyondan 4 saat sonra PEC'te MV'lerle etkileşen ana hücre tipinin analizi.

Ly6-G yüzey belirteçi temel olarak nötrofillerce ifade edilirler. Ayrıca nötrofillerin MHC Sınıf II molekülü ifade etmedikleri de bilinmektedir. Şekil 4.16 ve 4.17'den elde edilen bilgiler ışığında *in vivo* ortamda *ip* enjeksiyonu sonunda MV'lerin en çok nötrofillerce tanınıp bu hücrelerce internalize edildiğini önermektedir.

4.7. MV'lerin sitotoksisite tayinleri:

Sitotoksisite tayini için fare kemik iliği hücreleri toplanmış ve bu hücreler 1 hafta boyunca L929 hücre hattı kültür sıvısında bekletilerek kemik iliğinden başkalaşmış makrofaj (BMDM) eldesi gerçekleştirilmiştir. BMDM'ler farklı doz MV1'lerle 24 saat boyunca inkübe edilmiş, bu sürenin sonunda hücrelerin canlılığı propidium iodid boyamasıyla belirlenmiştir. Bu deneylerde ayrıca kommensal MV'lerinden saflaştırılan ve MV'lerin yapısında var olduğu düşünülen egzopolisakkaritler de kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.18'de gösterilmiştir.

BMDM



Şekil 4.18. Farklı doz MV1'lerle inkübe edilmiş kemik iliği kökenli fare makrofajlarındaki canlılık oranları. Örnekler üçlü kuyucuklarda çalışılmıştır.

Yukarıdaki bulgulardan da anlaşılacağı üzere MV'lerin makrofajlar üzerinde kayda değer bir sitotoksik etkileri gözlenmemiştir.

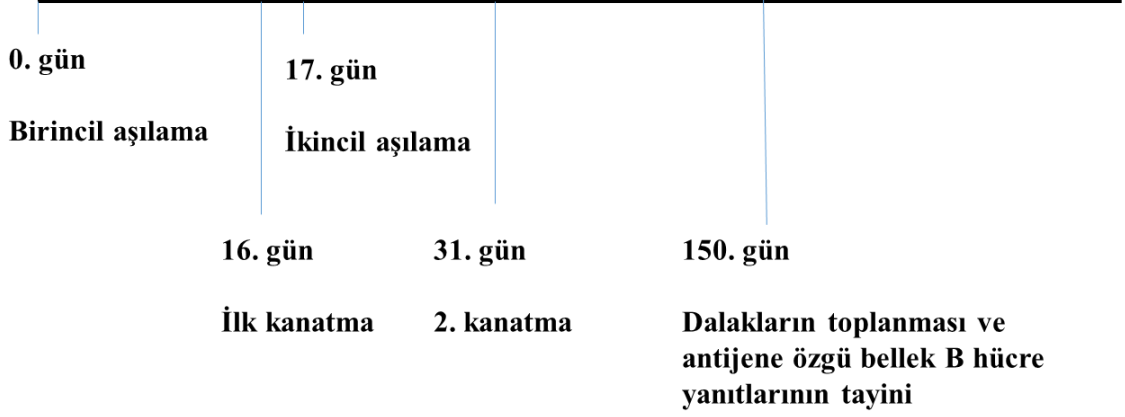
4.8. MV'lerin adjuvant olarak kullanıldığı fare aşı deneyleri:

E.coli ve kommensal kökenli MV'lerin immün sistem üzerindeki etkileri model aşı olarak adjuvantsız şap aşısı kullanılarak test edilmiştir. Aşılamada kullanılan temel yaklaşım Şekil 4.19'da özetlenmiştir.

Aşılama çizelgesi

5 fare/grup

Şap serotip O antijen dozu : 3µg/fare
MV dozu: 10µg/fare



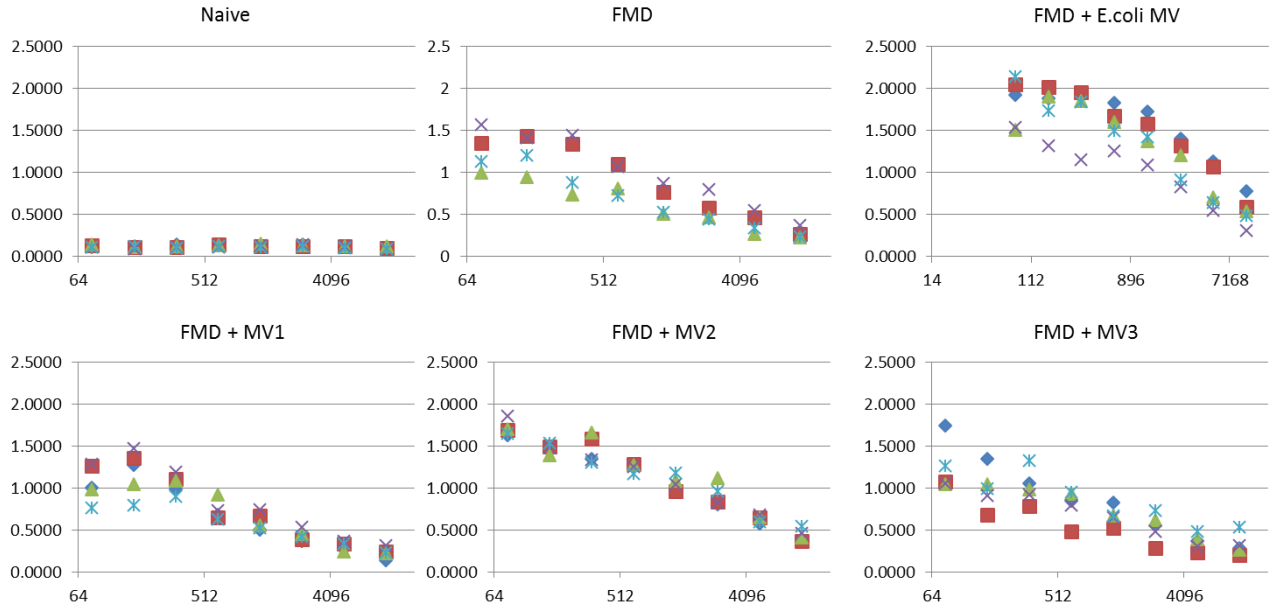
Şekil 4.19. Kommensal ve *E.coli* kökenli MV'lerin aşılama çalışmalarındaki aşılama çizelgesi ve bilgileri.

