



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LENTİVİRAL MYDGF ÜRETİMİ, ÇOĞALTILMASI VE
İLETİMİ**

MUSTAFA CAN KİREN

TIBBİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL – 2019



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LENTİVİRAL MYDGF ÜRETİMİ, ÇOĞALTILMASI VE
İLETİMİ**

MUSTAFA CAN KİREN

TIBBİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL – 2019

TEZ ONAY FORMU

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Fizyoloji
Tez Sahibi : Mustafa Can KİREN
Tez Başlığı : Lentiviral MYDGF Üretimi, Çoğaltılması ve İletimi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Kampüs
Sınav Tarihi : 10.06.2019

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Prof.Dr. Ertuğrul KILIÇ

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Ülkan KILIÇ

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Dr.Öğr.Üyesi Ahmet Burak ÇAĞLAYAN İstanbul Medipol Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun **11.06/2019** tarih ve **2019/18-03** sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.



BEYAN

BEYAN

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

Mustafa Can KİREN



TEŞEKKÜR

Eğitim hayatım boyunca karşılaştığım her tŸrlŸ soruna kendi sorunuymuş gibi çŸzŸm arayan, yoğun iř temposu olmasına rağmen değerli vaktini bana ayırarak, hořgŸrŸ ile bana destek olan, bilgi ve tecrŸbeleriyle bana yol gŸsteren, bilimsel uyarı ve ōnerilerinden yararlandığım danışman hocam Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ'a

Kariyer hayatıma yŸn vermem konusunda bana yol gŸsteren ve beni bu konuda her daim motive eden ŐzgŸr şAHİN, Deniz ATASOY ve NilŸfer ATASOY'a

Çalışma sŸrecinde bana hem fiili hem de manevi desteklerini esirgemeyen arkadaşım Aysun ÇAğLAYAN'a

Bu sŸreci benimle beraber yaşamış ve hayatımın her anında her konuda yanımda olduğunu hissettiren eşim Gizem KİREN'e

Beni ben yapan, her dŸřtŸđŸmde bana el uzatıp tekrar denemem konusunda bana destek olan ve motive eden, maddi manevi her zaman yanımda olan kardeşim Kutay KİREN, annem Ayře KİREN ve babam Mustafa KİREN'e

En içten duygularımla teřekkŸr ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİL VE TABLOLAR LİSTESİ	vi
1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT.....	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Gen tedavisi.....	5
4.2.Gen Tedavisi Tarihi.....	6
4.3. Gen tedavisinin sınıflandırılması.....	7
4.3.1. Ex vivo gen tedavisi.....	7
4.3.2. İn vivo gen tedavisi.....	8
4.3.2.1. Somatik Hücre Gen Terapisi.....	9
4.3.2.2. Eşey Hücresi Gen Tedavisi	10
4.4. Vektörler.....	11
4.4.1. Viral olmayan vektörler	11
4.4.1.1. Viral Olmayan Vektörlerin Kullanmanın Gerekçesi.....	12
4.4.1.2.Viral Olmayan Gen transferinde teknik zorluklar ve sınırlamalar.....	13
4.4.1.3. Viral olmayan vektör çeşitleri	13
4.4.1.4. Viral olmayan gen tedavisi için fiziksel vektörler	16
4.4.1.5. Viral olmayan gen tedavisi için kimyasal yöntemler.....	19
4.4.2. Viral Vektörler.....	21
4.4.2.1. Retrovirüsler.....	21
4.4.2.2. Adenovirüs	21
4.4.2.3. Adeno-ilişkili virüsler [AAV].....	22
4.4.2.4. Herpes simpleks virüsleri (HSV)	22
4.5. Lentiviral vektörler.....	24
4.5.1. Lentiviral vektör sistemleri.....	25
4.5.2. Vektör üretimi için kullanılan hücresel hatlar	26
4.5.3. Lentiviral vektör üretimi.....	27

4.5.4. Lentiviral vektör saflaştırma	30
4.6. Miyeloid kaynaklı büyüme faktörü (MYDGF)	31
5. MATERYAL VE METOT	32
5.1. Materyaller	32
5.1.1. Kullanılan Kimyasallar	32
5.1.2. Kullanılan Ekipman ve Cihazlar	32
5.2. Metot	33
5.2.1. MYDGF klonlama	33
5.2.1.1. cDNA'dan PCR yöntemiyle full length MYDGF amplifikasyonu	33
5.2.1.1.1. SH-SY5Y Hücre Kültürü	33
5.2.1.1.2 RNA İzolasyonu	34
5.2.1.1.3 RNA'dan cDNA Sentezi	34
5.2.1.1.4 PCR Reaksiyonu.....	35
5.2.1.2. Jel Elektforez ve Jel Ekstraksiyonu	36
5.2.1.3. Restriksiyon Enzimi ile Parçalama	37
5.2.1.4. Ligasyon.....	37
5.2.1.5. Plazmid Üretimi ve Transformasyon	37
5.2.1.6. Koloni seçimi ve doğrulaması.....	38
5.2.2. Pseudovirüs Üretimi	39
5.2.2.1. Lentiviral vektörlerin üretilmesi	39
5.2.3. Viral Transdüksiyon	39
5.2.3.1. Gereken Virüs Miktarının Hesaplanması.....	39
5.2.3.2 Hücre Ekimi	40
5.2.3.3 Transdüksiyon	40
6.ARAŞTIRMA BULGULARI	41
6.1. PCR Yöntemiyle cDNA Kullanılarak Çoğaltılmış MYDGF Geninin Jel Görüntüsü	41
6.2. Transformasyon Sonrası Oluşan Kolonilerin Seçimi ve Doğrulaması.....	41
6.3. Lentiviral Vektörlerin Üretilmesi	42
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	43
8. KAYNAKLAR	45
9.ÖZGEÇMİŞ	55

ŞEKİL VE TABLOLAR LİSTESİ

Şekil 4.1 Somatik hücrelere genaktarımını göstermektedir.....	9
Şekil 4.2 Eşey hücrelere gen aktarımı yapılmış ve yapılmamış bebekleri göstermektedir.....	10
Şekil 4.3 Plazmid Vektör Yapısı.....	14
Şekil 4.4 Katyonik Lipid, gen tedavisinde en çok kullanılan tipleri.....	15
Şekil 4.5 HSV Tip-1 vektör yapısı.....	23
Şekil 4.6 Virüsün vektöre dönüştürülmesi.....	23
Şekil 4.7 MLV ve HIV-1 genomunun şematik gösterimi.....	24
Şekil 4.8 Lentiviral sistemlerin şematik gösterimi.....	26
Şekil 4.9 10'lu tepsi sistemindeki paralel hücre kültürleri.....	28
Şekil 5.1 Plazmid Üretimi ve Transformasyon.....	38
Resim 6.1 PCR yöntemiyle cDNA kullanılarak çoğaltılmış MYDGF geninin jel görüntüsü.....	41
Resim 6.2 Transformasyon sonrası oluşan tüm koloniler ve içerlerinden seçilenler.....	41
Resim 6.3 HEK293T hücreleri lentiviral vektörünün olmadığı ışık mikroskopi görüntüsü.....	42
Resim 6.4 HEK293T hücrelerinin virüsü ürettiğine dair 48 ve 72 saat sonundaki hücre görüntüleridir.....	42
Tablo 5.1 PCR reaksiyonu komponentleri.....	35
Tablo 5.2 PCR reaksiyonu sıcaklık ve süreleri.....	36

1.ÖZET

LENTİVİRAL MYDGF ÜRETİMİ, ÇOĞALTILMASI VE İLETİMİ

Gen tedavisi, hastalığa sahip hücrelerde genetik bozuklukların düzeltilmesi amacıyla ilgili genlerin aktarımı olarak tanımlanan bir tedavi yöntemidir. Terapötik gen olarak adlandırılan tedavi edici bu genlerin aktarım amacı, mutasyon sonucu oluşan fonksiyon kayıplarını geri getirmek veya eksik olan gen ürününün ekspresyon seviyesini fizyolojik olarak normal seviyelere getirmektir. Ekspresyon artırma, bastırma veya gen onarma gibi ihtiyaçlara göre üretilen terapötik gen vektör adı verilen genetik materyali çeşitli hücrelere, dokulara ve tüm organlara taşıyan araçlar olan vektörler aracılığıyla yüklenmektedir. Gen tedavisinde taşıyıcı olarak rol alan vektörler viral ve viral olmayan vektörler olarak iki sınıfa ayrılır. Viral vektörler, viral olmayan vektörlere göre daha etkin bir gen tedavi fırsatı sunmaktadır. Lentiviral vektörler, güçlü transdüksiyon özelliklerine ve kararlı ifade yeteneklerine sahip olduklarından dolayı gen tedavisinde etkin yöntemlerden biri olarak kabul edilirler. En önemli özelliklerden biri ise sadece bölünen değil, bölünmeyen hücreleri de enfekte edebilme yetenekleridir. Miyeloid türevli büyüme faktörü (MYDGF) kemik iliği kaynaklı monositlerden/makrofajlardan salgılanan parakrin etkili bir proteindir. MYDGF, MAPK1 / 3-, STAT3- ve CCND1 aracılı sinyal yolları üzerinden endotel hücre çoğalmasını düzenler. PI3K / AKT'ye bağımlı sinyal yolağında ise kardiyak miyosit ölümünü inhibe eder. Bu tezde, miyokardiyal enfarktüs, romatoid artrit, hepatosellüler kanser gibi çeşitli hastalıklara tedavi seçeneği sunmak adına MYDGF'yi lentiviral vektör olarak üretmek, çoğaltmak ve hücreye aktarımını sağlamak amaçlanmıştır. Bu tez çalışmasında kullanılan MYDGF geni, SH-SY5Y hücre hattından elde edilmiştir. MYDGF, pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektörüne klonlanıp uygun paketlenme plasmidleri yardımıyla HEK293T hücrelerine verilerek lentiviral vektörü üretilmiş, çoğaltılmış ve hedef hücreye aktarımı sağlanmıştır. Bu çalışmadaki lentiviral vektör yardımı ile MYDGF geninin hücreye aktarılma yöntemi gelecekte yapılacak olan MYDGF geni ile ilgili hastalıkların gen tedavisi çalışmalarına yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Gen tedavisi, Lentiviral vektörler, MYDGF geni

2.ABSTRACT

LENTIVIRAL MYDGF PRODUCTION, REPRODUCTION AND TRANSMISSION

Gene therapy is a treatment that is defined as the transmission of genes of interest in order to correct genetic disorders in the cells with disease. The therapeutic purpose of these genes called therapeutic genes, is to restore functional loss resulting from mutation or to bring back the level of expression of the missing gene product to physiologically normal levels. The therapeutic gene produced according to needs such as expression enhancement, suppression, or gene repair is carried by vectors, which act like a vehicle to the genetic material transportation, into a variety of cells, tissues and all organs. These carrier vectors in gene therapy are divided into two classes as viral and non-viral vectors. Viral vectors offer a more efficient gene therapy compared to non-viral vectors. Lentiviral vectors are considered to be effective methods in gene therapy because of their strong transduction properties and stable expression abilities. One of the most important features is the ability not only to divide but also to infect non-dividing cells. Myeloid-derived growth factor (MYDGF) is a paracrine-effective protein secreted from bone marrow-derived monocytes / macrophages. MYDGF regulates endothelial cell proliferation through MAPK1 / 3-, STAT3- and CCND1 mediated signaling pathways. In the PI3K / ACT-dependent signaling pathway, it inhibits cardiac myocyte death. The aim of this thesis is to produce, reproduce and transfer the MYDGF as a lentiviral vector to provide treatment alternatives for various diseases such as myocardial infarction, rheumatoid arthritis, and hepatocellular cancer. The MYDGF gene used in this thesis was obtained from SH-SY5Y cell line. The MYDGF was cloned into the pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vector and delivered to HEK293T cells with the help of appropriate packaging plasmids, produced as lentiviral vector, amplified and transferred to the target cell. Thanks to this study, in future, the method of transferring the MYDGF gene to the cell with the help of the lentiviral vector will help the gene therapy for the patients with MYDGF generelated disease.

Keywords: Gene therapy, Lentiviral vectors, MYDGF gene

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Gen tedavisi, hastanın hücrelerini genetik olarak değiştirerek hastanın hastalık durumunu tedavi etmek veya sağlık durumunu iyileştirmek için kullanılan prosedür olarak tanımlanır (1). Hem kalıtsal hem de edinilmiş hastalıkların tedavisinde, terapötik bir gen materyali ve bununla ilişkili düzenleyici elementleri çekirdeğe ileterek benzersiz bir yaklaşım sağlar. Bu yaklaşımın nedeni mutasyonun neden olduğu fonksiyon kaybını düzeltmek veya eksik gen ürününün fizyolojik olarak normal seviyelerde ifade edilmesini sağlamaktır (2). Günümüzde tedavisi zor veya imkânsız olarak nitelendirilen birçok hastalığın, tek bir gende veya mutasyon nedeniyle bir dizi gende meydana gelen kusur nedeniyle meydana geldiği iyi belgelenmiştir.

Gen terapisi, enzim/protein replasman tedavisine alternatif olarak kabul edilir. İkame tedavinin karşılaştığı in vivo temizlenme veya üretim maliyeti gibi dezavantajları, gen terapisini çeşitli nadir genetik bozukluklar için potansiyel bir tedavi alternatifi haline getirir. Birçok farklı gen terapisi çeşidi olmasına rağmen, tedavi hastalığın nedeninden sorumlu olan mutant genin tanımlanması ile başlar. Bir sonraki adım aynı sağlıklı geni klonlamaktır. Klonlanan bu gene terapötik gen veya transgen denir. Terapötik gen, bir ekspresyonu artırma, bastırma veya tamir etme ihtiyacına göre uyarlanır. Terapötik gen üretildikten sonra, vektör adı verilen bir araca yüklenir. Vektörün işlevi, terapötik geni hastadaki hedef hücreye iletmektir. Vektör, hedef hücreye ulaştıktan sonra genetik materyali çekirdeğe iletir. Çekirdekte, genetik materyal DNA'ya bütünleşmiş olur ve kusurlu veya mutasyona uğramış geni düzeltir. Gen tedavisinde başarıya ulaşılmasında en kritik adım vektörlerin seçilmesidir.

Vektörler, genetik materyali çeşitli hücrelere, dokulara ve tüm organlara taşınmasında feribot görevi yapan taşıtlardır. Optimum vektör ve iletim sistemi, hedef hücrelere, hedef hücrelerin özelliklerine, ekspresyon süresine ve vektöre dahil edilecek genetik materyalin boyutuna bağlıdır (3,4). Gen terapisi için kullanılan mevcut vektörler geniş ölçüde viral vektörler ve viral olmayan vektörler olarak sınıflandırılır.

Lentiviral vektörler, nükleer membrandan geçerken hedef hücrenin kalıcı olarak değiştirilmesinde oldukça başarılıdır. MYDGF, MAPK1/3-, STAT3- ve CCND1 sinyal yolları üzerinden endotel hücre çoğalmasını, PI3K/AKT- sinyal yolağı üzerinden kardiyak miyosit apoptozunu inhibe eder. MYDGF genindeki mutasyon miyokardiyal enfarktüs sonrası kalbin onarılmaması ve kasılma fonksiyonunda aksama gibi sağlık problemleri yaratabilmektedir. Bu tezin amacı farklı yollarda rol oynayan MYDGF genini lentiviral yöntemler kullanarak üretmek, çoğaltmak ve hücre içerisine sokulmasını sağlamaktır.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. Gen tedavisi

Genler, kalıtım için temel işlevsel birim olarak kabul edilen ve genellikle proteinler olmak üzere belirli moleküllerin oluşumu için bilgi depo eden küçük DNA bölümleridir. Genlerinin birçoğunun her insanda aynı olmasının yanı sıra sadece %1'den az bir kısmı insandan insana farklılık göstermektedir. Vücuttaki her bir hücrenin görevlerini doğru zamanda ve doğru şekilde yapmaları genler tarafından oluşturulan proteinlere bağlıdır. Genlerdeki mutasyonlar, bu genlerin oluşturduğu proteinlerin fonksiyonlarında kayıplar olmasına veya oluşması beklenen proteinlerin hiç oluşmamasına neden olabilirler. Mutasyon sonucunda etkilenen proteinler vücudun normal gelişimini bozabilir veya tıbbi bir durum yaratabilir. Örneğin, kistik fibroz, birleşik immün yetmezlik sendromları, kas distrofisi, hemofili ve kanser gibi birçok hastalıklar, kusurlu genlerin varlığından kaynaklanır (5,6)

Mutasyonların sadece küçük bir yüzdesi sağlık üzerinde olumsuz bir etki gösterir. Genetik bir hastalığa neden olabilecek gen mutasyonları, genellikle hastalıkla ilgili proteinler üretilmeden enzimler tarafından farkedilip onarılır. Mutasyonlar sonucunda onarılamayan genler çeşitli genetik hastalıklara neden olmaktadır. Bazı durumlarda bu hastalıkları tedavi etmek için geleneksel ilaçların kullanımını yetersiz kalmaktadır. Tedavi sürecinde geleneksel ilaçlara ek olarak faydalı genlerin veya kısa oligonükleotidlerin aktarımı amacıyla kullanılan ve gen terapisi olarak tanımlanan yeni bir yöntem kullanılmaktadır. Gen tedavisi temel olarak, hücrenel bir işlev bozukluğunu düzeltmek veya yeni bir hücrenel işlev sağlamak için genetik materyalin hedef hücreye aktarılması olarak tanımlanır (7).