Aşılama çalışmalarında 3 farklı tip kommensal kökenli MV (MV1, MV2 ve MV3) ile *E.coli* kökenli MV'ler karşılaştırılmıştır. Kısaca, Balb/c fareler her grupta en az 5 fare olacak şekilde 0 ve 14. günlerde aşağıda gösterilen gruplara göre 3 µg/fare adjuvant içermeyen monovalent inaktive şap aşısı (FMDV) ve 10 µg/fare MV preparatı kullanılarak intraperitoneal olarak aşılanmıştır:

1. Sadece Saline (Aşısız, Kontrol Grubu)
2. FMDV
3. FMDV + *E.Coli* MV
4. FMDV + MV1 (Pediokok suş1)
5. FMDV + MV2 (Laktobasil suş2)
6. FMDV + MV3 (Laktobasil suş3)

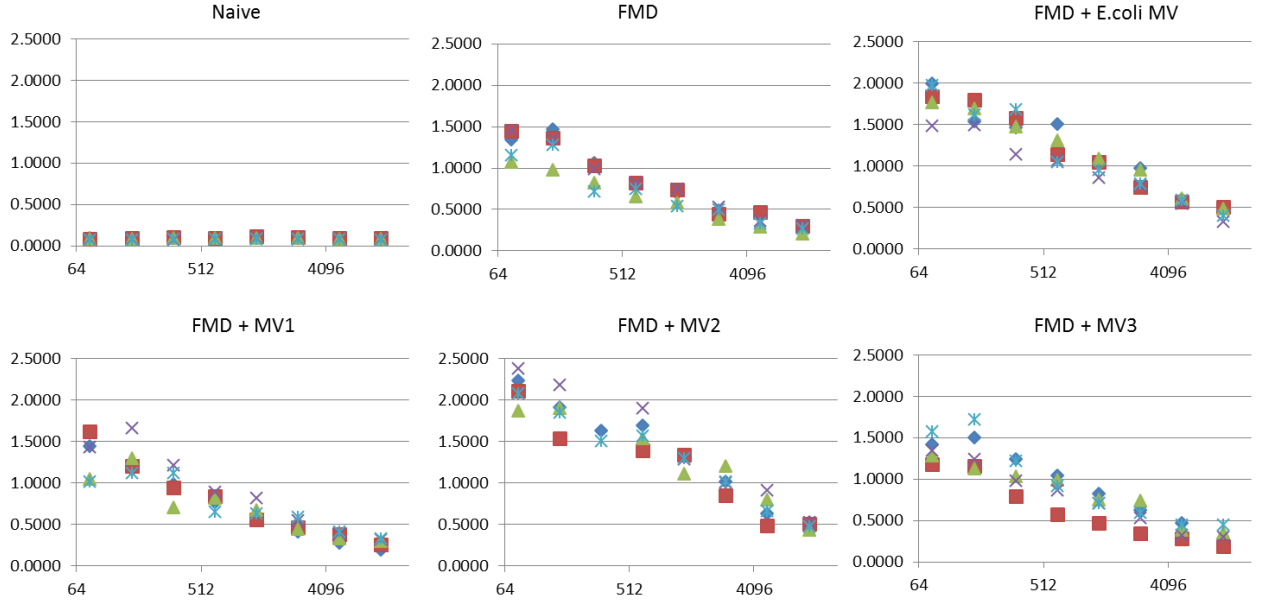
27. günde toplanmış serumlardan anti-FMDV total IgG, IgG1 ve IgG2a titreleri FMDV O-antijeni ile kaplanmış mikroplakalarda ELISA yöntemiyle tayin edilmiştir. Bu ikincil antikor yanıtları deneyde kullanılan her bir fare için Şekil 4.20 (anti-FMDV total IgG), Şekil 4.21 (anti-FMDV IgG1) ve Şekil 4.22'de (anti-FMDV IgG2a) gösterilmiş, bu deneylerden elde edilen ortalama sonuçlar ise Şekil 4.23'de özetlenmiştir.