Gen transferi tekniklerinin kullanımı sayesinde belirlenen DNA dizilimi, genin fonksiyonunu bozabilir, kaybolan bir fonksiyonu geri getirebilir veya yeni bir fonksiyonun ortaya çıkmasına neden olabilir. Gen terapisi, DNA'nın hücreye girmesi, girdiği bölgeden hedef hücrenin çekirdeğine gitmesi ve bu gene bağlı ürünün hücre içerisinde üretilmesi şeklinde üç basamaktan oluşur. Başarılı gen tedavisi, doğru geni seçme, bu genin hücreye aktarımı için doğru yöntemi seçme, yeterli transfeksiyon, gen ürünlerinin doğru ve yeterli üretimi, düşük yan etki profili ve ilaç tedavisinden daha etkin bir sonuç elde etme gibi faktörlere bağlıdır (8).

4.2.Gen Tedavisi Tarihi

Gen aktarımı kullanan ilk klinik çalışma olarak bildirilen Rosenberg ve ark. tarafından yapılan çalışmada, neomisin direnç markörü genini metastatik melanomalı beş hastadan elde edilen tümör infiltrasyonlu lenfositlere transfer etmek için bir retroviral vektör kullanılmıştır. Bu lenfositler in vitro olarak genişletilmiş ve daha sonra ilgili hastalara yeniden infüze edilmiştir. Bu ilk çalışma, retroviral gen transferinin güvenli ve pratik olduğunu göstermesinden dolayı birçok başka çalışma için yol gösterici olmuştur (9).

1963 ve 1990 arasında gen terapisini mümkün kılan, rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesidir. 1989'dan beri dünya çapında 900'den fazla klinik çalışma onaylanmıştır.

2005 yılının Kasım ayında Çin, bazı kötü huylu tümörlerin tedavisi için ilk gen terapisi ilaçlarını onaylamıştır. Agresif türden bir beyin tümörünün tedavisi için, bir gen tedavisi ilacının onayına yönelik ilk Avrupa başvurusu 2005 yılında Avrupa Tıbbi Ürünleri Değerlendirme Ajansına (EMA) sunulmuştur. Teknik uygulamadaki büyük zorluklara rağmen, gen tedavisinin uygulanabilirliği günümüz şartlarında kabul edilmektedir. Örneğin, son beş yılda ağır kalıtsal immün yetmezlik hastalıkları olan hastalar için başarılı tedaviler geliştirilmiştir. Bu tedavilerin hayati tehlike arz eden hastalara fayda sağladığı görülmektedir. Fakat ABD'de bir hastanın 1999'da sistemik olarak uygulanan çok yüksek bir adenoviral vektör dozu sonucu ölümü, halk tarafından gen terapisi için bir engel olarak görülen trajik olaylardan biridir (10).

Bununla birlikte, aynı prensipler, diğer tıbbi müdahalelerde olduğu gibi gen terapisi için de geçerlidir. Etkili prosedürler, altta yatan mekanizmaların anlaşılması sonucu prosedürlerin iyileştirilmesiyle azaltılabilen potansiyel yan etkilerle ilişkilidir. Alman bilim insanları, bu alanda öncü olup vektör-konak etkileşiminin temel araştırmalarını yaparak klinik çalışmalara kadar olan sürece önemli katkılarda bulunmuşlardır. Bu çalışmaların yanı sıra, 2006'da yetişkin hastalarda ciddi bir immün yetmezliğin gen tedavisi yoluyla düzeltildiğini bildirilmiştir (10).

4.3. Gen tedavisinin sınıflandırılması

4.3.1. Ex vivo gen tedavisi

Ex vivo gen tedavisi, Amerikan Gen ve Hücre Terapisi Derneği tarafından, hastanın hücrelerinin toplandığı, laboratuarda yetiştirildiği ve bir düzeltici veya terapötik gen taşıyan vektörler ile inkübe edildiği ve sonunda yeni genetik bilgi içeren bu hücrelerin türetildiği hastaya tekrar naklediği bir gen tedavisi türü olarak tarif edilir.

İn vivo gen tedavisi ile ilişkili özgüllük eksikliği, düşük verimlilik, nakil vektörüne sistemik maruz kalma (örneğin, neoplastik ve enflamatuvar komplikasyonlar) ve tekrar tedaviye sebep olan düşük cevaplar (11-14) gibi sınırlamalar in vivo gen tedavisindeki yan etki olasılığını artırmaktadır. Gen tedavisine ex vivo bir yaklaşımla, bu sorunların bazılarının çözüldüğü görülmektedir (15-16). Genel olarak, bugüne kadarki en başarılı ex vivo gen tedavisi çalışmaları hedef hücrelerde yeni fonksiyon, artırılmış terapötik gen dozajı ve gelişmiş bağışıklık hedeflenmesi gibi amaçlarla üretime yöneliktir.

Hedef Hücrelerde Yeni Fonksiyon

Ex vivo gen tedavisi, hücelere yeni bir fonksiyon vermek amacıyla yaygın olarak kullanılır. Örnekler arasında yüksek doz anti-tümör kemoterapi rejimlerine izin vermek için ilaç direncinin indüklenmesi (17) ve interferona indüklenme sayılabilir. Tümör hedefleyen makrofajlarda ekspresyon, daha sonra tümörleri arar ve öldürebilir (18).

Artırılmış Terapötik Gen Dozajı

Genetik manipülasyon, hedef hücre gen dozajını supra-normal seviyelere yükseltmek için kullanılabilir (19,20).

Gelişmiş Bağışıklık Hedeflemesi

Lösemide yapılan son çalışmalar, kanserde immünoterapinin gücünü göstermiştir (21-23). Allojenik T hücreleri kanser hücrelerini tanıyabilir ve öldürebilir, ancak bu esnada sağlıklı dokuların tanınması da "graft-versus-host hastalığı" ile sonuçlanabilir. Bir intihar geninin bu donör lenfositlere aktarılması, bu

gibi toksik etkileri azaltabilir (21). Otolog insan T lenfositleri ayrıca CD19'u hedef alan kimerik antijen reseptörlerini eksprese etmek için bir lentiviral vektör kullanılarak genetik olarak modifiye edilmiştir. Bu hücreler, gelişmiş kronik lenfositik lösemili üç hastaya infüzyon edilmiştir. Tasarlanan T hücrelerinin in vivo> 1000 kat genişlediği, kemik iliğine çekildiği, en az 6 ay boyunca hastalığın tamamen düzelmesiyle sonuçlandığı ve en az 6 ay boyunca fonksiyonel CAR'ları yüksek seviyelerde ifade etmeye devam ettiği gözlemlenmiştir (22). Bununla birlikte, hipogamaglobülinemi gibi toksik yan etkiler görülmüştür (23). Bu tür ex vivo gen terapisi yaklaşımları, preklinik ve hatta klinik çalışmalarda avantajlı olduğunu kanıtlamıştır (24-27).

4.3.2. İn vivo gen tedavisi

Genin düzeltilmiş bir kopyasının sistematik olarak enjeksiyon yoluyla verilmesi, bir transgeni hastanın vücuduna transfer etmenin oldukça etkili bir yoludur. İn vivo yöntemin en büyük sorunu verimsiz hedeflemesidir. Viral veya viral olmayan bir vektör vasıtasıyla vücuda verilen transgen vücutta bağışıklık tepkisi uyandırır. Vektöre karşı bağışıklık tepkisi, transgenin geçici ifadesine ve vektörün vücuttan temizlenmesine yol açar. Nötrleştirici antikor, vektörün ikincil enjeksiyonuna izin vermez (28).

Nötralize edici antikorun azaltılması, gen terapisi vektörünün iletimini iyileştirmek için mevcut araştırma alanıdır. Tüm gen terapisi uygulama protokolleri, transgenin plazma membranını geçmesini ve çekirdeğin içine girmesini gerektirir. En büyük engel, hala transgeni etkili bir şekilde hücre içi bölmeye iletememektir.

Genin dokuya hedeflenmesi için viral vektörlerde ve ayrıca viral olmayan vektörlerde birçok modifikasyon önerilmiştir. Örneğin, Herpes simpleks virüsünün bir proteini olan VP22, bir hücreden diğerine yayılma özelliğine sahiptir ve bu özellik vektörlerin tasarlanmasında başarıyla uygulanmıştır (28).

İN vivo gen terapisi, direkt enjeksiyon olarak veya biyolojik gen tabancaları kullanılarak uygulanabilir. Transgen ayrıca viral veya viral olmayan vektörler yoluyla da aktarılabilir. Rekombinant virüsler, transgeni dokuya özel promotör ile taşıyacak şekilde tasarlanır. Alternatif olarak, transgeni içeren DNA, hastalara

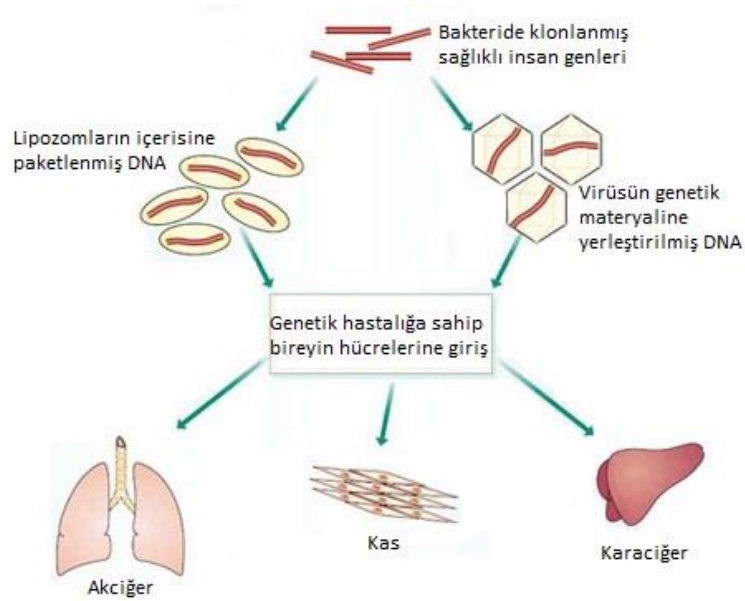
lipozom ile birlikte enjekte edilebilir. Plazmid DNA, ayrıca bir gen tabancası gibi mekanik araçlarla da hedeflenebilir.

İn vivo olarak, transgen, hastanın klinik durumuna ve vektörün tasarımına bağlı olarak çeşitli yollardan doğrudan enjekte edilebilir. Hedefe özel gen terapisi, benzersiz promotörlerin yardımı ile mümkündür. Örneğin, karaciğere yönelik gen tedavisi genellikle tiroid bağlayıcı globulin promotörü (TBG) ile yapılırken, kas hücrelerini yönlendirmek için sitomegalovirüs (CMV) promotörü kullanılmaktadır (28).

İn vivo gen terapisi, somatik hücre gen terapisi ve eşey hücresi gen terapisi olmak üzere iki türlü uygulanabilir.

4.3.2.1. Somatik Hücre Gen Terapisi

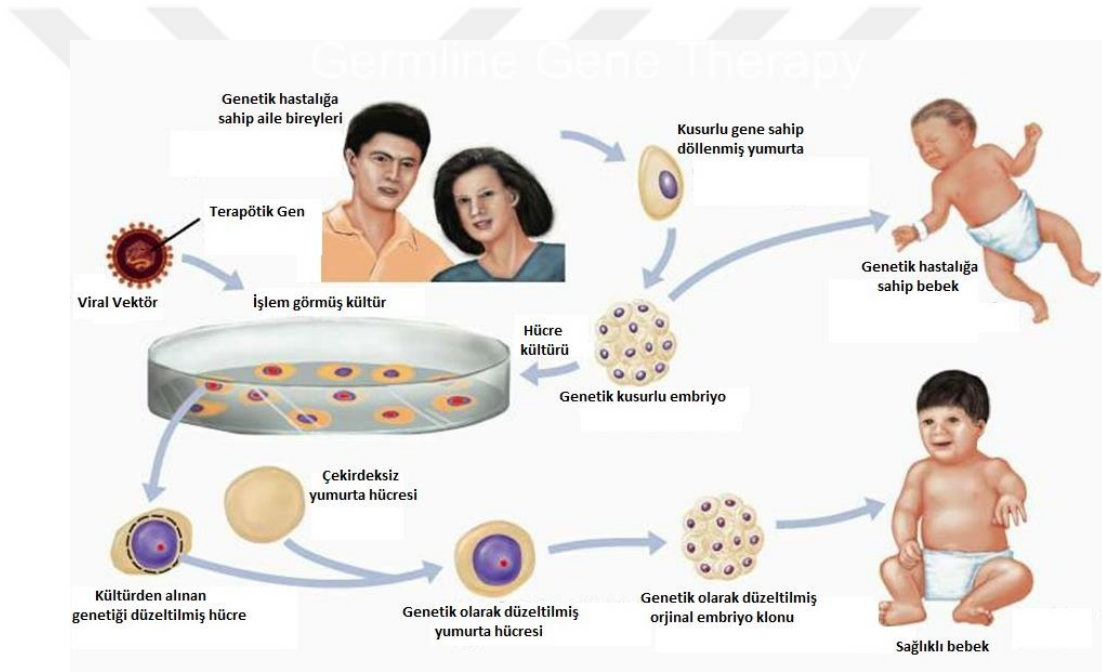
İnsan vücudundaki eşey hücreleri hariç bütün hücreler somatik hücre olarak adlandırılır. Somatik gen terapisi DNA'nın kemik iliği hücreleri gibi somatik hücrelere aktarılmasıdır ve DNA eşey hücrelerine girmediği için, somatik hücre gen terapisi kalıtsal değildir. Diğer bir deyişle somatik hücre gen tedavisi sadece genetik hastalığa sahip bireydeki genetik hastalığın tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. Aktarılan DNA, hastadaki mutasyonu veya hastalığa ait allelleri düzeltir. Bu gen transferi virüs aracılı veya lipozom aracılı olur (28).



Şekil 4.1 Somatik hücrelere gen aktarımını göstermektedir.

4.3.2.2. Eşey Hücresi Gen Tedavisi

Eşey hücresi gen terapisi, DNA'nın yumurta ve sperm üreten üreme hücrelerine aktarılmasıdır. Bu terapi ile nesiller arası aktarımı kesin olarak görülen genetik hastalıkların tedavisi amaçlanmaktadır. Eşey hücresi tedavisi, eşey hücreler döllenmeden hemen önce veya blastomerin ilk aşamasında olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Eşey hücreleri döllenmeden önce genetik yapıdaki modifikasyonlar sonraki kuşaklara direkt olarak iletilmektedir. Blastomerin ilk aşamasında yapılan genetik değişikliklerde ise hücrelerin gelişip bölünmesine izin verilir, ancak bu hücrelerden sadece düşük bir yüzdesi istenilen genetik materyale sahip olur (28).



Şekil 4.2 Eşey hücrelere gen aktarımı yapılmış ve yapılmamış bebekleri göstermektedir.

4.4. Vektörler

Genetik bilginin bir hücreye aktarılmasını kolaylaştırmak, vektör adı verilen araçlar ile oluşturulmaktadır. Vektörler, viral ve viral olmayan şeklinde iki dağıtım sistemine ayrılabilir. En yaygın kullanılan viral vektörler, retrovirüs, adenovirüs ve adeno-ilişkili virüsten (AAV) türetilir.

Daha az yaygın şekilde kullanılan diğer viral vektörler, herpes simpleks virüsü 1'den (HSV-1), vaccinia virüsünden veya bakulovirüsten türetilir. Viral olmayan vektörler, bakterilerde çoğalan çift zincirli bir DNA çemberi olan plazmid deoksiribonükleik asit (DNA), oligodeoksinükleotitler veya bunlara benzeyen kimyasal olarak sentezlenmiş bileşikler olabilir (29).

Optimum vektör ve iletim sisteminin belirlenmesinde göz önünde bulundurulması gereken önemli noktalar şunlardır: (a) hedef hücreler ve karakteristikleri, yani viral olarak ex vivo dönüştürülme ve hastaya tekrar enjekte edilme kabiliyeti, (b) gereken ekspresyonun miktarı ve (c) transfer edilecek genetik materyalin boyutu (29).

4.4.1. Viral olmayan vektörler

Viral olmayan transfeksiyonun en basit yöntemi direkt DNA enjeksiyonudur. Çıplak DNA plazmidlerini enjekte eden klinik çalışmalar başarıyla gerçekleştirilmiştir. Daha büyük başarılarla ulaşan çıplak PCR ürünleri ile denemeler yapılmıştır (30).

Araştırmalarda, elektroporasyon (plazma zarında elektrik alanı kaynaklı gözeneklerin oluşturulması), sonoporasyon (hücre zarını bozmak için ultrasonik frekanslar), manyetofeksiyon (DNA ile kompleks hale getirilmiş manyetik partikül kullanımı), gen tabancaları gibi birçok viral olmayan metot gen aktarımında kullanılmıştır. Her yöntemin kendine ait avantajları ve dezavantajları vardır (31).

Çeşitli viral olmayan yaklaşımlar arasında, reseptör aracılı gen transferi şu anda en çok kullanılanlardan biridir. Bu uygulama, özgül proteinlerle, bir lipozomla veya her ikisiyle birlikte konjüge edilmiş DNA'nın kullanımını içerir. Deneysel ex-vivo koşullar altında, DNA içeren lipozomların, sonraki geçici eksojen ile endositoz yoluyla hücrel olarak alındığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, endositoz DNA'nın

istikrarlı entegrasyonu için kullanılabilecek yöntemler, hedefleme yeteneğinde, transfeksiyon etkinliğinde ve DNA taşıma kapasitesinde bir gelişme oluncaya kadar bu yaklaşımın uygulanması muhtemelen sınırlı kalacaktır (31,32).