Şap serotip O antijenine özgü ikincil total IgG yanıtları



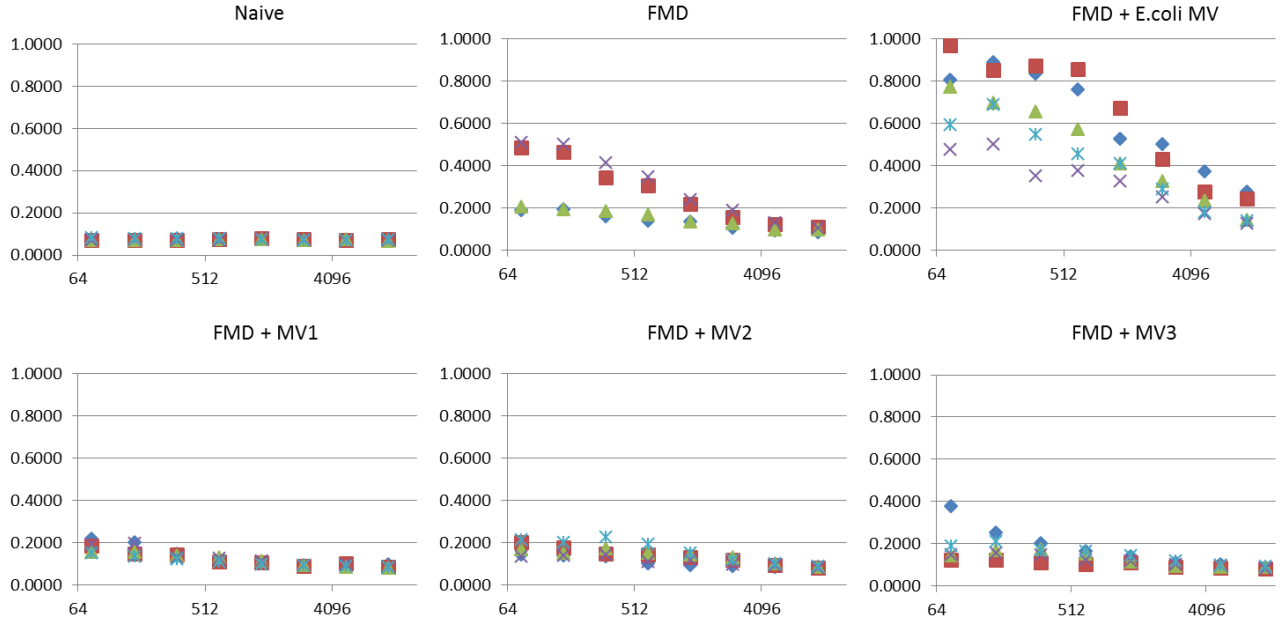
Şekil 4.20. İmmünizasyon gruplarına göre ELISA ile tayin edilen anti-FMDV total IgG yanıtları. 405 nm de okunan renk değişimi seri seyreltilen serumlara karşı her bir fare için gösterilmiştir.

Şap serotip O antijenine özgü ikincil IgG1 yanıtları



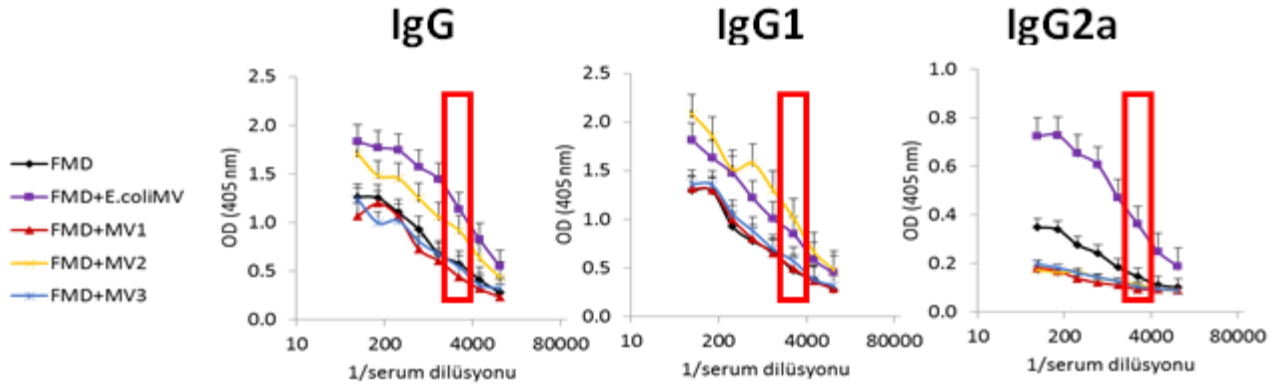
Şekil 4.21. İmmünizasyon gruplarına göre ELISA ile tayin edilen anti-FMDV IgG1 yanıtları. 405 nm de okunan renk değişimi seri seyreltilen serumlara karşı her bir fare için gösterilmiştir.

Şap serotip O antijenine özgü ikincil IgG2a yanıtları

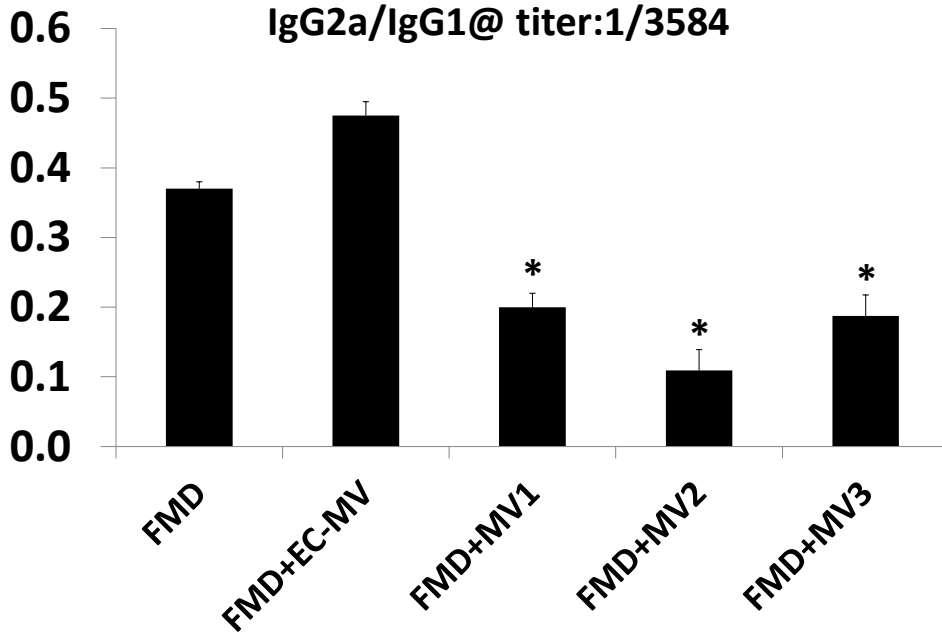


Şekil 4.22. İmmünizasyon gruplarına göre ELISA ile tayin edilen anti-FMDV IgG2a yanıtları. 405 nm de okunan renk değişimi seri seyreltilen serumlara karşı her bir fare için gösterilmiştir.

A)



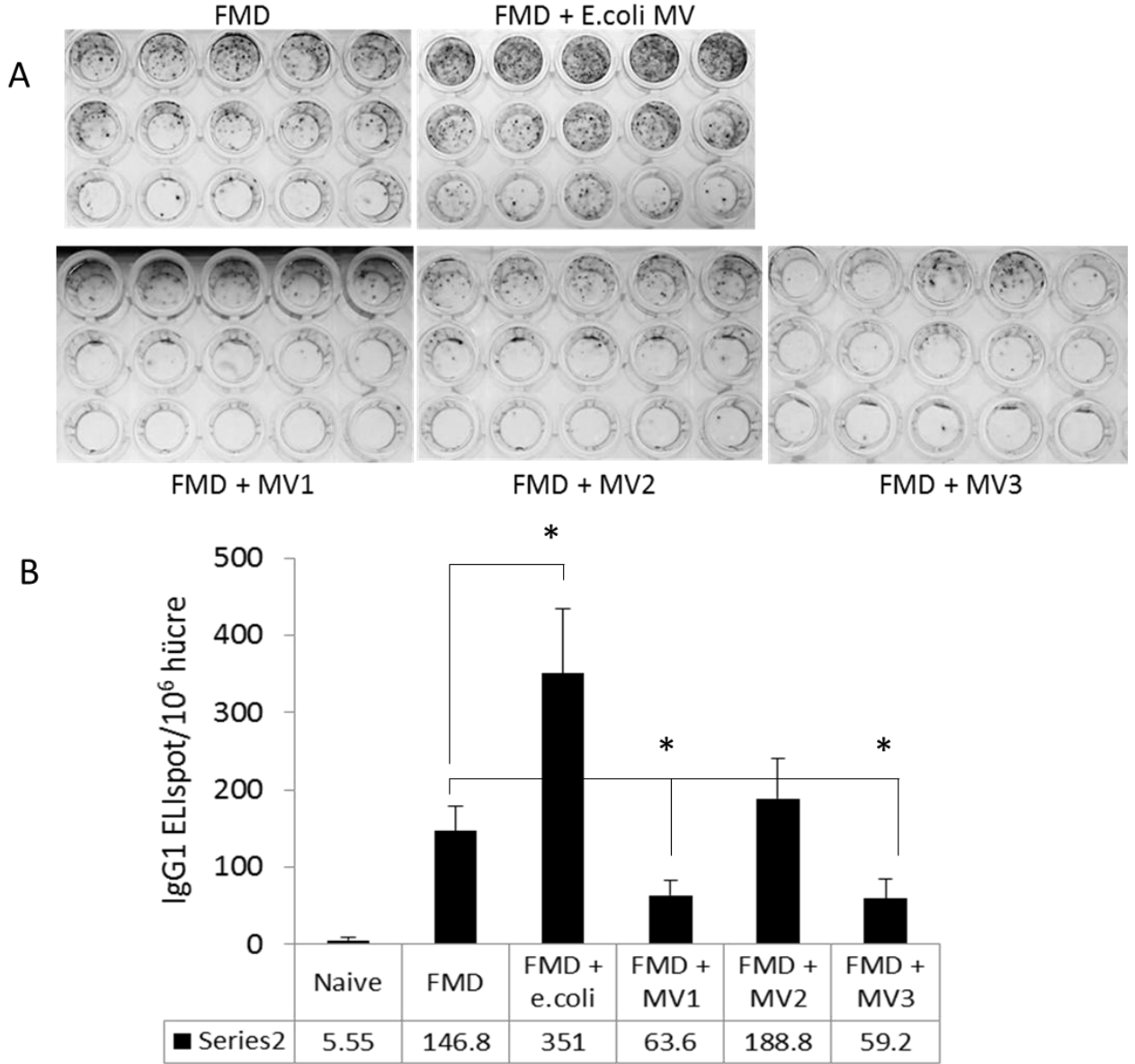
B)



Şekil 4.23. Tüm gruplardan elde edilen ortalama anti-FMDV total IgG, IgG1 ve IgG2a yanıtları (A). 1/3584 titrede elde edilen IgG2a/IgG1 oranları (B). (FMD grubuna oranla *0.05<P)

Şap aşısı çalışmalarını özetleyecek olursak, yukarıda sunulan sonuçlara göre E.coli MV'lerinin adjuvansız şap aşısına göre serotip O antijeni spesifik total IgG, IgG1 ve IgG2a yanıtlarını arttırdığı ve dolayısıyla immün stimulan özelliklere sahip bir adjuvan olarak etki oluşturduğu gözlenmektedir. E.coli MV'lerinin özellikle IgG2a antikor yanıtında çok etkin olduğu ve dolayısıyla Th1 tipi immün yanıtı tetiklediği gözlenmiştir. Buna karşın tüm komensal kökenli MV'lerin şap aşısına karşı gelişen IgG2a yanıtını baskıladıkları görülmüştür (Bkz. şekil 4.23B). Bu sonuçlar komensal MV'lerin E.coli MV'lerinin aksine immün uyarıcı değil de daha çok baskılayıcı etkilerinin olduğunu önermektedir. Şap aşısına özgü ise özellikle Th1 tipi immün yanıtın etkinliğini IgG2a'yı baskılayarak düşürmektedir.