Son zamanlarda, sentetik oligonükleotitlerin kullanımı (hedef gene özel antisens kullanılarak kusurlu genlerin etkisiz hale getirilmesi), lipopleksler (anyonik ve nötr lipidlerden oluşan) ve polipleksler (DNA ile polimerlerin kompleksi) gibi birkaç kimyasal yöntem kullanılmıştır. Ayrıca iki veya daha fazla tekniği birleştiren bazı hibrit yöntemler geliştirilmiştir (33). Örneğin, lipozomları inaktive edilmiş bir HIV veya influenza virüsü ile birleştiren virozomlardır. Bunun, solunum epitel hücresinde, yalnızca viral veya yalnızca lipozomal yöntemden daha etkili bir gen transferine sahip olduğu gösterilmiştir. Diğer melez yöntemler, viral vektörlerin katyonik lipidlerle karıştırılmasını içerir. Araştırmacılar ayrıca yapay insan kromozomun hedef hücrelere dahil edilmesini denemişlerdir. Bu kromozom, standart 46 boyunca özerk bir şekilde var olur, çalışmalarını etkilemez veya herhangi bir mutasyona neden olmaz. Kompleks olmayan veya protein kompleks DNA'nın kimyasal, mekanik, elektriksel, partikül bombardımanı yöntemi veya yapay kromozom yöntemiyle doğrudan transferi, nispeten büyük DNA fragmanlarının aktarılması avantajına sahiptir. Bununla birlikte, bu işlemler hala yetersizdir, ex-vivo gen transferi ile sınırlıdır ve tanımlanmamış sitotoksik etkileri vardır (30).

4.4.1.1. Viral Olmayan Vektörlerin Kullanmanın Gerekçesi

Transfeksiyon yapan konakçı hücrelerin etkinliği, viral olmayan yöntemlere kıyasla viral vektörlerle nispeten yüksektir. Virüs vektörlerini kullanmanın temel sakıncaları, immünojenikliği ve sitotoksitesidir. Gen terapisi klinik çalışmasının ilk ilişkili fatalitesi, viral vektöre (adenovirüs) karşı enflamatuar reaksiyonla ilgilidir.

Viral gen aktarım aracının kullanılmasına ilişkin diğer bir endişe nedeni, ek mutajenez olarak bilinen fenomendir, yani viral DNA'nın ektopik kromozomal entegrasyonu, tümör baskılayıcı gen ekspresyonunu bozar veya hücrelerin malign transformasyonuna yol açan onkojeni aktive eder. Patojenitesinde azalma, düşük maliyet ve üretim kolaylığı nedeniyle, viral olmayan vektörler viral yaklaşımlara göre önemli avantajlara sahiptir. Viral olmayan vektörleri kullanmanın en büyük avantajı biyolojik güvenliğidir. Bununla birlikte, viral olmayan gen aktarımının

uygulanması, düşük verim ve transgenlerinin düşük geçici ifadesi nedenleriyle kısmen göz ardı edilmiştir (34). Viral olmayan vektörler, daha az immünotoksitesinden dolayı önem arz etmektedir. Viral olmayan vektörlerin klinik çalışmalarda kullanımını 2004 yılından 2013 yılına yükselirken bu durum sebebiyle viral vektörlerin kullanımını önemli ölçüde azalmıştır. Verimlilik, özgüllük, gen ekspresyon süresi ve güvenlikte kaydedilen ilerlemeler, klinik deneylere giren viral olmayan vektör ürünlerinin artmasına neden olmuştur.

4.4.1.2. Viral Olmayan Gen transferinde teknik zorluklar ve sınırlamalar

Başarılı bir gen terapisine ulaşılmasındaki ana teknik sınırlamalar veya kritik adımlar kategorilere ayrılır (35-38) Vektör taşınmasının etkinliği ve hedef hücrelere boşaltılması, aktivite, bağışıklık tepkisi, düzenleyici konular, etik kaygılar ve ticarileştirme bu kategorilerdendir. Bu kategorilerin her biri, hastalığın etkin bir şekilde tedavi edilmesi için gen terapisine büyük bir meydan okuma teşkil etmektedir (39).

Viral olmayan vektörler genellikle aşağıdaki nükleik asit türlerini transfer etmek için kullanılır (40,41).

- Küçük DNA (Oligodeoksinükleotitler) veya kimyasal olarak sentezlenen ilgili moleküller.
- Büyük DNA molekülleri (Plazmid DNA, pDNA)
- RNA (Ribozimler, Si RNA, m RNA)

4.4.1.3. Viral olmayan vektör çeşitleri

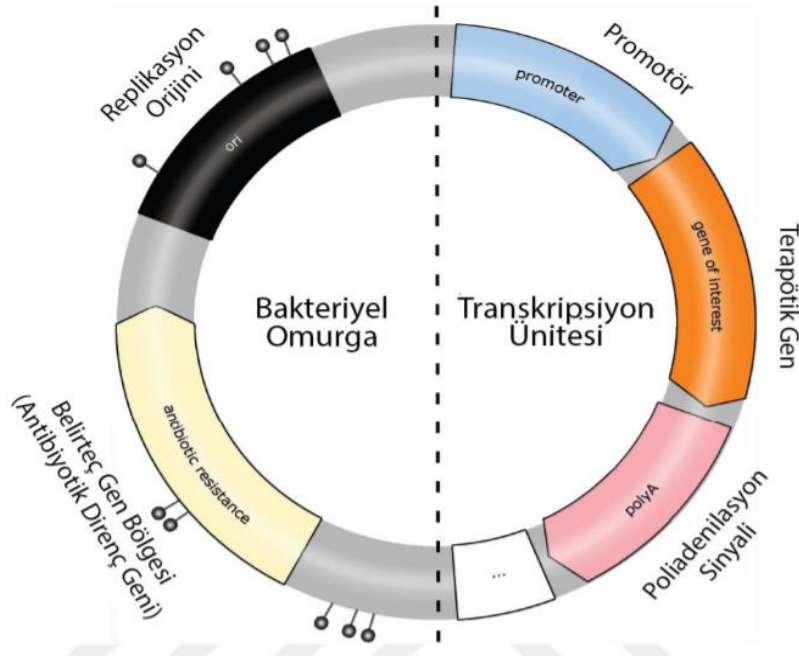
Virüs türevli vektörlerle karşılaştırıldığında, viral olmayan vektörlerin, immünojenik olmayan uygulama güvenliği, neredeyse sınırsız transgen büyüklüğü ve tekrarlanan uygulama olasılığı gibi çeşitli avantajları vardır (42). Viral olmayan gen verme sistemleri genellikle üç kategoriden oluşur: (a) çıplak DNA teslimi, (b) lipit bazlı ve (c) polimer bazlı teslimi (43).

Çıplak plazmid DNA

Viral olmayan gen aktarımının en basit tekniği çıplak DNA denilen kullanımıdır. Son yıllarda çıplak plazmid DNA kullanılarak bir sitotoksik T-lenfosit

antijen 4-immüoglobülin (CTLA4-Ig) geninin verildiği çıplak plazmid DNA transfer yöntemi rapor edilmiştir (44). Fetal karaciğer kinaz-1 geninin verildiği antianjiyogenik tedavi için çıplak DNA kullanılmıştır (45).

Doğal sadeliği olan çıplak DNA, çekici bir viral olmayan vektördür ve ayrıca standart rekombinant DNA teknikleri kullanılarak bakterilerde ve manipülasyonlarda üretim kolaylığı, viral olmayan gen verme sistemi olarak kullanımının önemini gösterir. Çıplak DNA gen iletim sistemi kullanılmasındaki diğer önemli avantaj, doğumun ardından uzak bölgelerde çok az yayılma ve transfeksiyon gösterme kabiliyetidir ve ayrıca kendisine karşı herhangi bir antikor tepkisi gösterilmemesinden dolayı birkaç kez uygulanabilir (46,47).

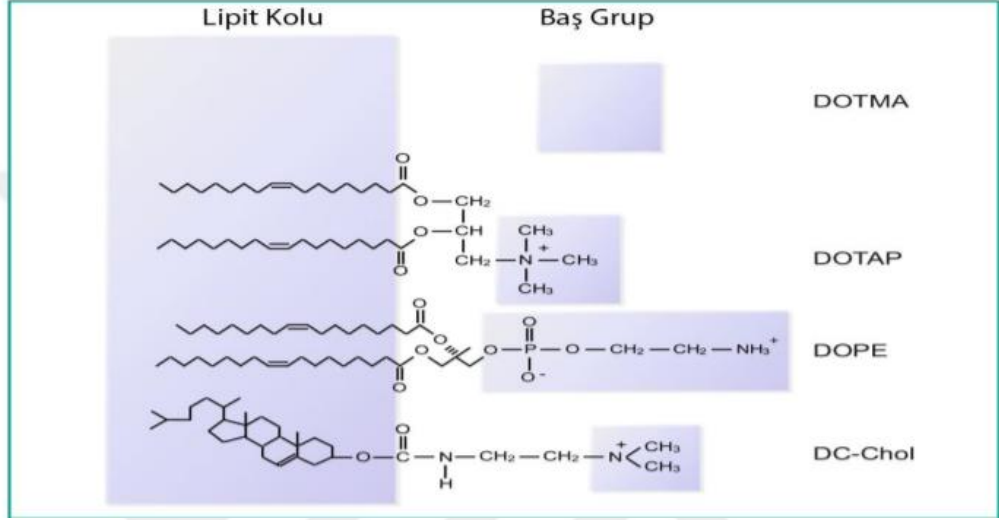


Şekil 4.3 Plazmid Vektör Yapısı

Katyonik lipitler

Katyonik lipozomlar, negatif yüklü DNA'yı taşımak için uygun olan önemli bir bileşik sınıftır. Bununla birlikte, in vivo olarak bu reaktiflerin kullanımı, içsel toksisiteleri ile rahatsız edicidir. Katyonik lipitler, pozitif yüklü bir baş grubu, bir hidrofobik kuyruk ve kafayı kuyruk grubuna bağlayan bir bağlayıcıdan oluşur. Yüklenen baş grupları genellikle kuaterner aminlerdir, kuyruklar doymuş veya

doymamış alkil zincirleri veya kolesteril gruplarıdır. Katyonik lipozomlar, araca DNA uygulaması gerektiren nötr ve anyonik lipozomların aksine, negatif yüklü DNA ile kompleksler oluşturur. Ayrıca pozitif yükleri, negatif yüklü hücre zarı ile etkileşime izin verir ve böylece hücreye nüfuz etmesine izin verilmiştir (48).



Şekil 4.4 Katyonik Lipid, gen tedavisinde en çok kullanılan tipleri

Viral olmayan gen verme vektörleri olarak çeşitli katyonik lipidlerin kullanımı hakkında çok sayıda rapor vardır. Katyonik lipozomların kullanımı hakkındaki raporlardan biri olan, Felgner ve ark.'nın ilk raporu arasında yer alan Nabeleta'nın dünyanın ilk insan gen terapisi klinik denemesi 1987'de yapılmıştır (49). Katyonik lipozomlar ile aktarımda son zamanlarda sıkça kullanılan siRNA iletimidir. Sato ve arkadaşları karaciğer parankimal hücre seçici siRNA seleksiyonu için galaktosile edilmiş katyonik lipozomlarla komplekslenmiş siRNA'yı, siRNA'nın nükleaz sindirimine ve idrar boşaltımına maruz kalmadığını, ayrıca karaciğere etkili bir şekilde verildiğini ve karaciğer parankimal hücrelerinin yerine parankimal hücrelerde tespit edilmediğini göstermiştir. Karaciğerdeki endojen gen (ubc13 geni) ekspresyonu, farelere ubc13-siRNA ve galaktosillenmiş lipozom kompleksleri uygulandığında %80'e kadar inhibe edilmiştir (50).

Bununla birlikte, katyonik lipozomlar, in vitro transfeksiyon ajanları olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Fakat in vivo başarı toksisite sebebiyle engellenmiştir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, katyonik lipozomların toksisitesinin arkasındaki mekanizmanın büyük ölçüde apoptoz indüksiyonu olduğu

bulunmuştur. Bir cDNA mikroarray çalışması apoptozis, transkripsiyon düzenleme ve immün yanıtla ilgili 45 genin yükseltilen düzenlenmesinin lipofeksiyondan kaynaklandığını göstermiştir (51).

Polimerik gen taşıyıcıları

Sentetik polikasyonik polimerler, gen iletimi için viral olmayan vektörler olarak büyük ilgi görmüştür. Etkiledikleri çeşitli mekanizmaları ve ayrıca bu sistemlerin çeşitli biyokimyasal ve terapötik yönlerini gösteren bir dizi inceleme ve kitap yayınlanmıştır. Bu polimerler, DNA'nın fosfat grupları ile polisikasyon polimerinin karşıt yüklü grupları arasındaki elektrostatik etkileşimin bir sonucu olarak kendiliğinden oluşur (52-54).

PEI (polietilenimin), viral olmayan gen iletimi için bir altın standart olarak belirlediğinden kullanımı uygundur. Büyük DNA moleküllerini yoğunlaştırma kabiliyetleri ve sonunda 100nm büyüklüğünde veya daha az homojen küresel moleküllere dönüştürme yetenekleri sayesinde hem in vitro hem de in vivo olarak verimli bir şekilde hücrelere transfekte edilebilirler (53).

Gen sunumunda ümit verici sonuçlar veren diğer bir sentetik polimer, poli-L-lisindir. Peptidik doğası nedeniyle virüs dışı gen teslimi için çalışılan ilk polimerlerden biridir, yani biyolojik olarak parçalanabilir ve bu nedenle in vivo kullanım için daha uygundur (55).

İmidazol içeren polimerlerin de etkili transfeksiyon özelliklerine sahip oldukları bildirilmiştir. Histidin veya diğer imidazol içeren yapılarla yapılan çeşitli yaklaşımlarda, modifiye edilmemiş poli-L-lisinden daha iyi transfekte edici ajanlar oldukları kanıtlanmıştır (56-59).

4.4.1.4. Viral olmayan gen tedavisi için fiziksel vektörler

Gen materyalini transfer etmek fiziksel araçlarla daha basit olduğu için bu gen terapisi araştırmacılarının ilgisini çekmektedirler. Bu yöntemlerle, hücrelerin zar bariyerini engellemek için fiziksel güç kullanır, böylece genetik materyalin hücre içi dağıtımını kolaylaştırılır.

İğne: İlgilenilen genetik materyal, bir iğne yardımıyla dokuya veya bir damara sistemik enjeksiyonla uygulanır. Herhangi bir taşıyıcı olmadan, gen transferinin en

basit ve en güvenli yöntemidir. Uygulanabilir aday dokular kas, cilt, karaciğer, kalp kası ve katı tümörlerdir. Bununla birlikte, serumdaki nükleazların hızlı bozunması nedeniyle verim düşüktür ve mononükleer fagosit sistemi tarafından temizlenir (60,61).

Balistik DNA: Parçacık bombardımanı, mikroprojektil gen transferi veya gen tabancası balistik DNA için kullanılan diğer terimlerdir. Bu yöntem ilk önce bitkilere gen transfer tekniği olarak kullanılmıştır. Metot, hedef dokuyu belli bir hızda geçerek DNA kaplı ağır metal parçacıkları sağlama prensibine dayanır. Yeterli hız, yüksek voltajlı elektronik boşalma, kıvılcım boşalma veya helyum basıncı boşalma ile elde edilir. Gaz basıncı, parçacık büyüklüğü, doz frekansı, gen transferinin etkinliğini belirlemede kritik parametrelerdir. Altın, tungsten ve gümüş metal parçacıklar olarak kullanılır ve tipik olarak 1 µm çapındadırlar. Gen tabancasının en büyük avantajı, DNA dozlarının tam olarak verilmesidir. En sık olarak yumurtalık kanserinin gen terapisi araştırmalarında kullanılır (60,62).

Elektroporasyon: Elektroporasyon için kullanılan diğer terimler gen elektro enjeksiyonu, gen elektrot transferi, elektrik aracılı gen terapisi, elektrojen transferidir. Elektroporasyon, plazmid DNA'yı iletmek için güvenilir bir fiziksel yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Membran kapasitansından daha büyük olan bir elektrik alanın uygulanması, zıt polarite yüklerinin hücre zarının her iki tarafında sıralanmasına neden olacak ve böylece hücre yüzeyinde belirli bir noktada potansiyel bir fark yaratacaktır. Sonuç olarak bu yöntemle, zarın parçalanması bir gözenek oluşturur ve molekülün geçmesine izin verir. Gözenek oluşumu yaklaşık 10 nanosaniyede gerçekleşir. Membranın gözeneği alan kuvveti ve darbe süresine bağlı olarak geri dönüşümlü olabilir. Tersinir ise, hücreler canlı kalır, aksi takdirde hücre ölümü ile sonuçlanır. Geri dönüşümsüz elektroporasyon kanser tedavisinde kanser hücrelerini yok etmek için kullanılır. Zarın gen aktarımına geçirgenliği, nabız genliği ve süresi ile kontrol edilir. Şu anda kullanılan alan kuvveti, kısa darbeleri (mikrosaniye) veya uzun darbeleri (milisaniye) yüksek alan kuvveti [$> 700V / cm$] veya düşük alan kuvvetidir [$<700V / cm$]. Bu değişken kombinasyon hedef doku tarafından belirlenir. Genel olarak, kanser hücreleri uzun bir nabızla düşük alan kuvveti gerektirirken, kas hücreleri yüksek alan kuvvetli bir kısa nabız gerektirir. Tedavi intradermal, intramüsküler veya intratumoral olarak verilebilir (62-64).

Sonoporasyon: Sonoporasyon, hücrenin DNA alımına izin vermek için hücre zarını geçici olarak geçirgen hale getirmek amacıyla ultrason dalgasını kullanan invaziv olmayan bölgeye özgü bir tekniktir. İlgili genetik materyal, mikro-kabarcık içine dahil edilir ve sistemik sirkülasyona uygulanır. Bunu harici ultrason uygulaması takip eder. Ultrason dalgaları, mikro kabarcıkları hedef dokunun mikro dolaşımı içinde kavite eder, terapötik genin hedeflenmiş transfeksiyonunun oluşmasıyla sonuçlanan biyo etkileri üretir.

Mikro kabarcıklar, perflorokarbon veya kükürt heksaflorür gibi yüksek molekül ağırlıklı gaz dolu çekirdekten [hava / azot / âtıl gaz] oluşur. Dış kabuk, lipitler, proteinler veya sentetik biyopolimerler gibi biyo-uyumlu bileşiklerden oluşur. Mikro kabarcıklar ise dolaşımdaki kırmızı kan hücrelerine benzetilmektedir (ortalama 2-4 µm çapında).