MV'lerin ,aşılama en önemli özelliklerden olan bellek B-hücresi gelişimine ait etkisini de aşılama 5 ay sonra test ettik. Aşılama farelerde şap aşısına özgü bellek B-hücre düzeyi ELISPOT yöntemiyle ölçülmüştür. Bu sonuçlar Şekil 4.24A ve 4.24B'de gösterilmiştir.



Şekil 4.24. Şap aşısı serotip O antijenine karşı gelişen bellek B hücre yanıtları. (A) Her bir aşı grubundaki bellek hücre ELISPOT'ları yüksekten düşüğe doğru 3 farklı doz hücre konsantrasyonu için (üst, orta ve alt kuyucuklar) gösterilmiştir. Her gruptan 5 farenin yanıtları yan yana sıralanmıştır. (B) 5 fareden elde edilen grup ortalamaları \pm SD gösterilmiştir.

Antikor yanıtları ile B-hücre verileri göz önüne alındığında birbirlerini destekler bir sonuç ortaya çıkmaktadır. Yine beklendiği ve bilindiği gibi, E.coli MV'lerinin immün uyarıcı özelliği sebebiyle antijene özgü bellek B-hücre oluşumunun düzeyini istatistiksel anlamlı bir biçimde artırdığı görülmüştür. Özellikle komensal MV'lerden MV1 ve MV3'ün bellek B-hücre sayılarını serbest FMDV aşısına göreceli olarak istatistiksel anlamlı bir biçimde baskılamıştır. MV2 Ecoli MV'leri gibi davranmasa da MV1 ve MV3'ten daha etkin uyarıcı biçimde davranmıştır.



Yukarıdaki bu sonuçlar beraber değerlendirildiklerinde E.coli MV'lerinin hayvan aşılarda kullanılabilir iyi bir immün uyarıcı ve Th1'i destekler tür adjuvan özelliklerine sahip olduklarını önerirken, bazı komensal MV'lerin ise immün düzenleyici etkilerinin bulunduğu ve özellikle Th1 tipi immün yanıtı baskılayacak karakterde olduğunu düşündürmüştür. Belki de ileride bu tip MV'lerin, anti-enflamatuvar etkinin önemli olduğu hastalık durumlarında kullanım alanı bulabilecek potansiyele sahip bir adjuvan olarak uygulanması olası olacaktır.

Bir diğer model olarak komensal kökenli MV'lerin immün sistem üzerindeki etkileri EG7 fare timoma modeli kullanılarak test edilmiştir. OVA protein immunizasyonunu takiben farelere EG7 hücre hattı verilerek OVA yanıtına has anti-tümör yanıt incelenmiştir. Bu model test edilirken MV'ler ile birlikte 3',5' – siklik diguanilik asit (c-di-GMP) tehlike molekülü yüklenerek etkileri incelenmiştir.

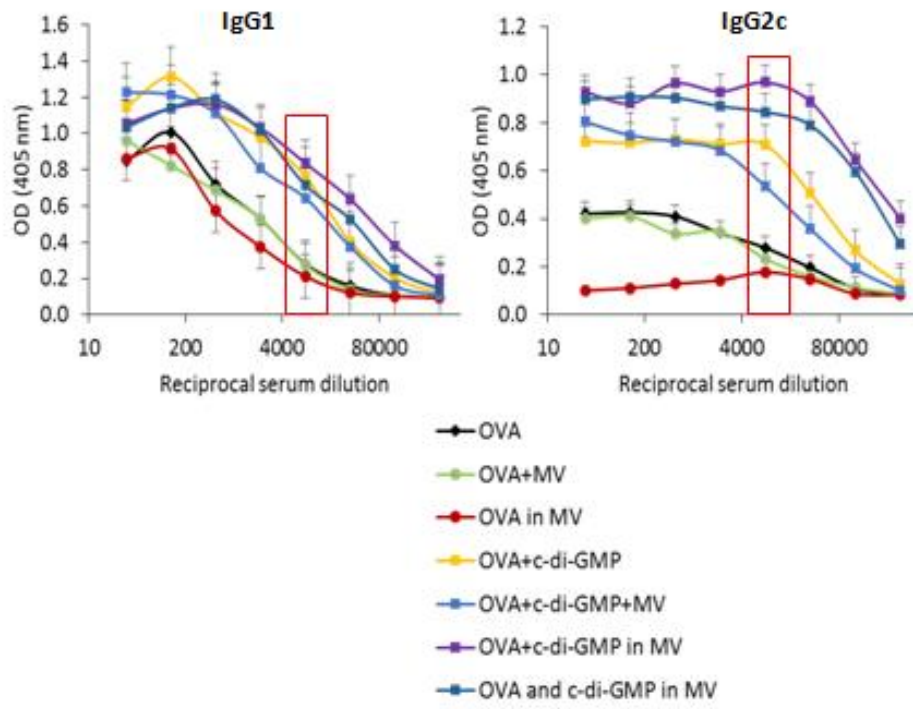
Aşılama çalışmalarında seçilen 1 komensal kökenli MV'nin (MV1) farklı kompleksleri test edilmiştir. Kısaca, C57BL/6 fareler her grupta en az 5 fare olacak şekilde 0 ve 14. günlerde aşağıda gösterilen gruplara göre 7.5 µg/fare OVA model antijeni, 15µg/fare c-di-GMP molekülü ve 10 µg/fare MV preparatı kullanılarak intraperitoneal olarak aşılanmıştır:

1. OVA (7.5 µg/fare)
2. OVA (7.5 µg/fare) + MV1 (10 µg/fare)
3. OVA (7.5 µg/fare) MV1 içerisinde tutuklanmış (10 µg/fare)
4. OVA (7.5 µg/fare) + adjuvant (cyclic-di-GMP; 15 µg/fare)
5. OVA (7.5 µg/fare) + (cyclic-di-GMP; 15 µg/fare) + MV1
6. OVA (7.5 µg/fare) + (cyclic-di-GMP MV1 içerisinde tutuklanmış 15 µg/fare)
7. Hem OVA (7.5 µg/fare) hem cyclic-di-GMP (15 µg/fare) MV1 içerisinde tutuklanmış

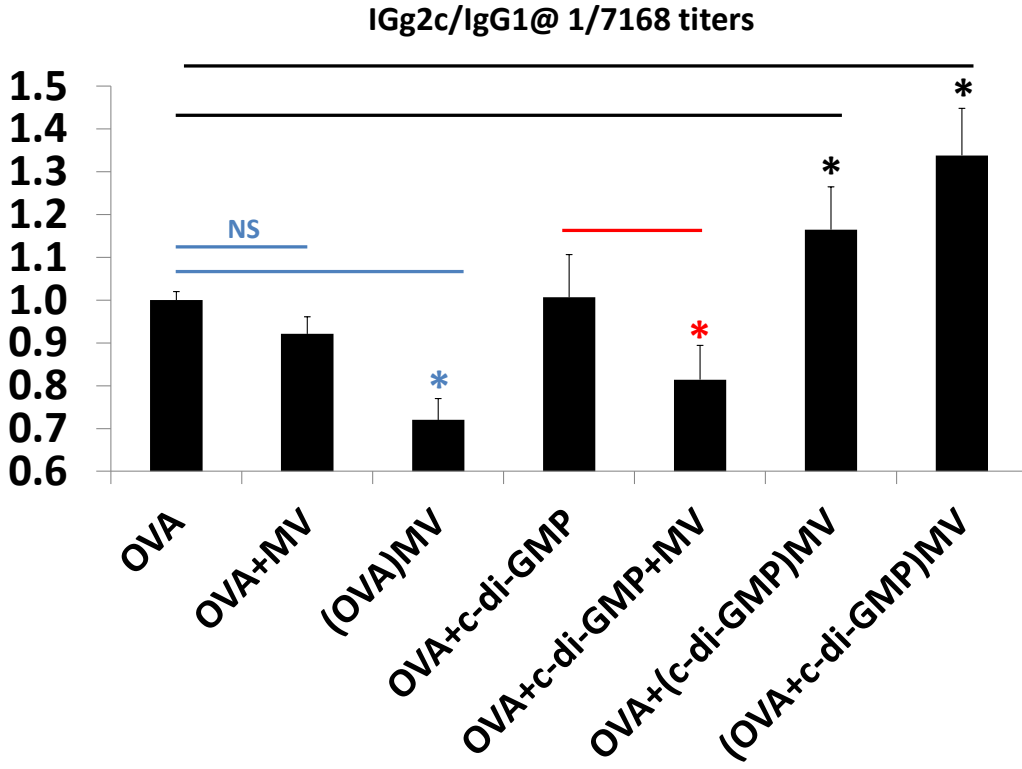
27. günde toplanmış serumlardan anti-OVA IgG1 ve IgG2c titreleri OVA antijeni ile kaplanmış mikropalakalarda ELISA yöntemiyle tayin edilmiştir. Bu ikincil antikor yanıtları deneyde kullanılan her bir fare için Şekil 4.25'de (anti-OVA IgG1, IgG2c) gösterilmiştir.

OVA model antijenine özgül ikincil IgG1 ve IgG2c yanıtları

A)



B)



Şekil 4. 25. İmmünizasyon gruplarına göre ELISA ile tayin edilen anti-OVA IgG1 ve IgG2c yanıtları (A). Th1 yanıtının düzeyini anlamak için IgG2c/IgG1 oranlarının 1/7168 titredeki çizimi (B). 405 nm de okunan renk değişimi seri seyreltilen serumlara karşı her bir fare için gösterilmiştir. (*0.05<P, NS: istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır)

Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, Ovalbüminle (OVA) aşılanmış farelerde MV'lerin anti-OVA IgG2c antikor cevabını baskıladığı gözlemlendi. Aynı MV'lerin içlerine immün uyarıcı karakterde c-di-GMP ligantı yüklendiğinde ise güçlü bir immün adjuvant etkisi gösterdiği belirlendi.