Sonoporasyon tekniği genellikle beyin, kornea, böbrek, periton boşluğu, kas ve kalp dokularında kullanılır. Gen ürünleri, aşağıdaki üç yoldan herhangi biriyle mikro kabarcıklarla eşleştirilmiştir (65).

1. Gen ürünü ile bağlantılı olarak mikro kabarcıklar üretmek [DNA, kabuğa veya lümene dahil edilir].
2. Şarj bağlaması (DNA'nın çakışma ve elektrostatik etkileşim ile kabuğa bağlanması).
3. Bağlantısız (birlikte çalışan mikro kabarcık ve genetik materyal).

Fotoporasyon: Bu fiziksel yöntem, DNA'nın hücreye girmesini sağlamak amacıyla hücre zarı üzerinde geçici gözenekler üretmek için tek bir lazer darbesini kullanır. Lazerin odak noktası ve darbe frekansı verimliliği kontrol eder. Transgen ekspresyon seviyesinin elektroporasyon ile aynı olduğu iddia edilmektedir. Bu teknik belgelenmiş kanıtlardan yoksundur (66).

Manyetofeksiyon: Manyetik olarak hedeflenen ilaç dağıtımını hipotezine dayanır. Teknik, terapötik genin manyetik nanoparçacık ile birleştirilmesine dayanır. Bu kompleks hücre kültürüne dahil edilir. Hücre kültürünün altına yerleştirilen toprak elektromıknatıslarının ürettiği alan gradyanı kompleksin tortullaşmasını ve transfeksiyon hızını artırır. İn vivo durumda, terapötik gen-manyetik parçacık

kompleksi, intravenöz olarak uygulanır. Güçlü ve yüksek gradyanlı mıknatıslar kullanılarak, kompleks hedefe yakalanır ve tutulur. Genetik materyal, çapraz bağlanan molekülün enzimatik bölünmesi, yük etkileşimi veya matrisin bozulması ile serbest bırakılır. Bu teknik çoğunlukla primer hücreleri ve başka yollarla transfekte edilmesi zor olan hücreleri transfekte etmek için in vitro araştırmalarda kullanılır (67,68).

Hidroporasyon: Hidrodinamik gen transferi olarak da adlandırılır. Teknik olarak hücre zarına nüfuz etmek için hidrodinamik basınç kullanır. Hidrodinamik basınç, zamanın bir bölümünde büyük hacimli DNA çözeltisi enjekte edilerek oluşturulur. Bu, kılcal endotelyumun geçirgenliğini artırır ve parankim hücrelerini çevreleyen plazma zarı içinde gözenekler oluşturur. İlgili terapötik gen, gözenekler yoluyla hücreye ulaşabilir ve zar gözenekleri daha sonra kapatılarak genetik materyali hücre içinde tutar. Bu teknik en sık hepatik hücrelerde gen tedavisi araştırması için kullanılır (60,69).

Mekanik Masaj: Karaciğerin mekanik masajının, birkaç dakika boyunca geçici membran defektleri oluşturduğu, bu da plazmid DNA'nın hepatik hücrelere difüzyonla girmesini kolaylaştırdığı hipotezine dayanır. Ancak bu oldukça tartışmalıdır ve mekanik masajın gen aktarım şekli olarak kullanılması konusunda çalışmalar azdır (63).

4.4.1.5. Viral olmayan gen tedavisi için kimyasal yöntemler

Kimyasal vektörler geniş ölçüde inorganik parçacıklar, lipit bazlı, polimer bazlı ve peptid bazlı olarak sınıflandırılır.

Genellikle amaçlarına göre kategorize edilir (63,70).

1. Onları nükleazlardan ve diğer kan bileşenlerinden korumak için terapötik gen ile yoğunlaştırılmış kompleks oluşturanlar.
2. Belirli hücreleri hedef almak için tasarlananlar.
3. Genetik materyalin sitosol veya çekirdeğe iletimini artırmak için tasarlanmış olanlar.
4. Sitosolde DNA / RNA'dan ayrılmak için tasarlanmış olanlar.

5. Terapötik genin dokuda sürekli salınması veya kontrollü salımı için tasarlananlar.

Kimyasal viral olmayan nükleik asit verme sistemleri genellikle DNA / Katyonik lipid (Lipopleksler), DNA / katyonik polimer (Polipleksler) ve DNA / katyonik Polimer / katyonik Lipid'dir (Lipopolipleksler) (40).

İnorganik parçacıklar: Genellikle retiküloendotelyal sistemden kaçmak veya sıkışmış bir molekülü bozulmaya karşı korumak için boyut, şekil ve gözeneklilik bakımından değişkenlik gösterebilen nanopartiküllerdir. Kalsiyum fosfat, silika, altın, manyetik bileşikler, kuantum noktaları, karbon nanotüpleri, fullerenler, supramoleküler sistemler bu kategoride en çok incelenen bölümdür (36).

1.Kalsiyum fosfat: Bu sistemde ilk kullanılan kalsiyum fosfat parçacıklarıdır. Biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilirlerdir. Kalsiyum endositozda hayati bir rol oynar, kolayca emilme avantajına sahiptir ve yüksek bağlanma afinitesi oluşturur. Bununla birlikte, kalsiyum fosfat nanokristalleri zamanla büyür ve depolanma kapasitelerini azaltır. Bu problem daha sonra magnezyum ekleyerek aşılır (36).

2.Silika: İnsanlar tarafından kum ve cam gibi yaygın olarak kullanılan malzemelerin ana bileşenidir. Göreceli işlevselleştirme kolaylığı, gen dağıtım aracı olarak kullanılmasını cazip kılmaktadır. Gen dağıtım maddesi olarak yaygın bir şekilde kullanılan silika, düşük toksisitesinden dolayı nanopartiküllerin amino silikonlarla işlevselleştirilmesiyle elde edilir. Serum proteinleri arasındaki etkileşime bağlı olarak serum içeren ortamların varlığında iletim veriminin düşmesi majör sınırlayıcı bir faktördür (36).

3.Altın: Hazırlık kolaylığı, sınırsız yüzey karakterizasyonu ve etkisiz doğa gibi özellikler araştırmacıları altın nanoparçacıklara doğru çekmiştir. Altın nanopartiküller kızıl ötesi bölgeye yakın güçlü ışık emilimine sahiptir. Yakın kızılötesi ışık dokulara derinlemesine nüfuz edebilir. Altın yüzeyinin DNA ile değiştirilmesi, fototermal etki kullanılarak hücreyi transfekte etmek için kullanılabilir (36). Fototermal etkinin neden olduğu termal denatürasyon, gen salımının kontrol edilmesine yardımcı olur. Araştırmalar, altın ile transfeksiyon verimliliğinin, in vitro olarak daha düşük toksisite ile lipoplekslerle karşılaştırılabilir olduğunu kanıtlamıştır. Diğer bir taraftan, yüksek kimyasal stabilitesi nedeniyle hücre içerisinde kolayca çözünmez ve hücre içinde birikerek hücre büyümesine zarar verebilir (36).

Manyetik nanopartiküller (süper manyetik demir oksit, çoğunlukla manyetit), fullerenler (çözülebilir karbon molekülleri), karbon nanotüpleri (silindirik fullerenler), kuantum noktaları (yarı iletken nanomalzemeler) ve supramoleküler sistemler, tüm invitro ve hayvan modellerinde umut verici sonuç öne sürmektedir. Bu inorganik nanoparçacıkların yüzeyi, DNA bağlanmasını kolaylaştırmak için kaplanabilir. Hipotezler, küçük parçacık boyutunun, fizyolojik ve hücrel engellerin çoğundan etkili bir şekilde geçebileceği ve daha yüksek transfeksiyon verimi üretebileceği üzerinedir. Transfeksiyon verimi, işlevsellik etkisi ve klinik uygulamaların hızlanması için tip, büyüklük ve güvenlik üzerine uzun vadeli çalışmalar yapılması gerekmektedir (36).

4.4.2. Viral Vektörler

4.4.2.1. Retrovirüsler

RNA genomlarının çift sarmallı DNA kopyalarını oluşturabilen bir virüs sınıfıdır. Genomunun bu kopyaları, konakçı hücrelerin kromozomlarına entegre edilebilir. İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) bir retrovirüsdür. Retrovirüsler kullanarak yapılan gen terapisinin problemlerinden biri, integral enzimin, virüsün genetik materyalini konakçı genomunda rastgele bir pozisyona sokabilmesidir. Genetik materyal, konakçı hücrenin orijinal genlerinden birinin ortasına sokulursa, bu gende ekleme mutajenezi görülür. Mutasyon sonucu oluşan gen hücre bölünmesinde rol alıp kontrolsüz bölünmeye sebep olursa, kanser gibi tehlikeli hastalıklar riski yaratır. Bu problem, yakın zamanda, çinko parmak nükleazları kullanarak veya belirli kromozomal bölgelere entegrasyon bölgesini yönlendirmek için beta-globin lokus kontrol bölgesi gibi bazı sekansları dahil ederek ele alınmaya başlamıştır (71).

4.4.2.2. Adenovirüs

Genleri yanlış yerlere sokma probleminden kaçınmak için, bazı araştırmacılar diğer virüs türlerine yönelmiştir. Adenovirüsler solunum, bağırsak ve göz enfeksiyonuna neden olabilen çift iplikli DNA genomlu bir virüs sınıfıdır. Bu virüsler bir konakçı hücreye bulaştığında, DNA moleküllerini konakçıya sokarlar. Adenovirüsün genetik materyali, konakçı hücrenin genetik materyali içine dâhil

edilmez. DNA molekülü, konakçı hücrenin çekirdeğinde serbest kalır ve bu ekstra DNA molekülündeki talimatlar, diğer herhangi bir gen gibi kopyalanır. Adenovirüs, ayrıca, akciğer hücreleri gibi daha yavaş bölünen hücreler de dahil olmak üzere, retrovirüsten daha çok çeşit hücreleri enfekte edebilir. Diğer bir taraftan, adenovirüsün hastanın bağışıklık sistemi tarafından da saldırıya uğraması daha olasıdır ve genellikle istenmeyen bir enflamatuvar tepkiyi tetikler. Dezavantajlarına rağmen, bu vektör sisteminin karaciğer ve yumurtalık kanserini tedavi etmek için kullanılması planlanmıştır ve ayrıca baş ve boyun kanserini tedavi etmek için lisans verilen ilk gen terapisi ürünü Gendicine adenoviral ürünüdür (72,73).

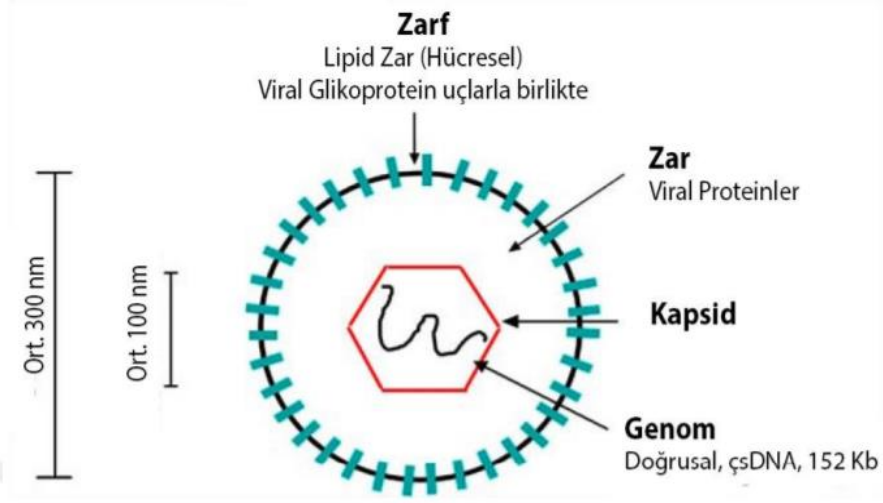
4.4.2.3. Adeno-ilişkili virüsler [AAV]

En umut verici potansiyel vektörlerden biri hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri içeren geniş bir hücre yelpazesini enfekte eden AAV adı verilen yeni keşfedilen bir virüsdür. AAV'ler, parvovirus ailesinden, tek zincirli bir DNA genomuna sahip küçük virüslerdir. Adenovirüslerin aksine AAV'ler patojenik değildir. Araştırmacılar, çoğu insanın hastalığa neden olmayan ve bağışıklık tepkisi sağlamayan AAV taşıdıklarına inanıyor. Bilim adamları genetik kusurları düzeltmek için AAV kullanarak hayvan deneyleri yapmaktadırlar. Kalıtsal kan hastalığı hemofili, kas ve göz hastalığını tedavi etmek için AAV'ler ön çalışmalarda kullanılmaktadır. AAV'lerin dezavatajı ise tercihen kromozom 19 olmak üzere, konak hücrenin genomuna entegre olmalarından dolayı oluşabilecek istenmeyen genetik hasarlardır. Bu problemden kaçınmak için, ters terminal sekanslarından ve entegrasyon için gerekli rep geninden yoksun rekombinant AAV'ler geliştirilmiştir. AAV'lerin diğer dezavantajları ise düşük taşıma kapasiteleri ve üretimlerindeki zorluklardır (74).

4.4.2.4. Herpes simpleks virüsleri (HSV)

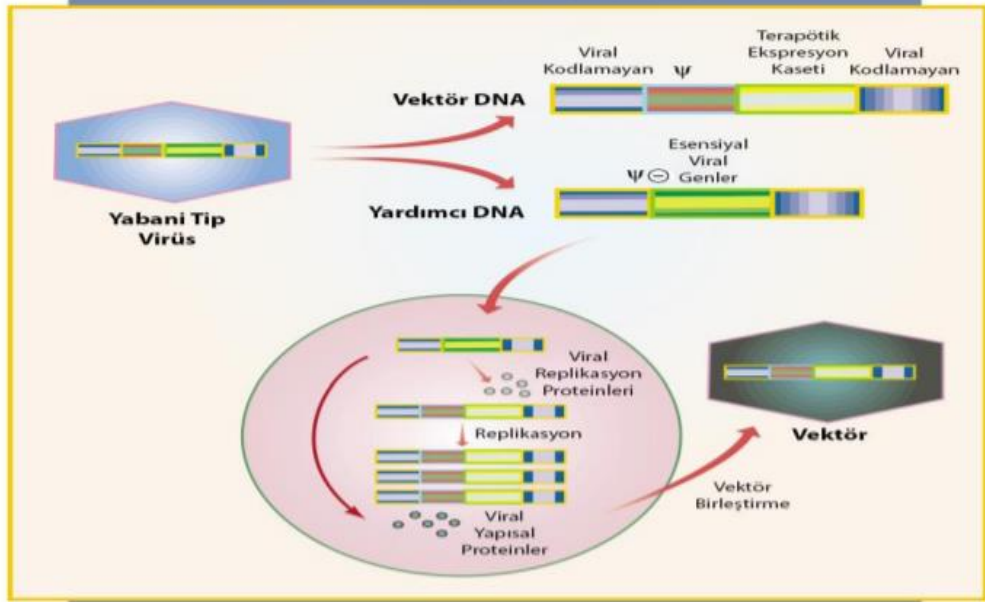
Belirli bir hücre tipini veya nöronları enfekte eden çift sarmallı bir DNA virüs sınıfıdır. Herpes simpleks virüs tip 1, insanlarda soğuk yaralara neden olan yaygın bir patojenidir. Çoğunlukla sinir sisteminde gen aktarımı için kullanılan bir insan nörotropik virüsdür. Diğer virüslere kıyasla büyük bir genoma sahiptir, bu da bilim insanlarının birden fazla terapötik genin tek bir virüse sokmasını ve birden fazla gen kusurunun neden olduğu rahatsızlıkların tedavisinin önünü açmasını sağlar. HSV,

kas, karaciğer gibi çok çeşitli dokuları enfekte edebildiği için ideal bir vektör oluşturur.



Şekil 4.5 HSV Tip-1 vektör yapısı

Virüsler, konak hücreler üzerinde yüksek etkinlik düzeyinde replike olabilmeye kabiliyetine sahiptirler. Dolayısıyla, tedavi edici genlerin hedef hücreye taşınması ve ekspresyonu açısından çok uygun vektörlerdir. Aşağıdaki şekilde virüslerin vektöre dönüşüm diyagramı sunulmaktadır.

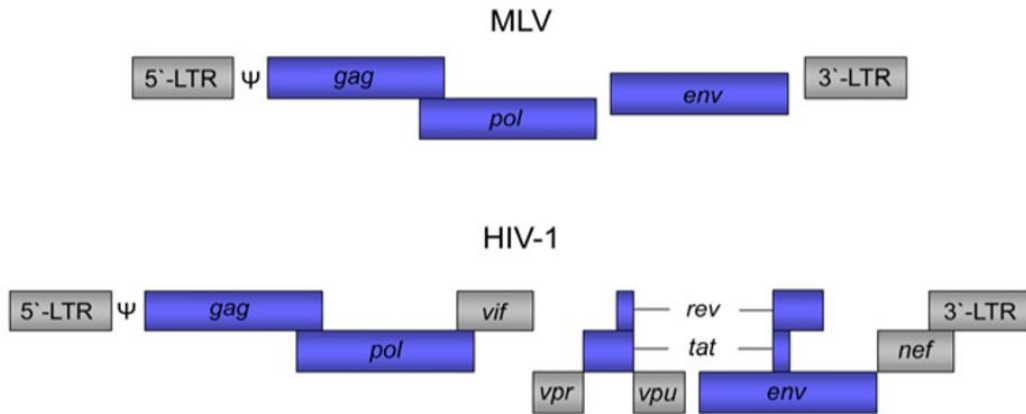


Şekil 4.6 Virüsün vektöre dönüştürülmesi

4.5. Lentiviral vektörler

Lentiviral vektörler retrovirüs ailesine ait olan lentivirüslerden üretilirler. Lentivirüs ailesinin en çok kullanılan türü insan immün yetmezlik virüsü-1 (HIV-1) 'dir. Lentivirüsler konakçı hücreye önemli miktarda genetik bilgi aktarma yeteneğine sahip olduğu için, bu vektörlerin kullanımı gen tedavisinde gen iletiminin en etkili yöntemlerinden biri olarak kabul edilir. Lentiviral genom temel olarak gag / pol ve env genlerinden oluşur. Membran ilişkili matris proteini, çekirdek oluşturan kapsid proteini ve viral RNA'ya bağlanan nükleokapsit proteini gibi bütün yapısal proteinler gag bölgesi tarafından kodlanır. Pol geni proteaz, tersinir transkriptaz ve entegraz gibi viral enzimlerin oluşumunu sağlar. Env geni ise zarfı kodlar (76).

Viral gen, promotör, transkripsiyon sonu, poly adenilasyon sinyalleri ve viral entegrasyon için gerekli bağlanma yerini taşıyan uzun iki özdeş sonlandırma tekrarı ile çevrilidir. Kapsülleme sinyali (Ψ) genomik RNA'nın viral parçacıklara paketlenmesini düzenler. Bu genom yapısı, retrovirüs ailesinin bir üyesi olan mürin lösemi virüslerinden türetilen γ -retrovirüsünün yedi türünde de ortaktır. HIV-1 gibi lentivirüslerde ise ek olarak tat, rev, nef, vif, vpr ve vpu gibi genler vardır (76).



Şekil 4.7 MLV ve HIV-1 genomunun şematik gösterimi

Lentiviral vektörlerin güçlü transdüksiyon özelliği ve kararlı ifade yeteneği bu vektörlerin gen tedavisinde kullanımında büyük avantaj sağlamaktadır. Lentivirüsleri γ -retrovirüslerden ayıran en önemli özelliklerden biri ise sadece bölünen değil, bölünmeyen hücreleri de enfekte edebilme yeteneğidir.

Nükleer zarın mitotik dağılmasına ihtiyaç duymazlar. Bunun yerine nükleer pordan geçebilecek nükleer taşıyıcı proteinlere dayanırlar (77).

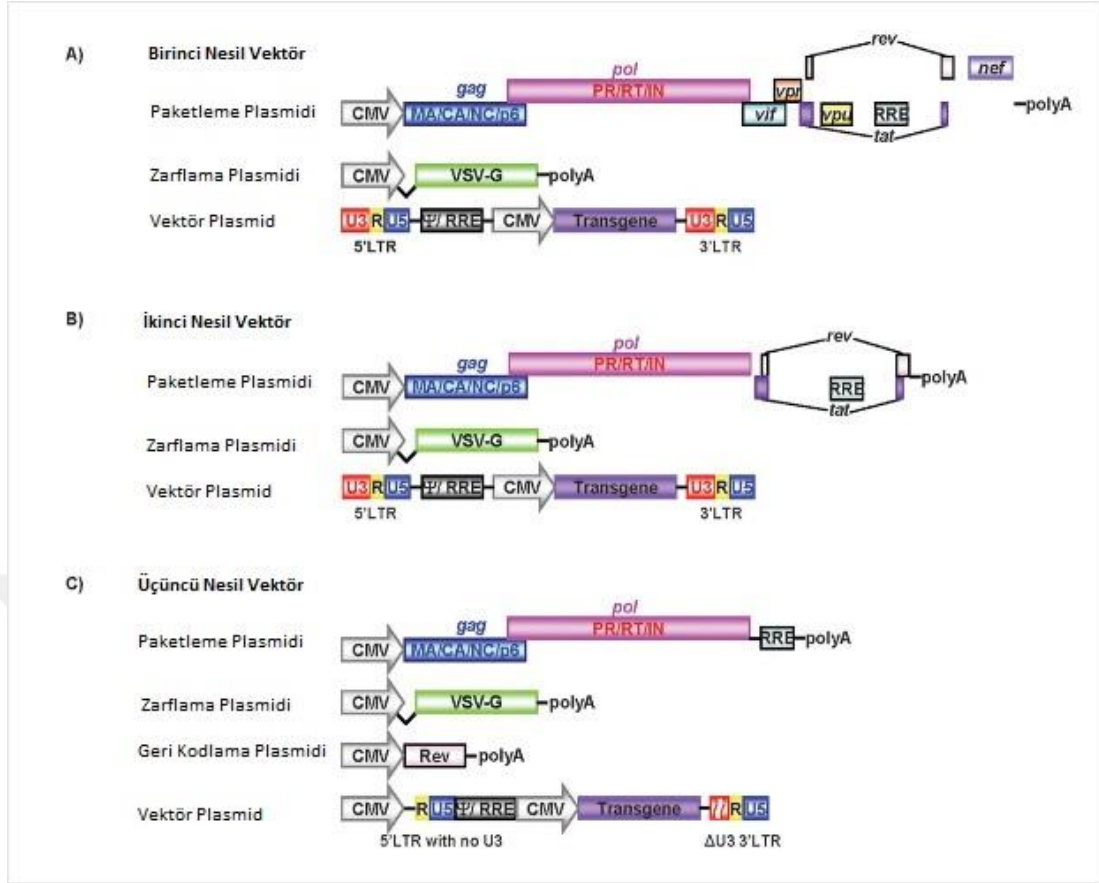
4.5.1. Lentiviral vektör sistemleri

Lentivirüslerin bulaşıcı doğasının oluşturduğu güvenlik endişeleri sebebi ile lentiviral paketleme sistemleri 3 ve 4 plasmid sistemleri olmak üzere ayrılmıştır.

Birinci nesil lentiviral vektörler: Güvenliği artırmak ve lentivirüslerin bulaşıcılığı ile ilgili endişeleri gidermek amacıyla birinci nesil HIV-1 türevli lentiviral vektörler, vektör bileşenlerini üç plasmide böldü: (i) bir paketleme plasmidi (ii) bir viral glikoproteini kodlayan zarflama plasmidi ve (iii) bir transfer vektörü genom yapısı. Vektör parçacıklarına aktarılmaları önlemek ve hazırlanan vektörlerdeki RCL'lerin (replikasyon uyumlu lentivirüsler) üretimini azaltmak amacıyla paketleme ve zarflama plasmidleri özel olarak tasarlandı (78,79).

İkinci nesil lentiviral vektörler: Vif, Vpu, Vpr veya Nef gibi gen proteinlerinin değiştirilmesi ile ikinci nesil lentiviral vektörler üretilmiştir. Bu yardımcı proteinler, bazı insan lenfoid hücre hatlarında viral replikasyonu etkilemeden silinebilir (80,81).

Üçüncü nesil lentiviral vektörler: Bu vektör sistemi, üç yardımcı plazmid ve bir TV plazmidinden oluşan dört plazmitli bir sistemdir (82).



Şekil 4.8 Lentiviral sistemlerin şematik gösterimi

4.5.2. Vektör üretimi için kullanılan hücresel hatlar

HEK293 hücre tipi 1973 yılında Hollanda'nın Leiden şehrinde bulunan Alex van der Eb'in laboratuvarında insan embriyonik böbre hücrelerinin transforme edilmesi yöntemi ile üretilmiştir. Transforme olan hücreler yasal olarak aldırılan fetüs hücrelerinden alınmıştır. 293 sayısı ile Eb'in post doktora öğrencisi olan Frank Graham'ın deneylerini numaralandırma alışkanlığından gelmektedir. Mevcut lentiviral vektör üretimi için en sık kullanılan HEK293 hücre türevidir HEK293T'dir. HEK293T hücreleri SV40 adı verilen büyük T-antijenine sahiptirler (83-85). Bu antijen SV40 orijini taşıyan vektörler için amplifikasyon kolaylığı sağlayan bir yöntem fırsatı sunmaktadır. Bu sistem geçici transfeksiyon sonucu elde edilen ekspresyon seviyelerini önemli seviyede artırmaktadır. Diğer HEK293 hücre türevleri farklı özellikler gösterse de büyümedeki güvenilirlik ve transfeksiyon kolaylığı en çok ilgi çeken özelliklerdendir (86).

4.5.3. Lentiviral vektör üretimi

Lentiviral vektör üretimi, kullanım amaçlarına göre küçük ölçekli ve büyük ölçekli olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Lentivirüs sistemlerindeki, ilgilenilen transgenler ve titrasyon yöntemlerindeki farklılıklar, her iki üretim yönteminin kendi içinde farklı performanslara ve farklı verimliliklere sahip tekniklerle gerçekleştirilmesine sebep olmaktadır.

Küçük ölçekli vektör üretimi

Ar-Ge amacıyla gerçekleştirilen küçük ölçekli üretimler genellikle petri kapları, T-şişeleri veya hiperflasklar içerisinde yetişen yapışkan hücreler kullanılarak gerçekleştirilir. En ideal birleşme sırasında hücreler kalsiyum-fosfat protokolü veya yeni geliştirilmiş polietilenimin (PEI) metodu kullanılarak transfekte edilirler. PEI'lar kültür ortamlarından bağımsız olmaları, transfeksiyon sonrası medyum değişimine ihtiyaç duymamaları ve süspansiyon kültürlerinde uygulanabilirlik gibi avantajlara sahiptir. Prensip olarak, küçük ölçekli uygulamalarda, lipofektamin, fügen ve 293fektin gibi çok etkili katyonik transfeksiyon ajanlarının kullanımı da yüksek ekspresyon seviyeleri ile sonuçlanmaktadır. Ausubel ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada farklı hücre kültür sistemleri karşılaştırılmış ve bu sistemlerle üretilen vektör titreleri arasında farklılık gözlemlenmemiştir (85). Kuther ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise hiperflaskstaki kültürlerinde artmış oksijen seviyesi sayesinde geleneksel kültür ortamlarına göre 10 kat fazla lentiviral vektör üretildiği ve ham vektör ürününün hücre proteinler ve nükleik asit tarafından daha az kontamine olduğu gözlemlenmiştir (88). Silindir şeklindeki şişelerde ise, HEK293T hücrelerinin kültür yüzeylerine bağlanması çok güçlü olmadığından dolayı vektör üretimi daha zordur ve hücreleri yüzeye bağlı tutmak için transfeksiyon koşulları çok iyi optimize edilmelidir.

Büyük ölçekli vektör üretimi

Lentiviral vektör kullanımı, klinik çalışmalara doğru ilerledikçe, daha büyük vektör kısımlarına ihtiyaç duyulmaktadır ve üretim yöntemlerinin geliştirilmesini gerektirmektedir. Bu durum ek üretim üniteleri veya yapışık hücre kültürlerine göre çok daha iyi ölçeklenebilirlik sağlayan süspansiyon kültürleri kullanılarak gerçekleştirilebilir.

Yapışkan hücreler kullanarak büyük ölçekli vektör üretimi

Bu yöntemle yapılan büyük ölçekli lentiviral vektör üretimi, ek kültür veya ek üretim birimi kullanarak kültür yüzeyinin artırımı ile gerçekleşmektedir. Üretimler, çok sayıda çoklu tepsi sistemi ile paralel kültürlerde gerçekleştirilir (Şekil 2.9). Kullanım kolaylığı nedeniyle genellikle 10'lu tepsi sistemi tercih edilmektedir fakat tecrübeli bir el 40'lı tepsi sistemini aynı rahatlıkta kullanabilmektedir. Fakat bu sistemde orta tabakalardaki kültürler için gaz değişimi aynı olmayabilir ve 40'lı tepsilerde büyüme kontrolü amaçlı mikroskop kullanımı oldukça zordur (84,85).



Şekil 4.9 10'lu tepsi sistemindeki paralel hücre kültürleri

Süspansiyon kültürleri kullanarak vektör üretimi

Yapışkan hücrelerin transfeksiyonu, lentiviral vektör üretimi için altın standart yöntem olarak kabul edilse de bu sistem ölçeklenebilirlik açısından oldukça sınırlıdır. Endüstriyel üretimler için büyük biyoreaktörlerde hücre kültürü genellikle en uygun yaklaşımdır.

Biyoreaktörlerde üretim, üretici hücrelerin süspansiyon halinde genişlemesini gerektirir. Lentivirüs üretimi için kullanılan birkaç hücre hattı (293T, 293FT ve 293SF-3F6), kimyasal olarak tanımlanmış ortamlarda mikro taşıyıcılara ihtiyaç duymadan kolayca süspansiyon halinde büyümektedir. Buna ek olarak, kültür ortamında sığır serumu ve hayvansal bileşenlerin yokluğu, harici ajanlar tarafından oluşan kontaminasyon riskini azalttığı için, klinik üretimler için en uygun durumdur (90-92).

Bir süspansiyon kültüründeki hücreler sallama şişeleri, cam biyoreaktörler, paslanmaz çelik biyoreaktörler, dalga torbaları ve tek kullanımlık karıştırılmış tanklar gibi farklı tipte kaplarda genişletilebilir (90). Kültürü sürekli olarak karıştırma gerekliliği nedeniyle kalsiyum fosfat kullanarak DNA çöktürmesinin, süspansiyon hücrelerini transfekte etmek için daha az etkili olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple, katyonik polimerler gibi diğer transfeksiyon ajanları daha sık kullanılmaktadırlar. 293T ve 293-EBNA1 hücrelerinde en yüksek transfeksiyon verimliliği lineer 25-kDa PEI tarafından indüklenmektedir ve bu durum transfekte olan hücrelerin %75'inin yeşil flüoresan protein (GFP) haberci plazmidini kullanmasına yol açmaktadır (93). Aynı PEI formu, Marceau ve Gasmi patentinde lentiviral vektör üretimi için kullanılmış ve GFP-pozitif hücrelerin oranı %90 olarak belirlenmiştir. Fakat bu çalışmada transfeksiyon etkinliği transfeksiyondan 48 saat sonra ölçülmüştür. Bu nedenle, GFP sinyali ayrıca neosentize lentiviral vektörün sebep olduğu hücre transdüksiyonundan da kaynaklanabilir (90).

PEI aracılı transfeksiyonun dezavantajı, yüksek transfeksiyon verimine ulaşmak için gereken plazmid DNA miktarıdır. Çok miktarda DNA, yüksek bir hammadde maliyetini temsil eder (92,94). PEI ile ilgili bir diğer sorun ise, PEI molekülünün saflaştırılmış vektör preparatında tespit edilmesi için geliştirilmiş bir yöntemin bulunmamasıdır. Bu nedenle, PEI'nin vektörle beraber kalmaya devam etmesinin, vektörün enfekte etmek kabiliyeti ve stabilitesi için zararlı olup olmadığı açık değildir.

Yapışık hücrelerde lentiviral vektörün kültür süpernatantınının, bir günde en az iki kez hasat edilebilir olması bu işlemin maliyet etkinliğini artırmaktadır. Süspansiyonda ise, kültür ortamı hücrelerden bağımsız olarak toplanamayacağı için böyle bir uygulama yapılamaz.

Sonuç olarak, süspansiyon hücrelerinin geçici transfeksiyonu kullanılarak lentiviral vektörlerin büyük ölçekli üretimi mümkündür ve umut verici verimlilik göstermektedir. Bu teknolojiyi endüstriyel üretime aktarmadan önce büyük miktarlarda plazmid DNA gerektiren ve üretim işlemini oldukça maliyetli kılan transfeksiyon prosedürünün optimize edilmesi gerekmektedir (95).

4.5.4. Lentiviral vektör saflaştırma

Klasik saflaştırma protokolleri vektör preparatlarının konsantrasyonunu artırmak için ultrasantrifüj kullanımına dayanmaktadır. Fakat santrifüj kullanımının ölçeklendirilme limitleri, zaman kaybına sebep olması ve enflamatuar veya immünojenik reaksiyonlara neden olan kirliliğe sebep olması gibi dezavantajları vardır (96). Hücre zarı ve kromatografi sürecine dayanan güncel stratejiler ise, vektör preparatlarındaki protein ve DNA kirliliklerini azaltmak için birkaç basamağın kombinasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Mikrofiltrasyon, retroviral vektör yığınlarının saflaştırılmasında sık olarak kullanılan tekniklerden biridir. Çalışmalarda, filtre boyutundaki azalmanın, filtrasyona uğrayan retroviral parçacıklardaki bozulmayı azalttığı gösterilmiştir (97). Ultrafiltrasyon gibi hücre zarı bazlı yöntemler viral vektörlerin konsantrasyonunu artırmak için yeterli tekniklerdir. Örneğin, teğetsel akış filtrasyonu (TAF) kısa sürede ölçeklenebilirlik, verimlilik ve zamandan kazanç gibi avantajlar sağlayarak lentiviral vektörlerin kısmi saflaştırılmasında ve konsantre edilmesinde kullanılmıştır (98).

Lentiviral vektörlerin saflaştırılmasında heparin etkileşimli kromatografi, anyon-değişimli kromatografi ve jel filtrasyonu gibi kromatografik yöntemler kullanılmaktadır (99, 100). Anyon-değişimli kromatografi, lentivirüsleri saflaştırmak amacıyla, negatif yüke sahip viral parçacıkların pozitif yüke sahip hücre zarına bağlandığı ve sonrasında ayırma sıvıları ile ayrıldığı bir yöntemdir (101). Kromatografik yöntemler üç genel prensibe dayanmaktadır.

1. Yakalama: Hedef molekülün hücre kültüründen ilk saflaştırılmasıdır ve ana kirleticilerin ortadan kaldırılmasını sağlar.

2. Ara saflaştırma: Proteinler, DNA ve endotoksinler gibi belirli safsızlıkların uzaklaştırılmasıyla sonuçlanan adımdır.

3. Parlatma: Aktif, güvenli ve saf bir ürün bırakmak amacıyla, geriye kalan ve safsızlığa neden olabilecek maddelerin uzaklaştırılmasıyla sonuçlanan adımdır.

Kromatografik yöntemlerin kullanımı, lentiviral vektörlerin geri kazanım oranını %70'e çıkarmış ve konak hücre DNA'sının ayırma oranını %99'a çıkarmıştır (84, 102).

4.6. Miyeloid kaynaklı büyüme faktörü (MYDGF)

C19orf10 olarak da bilinen insan miyeloid türevli büyüme faktörü (MYDGF) UPF0556 ailesine ait olup, miyokard infarktüsünden sonra doku onarımını ve korunmasını sağlayan kemik iliği kaynaklı monositlerden/makrofajlardan salgılanan bir parakrin etkili proteindir (103). MYDGF dalak, prostat ve akciğerde kuvvetli, sol ventrikül ve karaciğerde zayıf bir şekilde eksprese edilmektedir. MYDGF, MAPK1 / 3-, STAT3- ve CCND1 aracılı sinyal yolları üzerinden endotel hücre çoğalmasını düzenler. PI3K / AKT'ye bağımlı sinyal yolağında ise kardiyak miyosit ölümünü inhibe eder (104). Bazı insanlarda hepatoselüler karsinomlarda C19orf10 mesajının arttığı ve bunun sonucunda rekombinant proteinin fazla ekspresyonu veya eklenmesinin AKT fosforilasyonu ve karaciğer kanseri hücre hattının çoğalmasıyla sonuçlandığı görülmüştür (105).

MYDGF, insan embriyonik böbrek 293 (HEK293) hücrelerinde C-terminal afinite etiketleri ile eksprese edilen iyi karakterize edilmemiş ve putativ salgılanan proteinler arasından seçildi. Rekombinant proteinler, serum açıklığına sahip, kültürlenmiş neonatal sıçan ventriküler miyositler üzerindeki sitoprotektif etkileri incelemek amacıyla test edildi. MYDGF'nin sağladığı sitoproteksiyon AKT'nin fosforilasyonu ve apoptozun inhibisyonu ile ilişkili bulunmuştur (106,107).

Eksojen olarak ilave edilen MYDGF, insan koroner arter endotel hücrelerinin proliferasyonunu teşvik etmiştir (104). Son olarak, gelişimsel kusurları olmamasına rağmen, MYDGF genetik nakavtlı farelerde, WT farelerine kıyasla daha büyük enfarktüs yaraları görülmüştür ve hücre proliferasyonu ve anjiyogenez infarkt sınır bölgesinde azalmıştır. Normal kemik iliğinin transplantasyonu veya iskemi ve reperfüzyon ardından uygulanan rekombinant MYDGF bu etkiyi tersine çevirmiştir (104).

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Materyaller

Bu çalışmada, E.coli Stb13 suşu (Thermo Fisher Scientific) ve Lenti-GDNF ve Lenti-VEGF, PAX, PMD2 plazmidler (Applied Biological Materials Inc) kullanılmıştır. Ayrıca çalışmada SH-SY5Y ve HEK293T hücre hatları (cat. no. CRL-11268), insan osteosarkom (HOS) hücreleri (cat. no. CRL-1543) ATCC firmalarından satın alınmıştır.

5.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada DMEM yüksek glikoz (GIBCO, katalog numarası: 11995), UltraCULTURE Serumsuz besiyeri (Lonza, katalog numarası: 12-725F), ısı ile etkisiz hale getirilmiş FBS (GIBCO, katalog numarası: 26140-079), Glutamax (GIBCO, katalog numarası: 35050), Penisilin-streptomisin (GIBCO, katalog numarası: 15140-122),% 0,25 Triptsin-EDTA (GIBCO, katalog numarası: 3197), PBS, kalsiyum klorür ve magnezyum klorür içermeyen PBS (GIBCO, katalog numarası: 14190), 0,25 mM EDTA (Invitrogen, katalog numarası: No Y02353), DNaseI Amplifikasyon derecesi (Invitrogen, katalog numarası: 18068015), CaCl₂ (Sigma, katalog numarası C-2536), H₂O (GIBCO, katalog numarası: 10977-015), ReliaPrep RNA Cell Miniprep System Kiti, PureLink® Quick Gel Extraction Kiti, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, İProof High-Fidelity PCR kit, 10 Fast Digestion Green Buffer, Fast Digest Enzyme, Rapid DNA Ligation Kiti, kullanılmıştır.

5.1.2. Kullanılan Ekipman ve Cihazlar

15 mL'lik falkon tüpü, 75 cm²'lik flakslar, mikrosantrifüj tüpler, PCR tüpleri, 500 mL'lik erlen, 100 mL'lik mezür, 150 cm² kaplar (Nuncclone, katalog numarası: 168381), T150 doku kültürü şişeleri, T25 doku kültürü flaksları, 6 kuyucuklu hücre kültürü plakaları (Applied Biosystems, katalog numarası: N801-0560), Polistiren yuvarlak tabanlı tüpler (5 ml, 12 mm, 75 mm) (Becton Dickinson, katalog numarası: 352005), 0,45 mm PES filtre üniteleri (Corning, katalog numarası: 430768), 0,22

mm PES filtre üniteleri (Corning, katalog numarası: 431096), 2. seviye biyogüvenlik kabini, Doku kültür kaputu(hood), inkübatör, Bekman ultra santrifüj (Beckman Coulter), SW28 ultra santrifüj rotoru (Beckman), SW28 santrifüj tüpleri (Beckman, katalog numarası: 344058), Beckman Avanti J-25 I santrifüj (Beckman), Sabit Açılı Rotor, JLA-10.500 (Beckman), 250 ml'lik kapak takımları olan polipropilen geniş ağızlı şişe(Beckman, katalog numarası: 356011), bu tez kapsamında laboratuarda kullanılan cihaz ve ekipmanlardır.

5.2. Metot

5.2.1. MYDGF klonlama

5.2.1.1. cDNA'dan PCR yöntemiyle full length MYDGF amplifikasyonu

5.2.1.1.1. SH-SY5Y Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmalarının standart başlangıç temizlik prosedürü olan 30 dakikalık UV ışık ile laminar flow kabin sterilizasyonu, çalışma alanı ve deney esnasında kullanılması öngörülen araç gereçlerin %70'lik etanol çözeltisi ile temizliği yapılmıştır. Çalışma için seçilen SH-SY5Y hücre hattı, dondurulmuş olarak bekletildiği stoktan çıkarılmış, 37 °C olarak ayarlanan su banyosunda 2 dakika içerisinde bekletilerek çözündürülmüştür. Kontaminasyonu önlemek amacı ile içerisinde SH-SY5Y hücre hattı bulunan kap %70'lik etanol ile temizlenmiştir. Çözülmüş halde bulunan SH-SY5Y hücreleri daha önceden hazırlanan 15 mL'lik falkonun içindeki 9 mL'lik medyumların içerisine eklenmiştir. Falkon 7 dakika boyunca 125 g ile santrifüj edilmiştir. Bu işlemde sonra falkondaki süpernatant olarak adlandırılan suyun üstünde yüzen bölüm çıkarılmış, pelet olarak adlandırılan dibe yapışmış toprak bölüm 3 mL medyum kullanılarak resüspanse işlemi gerçekleştirilmiştir. 75 cm²'lik flask içerisine pH değeri 7,3 olarak ayarlanmış 10mL meydum eklenmiştir ve 3mL meydum ile süspanse edilmiş SH-SY5Y hücreleri flasktaki medyumun içerisine ilave edilmiştir. Flask içerisindeki yapmış SH-SY5Y hücrelerinin oranı %80 doluluğa ulaşana kadar 37 °C 'lik etüve konulmuştur. Yapışmış olan hücreleri flask yüzeyinden ayırmak amacı ile Tripsin EDTA solüsyonu çözeltisi flaska eklenmiş ve flask hafifçe sallayarak çalkalanmıştır. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskop kullanılarak onaylandıktan sonra flaska

8 mL büyüme medyumu eklenmiştir. Flasktaki hücreler, flask başına ortalama 5×10^3 hücre/cm² olacak şekilde yeni flaslara aktarılmıştır. Yeni hazırlanan flaslklar 37 °C 'lık etüve konulmuştur.

5.2.1.1.2 RNA İzolasyonu

37°C'lık etüvde yetiştirilen SH-SY5Y hücreleri, 5×10^4 hücre/cm² konsantrasyona ulaştıktan sonra steril santrifüj tüpüne aktarılıp 5 dakika boyunca 300 g ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra tüpteki süpernatantlar alınmış ve dipteki pelet 1xPBS ile yıkanmıştır. Sonrasında hücreler tekrar 5 dakika boyunca 300 g ile santrifüj edilmiş ve süpernatant tüpten alınmıştır. Bu işlemden sonra dipteki pelet BL+TG Buffer ile yıkanmış ve üzerine %100'lük izopropanol eklenip 5 saniye boyunca hafifçe vortex işlemi uygulanmıştır. SH-SY5Y hücrelerini içeren bu karışım üzerine mini kolon yerleştirilmiş olan mikrosantrifüj tüpüne konulup 25 °C'de 30 saniye boyunca 13000 g ile santrifüj edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpünde biriken sıvı atıldıktan sonra mikrosantrifüj tüpüne tekrar yerleştirilen mini kolon 500 µL RNA yıkama solüsyonu ile yıkınıp tekrardan 30 saniye boyunca 13000 g ile santrifüj edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpünde biriken sıvı tekrardan uzaklaştırıldıktan sonra mini kolona 30 µL DNaz-I inkübasyon karışımı ekleyip 15 dakika boyunca 25 °C'de inkübe edilmiştir. 15 dakikalık inkübasyon işlemi sonrasında mini kolona 200 µL kolon yıkama solüsyonu eklenip 15 saniye boyunca 13000 g'de santrifüj edilmiştir. Bu işlemden sonra mini kolona 500 µL RNA yıkama solüsyonu eklenip 30 saniye boyunca 13000 g ile santrifüj edilmiştir. İçerisinde RNA yıkama solüsyonu olan mikrosantrifüj tüpü atılıp mini kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildikten sonra 300µL RNA yıkama solüsyonu eklenerek yüksek hızda 2 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra mini kolon elüsyon tüpüne konulup 15µL nükleaz free su eklenerek 1 dakika boyunca 13000 g ile santrifüj edilmiştir. Son olarak mini kolon çıkarılıp purifiye edilmiş RNA içeren elüsyon tüpü -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

5.2.1.1.3 RNA'dan cDNA Sentezi

First Strand cDNA Synthesis Kit'indeki gerekli malzemeler çözülerek buz içerisine yerleştirilmiştir. Protokolün ilk aşamasında 100 ng RNA ve 2.5 µg primer

içeren, geriye kalan kısma su eklenerek hazırlanan 13 µL'lik karışım hazırlanmıştır. RNA'nın ikincil yapılarının denatürasyonu garantiye almak adına karışım 10 dakika boyunca 65°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında bu karışım içerisine, 4µL Transcriptor RT Reaction Buffer (5x), 0.5µL Protector RNase Inhibitor (40 U/µl), 2µL dNTP-Mix, 10 mM ve 0.5 µL Transcriptor Reverse Transcriptase olmak üzere toplamda 7 µL'lik karışım eklenmiştir. Son karışım 30 dakika boyunca 55 °C'de inkübe edildikten sonra transkriptör ters transkriptazı inaktive etmek amacıyla 5 dakika boyunca 85 °C'de ısıtılmıştır. Son olarak, elde edilen cDNA kullanılacağı zamana kadar -20 °C'de saklanmıştır.

5.2.1.1.4 PCR Reaksiyonu

PCR reaksiyonu komponentleri aşağıdaki verilen protokole uygun olarak standardize edilmiştir.

Tablo 5.1 PCR reaksiyonu komponentleri

Komponent	20µL'lik Reaksiyon İçin Gereken Hacim
5X HF Buffer	4µL
dNTP karışımı	0.5µL
İleri Primer	0.5µL
Geri Primer	0.5µL
DNA	1µL
Steril H ₂ O	13.3µL
DNA Polimeraz	0.2µL
TOPLAM	20µL

İleri Primer : AGTCAGAATTCATCCGCAGCCCCGGGATGG

Geri Primer : AGTCAGCGGCCGCTCACATCAGGACTTCTGAGCCTTC

Hazırlanan PCR karışımı aşağıda verilen sıcaklıklarda PCR işlemine alınmıştır.

Tablo 5.2 PCR reaksiyonu sıcaklık ve süreleri

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Devir
İlk Denatürasyon	98°C	2 Dakika	1
Denatürasyon	98°C	10 Saniye	30
Yapışma	62°C	30 Saniye	
Uzama	72°C	30 Saniye	
Son Uzama	72°C	10 Dakika	1
Stoklama	4°C	∞	∞

PCR ürünleri -20°C’de stoklanmıştır.

5.2.1.2. Jel Elektroforez ve Jel Ekstraksiyonu

PCR ürünlerinin elde edilmeye çalışılan DNA bölümleri olup olmadığını anlamak amacıyla jel elektroforez yöntemi kullanılmaktadır. Bu amaç doğrultusunda 1g agaroz, 100 mL TAE (Tris/Asetik asit/ EDTA) içerisinde ısıtma işlemi yardımı ile çözündürülerek %1’lik agaroz jel hazırlanmıştır. Isıtma işlemi sonrasında soğuma esnasında olan jel çözeltisine 4 µL Safe-Red adlı nükleik asit boyası eklenmiştir. Hazırlanan jel elektroforez tankına dökülüp katılaşmaya kadar soğumaya bırakılmıştır. Katılaşmış jele öncelikle 5 µL Ladder ve sonrasında 4 µL yükleme boyası ile karıştırılmış 1µL PCR ürünleri her bir velle yüklenmiştir. Jel 30 dakika boyunca 100 V ile çalıştırıldıktan sonra, Ladder ve PCR örnekleri UV ışık altında görüntülenmiştir. Ladder referans alınarak istenilen DNA parçaları keskin bir birstüri yardımı ile çıkarılmıştır. Çıkarılan jel dilimi hacminin üç katı olacak şekilde jel çözücü buffer ile bir mikrosantrifüj içinde konuşmuştur. Jel 10 dakika boyunca 50°C’de inkübe edildikten sonra jel hacmi kadar izopropanol tüpün içerisine eklenmiştir. Çözümüş durumdaki jel çözeltisi pipet yardımı ile jel ekstraksiyon kolonu olan yıkama tüpüne boşaltılmıştır. 1 dakika boyunca 12000 g ile santrifüj

işlemi yapıldıktan sonra tüpte kalan sıvı çıkarılmıştır. Kolon tekrar tüpe yerleştirilip 500 µL etanol içeren yıkama bufferı eklenmiştir ve tüp tekrardan dakika boyunca 12000 g ile santrifüj edilmiştir. Tüpteki sıvı tekrardan boşaltıldıktan sonra içerisinde kolon olan tüp maksimum hızda 1-2 dakika daha santrifüj edilmiştir ve tüpteki sıvı boşaltılmıştır. Kolon tüpe yerleştirilip 50 µL elüsyon bufferı eklendikten sonra 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilip 1 dakika boyunca da 12000 g ile santrifüj edilmiştir. Saflaştırılan DNA -20°C’de stoklanmıştır.

5.2.1.3. Restriksiyon Enzimi ile Parçalama

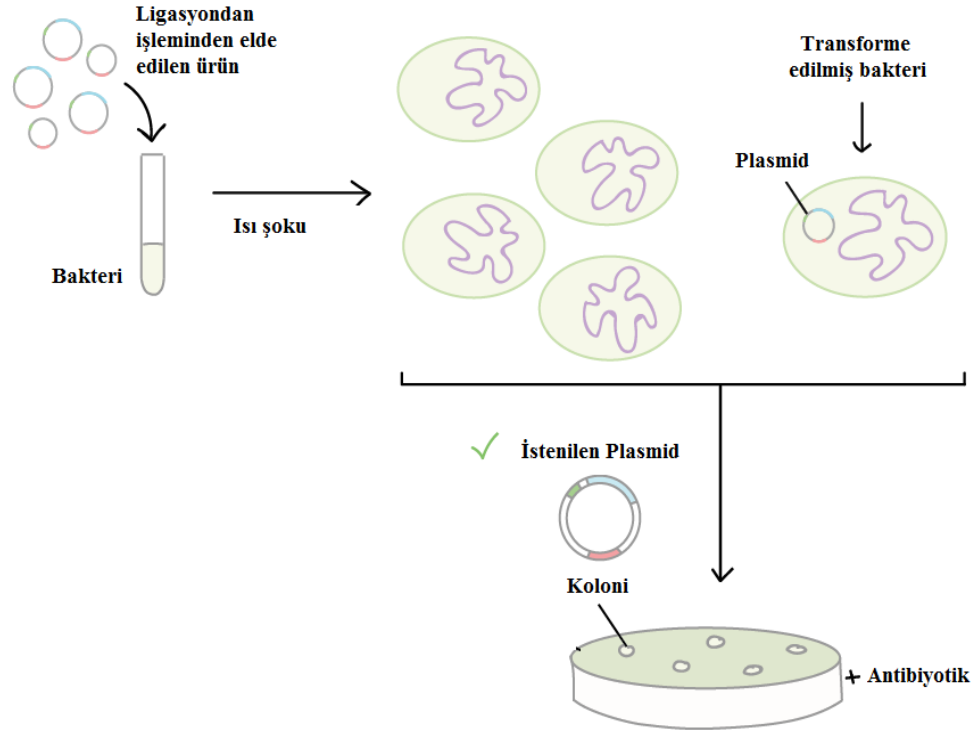
Restriksiyon enzimi, restriksiyon bufferı ve saflaştırılan DNA belirlenen miktarlarda su ile karıştırılmıştır ve 5 dakika boyunca 37°C’lik su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu işlem sonunda DNA istenilen parçalara ayrılmıştır. Aynı işlem pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektörüne de uygulanıp kesim işlemi gerçekleştirilmiştir.

5.2.1.4. Ligasyon

Restriksiyon işlemi sonrası kesilen pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektörü ve DNA, uygun miktarlarda ligaz enzimi, ligasyon bufferı ve su bir tüp içerisinde karıştırılıp 5 dakika boyunca 22°C’de inkübe edilmiştir. Bu işlem sonunda ligasyon gerçekleşmiştir.

5.2.1.5. Plazmid Üretimi ve Transformasyon

Bu bölümde öncelikle ligasyon işleminde elde edilen ürünlerin ısıl işlemle şok uygulama metodu kullanılarak bakteriyeye sokulması amaçlanmıştır. İlk olarak E.coli Stb13 suşundan 100µL alınarak 1.5ml’lik tüpün içerisine konulmuştur. Tüp bir süre buzda bekletildikten sonra tüpün içerisinde 50ng ligasyon ürünü konulup 10 dakika daha buzda bekletilmiştir. DNA ve E.coli içeren tüp 45 saniye boyunca 42°C’lik su banyosuna konulmuştur. E.coli hücrelerine gelebilecek zararı azaltmak amacıyla tüp 2 dakika boyunca tekrardan buza konulmuştur. Tüp buzdan alındıktan sonra içerisine 900µL antibiyotik içermeyen LB medyum konulup 1 saat boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre bittikten sonra tüpten 100 µL alınarak plazmidlerin direnç sağladığı uygun antibiyotikleri içeren agar besiyerlerine ekilip gece boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Çoğaltılmış olan bakteriler bir sonraki işleme kadar dondurulup stoklanmıştır.



Şekil 5.1 Plazmid Üretimi ve Transformasyon

5.2.1.6. Koloni seçimi ve doğrulaması

Agar besiyerindeki plazmid içeren bakteri kolonilerinden en izole olanlardan biri seçildikten sonra çoğaltma işlemi için LB medyum içerisine konulup 1 gece boyunca çalkalayıcıda bekletilmiştir. Çoğaltma işlemi sonrası bu karışım 10 dakika boyunca 5500 rpm ile santrifüj edilmiş, sonrasında süpernatant kısım çıkarılıp dipte pelet olarak bulunan hücreler 250 μ L süspansiyon çözeltisi ile süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon işlemi sonrasında tüpe 250 μ L Lizis çözeltisi eklenip hafifçe vortex işlemi uygulanmıştır. Bu işlemden sonra tüpe 350 μ L nötralizasyon çözeltisi eklenip hafifçe vortex işlemi uygulandıktan sonra tüpler 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant kısım içinde GeneSpin kolonu bulunan mikrosantrifüj tüpüne eklenip 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası tüpteki sıvı boşaltılıp, kolon tekrar tüpe yerleştirildikten sonra yıkama eklenerek 60 saniye boyunca santrifüj edilmiştir. Kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne konulup 50 μ L elüsyon bufferı eklendikten sonra 2 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Tüpte toplanan temizlenmiş plazmid bir sonraki kullanım için -20°C 'de stoklanmıştır.

Son olarak temizlenmiş olan plasmide restriksiyon işlemi uygulanıp %1'lik agaroz jelde yürütülerek istenilen DNA parçaları gözlemlenmiştir.

5.2.2. Pseudovirüs Üretimi

5.2.2.1. Lentiviral vektörlerin üretilmesi

Çalışmanın bu kısmına HEK293T hücreleri 8×10^6 yoğunlukta olacak şekilde 15 mL DMEM, %10 FBS, %1 Glutamax ve %1 penisilin-streptomisin içeren besiyeri dolu T75 flasklara ekilip 20 saat boyunca, 37°C 'de, %5 CO_2 içeren inkübasyon ortamına bırakılmıştır. İnkübasyon işleminin sonlarına doğru 1,3 pmol psPAX2, 0,72 pmol pMD2.G ve 1,64 pmol transfer edilecek terapötik gen içeren plasmid ve kalan kısım $500\mu\text{L}$ 'e tamalanacak şekilde serum içeren karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım HEK293T ekilmiş flasklara dikkatlice eklenip 18 saat boyunca 37°C 'de, %5 CO_2 içeren inkübasyon ortamına bırakılmıştır. 18 saatlik inkübasyon sonrası medyum 15ml'lik taze DMEM ile yenilenip 37°C 'de, %5 CO_2 içeren inkübasyon ortamına bırakılmıştır. 48, 72, 96'nci saatlerde meydumların toplanma ve yenilenme işlemleri yapılmıştır. Toplanmış olan meydumlar 10 dakika boyunca 500 g ile santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant $0,45\text{nM}$ 'lık PES filtresi ile filtrelenip -80°C 'de stoklanmıştır.

5.2.3. Viral Transdüksiyon

5.2.3.1. Gereken Virüs Miktarının Hesaplanması

Genel hesaplama formülü olarak aşağıdaki iki formül kullanılmıştır.

I. İhtiyaç Duyulan Virüs Miktarı =

Ekilen Hücre Sayısı \times Enfekte Etme Oranı

II. İhtiyaç Duyulan Virüs Microlitresi = $\frac{\text{İhtiyaç Duyulan Virüs Miktarı}}{\text{Viral Titre}}$

5.2.3.2 Hücre Ekimi

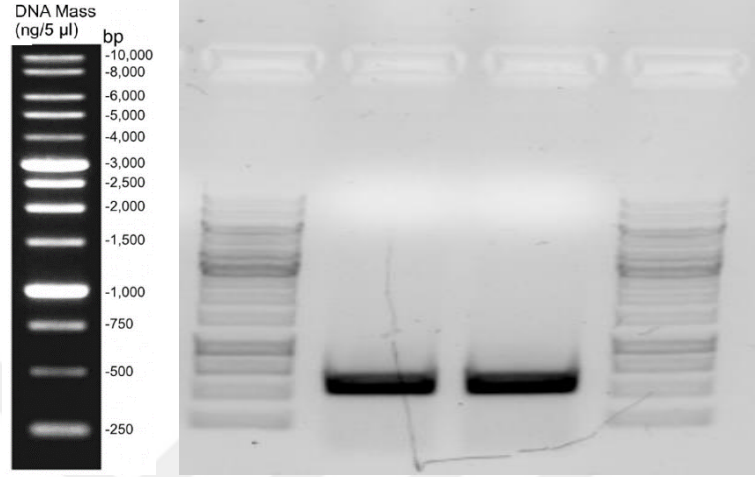
Transdüksiyon işleminde 1 gün önce $3,5 \times 10^4$ hücre 500 μ L meydum içerisine ekilmiştir. Hücre yapışmasından sonra 1.5 mL ekstra medyum eklenmiştir.

5.2.3.3 Transdüksiyon

Üretilen lentivirüs çözülerek buza konulmuştur. 1mg/ml konsantrasyonunda 8 μ L polibren 957 μ L meydum ile karıştırılmıştır. Yukarıdaki hesaplamara göre $3,5 \times 10^4$ hücre için 35 μ L terapötik gen içeren lentivirüs uygun görülüp polibren/meydum karışımına eklenmiştir. Polibrenin son konsantrasyonu 8 μ L/ml olarak ayarlanmıştır. Hücrelerinin ekildiği meydum boşaltılıp yerine lentivirüs/polibren/medyum karışımı eklenmiştir. Gece boyunca 37°C'de inkübe edildikten sonra lentivirüs/polibren/medyum karışımı boşaltılıp yerine taze medyum eklenmiştir. Hücre kültürü bir sonraki işlem olan görüntüme için tekrardan 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

6.ARAŞTIRMA BULGULARI

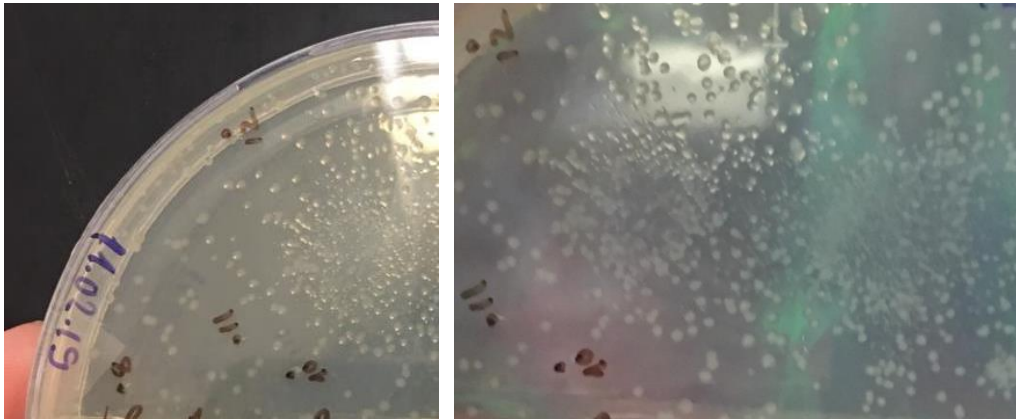
6.1. PCR Yöntemiyle cDNA Kullanılarak Çoğaltılmış MYDGF Geninin Jel Görüntüsü



Resim 6.1 PCR yöntemiyle çoğaltılmış MYDGF geninin jel görüntüsü

MYDGF geni PCR yöntemi ile çoğaltılmış olup jel elektroforez yöntemi ile görüntülenmesi yapılmıştır. 580 baz çifti büyüklüğündeki MYDGF geninin jeldeki görüntüsü, DNA markerında 580 baz çiftinin bulunduğu aralığa denk gelmekte ve MYDGF geninin doğru bir şekilde çoğaltıldığını göstermektedir.

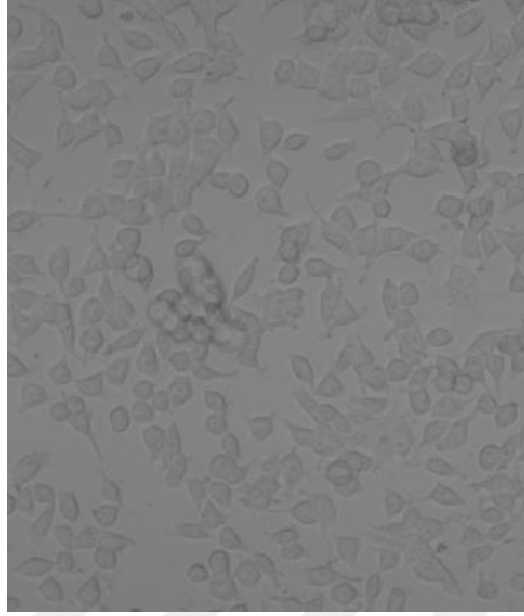
6.2. Transformasyon Sonrası Oluşan Kolonilerin Seçimi ve Doğrulaması



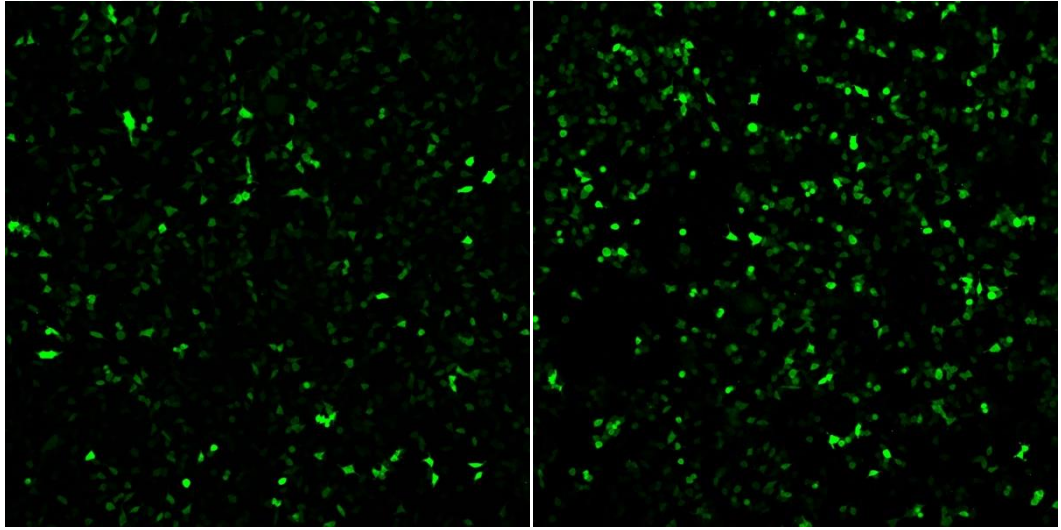
Resim 6.2 Transformasyon sonrası oluşan tüm koloniler ve içerlerinden seçilenler

MYDGF geninin E.Coli'ye transformasyon işlemi gerçekleştirilmiş olup, diğer kolonilerden izole olan koloniler seçilmiş ve jel elektroforez yöntemi ile doğrulamaları yapılmıştır.

6.3. Lentiviral Vektörlerin Üretilmesi



Resim 6.3 HEK293T hücrelerinin lentiviral vektörünün olmadığı ışık mikroskobu görüntüsü



Resim 6.4 HEK293T hücrelerinin virüsü ürettiğine dair 48 ve 72 saat sonundaki hücre görüntüleridir.

Resim 6.4, HEK293T hücrelerinde virüs varlığını ve bu hücrelerin 48. ve 72. saatlerdeki eksprese ettikleri yeşil floresan proteini eksprese göstermektedir.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Literatürlerde yer alan kaynaklar incelendiğinde, MYDGF geninin mutasyonu sonucunda sağlıklı bireylerde miyokardiyal enfarktüs ve hepatosellüler kanser oluşma riski olduğu gösterilmektedir (104,107,108). MYDF ile yapılan adenovirüs aracılı gen tedavisinin miyokard enfarktüsünden sonra oluşan enfarktüs boyutunu ve sistolic disfonksiyon oluşumunu azalttığı gösterilmektedir (108). MYDGF genin ile yapılan gen terapisi çalışmaları oldukça azdır ve bu çalışmadaki lentiviral MYDGF vektörü üretimi ileride yapılacak gen terapisi çalışmalarına model olacaktır.

MYDGF geninin aktarılması amaçlı yapılan bu çalışmadaki lentiviral vektör üretimi, çoğaltılması ve hücre hattına aktarılmasındaki aşamalar literatürdeki viral vektör üretim protokollerine uygun olarak yapılmıştır.

Bu çalışmadaki modellemeye üretim, çoğaltma ve hücre hattına aktarım olmak üzere üç hedef seçilmiştir.

HEDEF I: MYDGF geni ile ilişki hastalıklara gen tedavisi olarak kullanılabilen lentiviral vektör üretimi

GERÇEKLEŞME: Öncelikle SH-SY5Y hücre hattından RNA izole edilmiş ve bu RNA'lerden cDNA sentezlenmiştir. Sentezlenen cDNA, PCR metoduyla amplifiye edilmiş ve sonrasında jel elektroforez yöntemi kullanılarak MYDGF genine ait DNA parçaları görüntülenmiştir (Şekil 6.1). Jelden bistiği yardımıyla çıkarılan MYDGF geni restriksiyon enzimi ile kesilen vektörle ligasyon işlemine sokulmuştur. Ligasyon işleminin ürünü E.coli suşu olan Stb13'e transforme edildikten sonra çoğaltılıp uygun kolonilerin seçimi yapılmıştır (Şekil 6.2) Plasmid DNA ve paketleme plazmidlerinin birleştirilmesi sonucunda lentiviral vektör üretimi gerçekleşmiştir (Şekil 6.3)

HEDEF II: Lentiviral vektörü üretilen MYDGF geninin çoğaltılması

GERÇEKLEŞME: Üretilen lentiviral vektörün çoğalma işlemi 48'inci ve 72'nci saatlerde görüntülenmiştir (6.4).

HEDEF III: Üretilen ve çoğaltılan lentiviral vektörler aracılığıyla MYDGF geninin hücre hattına aktarılması

GERÇEKLEŞME: Gerekli virüs miktarı hesaplanıp uygun sayıda hücre ekildikten sonra MYDGF genini içeren izole edilmiş hücreler %10 FBS ve %1 PSA içeren DMEM besiyeri içerisine ekimi yapıp 37°C'de %5 CO₂ inkübe edilmiştir. Polibrenin son konsantrasyonu 8 µL/ml olarak ayarlandıktan sonra hücrelerinin ekildiği meydan boşaltılıp yerine lentivirüs/polibren/medyum karışımı eklenmiştir. Gece boyunca 37°C'de inkübe edildikten karışımın taze medyum değişimi yapıp tekrardan inkübasyona bırakılmıştır.

Bu tez çalışmasında, MYDGF geni pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektörü ile birleştirilip paketleme plazmidleri yardımıyla HEK293T hattına verilerek lentiviral vektör üretimi gerçekleştirilmiş, bu lentiviral vektörler çoğaltılmış ve hedef hücreye başarıyla aktarılmıştır. Bu çalışma MYDGF geni ile ilişkili hastalıklara gen tedavisi uygulanabilmesi için lentiviral vektör kullanımı seçeneğini sunmaktadır.

8. KAYNAKLAR

1. Strachan T, Read AP. Human molecular genetics. Wiley-Liss, Newyork. 1999.
2. Gloves DJ, Lipps HJ. Towards safe non viral therapeutic gene expression in humans. *Nat Rev Genetics*. 2005;6:299-310.
3. Somia N, Verma IM. Gene therapy: Trials and Tribulations. *Nat Rev Genet*. 2000;1(2):91-99.
4. Ponder KP. Vectors in gene therapy. In *An introduction to molecular medicine and gene therapy*. Edited by Kresnia TF, John wiley & sons Inc, Newyork, USA. 2000;77-112....
5. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, Yates F, de Villartay J P, Le Deist F and Fischer A. Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *J Gene Med*. 2001; 3: 201-206
6. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova J L, Bousso P, Deist F L and Fischer A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. 2000; 288: 669-72.
7. Culver K. *Gene Therapy—A Handbook for Physicians*. Mary Ann Liebert, Inc., New York. 1994; 78-86.
8. Cavazzana-Calvo M and Fischer A. Gene therapy for severe combined munodeficiency: are we there yet? *J Clin Invest*. 2007; 117: 1456-65....
9. Rosenberg S A, Aebersold P, Cornetta K., Kasid A, Morgan R A, Moen R, Karson E M, Lotze M T, Yang J C and Topalian S L. Gene transfer into humans—immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*, 1990; 323: 570-78.
10. Edelstein M L, Abedi M R, Wixon J and Edelstein R M. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004—an overview. *J Gene Med*. 2004; 6: 597-602.
11. McCormack MP, Rabbitts TH. Activation of the T-cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2004; 350: 913–922.
12. Kaiser J. Clinical trials. Gene transfer an unlikely contributor to patient's death. *Science* 2007; 318: 1535.

13. Smith RH. Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther* 2008; 15: 817–822.
14. Bushman FD. Retroviral integration and human gene therapy. *J Clin Invest* 2007; 117: 2083–2086.
15. Gerrard AJ, Hudson DL, Brownlee GG, Watt FM. Towards gene therapy for haemophilia B using primary human keratinocytes. *Nat Genet* 1993; 3: 180–183.
16. Fenjves ES, Yao SN, Kurachi K, Taichman LB. Loss of expression of a retrovirus-transduced gene in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 576–578.
17. Sorrentino BP. Gene therapy to protect haematopoietic cells from cytotoxic cancer drugs. *Nature Rev Cancer* 2002; 2: 431–41.
18. De Palma M, Mazzieri R, Politi LS, et al. Tumor-targeted interferon- delivery by Tie2-expressing monocytes inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer Cell* 2008; 14: 299–311.
19. Biffi, A, Capotondo A, Fasano S, et al. Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice. *J Clin Invest* 2006; 116: 3070–82.
20. Visigalli I, Delai S, Politi LS, et al. Gene therapy augments the efficacy of hematopoietic cell transplantation and fully corrects mucopolysaccharidosis type I phenotype in the mouse model. *Blood* 2010; 116: 5130–9.
21. Ciceri F, Bonini C, Stanghellini MT, et al. Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. *Lancet Oncol* 2009; 10: 489–500.
22. Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 2011; 3: 95ra73.
23. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2011; 365: 725–33.

24. Qu D, Li J, Li Y, et al. Angiogenesis and osteogenesis enhanced by bFGF ex vivo gene therapy for bone tissue engineering in reconstruction of calvarial defects. *J Biomed Mater Res A* 2011; 96: 543-51.
25. Kerns HM, Ryu BY, Stirling BV, et al. B cell-specific lentiviral gene therapy leads to sustained B-cell functional recovery in a murine model of X-linked agammaglobulinemia. *Blood* 2010; 115: 2146-55.
26. Boztug K, Schmidt M, Schwarzer A, et al. Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med* 2010;363: 1918-27.
27. Naldini L. Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 301-15.
28. Herrero, M. J., Sendra, L., Miguel, A., & Aliño, S. F. (2017). Physical Methods of Gene Delivery. In *Safety and Efficacy of Gene-Based Therapeutics for Inherited Disorders* (pp. 113-135). Springer, Cham.
29. Misra, S. (2013). Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. *J Assoc Physicians India*, 61(2), 127-133.
30. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990;247:1465-68.
31. Wagner E, Curiel D, Cotton M. Delivery of drugs, proteins and genes using transferring as a ligand for receptor-mediated endocytosis. *Adv Drug Deliv Rev* 1994;14:113-135.
32. Curiel DT. Receptor-mediated gene delivery employing adenoviruspolylysine DNA complexes. In Wolff JA (ed). *Gene Therapeutics Methods and Applications of Direct Gene Transfer*, Birkhauser Boston, Cambridge, Mass, 1994:99-117.
33. Pierce EA, Liu Q, Igouchera O, Dmarrudin R, Ma H, Diamond SL, et al. Oligonucleotide-directed single base DNA alteration in Mouse embryonic stem cells. *Gene Therapy* 2003;10:24-33.
34. Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA (2012) Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res* 1: 27.
35. Wang W, Li W, Ma N, Steinhoff G. Non-viral gene delivery methods. *Curr Pharm Biotechnol*. 2013;14(1):46-60.

36. Al-Dosari MS, Gao X. Non viral gene delivery: Principle, limitations and recent progress. *AAPS J.* 2009;11(4):671-81.
37. Kay MA. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat Rev Genet.* 2011; 12(5):316-28.
38. Mingozzi F, High KA. Therapeutics in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet.* 2011;12(5):341-55.
39. http://en.wikipedia.org/wiki/Alipogene_tiparvovec.
40. Midoux P, Pichon C, Yaounac JJ, Jaffres PA. Chemical vectors for gene delivery; a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acid carriers. *Br J Pharmacol.* 2009;157(2):166-78.
41. <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/> assessed on march 20th 2014.
42. Gardlik R, Palffy R, Hodosy J, Lukacs J, Turna J & Celec P. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med. Sci. Monit.*, 2005; 11(4): 110-121.
43. Par, T G, Jeong J H and Kim S W. Current status of polymeric gene delivery systems. *Adv Drug Del Rev.* 2006; 58: 467-486.
44. Yoshino H, Hashizume K and Kobayashi E. Naked plasmid DNA transfer to the porcine liver using rapid injection with large volume. *Gene Ther.* 2006; 13: 1696-1702.
45. H, Murakami T, Li HM, Back T, Kurosaka K and Suzuki Y. Hydrodynamics-based gene delivery of naked DNA encoding fetal liver kinase-1 gene effectively suppresses the growth of pre-existing tumors. *Cancer Gene Ther.* 2006; 13: 993-1001.
46. Cemazar M, Golzio M, Sersa G, Rols MP and Teissie J. Electrically-assisted nucleic acids delivery to tissues in vivo: where do we stand? *Curr Pharm Des.* 2006; 12: 3817-3825.
47. Wolff JA and Budker V. The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv Genet.* 2005; 54: 3-20.
48. Jafari M, Soltani M, Naahidi S, Karunaratne DN and Chen P. Nonviral approach for targeted nucleic acid delivery. *Curr med chem.* 2012; 19: 197-208.

49. Nabel EG and Nabel GJ. Direct gene transfer: basic studies and human therapies. *Thromb Haemost.* 1993; 70: 202-203.
50. Sato A, Takagi M, Shimamoto A, Kawakami S and Hashida M. Small interfering RNA delivery to the liver by intravenous administration of galactosylated cationic liposomes in mice. *Biomaterials.* 2007; 28: 1434-1442.
51. Nguyen LT, Atobe K, Barichello JM, Ishida T and Kiwada H. Complex formation with plasmid DNA increases the cytotoxicity of cationic liposomes. *Biol Pharm Bull.* 2007; 30: 751-757.
52. Rolland A. Gene medicines: the end of the beginning? *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57: 669-673.
53. Azzam T and Domb AJ. Current developments in gene transfection agents. *Curr Drug Deliv.* 2004; 1: 165-193.
54. Chesnoy S, Durand D, Doucet J and Couarraze G. Structural parameters involved in the permeation of propranolol HCl by iontophoresis and enhancers. *J Control Release.* 1999; 58: 163-75.
55. Wolfert MA, Dash PR, Nazarova O, Oupicky D, Seymour LW and Smart S. Polyelectrolyte vectors for gene delivery: influence of cationic polymer on biophysical properties of complexes formed with DNA. *Bioconjug Chem.* 1999; 10: 993-1004.
56. Bennis JM, Choi JS, Mahato RI, Park JS and Kim SW. pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) comb shaped polymer. *Bioconjug Chem.* 2000; 11: 637-645.
57. Fajac I, Allo JC, Souil E, Merten M, Pichon C and Figarella Cl. Histidylated polylysine as a synthetic vector for gene transfer into immortalized cystic fibrosis airway surface and airway gland serous cells. *J Gene Med.* 2000; 2: 368-378.
58. Midoux P and Monsigny M. Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug Chem.* 1999; 10: 406-411.
59. Wolfert MA, Schacht EH, Toncheva V, Ulbrich K, Nazarova O and Seymour LW. Characterization of vectors for gene therapy formed by self-assembly of DNA with synthetic block co-polymers. *Hum Gene Ther.* 1996; 7: 2123-2133.

60. Gene therapy. In Gene therapy –tools and potential application. 2013. www.inthechopen.com [Assessed on March 31st 2014].
61. Herweiger H, Wolff JA. Progress and prospects: naked gene transfer and therapy. *Gene ther.* 2003;10:453-58.
62. Li SD, Huang SL. Gene therapy progress and prospects; Decade strategy. *Gene Ther.* 2006;13:1313-19.
63. Su CH, WU YJ, Wang HH, Yeh HI. Non viral gene therapy targeting Cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;303:H629-38.
64. Shirley S, Heller R, Heller L; Electroporation gene therapy. In Gene therapy of cancer. 3rd edition. Edited by Iatime EC, Gerson SL. Sandiego[USA]. Elsevier: 2013;93-106.
65. Newman CM, Bettinger T. Gene therapy progress and prospects: Ultrasound for gene transfer. *Gene ther.* 2007;14(6): 465-75.
66. Li SD, Huang L. Non viral is superior to viral gene delivery. *J Cont releae.* 2007; 123[3]:181-83.
67. Dabson J. Gene therapy progress and prospects; magnetic nano particle based gene delivery. *Gene therapy.* 2006;13:283-87.
68. Jones CH, Chen CK, Ravikrishnan A, Rane S, Pfeifer BA. Overcoming non viral gene delivery barriers: perspective and future. *Mol Pharm.* 2013;10(11):4082-98.
69. Herweiger H, Wolff JA. Progress and prospects: Hydrodynamic gene delivery. *Gene ther.* 2006;14:99-107.
70. Jin L, Zeng X, Liu M, Deng Y, He N. Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano carriers. *Theranostics.* 2014;4[3]:240-55.
71. Durai S, Mani M, Kandavelou K., Wu J, Porteus M.H, Chan-drasegaran S. *Nucleic Acids Res.* 2009; 33: 5978-5990.
72. Peng Z. Current status of Medicine in China: Recombinant Human agent for treatment of Cancers. 2005; 16: 1016-1027.
73. Sibbald B. Death but one unintended consequence of gene therapy trial. *CMAJ,* 2001; 164: 1612.

74. AMT being able to produce AAV in adequate amounts (http://www.ots.at/presseaussendung/OTE_20080526_OTE0002).
75. Walther W and Stein U. Viral vector for gene transfer: a review of their use in the treatment of human disease. *Drug*. 2000; 60: 249-271.
76. Delenda, C (2004). Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med* 6 (suppl. 1): S125–S138.
77. Curran, MA, Kaiser, SM, Achacoso, PL and Nolan, GP (2000). Efficient transduction of nondividing cells by optimized feline immunodeficiency virus vectors. *Mol Ther* 1: 31–38.
78. Ramezani, A and Hawley, RG (2002). Overview of the HIV-1 lentiviral vector system. *Curr Protoc Mol Biol* (Chapter 16: Unit 16.21).
79. Lu, X, Humeau, L, Slepushkin, V, Binder, G, Yu, Q, Slepushkina, T et al. (2004). Safe two-plasmid production for the first clinical lentivirus vector that achieves >99% transduction in primary cells using a one-step protocol. *J Gene Med* 6: 963–973.
80. Rohll, JB, Mitrophanous, KA, Martin-Rendon, E, Ellard, FM, Radcliffe, PA, Mazarakis, ND et al. (2002). Design, production, safety, evaluation, and clinical applications of nonprimate lentiviral vectors. *Methods Enzymol* 346: 466–500.
81. Levine, BL, Humeau, LM, Boyer, J, MacGregor, RR, Rebello, T, Lu, X et al. (2006). Gen transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17372–17377.
82. Dull, T, Zufferey, R, Kelly, M, Mandel, RJ, Nguyen, M, Trono, D et al. (1998) third generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72: 8463–8471.
83. Gama-Norton, L, Botezatu, L, Herrmann, S, Schweizer, M, Alves, PM, Hauser, H et al. (2011). Lentivirus production is influenced by SV40 large T-antigen and chromosomal integration of the vector in HEK293 cells. *Hum Gene Ther* 22: 1269–1279.
84. Merten, OW, Charrier, S, Laroudie, N, Fauchille, S, Dugué, C, Jenny, C et al. (2011). Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector

- produced for clinical ex vivo gene therapy application. *Hum Gene Ther* 22: 343–356.
85. Ausubel, LJ, Hall, C, Sharma, A, Shakeley, R, Lopez, P, Quezada, V et al. (2012). Production of CGMP-grade lentiviral vectors. *Bioprocess Int* 10: 32–43.
 86. Smith, SL and Shioda, T (2009). Advantages of COS-1 monkey kidney epithelial cells as packaging host for small-volume production of high-quality recombinant lentiviruses. *J Virol Methods* 157: 47–54.
 87. Marino, MP, Luce, MJ and Reiser, J (2003). Small- to large-scale production of lentiviral vectors. *Methods Mol Biol* 229: 43–55.
 88. Kutner, RH, Zhang, XY and Reiser, J (2009). Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat Protoc* 4: 495–505.
 89. Patel, M, Wilcox, DA, Giddings, AM, McKay, TR, Olsen, JC (2004). Modification of HEK 293 cell integrin expression profile allows convenient large-scale roller bottle production of lentiviral vectors. *Mol Ther* 9:S33.
 90. Marceau, N and Gasmi, M, Scalable lentiviral vector production system compatible with industrial pharmaceutical applications, WO 2013076309 A1 (2013).
 91. Witting, SR, Li, LH, Jasti, A, Allen, C, Cornetta, K, Brady, J et al. (2012). Efficient large volume lentiviral vector production using flow electroporation. *Hum Gene Ther* 23: 243–249.
 92. Ansoerge, S, Lanthier, S, Transfiguracion, J, Durocher, Y, Henry, O and Kamen, A (2009). Development of a scalable process for high-yield lentiviral vector production by transient transfection of HEK293 suspension cultures. *J Gene Med* 11: 868–876.
 93. Durocher, Y, Perret, S and Kamen, A (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res* 30: E9.
 94. Tom, R, Bisson, L and Durocher, Y (2008). Transfection of HEK293-EBNA1 cells in suspension with linear PEI for production of recombinant proteins. *CSH Protoc* 2008: pdb.prot4977.

95. Merten, O. W., Hebben, M., & Bovolenta, C. (2016). Production of lentiviral vectors. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 3, 16017.
96. Baekelandt, V., Eggermont, K., Michiels, M., et al. (2003). Optimized lentiviral vector production and purification procedure prevents immune response after transduction of mouse brain. *Gene Ther.* 10, 1933–1940
97. Reeves, L., and Cornetta, K. (2000). Clinical retroviral vector production: step filtration using clinically approved filters improves titers. *Gene Ther.* 7, 1993–1998
98. Geraerts, M., Michiels, M., Baekelandt, V., et al. (2005). Upscaling of lentiviral vector production by tangential flow filtration. *J. Gene Med.* 7, 1299–1310.
99. Segura, M.M., Kamen, A., Trudel, P., et al. (2005). A novel purification strategy for retrovirus gene therapy vectors using heparin affinity chromatography. *Biotech. Bioeng.* 90, 391–404.
100. Rodrigues, T., Carvalho, A., Roldao, A., et al. (2006). Screening anion-exchange chromatographic matrices for isolation of onco-retroviral vectors. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 837, 59–68.
101. Schweizer, M., and Merten, O.W. (2010). Large-scale production means for the manufacturing of lentiviral vectors. *Curr. Gene Ther.* 10, 474–486.
102. Slepushkin, V., Chang, N., Cohen, R., et al. (2003). Large-scale purification of a lentiviral vector by size exclusion chromatography or Mustang Q ion exchange capsule. *BioProcess. J.* 2, 89–95
103. Bortnov V, Annis DS, Fogerty FJ, Barretto KT, Turton KB, Mosher DF. Myeloid-derived growth factor is a resident endoplasmic reticulum protein. *J Biol Chem.* 2018 Aug 24;293(34):13166-13175.
104. Korf-Klingebiel, M., Reboll, M. R., Klede, S., Brod, T., Pich, A., Polten, F., Napp, L. C., Bauersachs, J., Ganser, A., Brinkmann, E., Reimann, I., Kempf, T., Niessen, H. W., Mizrahi, J., Schönfeld, H. J., et al. (2015) Myeloidderived growth factor (C19orf10) mediates cardiac repair following myocardial infarction. *Nat. Med.* 21, 140–149

105. Weiler, T., Du, Q., Krokhin, O., Ens, W., Standing, K., El-Gabalawy, H., and Wilkins, J. A. (2007) The identification and characterization of a novel protein, c19orf10, in the synovium. *Arthritis Res. Ther.* 9, R30.
106. Weeraphan, C., Diskul-Na-Ayudthaya, P., Chiablaem, K., Khongmanee, A., Chokchaichamnankit, D., Subhasitanont, P., Svasti, J., and Srisomsap, C. (2012) Effective enrichment of cholangiocarcinoma secretomes using the hollow fiber bioreactor culture system. *Talanta* 99, 294–301.
107. Sunagozaka, H., Honda, M., Yamashita, T., Nishino, R., Takatori, H., Arai, K., Yamashita, T., Sakai, Y., and Kaneko, S. (2011) Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 129, 1576–1585.
108. Shinde AV., Frangogiannis NG. (2015) Mediators secreted by myeloid cells may protect and repair the infarcted myocardium. *Circulation Research*.117:10–12

9.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mustafa Can	Soyadı	Kiren
Doğum Yeri	Zonguldak	Doğum Tarihi	30.08.1990
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	69589146356
E mail	m.cankiren@gmail.com	Telefon	+90 555 345 0270

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi/Fen Fakültesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2014
Yüksek Lisans	TED Zonguldak Koleji Vakfı Özel Lisesi	2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
Yerli Uzman	ÖSYM	2018-Güncel

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	Çok iyi	Çok İyi	Çok İyi

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES	81.08	82.43	72.25
YDS	81.25		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Programaları	Çok İyi
Matlab	İyi
Java	İyi

Sertifikalar

İstanbul Medipol Üniversitesi	Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	2016
----------------------------------	--	------