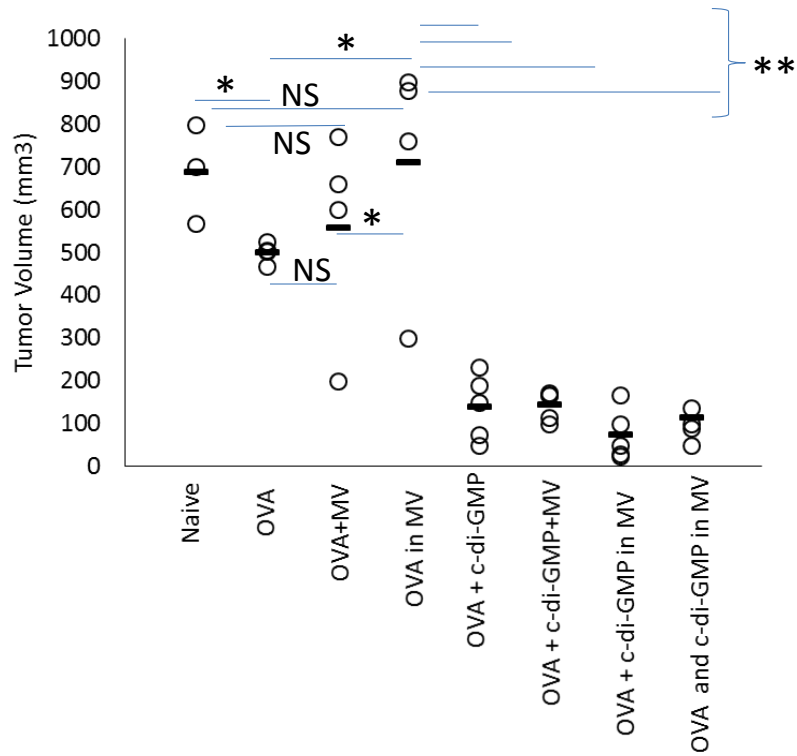
İlk aşlamayı takiben 30. günde immünizasyon sonrası oluşan OVA-spesifik immün yanıtın tümör oluşumu üzerindeki etkisini gözlemlemek için E.G7-OVA fare timoma hücre hattı ile tümör inokülasyonu başlatılmıştır. EG7 hücre hattının sırt bölgesine derialtı enjeksiyonu takiben her 3 günde bir ölçümler yapılmış, tümör hacmi (mm³ cinsinden) eğrileri kullanılarak değerlendirilmiştir.

Şekil 4.26'dan da anlaşıldığı üzere MV'ler tümör oluşumunu şiddetlendirirken, c-di-GMP ile yüklenmiş keseciklerin tümörden koruduğu gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada sadece MV1 kullanılmıştır. Grup # 2 ve #3 MV1 ile OVA antijenini içeriyor. Yani bu gruplarda OVA, ya MV ile karıştırılıp enjekte edilmiştir (Gr#2), ya da OVA önce MV'lerin içine yüklenerek hayvanlara enjekte edilmiştir (Gr#3). Buradaki çalışmadan da görüleceği gibi, sadece antijen ile MV1 kullanıldığında (Lütfen: şekil 4.25 ve 4.26'daki Gr#2 ve Gr#3 vs Gr#1 verilerini karşılaştırınız) tümör boyutu OVA grubundan daha yükseğe çıkmaktadır.

Sanki aşısız hayvanlar gibi tümör boyutları oluşmaktadır. Aynı zamanda Th1 yanıtı da gerilemektedir (Bkz. 4.25B). Bu da MV1'in immün baskılayıcı davranabildiğini önermektedir. Öte yandan immün uyarıcı c-di-GMP + OVA + MV1 karıştırılarak birlikte kullanıldığında (Gr#4), MV1 yine baskılayıcı olarak davranmaktadır.

A



B



Şekil 4. 26. OVA ile aşılanmış farelerin EG7 fare timoma hücre hattı ile uyarımından 14 gün sonraki tümör hacimleri. Tümör boyutları mm^3 olarak sunulmuştur (en x boy x yükseklik olmak üzere kaliper ile iki günde bir ölçülmüştür). (A) Her bir farenin tümör hacmi (o) ve grupların ortalama tümör hacimleri (-) gösterilmiştir. (B) Temsili olarak OVA kontrol grubu ve OVA MV1 içerisine tutuklanmış grubun fotoğrafları gösterilmiştir. (* $0.05 < P$, ** $0.01 < P$, NS: statistiksel olarak farklı değil)

Ancak MV1'in içine immün uyarıcı c-di-GMP+OVA birlikte yükleyince c-di-GMP sayesinde bu "baskılayıcı" karakter yerine "immün uyarıcı" karaktere dönüşmektedir. Bu nedenle de MV'ler immün düzenleyici olarak davranmaktadır.

Yani bir başka deyişle, aşılama sonrası oluşan OVA-spesifik, sitotoksik T-lenfosit hücreleri yeterince etkin ve efektör hücre haline dönüşebildiğinden, bu ajanlarla aşılanmış fareler tümör challenge'dan korunabilmişlerdir. Bunun yanında MV'lerin model tümör antijeni OVA ile birlikte kullanıldığı durumlarda MV1'in OVA'ya özgü anti-tümör immüniteyi geliştirmesi sağlanamadığından (immün baskılayıcı karakteri nedeniyle) tümör oluşumunu geciktirmek veya engellemek bir yana oluşum düzeyini tetiklediği gözlenmiştir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, mikrobiyotanın immün sistem üzerindeki düzenleyici etkisini göz önünde bulundurarak komensal kökenli bakterilerin ürettiği keseciklerin immün etkilerinin özelliklerini belirlemeyi amaçladık. Komensal kökenli keseciklerin büyük bir çoğunluğunun E.coli'den salgılanan keseciklerden (~ 200 nm) göreceli olarak daha büyük oldukları (~ 200-400 nm) ve tüm MV'lerin yaklaşık -40 mV civarında eksi yüklü yüzeye sahip olduğunu belirledik.

Gr+ ve Gr- Bakteri kökenli MV'lerin DNA ve RNA kökenli nükleik asitleri değişik düzeylerde içeriklerini belirledik. İleriki safhalarda planlanacak çalışmalarla, MV nükleik asit içeriklerinin bakteri tipine göre büyük değişkenlik göstermesi ile immün düzenleyici etkilerinin düzeyi ilişkilendirilmeye geçecek niteliktedir. Gr+ ve kontrol sus Gr- E.Coli MV'lerinin immün sistem üzerine nasıl etki oluşturduklarının belirlenmesi amacıyla yapılan deneylerde fare dalak hücreleri farklı doz MV'lerle uyarılmış salgılanan farklı sitokin ve ifadesi değişen bazı yüzey belirteçleri analiz edilmiştir. Bunların sonucunda E.coli kökenli keseciklerin en düşük dozda kullanıldıklarında bile immün uyarıcı davranarak değişik Th1 ve pro-enflamatuvar kökenli sitokinleri (özellikle düşük dozlarda) komensal kökenli keseciklere oranla daha yüksek düzeyde salgılattığı gözlenmiştir. Dolayısıyla bu veriler, E.coli MV'lerinin, komensal MV'lerden daha güçlü immün uyarıcı etkilere sahip olduğunu önermektedir ve aşı ya da anti-kanser uygulamalarda immün tedavi edici potansiyel ajan olarak kullanımı mümkündür.

E.coli ve komensal kökenli MV'lerin antijen sunum hücreleri üzerindeki etkilerinin birbirlerine zıt olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar bazı komensal MV'lerin immün düzenleyici etkilerinin olabileceği ihtimalini göz ardı etmememizi önermektedir.

MV'lerin hücre içine alınımını belirlemek üzere yapılan çalışmalarda ise MV'lerin temel aldığı bakteri suşundan bağımsız ancak doza bağımlı hücrelerce internalize edildiği belirlenmiş ve B220+ B hücre popülasyonuna ek olarak Ly6-G+ nötrofillerin de MV'leri etkinlikle internalize edebildikleri ve ayrıca in vivo'da MV'lerin kayda değer bir sitotoksik etkilerinin bulunmadığı belirlenmiştir.

Çalışmamızın en çarpıcı verileri ise MV'lerin aşı adjuvanı olarak kullanıldığı deneylerin sonucunda elde edilmiştir. E.coli MV'lerinin hayvan aşılarında kullanılabilir immün uyarıcı ve Th1 yanıtını destekleyen güçlü bir adjuvant özelliklerine sahip olduğunu belirlerken, çalışmada kullanılan pediokok kökenli MV'lerin (MV1) ve laktobasil kökenli MV'lerin (MV2 ve MV3), E.Coli MV'lerinin



aksine bu özelliklere sahip olmadığı belirlenmiştir, ve Th1 yanıtını baskılayabilecek nitelikte olduğu gözlenmiştir.

Son çalışmalarımız da ise EG7 fare timoma modelinin sonucunda sadece pediokokdan elde edilen MV1'lerin model tümör antijeni OVA'ya özgü anti-tümör immün yanıt oluşturmakta başarısız olduğunu, buna bağlı olarak tümör oluşumunu engellemek yerine tam aksine tetiklediğini belirledik.

Bu sonuçlar, bazı kommensal bakterilerden salgılanan keseciklerin E.coli kesecikleri kadar potent olmasalar da immün uyarıcı, bazı keseciklerin de immün baskılayıcı etkileri olma ihtimalini önermektedir.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. MAYDA GÜRSEL
Proje No:	113S305
Proje Başlığı:	Bakterilerden Salgılanan Nanokeseciklerin İmmün Stimulan Özelliklerinin Belirlenmesi ve İmmünoterapötik Uygulamaları
Proje Türü:	Uluslararası
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. FEN-EDEBİYAT F. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/10/2013 - 15/10/2015
Onaylanan Bütçe:	265650.0
Harcanan Bütçe:	238628.25
Öz:	<p>Hücre-dışı membran keseciği salgılanma olgusu, arkeler, bakteriler ve ökaryotlar dahil olmak üzere tüm hücreyel yaşam türlerinde gözlenen ortak bir özelliktir. Gram negatif bakteri kökenli dış membran keseciklerinin hastalık patogenezinin katkısına dair çok sayıda çalışma olmasına rağmen kommensal bakterilerin bu tür kesecikler salgılayıp salgılamadıkları henüz bilinmemektedir. Mikrobiyotanın immün homeostaz düzenlemesindeki önemi bilindiğinden bu çalışmada 5 farklı insan kommensal bakteri izolatının salgıladığı keseciklerin immüdüzenleyici etkilerini E.coli kökenli dış membran kesecikleriyle karşılaştırmalı olarak incelemeyi hedefledik. AKM mikroskopisi, dinamik ışık saçınımı ve zeta potansiyeli ölçümleri kommensal kökenli membran keseciklerinin (MV?ler) yaklaşık 50-300 nm ebatlarında ve yüksek eksi yük yoğunluğuna (-40 mV) sahip olduklarını gösterdi. Kommenal MV?lerle uyarılan fare dalak hücrelerinin E.coli keseciklerinin aksine daha az miktarda pro-enflamatuar sitokin (IFN? ve TNF?) ve daha yüksek miktarda IL-10 salgıladıkları bulundu. Aynı şekilde kommensal kökenli MV?ler antijen sunum hücresi olgunlaşmasında etkisiz kaldılar. E.coli keseciklerinin aksine kommensal kökenli keseciklerin varlığında inaktive şap aşısı ile aşılanmış farelerdeki şapa özgü IgG2a yanıtlarında baskılanma olduğu gösterildi. Aynı şekilde kommensal kökenli MV?lerin OVA antijeni ile aşılanmış farelerdeki anti-OVA antikor yanıtında azalmaya ve EG.7 tümör hücresi uygulama sonrası tümör gelişiminde şiddetlenmeye yol açtıkları, Th-1 ağırlıklı enflamatuar yanıtı azalttıkları gözlemlendi. Bu sonuçlar, insan kommensal kökenli membran keseciklerinin güçlü immün düzenleyici etkilere sahip olduklarını ve yeni tip anti-enflamatuar ajanlar olarak terapiye yönelik potansiyel uygulamalarının olabileceğini göstermektedir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Membran kesecikleri, kommensal bakteriler, immün düzenleme, aşı adjuvantı?
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır