



**İKİ FARKLI GENE (VEGF-A ve VEGFR-2) ÖZGÜ shRNA İÇEREN
VEKTÖR TASARIMI ve BUNUN MEME KANSERİNDE GEN
SUSTURMA ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Emine ŞALVA

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Elif YEŞİLADA**

Yüksek Lisans Tezi - 2019

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İKİ FARKLI GENE (*VEGF-A* ve *VEGFR-2*) ÖZGÜ shRNA İÇEREN VEKTÖR
TASARIMI ve BUNUN MEME KANSERİNDE GEN SUSTURMA
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Emine ŞALVA

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Elif YEŞİLADA

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından 2016/142 Y.Lisans Proje numarası ile desteklenmiştir.

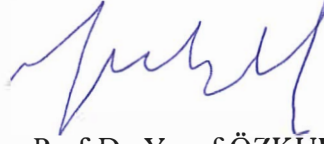
MALATYA

2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Emine ŞALVA'nın " İki Farklı Gene (VEGF-A ve VEGFR-2) Özgü shRNA İçeren Vektör Tasarımı ve Bunun Meme Kanserinde Gen Susturma Etkinliğinin Araştırılması "** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi: 19/07/2019



Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL
Erciyes Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Elif YEŞİLADA
İnönü Üniversitesi
Danışman
Üye



Doç. Dr. Şengül YÜKSEL
İnönü Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun /...../2019 tarih ve 2019/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Meme Kanseri.....	4
2.2. Tümör Anjiogenezi	8
2.3. Anjiogenez Mekanizması	8
2.4. Kanserin Anjiogenik Dönüşümü	9
2.5. Anjiogenez Bağımlı Metastaz.....	10
2.6. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörleri (VEGF)	11
2.7. VEGF Yolağı	12
2.8. Anti-Anjiogenik Tedavi	13
2.9. RNA Engelleme (RNA İnterferans, RNAi)	16
2.10. Kısa Saç Tokası RNA'lar (Short Hairpin RNA'lar, shRNA).....	19
2.11. Çoklu RNA kasetleri.....	20
3. MATERYAL VE METOT	22
3.1. Kullanılan Materyaller	22
3.1.1. Alet ve Cihazlar	22
3.1.2. Enzimler.....	22
3.1.3. Kimyasal Madde ve Malzemeler	23
3.1.4. Besiyerleri ve Çözeltiler	23
3.2. Metot.....	24
3.2.1. Plazmid DNA'nın bakteri hücresine transformasyonu ve çoğaltılması.....	24
3.2.2. Plazmid siRNA'nın Spektrofotometrik Kontrolü	25
3.2.3. Plazmid siRNA'nın Elektroforetik Kontrolü	26
3.2.4. VEGF-A ve VEGFR-2'ye spesifik shRNA hedef bölgelerinin seçilmesi ve oligonükleotid dizaynı	26
3.2.5. Tek iplikli shRNA dizilerinin bağlanması	27
3.2.6. psiRNA-DUO plazmid DNA'sı içerisine shRNA dizilerinin klonlanması	28
3.2.7. shRNA Dizilerinin Klonlandığı Vektörlerde Klonlamanın Doğruluğunun Nükleik Asit Sekanlama Yöntemi ile Tespit Edilmesi	30

3.3. In vitro Transfeksiyon Çalışmaları	31
3.3.1. Hücre Kültürü Pasajı ve Hücre Kültürünün Devamlılığının Sürdürülmesi Çalışmaları.....	31
3.3.2. Transfeksiyon Öncesi Hücre Ekimi ve Transfeksiyon	31
3.3.3. Plazmidlerin Hücreye Girişinin Floresan Mikroskopu İle İncelenmesi	32
3.3.4. ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) Yöntemi İle VEGF-A ve VEGFR2'nin Gen İnhibisyonunun Belirlenmesi	32
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. psiRNA-DUO Plazmidinin E.coli'ye Transformasyonu ve Kontrolüne İlişkin Bulgular	34
4.2. Plazmid siRNA'nın Spektrofotometrik ve Elektroforetik Kontrolüne İlişkin Bulgular	34
4.3. shRNA Dizilerinin Bağlanmasına İlişkin Bulgular	35
4.4. psiRNA-DUO İçerisine shRNA Dizilerinin Klonlanmasına İlişkin Bulgular.....	36
4.5. Klonlanan Vektörlerin Doğruluğunun Nükleik Asit Sekanslama Yöntemi İle Belirlenmesi.....	44
4.6. In vitro Transfeksiyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular	46
4.6.1. Meme Kanseri Hücrelerine psiVEGF-A/VEGFR-2 Plazmidinin Transfeksiyonunun Floresan Mikroskopu ile Görüntülenmesi	46
4.6.2. Klonlanan Plazmidlerin VEGF-A ve VEGFR-2 Gen Susturma Etkinliğinin ELISA Yöntemi İle İncelenmesi	47
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	58
KAYNAKLAR	59
EKLER.....	65
EK 1. ÖZGEÇMİŞ.....	65
EK 2. ETİK KURUL YAZISI	75

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans süresi boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, her türlü olanağı sağlayan, her zaman örnek aldığım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Elif YEŞİLADA'ya,

Çalışmam süresince beni destekleyen, hep yanımda olan, akademik yaşamın zorluklarına rağmen beni her zaman cesaretlendiren ve maddi-manevi yardımlarını esirgemeyen sevgili eşim Mehmet Emin ŞALVA'ya, ablam Dr.Saadet Alan'a ve biricik oğlum Mehmet Eren ŞALVA'ya, aileme, dostlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2016/142 no'lu Y.Lisans projesi ile desteklenmiştir.

Emine Şalva

Malatya, 2019

ÖZET

İki Farklı Gene (VEGF-A ve VEGFR-2) Özgü shRNA İçeren Vektör Tasarımı ve Bunun Meme Kanserinde Gen Susturma Etkinliğinin Araştırılması

Amaç: Meme tümörünün büyümesi ve metastazı anjiyogeneze bağlıdır. Kanser tedavisinde tek bir anjiyogenik faktörün baskılanması, anjiyogenezin inhibisyonunda yetersiz kalabilir. Aynı anda birden fazla geni hedefleyen birkaç shRNA'yı kodlayan vektörlerin tasarımı, RNAi teknolojisi açısından önemli bir stratejidir. Birkaç shRNA'yı hedefleyen vektör tek bir mRNA içerisinde bulunan birçok bölgeyi hedefleyebildiği gibi farklı genlere hedeflenerek de daha etkin bir protein ifade baskılanması oluşturulabilir. Bu çalışmada, anjiogenezde önemli rol oynayan *VEGF-A* ve *VEGFR-2* genlerine hedeflenen shRNA'ları içeren tek bir RNAi-temelli vektör modifikasyonu ile hücrelerde RNAi etkisinin artırılması ve meme kanserinde terapötik etkinliğinin iyileştirilmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda *VEGF-A* ve *VEGFR-2*'ye spesifik shRNA dizileri tasarlandı ve her iki shRNA dizisi vektöre tek ve iki basamakta klonlandı ve kontrol çalışmaları yapıldı. Ayrıca, tek bir vektöre her iki dizinin birlikte ve her bir dizini vektöre ayrı ayrı klonlanmasında aynı metod kullanıldı. Tekli ve ikili olarak klonlanan plazmidlerin gen susturma etkinlikleri meme kanser hücreleri olan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde protein seviyesinde ELISA yöntemi ile incelendi.

Bulgular: Anjiogenezde önemli rol oynayan *VEGF-A* ve *VEGFR-2*'ye spesifik dizilerin susturma vektörlerine klonlanması ile meme kanser hücrelerinde *VEGF-A* ve *VEGFR-2* protein ekspresyonları önemli ölçüde baskılanmıştır. Çalışmamızda ikili klonlama yapılan vektörlerin tekli klonlama yapılan vektörlere göre meme kanseri hücrelerinde gen susturma etkinliği daha yüksek bulundu.

Sonuç: Bu tez çalışması ile RNAi teknolojisi kullanılarak birden fazla anjiyogenik faktörün ya da protein ve ilişkili reseptörünün birlikte susturulması ile meme kanserinin tedavisinde ümit verici sonuçlar elde edilebileceği önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: shRNA, vektör temelli RNAi, VEGFA, VEGFR2, anjiogenez, meme kanseri

ABSTRACT

The Investigation of Gene Silencing Efficiency in Breast Cancer and Vector Design Containing shRNA Specific to Two Different Genes (*VEGF-A* and *VEGFR-2*)

Aim: The growth and metastasis of breast tumor is dependent to angiogenesis. Suppression of a single angiogenic factor can be insufficient to inhibit angiogenesis. The design of vectors encoding several shRNAs is an important strategy for RNAi technology. The vector that targets different genes to produce more efficient protein expression suppression. In this study, a single RNAi-based vector modification containing targeted shRNAs to *VEGF-A* and *VEGFR-2* genes, which play an important role in angiogenesis, aimed to increase the RNAi effect in cells and to improve therapeutic efficacy in breast cancer.

Material and Method: In our study, *VEGF-A* and *VEGFR-2* specific shRNA sequences were designed and both shRNA sequences were cloned into the vector in one and two steps and control studies were performed. In addition, to cloning of both sequences into one vector and of each sequence separately into the vector was used same method. The gene silencing activities of single and dual cloned plasmids were examined by ELISA method in MCF-7 and MDA-MB-231 cells.

Results: In our study, gene silencing efficiency was found to be higher in vectors with dual cloning than vectors with single cloning. The protein expression in breast cancer cells was significantly suppressed by the use of silencing vectors cloning *VEGF-A* and *VEGFR-2* specific sequences that play an active role in angiogenesis.

Conclusion: As a conclusion, it can be suggested that RNAi technology can be obtain promising results in treatment of breast cancer by together silence of different angiogenic factors and their associated receptors.

Key Words: shRNA, vector based-RNAi, *VEGFA*, *VEGFR2*, angiogenesis, breast cancer

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
OD	: Optik Dansite
OD260	: 260 nm dalga boyundaki optik dansite değeri
OD280	: 280 nm dalga boyundaki optik dansite değeri
PBS	: Phosphate Buffer Saline (Fosfat sodyum klorür tamponu)
PDGF	: Platelet-Türevli Büyüme Faktörü
pDNA	: Plazmid DNA
RISC	: RNA ile indüklenen susturma kompleksi
RNAi	: RNA interference
shRNA	: Short hairpin RNA (Kısa saç tokası RNA)
siRNA	: Small interfering RNA (Küçük interferans RNA)
TE	: Tris/EDTA
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGFR-2	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 2

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Sessiz tümör hücrelerinden (dormant tumor cells, DTC).....	11
Şekil 2.2. VEGF ekspresyonu ve isoformları.	12
Şekil 2.3 Tedavi için onay alan anti-anjiogenik ilaçların başlıca moleküler hedefleri	14
Şekil 2.4. Anjiogenez ve onay alan anti-anjiogenik ilaçların zaman çizelgesi	15
Şekil 2.5. RNAi mekanizmasında vektör temelli shRNA'lar ve siRNA'ların prosesi.	18
Şekil 3.1. psiRNA-DUO-GFPzeo plazmidinin yapısı	25
Şekil 3.2. psiRNA-DUO plazmidine shRNA'ların klonlanması.	28
Şekil 4.1. psiRNA-DUO (A) ve psiRNA-Luc-Lac'ın (B) <i>E.coli</i> GT115	34
Şekil 4.2. psiRNA-DUO'nun elektroforetik kontrolü	35
Şekil 4.3. İleri ve geri oligonükleotidlerin tek zincirli ON'ler ve bağlanmış ON'ler.....	36
Şekil 4.4. shVEGF-A ligasyonu için psiRNA-DUO'nun Acc65I/HindIII restriksiyon enzimi ile kesilmesi	37
Şekil 4.5. shVEGF-A'nın psiRNA-DUO'ya ligasyonunun elektroforetik kontrolü	37
Şekil 4.6. shVEGF-A'nın klonlandığı plazmidleri içeren (beyaz renkli koloniler) ve kontrol olarak kullanılan petrde içermeyen kolonilerin (plasmid BbsI ile kesildikten sonra shVEGFA'nın klonlanmadığı mavi renkli koloniler) morfolojik görünüşleri.....	38
Şekil 4.7. psiRNA-VEGF-A'nın elektroforetik kontrolü	39
Şekil 4.8. psiRNA-VEGFA'nın BbsI ile kesimi ve VEGFR-2 ile ligasyonu.....	40
Şekil 4.9. shVEGFR-2'nin klonlandığı plazmidleri içeren (beyaz renkli koloniler, ok işareti ile gösterilmiştir) ve rekombinant vektörü içermeyen (mavi renkli koloniler) kolonilerin morfolojik görünüşleri.....	40
Şekil 4.10. psiRNA-VEGFA-VEGFR2'nin elektroforetik kontrolü	41
Şekil 4.11. psiRNA-DUO'nun Acc65I/HindIII/BbsI restriksiyon enzimleri ile 3'lü kesim sonrası ve VEGF-A ve VEGFR-2 shRNA'larının bağlanması sonrası agaroz jel elektroforez görüntüleri.....	42
Şekil 4.12. shVEGF-A ve shVEGFR2'nin birlikte klonlandığı plazmidleri içeren (beyaz renkli, ok işareti ile gösterilmiştir) ve içermeyen (mavi renkli) kolonilerin morfolojik görünüşleri.....	43

Şekil 4.13. psiRNA-DUO-VEGFA-VEGFR2'nin elektroforetik kontrolü	44
Şekil 4.14. VEGFR2'nin shRNA sekansı.....	45
Şekil 4.15. VEGFA'nın shRNA sekansı	46
Şekil 4.16. psiVEGF-A/VEGFR-2'nin meme kanser hücre hatlarına transfeksiyonu sonrası floresan mikroskop görüntüleri.....	47
Şekil 4.17. huVEGF-A (A) ve huVEGFR-2 (B) standard eğrileri.	48
Şekil 4.18. MCF-7 ve MDAMB-231 hücre dizilerinde VEGF-A (A) ve VEGFR2 (B) gen ekspresyonlarının susturulması açısından karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlar.	49
Şekil 4.19. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına klonlanan plazmidlerin transfeksiyonu sonucu VEGF-A (A) ve VEGFR2 (B) gen susturma yüzdelерinin farklı zaman aralıklarında karşılaştırılması.	50

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Meme tümörlerinin moleküler sınıflandırılması ve immunohistokimya belirteçleri arasındaki bağlantı.....	7
Tablo 2.2. Meme kanserinin önemli moleküler alt tipleri.....	7
Tablo 2.3. Küçük moleküller, protein temelli ilaçlar (monoklonal antikorlar dahil) ve siRNA temelli ilaçların karşılaştırılması.....	17
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar	22
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan enzimler.....	22
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan madde, malzeme ve kitler	23
Tablo 4.1. İzole edilen plazmidlerin spektrofotometrik kontrolü	35
Tablo 4.2. psiRNA-DUO'nun klonlama için uygun restriksiyon kesim bölgeleri ve bant uzunlukları	36
Tablo 4.3. psiRNA-DUO-VEGFA'nın spektrofotometrik kontrolü	39
Tablo 4.4. psiRNA-VEGFA-VEGFR-2'nin spektrofotometrik kontrolleri.....	41
Tablo 4.5. Klonlama yapılan tüm plazmidlerin uzunlukları	41
Tablo 4.6. psiRNA-VEGFA-VEGFR2'nin spektrofotometrik kontrolü.....	43

1. GİRİŞ

Tümör bölgesine doğru kan damarlarının yönelmesi, tümörün büyümesi ve metastazı ile doğrudan ilişkilidir. Kan damarları ile taşınan kan, oksijen, büyüme faktörleri, besinler, metabolitler, hormonlar, endotelial türevli büyüme faktörleri ve sitokinlerin taşınmasında etkili olduğu gibi aynı zamanda tümörde proinvaziv ve proteolitik aktiviteler açısından da etkindir. Hipoksi cevabı, parakrin stimülasyonu, kanama ya da inflamasyon gibi reaktif süreçler tümör anjiogenezinin başlamasına katkıda bulunur (1).

Meme tümörünün büyümesi ve metastazı anjiyogeneze bağlıdır. Tek bir anjiyogenik faktör anjiogenezin inhibisyonunda yetersiz kalabilir. Bu nedenle, anjiyogenez inhibitörlerinin dengeli kombinasyonuna ihtiyaç vardır. Ayrıca mevcut anti-anjiyogenik tedaviler uzun sürelidir ve ilacın sürekli uygulanması gereklidir (2). Büyüme faktörlerinden özellikle Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), Platelet-Türevli Büyüme Faktörü (PDGF) ve Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) anjiyogeneze önemli rol oynarlar. Bunlar arasında VEGF insan kanserlerinde önemli bir pro-anjiyogenik büyüme faktörüdür, mezenchimal, stromal ve özellikle tümör hücreleri tarafından sekrete edilir. Anjiyogenez ve invazyona katkıda bulunur ve vasküler permeabiliteyi artırır. VEGF'nin yüksek düzeyde ekspresyonu birçok solid tümörde kötü prognozun göstergesidir. Özellikle metastatik lezyonları olan, yüksek seviyede VEGF'ye sahip hastalarda survival zamanı azalır (3). VEGF primer olarak reseptörü olan VEGFR-2 aracılığıyla sinyalleri hücreye iletir. VEGFR-2 endotelial hücreler, endotelial hücre öncülleri (prekürsörleri) ve tümör hücreleri gibi birçok hücre tarafından eksprese edilen bir tirozin kinaz reseptörüdür.

Endotelial hücreler, tümör hücrelerine göre genetik olarak çok daha stabil hücrelerdir, tümör hücrelerinden daha az ilaç direnci geliştirirler. Bu nedenle tümör hücrelerini hedefleyen yaklaşımlardan ziyade endotelial hücreleri hedefleyen antikanser terapötik ajanların geliştirilmesi daha etkin bir strateji olarak düşünülebilir (4). Kanserde anti-angiogenik stratejilerle tedavi ümit vericidir. Son yıllarda birçok anti-anjiyogenik ilacın klinikte kullanımı onaylanmıştır. Küçük kimyasal moleküllerle ya tümörü besleyen yeni kan damarlarının oluşumu (TNP-470, endostatin, angiostatin) önlenmeye çalışılır ya da var olan kan damarlarında hasar yapan ilaçlar (combrestatin)

kullanılır (5). Ayrıca tirozin kinaz inhibitörleri (sunitinib, pazopanib, vandetanib, axitinib, regorafenib, cabozantinib ve lenvatinib) VEGF reseptörlerini hedefleyen FDA'den onay alan bir grup ilaçtır (6). Bu anti-anjiogenik ilaçların etki mekanizması ya doğrudan endotelial reseptörleri hedefleyerek ya da dolaylı olarak anjiogenik sitokinleri hedefleyerek olur. Anti-angiogenik ajanların avantajlarına rağmen bazı kısıtlamaları da vardır. Çoğu anjiogenik inhibitör sistemik olarak verildiklerinde hedeflenen tümör damarlarına ulaşamaz, zayıf biyodağılım ve zayıf farmakokinetik profil oluşur, yan etkiler gelişir ve tedavi etkinliği oldukça azdır. Sık tekrarlayan verilmeler ise toksisite problemini ortaya çıkarır. Ayrıca ilaca direnç gelişir (5, 7). Anti-anjiogenik tedavide farklı bir strateji olarak monoklonal antikolar da kullanılmaktadır. Bevacizumab (Avastin) kolorektal kanserde VEGF proteinlerini hedefleyen FDA'den onay alan bir monoklonal antikordur. VEGFR-2'ye hedeflenen ramucirumab, VEGF ligandının bağlanmasını bloklayan solid tümörlerin tedavisinde kullanılan bir monoklonal antikordur. Bir diğer FDA'den onay alan VEGF-A, VEGF-B ve plasental büyüme faktörüne (PGF) hedeflenen aflibercept ise rekombinant bir füzyon proteindir (1). Anti-anjiogenik tedavide farklı bir strateji olarak gen tedavisi uygulamaları yapılmaktadır. Bir aptamer ilacı olan pegaptanib, VEGF'ye yüksek affinite ile bağlanan yaşla ilişkili makular dejenerasyon hastalığının tedavisinde kullanılan bir RNA aptameridir (8).

RNA interferans (RNA engellemesi) (RNAi)'nin keşfi ile hücre içerisindeki proteinlerin ifadelerinin seçici olarak inhibe edilebilmesi sağlanmıştır. Diziye özgü bu süreçte post-transkripsiyonel gen susturması, baskılanacak gene homolog çift iplikli RNA'ların (dsRNA) hücreye girmesi ile indüklenir. Dicer enziminin aktivitesi ile kısa dsRNA moleküllerine ayrılarak 21 bp uzunluğunda small interfering RNA'lar (siRNA) oluşur. Dicer enzimi ile oluşan siRNA çift iplikleri (dupleksleri), 5' fosfat ve 3'hidroksil grubu taşıyan, 3' uçlarında 2 nükleotidlik çıkıntı (overhang) içeren iki tane 21 nükleotid uzunluğunda moleküllerdir. siRNA'lar, RNA ile indüklenen susturma kompleksi (RISC) olarak bilinen ribonükleoprotein kompleksini oluşturmak için sitoplazmada bulunan proteinler ile etkileşir. Rehber olarak siRNA'nın antisens ipliğinin kullanılmasıyla, RISC ile birleşir ve spesifik olarak bağlandığı mRNA'yı keser. Kesilen mRNA daha sonra spesifik olmayan RNazlar ile parçalanır (9, 10).

RNAi, hücrelere sentetik kısa dsRNA dupleksleri, sentetik siRNA ve siRNA ya da short hairpin RNA'ları (shRNA) ekspres eden plazmid vektörlerin taşınması ile başarılır. siRNA'ların endojen ekspresyonu, fonksiyonel siRNA'lar ya da onların

öncüllerinin transkripsiyonunu sağlayan farklı Pol III promotor ekspresyon kasetleri kullanılarak sağlanır (11). shRNA gen ekspresyonunun inhibisyonu için önemli bir araçtır. Bu tekniğin sınırlamalarından biri tek bir genin hedeflenmesidir. Son zamanlarda, genlerin etkin olarak susturulması için tek bir vektörde çoklu siRNA ya da shRNA'ların klonlanması önerilmektedir. Bu RNAi ekspresyon vektörleri, birkaç geni aynı anda baskılayabilir (12). Oluşturulan vektörler, genler arasındaki ilişkileri ve gen kaybının hücre fonksiyonuna etkilerini değerlendirmek için de kullanılabilir. Bazı mRNA'ların etkin susturulmasını başarmak zordur, birkaç shRNA vektörü, susturma etkinliğini artırmak için tek bir mRNA içerisinde birçok bölgeyi hedeflemekte kullanılır (13).

shRNA vektörleri ya birçok geni hedeflemek ya da bir gen içerisindeki birçok bölgeyi hedeflemek için kullanılmaktadır. Birden fazla shRNA'nın klonlandığı vektör bir ya da daha fazla genin hedeflenen susturulmasını sağlar. Memeli hücrelerinde RNAi'ın başarılı bir şekilde indüklenmesinde birçok araştırmacı U6, H1 ya da 7SK gibi RNA polimeraz III promotorları ile sürdürülen vektör-temelli siRNA ya da shRNA ekspresyonunu geliştirmişlerdir (14). Günümüzde RNAi temelli vektörler, birçok shRNA kasetinin tekrarlanan insersiyonunu kolaylaştırmak için spesifik olarak tasarlanmaktadır. Ayrıca farklı promotorlu diğer vektörleri modifiye etmek için de kullanılmaktadır (H1, U6 ve 7SK). Birbiri ile uyumlu farklı vektörlerden bu promotor-shRNA kasetlerinin restriksiyon enzim bölgelerini yaparak, farklı promotorlu multipl kasetlerin etkin kombinasyonu da başarılabilmektedir (15).

Bu çalışmada, angiogeneze karşı etkin olan RNAi temelli gen tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için, bu yolda etkili olan protein ve ilişkili reseptörünün aynı anda eksprese olması ve meme kanserinde etkin gen susturmasının sağlanması amaçlanmıştır. Şimdiye kadar VEGF-A ya da VEGFR-2 shRNA'larının ayrı ayrı klonlandığı ve kanser tedavisindeki etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar olmakla birlikte, her ikisinin birlikte klonlanarak tek bir vektör üzerinden gen susturma etkinliğinin araştırıldığı herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. Çalışmamızda, anjiogeneze önemli rol oynayan VEGF-A ve ilgili reseptörü VEGFR-2 shRNA'larının aynı plazmid vektöre klonlanması ve birlikte ekspresyonunun sağlanması ile gen susturma etkinliğinin artırılması ve bunun meme kanserinde tedavi etkinliğinin artırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Gelişen tanı ve tedavi yöntemlerine rağmen, meme kanseri günümüzde önemli bir halk sağlığı problemidir. Bu kanser türü hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerin kadınlarında en sık görülen kanser tipidir ve mortalite sıralamasında akciğer kanserinin ardından ikinci sırada yer almaktadır (16). Meme kanseri insidansı 1970'lere kıyasla artış göstermiştir ve bu artışa neden olarak artan ortalama yaşam süresi, değişen üreme alışkanlıkları (daha geç yaşta anne olmak ve daha az sayıda çocuk doğurmak), obezite, menapoz sonrası hormon replasman tedavi ve yaygın mamografi tarama testleri sonucunda artan tanı sayısı gösterilmektedir (17). Meme kanseri erkeklerde nadiren görülürken (1/150), kadınlarda ise hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde en sık görülen kanser tipidir.

Meme kanseri, memenin lobüller ya da glandular süt kanallarının epitelyal hücrelerinden köken alan bir tümördür. Tümörün bazal membranı geçerek büyümesine göre, non-invaziv (in situ karsinom) ya da invaziv olarak adlandırılır. İnvaziv karsinomlar, değişen hücrelerin vücudun farklı organlarına metastaz yapma ve çevre bağ dokuya yayılması ile gelişir. Meme kanserinin metastaz yaptığı başlıca bölgeler kemik, beyin, karaciğer ve akciğerdir. Meme karsinomlarının üçte ikisi duktal karsinoma olarak adlandırılan duktusların epitelyal hücrelerinden kaynaklanır ve üçte biri de lobüler karsinomadır ve lobüllerden kaynaklanır. Daha az yaygın histolojik gruplarda, inflamatuvar, meduller, apokrin, musinoz ve tubuler karsinomalar olarak tanımlanır (18).

Meme kanseri heterojen bir hastalık olup moleküler ve klinik özellikleri farklılıklar gösterir. Meme kanserinin sınıflandırılması tanı ve tedaviye yardımcı bilgi sağlar. Farklı histolojik, genetik ve biyomoleküler özelliklerine göre sınıflandırılır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 20 farklı histopatolojik alt tip sınıflandırmıştır. Meme kanseri, tümörün boyutu, lenf nodu varlığı ve metastaz durumuna göre (Tumor Node Metastasis, TNM) sınıflandırılır. Histopatolojik derecelendirmede, tübül oluşumu, nükleer polimorfizm ve mitotik sayıya göre hem farklılaşma derecesi hem de proliferatif aktivitesi belirlenir. Histopatolojik değerlendirmelere ek olarak, meme kanseri moleküler biyomarkerlarına göre immunohistokimyasal olarak da karakterize edilir;

östrojen reseptör alfa ($ER\alpha$), progesteron reseptör (PR) ve insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2). Bu değerlendirmeye göre meme kanseri 3 fenotipe sınıflandırılır; ER/PR-pozitif, ER/PR-negatif/HER2-pozitif ve ER/PR-negatif/HER2-negatif (PR negatif ya da üçlü negatif olarak da adlandırılır). Tüm meme kanserlerinin yaklaşık olarak %85'i ER/PR-pozitif'tir ve bunlara hormon tedavisi uygulanabilmektedir. Meme kanserlerinin %20'si ER/PR-negatif/HER2-pozitif'tir. Bu tip meme kanserlerinin tedavisinde HER-2'yi hedefleyen monoklonal antikolar kullanılabilir. Bu nedenle bu biyomarkerlar sistemik tedavi açısından büyük öneme sahiptirler (19, 20).

Östrojen, meme bezlerinin morfogenezinde ve hormon bağımlı meme kanserlerinin büyümesinde etkilidir. Menopoz öncesi kadınlarda ovaryumda, menopoz sonrası kadınlarda adipoz dokuda sentezlenir. Östrojen hormonu hücrede 2 reseptöre bağlanarak aktivite gösterir; östrojen reseptör alfa ($ER\alpha$) ve östrojen reseptör beta ($ER\beta$). $ER\alpha$, meme kanseri için önemli bir biyomarkerdir ve meme kanseri hastalarının %75'inde eksprese olur. Östrojenin onkogenik etkisi ise $ER\alpha$ aracılığı ile hücre proliferasyonu, hücre canlılığı ve anjiogenezin tetiklenmesinde görev alan genlerin aşırı ekspresyonu ile olur. Bununla birlikte $ER\alpha$ 'nın metastaza etkisi yoktur, bu nedenle $ER\alpha$ pozitif meme kanserleri, $ER\alpha$ negatif meme kanserlerinden daha iyi bir prognoza sahiptirler (21).

Progesteron reseptörü (PR), östrojen ile regüle edilen bir gen dir ve ekspresyonu $ER\alpha$ aktivitesine bağlıdır. PR, östrojen reseptörü gibi bir steroid nükleer reseptördür ve hücre adezyonu, hücre büyümesi, steroid ve yağ asidi metabolizması ile ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenler. PR pozitif ve $ER\alpha$ -negatif tümörler daha nadir görülür, tüm meme kanserlerinin %1-3'ünü oluşturur. $ER\alpha$ -pozitif hastalarda, PR'nin negatif olması tümörün daha proliferatif ve agresif olduğunu, daha zayıf prognoza sahip olduğunu ve tekrarlanabilir olduğunu gösterir (22).

HER2 diğer adıyla ERBB2 epidermal büyüme reseptörü (EGFR) 4 üyeden oluşur (HER1/EGFR, HER2, HER3 ve HER4). HER2 hücre membranında lokalizedir ve tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. HER2 aktivitesi EGFR ailesinin diğer üyeleri ile dimer yapması ile aktifleşir, fosforilasyon ve hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu ile (mitojen-aktive protein kinazlar (MAPK), fosfoinositid 3 kinaz (PI3K)/Akt) hücre proliferasyonu, hücre survivalı, invazyon ve anjiogenezisi aktive ederler. HER2, meme

kanserlerinin yaklaşık %15-20'sinde aşırı eksprese olur, HER2 pozitif kanserlerin %30'unda ER α ekspresyonu vardır. HER2 overekspresyonu meme kanserinin kötü prognozu ile ilişkilidir (23).

Meme kanserinde bu biyomarkerların dışında prognoz açısından hücre proliferasyonu için Ki67 ekspresyonunun belirlenmesi tedavinin etkinliği açısından önemlidir. Siklin D1, siklin E, ER- β , sirküle tümör hücreleri, müsin-benzeri karsinoma ile ilişkili antijen ve kanser antijenleri de meme kanseri prognozunu yansıtır.

Meme kanserinin klinik olarak sınıflandırılmasında ise 4 alt tipe ayrılmıştır; lüminal A, lüminal B, HER2-pozitif lüminal olmayan ve bazal 3'lü negatif (ER-, PR-, HER2-). Bu dört alt tip proliferasyon, hormon reseptörü, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER-2) pozitifliği, bazal ve epitel gen ekspresyonuna göre birbirinden ayrılmaktadır. Bu alt tipler arasında en iyi prognoz lüminal A' dayken, en kötü prognoz ise bazal-benzeri üçlü negatif meme kanserindedir (24, 25).

Perou ve ark. (26) insan meme tümörlerini gen ekspresyon farklılıklarına göre karakterize etmişlerdir. Meme kanserinin moleküler profiline göre; ER+/lüminal-benzeri, bazal-benzeri, HER2+ ve normal meme benzeri tümörler. Lüminal alt tip, luminal A ve luminal B olarak ikiye ayrılır. Bu alttiplerin farklı klinik özelliklerine bakıldığında; HER2+ ve bazal-kötü, luminal B-orta ve luminal A-en iyi klinik duruma sahiptir.

Son zamanlarda yeni bir moleküler alt tip tanımlanmıştır; düşük-klaudin (claudin-low) alt tipi. Bu alt tip sıkı bağlantılar ve hücre-hücre adezyonuna (3,4,7 claudinler, okludin ve E-kaderin) katılan genlerin düşük ekspresyonu ile ilişkilidir. Düşük-klaudin alt tipine sahip tümörler üçlü negatif tümörlerdir, fakat epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) markerları ve immün cevap genleri açısından zengindirler. Bunlar kanser kök hücre benzeri özellikler gösterirler. Klinik açıdan bu tümörler bazal ve luminal alttipler arasında orta prognoza sahiptirler (27).

Tablo 2.1. Meme tümörlerinin moleküler sınıflandırılması ve immunohistokimya belirteçleri arasındaki bağlantı.

	Luminal A	Luminal B	HER2+	Bazal-benzeri/üçlü negatif
ER	+	+	-	-
PR	+/-	+/-	-	-
HER2	-	+	+	-
Ki67	düşük	orta	yüksek	yüksek

Tablo 2.2. Meme kanserinin önemli moleküler alt tipleri (28).

Moleküler Alt Tipler				
	Luminal A	Luminal B	Her2/neu	Bazal benzeri
Gen ekspresyon paterni	Luminal sitokeratinlerin (düşük MW) ekspresyonu, hormon reseptörleri ve ilgili genlerin yüksek seviyede ekspresyonu	Luminal sitokeratinlerin (düşük MW) ekspresyonu , hormon reseptörleri ve ilgili genlerin orta-düşük seviyede ekspresyonu	Her2/neu'nun yüksek düzeyde ekspresyonu, ER ve ilgili genlerin düşük ekspresyonu	Bazal epitelyal genler ve bazal sitokeratinlerin yüksek seviyede ekspresyonu, ER ve ilgili genlerin düşük ekspresyonu, Her2/neu'nun düşük ekspresyonu
Klinik ve biyolojik özellikler	İnvaziv meme kanserinin %50'si, ER/PR pozitif, Her2/neu negatif	İnvaziv meme kanserinin %20'si, ER/PR pozitif, Her2/neu ekspresyonu değişken, Luminal A'dan daha yüksek proliferasyon Luminal A'dan daha yüksek histolojik derece	İnvaziv meme kanserinin %15'i, ER/PR negatif, Her2/neu pozitif, yüksek proliferasyon, difüz TP53 mutasyonu, yüksek histolojik derece ve nodal pozitiflik	İnvaziv meme kanserinin %15'i, ER/PR/HER2 neu negatif (üçlü negatif), yüksek proliferasyon, difüz TP53 mutasyonu, BRCA1 disfonksiyonu (germline, sporadik)
Histolojik ilişki	Tubular carcinoma, cribriform carcinoma, düşük dereceli invaziv duktal karsinoma, NOS, klasik lobular karsinoma	İnvaziv duktal karsinoma, NOS, Mikropapiller karsinoma	Yüksek dereceli invaziv duktal karsinoma, NOS	Yüksek dereceli invaziv duktal karsinoma, NOS, Metaplastik karsinoma, Medullar karsinoma
Tedavi ve prognoza yanıt	Endokrin tedavisine yanıt, Kemoterapiye değişken cevap, İyi prognoz	Luminal A kadar iyi olmayan endokrin tedavisine yanıt (tamoksifen ve aromataz inhibitörleri) Kemoterapiye değişken cevap (Luminal A'dan daha iyi) Luminal A kadar iyi olmayan prognoz	Trastuzumab'a yanıt (Herceptin) Antrasiklinler ile kemoterapiye cevap, olumsuz prognoz	Endokrin tedavisine ya da Trastuzumab'a yanıt yok, platinum grup kemoterapiye ve PARP inhibitörlerine hassasiyet, kötü prognoz

Meme kanseri tedavisi, hastanın HER2 ve hormon reseptörleri durumuna bakılarak ameliyat, radyoterapi ve onkojenik yolakları hedefleyen (örn. küçük molekül

kinaz inhibitörleri ve monoklonal antikolar) ilaç tedavileri ile yapılmaktadır. Tanı ve tedavideki ilerlemeler meme kanserinin erken evrede tedavisine olanak sağlamaktadır. Toplam sağkalım oranlarında önemli gelişmeler olmasına rağmen, nüks etmiş ve metastazlı meme kanseri vakalarının prognozunda etki daha azdır. Bu nedenle, özellikle yayılmayı durdurmaya yönelik ve geç evre meme kanseri tedavisinde kullanılacak, yenilikçi tedavi yaklaşımlarına ivedilikle ihtiyaç vardır.

2.2. Tümör Anjiogenezi

Anjiogenezi süreci birçok fiziksel ve patolojik durumda önemli rol oynar. Solid tümörler çevreye büyüme ve metastaz için anjiogeneze ihtiyaç duyarlar. Prevasiküler fazda tümörler yaklaşık 2-3 mm³ dür ve yaklaşık bir milyon hücre içerirler. Bu boyutun artması ile tümör hücrelerinin yaşamı ve büyümesi için çevreden pasif difüzyon ile oksijen ve besinlerin alınması gereklidir (29). Tümör anjiogenezi, tümöre oksijen ve besin desteği ve atıkların uzaklaşmasını sağlamak için tümöre giren kan damar ağının proliferasyonu ile gelişir. Tümörle-indüklenen anjiogenezi süresince, endotelial hücrelerin proliferasyonu, göçü, apoptozis, survival, hücre-hücre ve hücre-matriks adezyonu için tümör hücreleri farklı intraselüler sinyal molekülleri olarak anjiogenik ve anti-anjiogenik faktörlerin salınımını indüklerler (30).

2.3. Anjiogenezi Mekanizması

Anjiogenezi, hücreler, çözünebilir faktörler ve ekstraselüler komponentler arasındaki etkileşimler ile gelişen çok basamaklı kompleks bir süreçtir. Anjiogenezi birbirini izleyen dört farklı basamakta gerçekleşir; 1) nitrik okside cevap olarak vazodilatasyon olur ve var olan damarların permeabilitesi artar, proteazlar ile var olan damarların bazal membranın degradasyonu olur, 2) interstisyel aralığa endotelial hücrelerin göçü ve sprouting gelişir, 3) göç tarafında endotelial hücrelerin proliferasyonu gerçekleşir ve 4) lümen oluşumu, olgun damar ağının oluşumu için vasküler düz kas hücreleri ve perisitlerin hareketi olur, perisitlerin katıldığı yeni bazal membranın oluşumu, anastomozların oluşumu ve sonuçta kan akışı gerçekleşir (29, 31).

Mikrodamarlanmada anjiogenik cevap, endotelial hücreler, perisitler ve çevre ekstraselüler matriks arasındaki hücresel adesif etkileşimlerdeki değişiklikler ile ilişkilidir. Aktif neovaskularizasyon sürecinde aktive olan endotelial hücreler hücre iskeletini yeniden organize ederler, integrinler ve selektinler gibi hücre yüzey adezyon

moleküllerini eksprese ederler, proteolitik enzimleri sekrete ederler ve bitişik ECM yeniden modellenir. Bu olaylar ile kapiller tomurcuklar oluşur. Otokrin ve parakrin anjiogenik faktörler endotel hücre göçü, proliferasyonu, uzaması, oryantasyonu ve farklılaşmasını sağlayarak bazal membranın yeniden yapılanmasına, lümen oluşumuna ve yeni ya da önceden var olan damarlar ile anastomozları indükleyerek, yeni mikrodamarların oluşumuna yol açarlar (29).

2.4. Kanserin Anjiogenik Dönüşümü

Anjiogenik fenotipe dönüşüm, malign tümörün gelişimine yardımcı olur. Tümör hücreleri, anjiogenez için bir ya da daha fazla pozitif regülatörü aşırı eksprese ederler, ECM'den anjiogenik proteinler hareket ederler ve makrofajlar gibi (kendi anjiogenik proteinlerini üreten) konak hücreleri çekebilirler. Tümör anjiogenezine endotel hücrelerde eksprese olan yüzey reseptörleri ile etkileşen tümör tarafından sekrete edilen anjiogenik büyüme faktörleri aracılık ederler. Anjiogenik büyüme faktörleri arasında başlıca Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) ve Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)'nin ekspresyonunda önemli artış görülür. Bu büyüme faktörleri, endotelial hücre membranındaki tirozin kinaz reseptörlerine bağlanırlar. Reseptörlerin dimerizasyonuna yol açan bağlanma ve reseptör yüzeyinde tirozinlerin otofosforilasyonunun aktivasyonu sinyal iletimini (PI3-kinaz, Src, Grb2/m-SOS-1, Ras için nükleotid değişim faktörü) başlatır. Reseptör tirozin kinazlardaki fosfotirozinlere bu proteinlerin SH-2 bölgelerinin bağlanması hücre siklus mekanizmasını başlatmak için önemli olan birkaç yolu aktive eder. GTP-bağlanma proteini Ras ve MAPK kaskadını ve daha sonra nukleusta transkripsiyon faktörlerini aktive eder (29, 32).

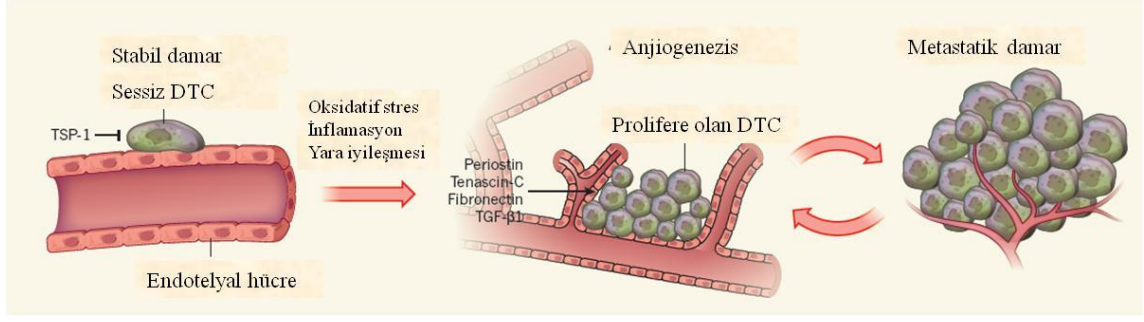
Anjiogenik faktörün upregülasyonu tümör hücresinin anjiogenik dönüşümü için yeterli değildir, aynı zamanda damar büyümesi inhibitörleri ya da negatif regülatörleri down-regüle olur. Yani anjiogenik fenotipe dönüşüm mikrodamar büyümesinin pozitif ve negatif regülatörleri arasındaki lokal dengenin değişimi ile düzenlenir. Anjiogenik dengede değişim, pro-anjiogenik büyüme faktörleri (VEGF, FGF) ve anjiogenezis inhibitörleri (TSP-1) arasında olur. Sonuçta anjiogenik değişim başlar ve bunu anjiogenezin ilerlemesi izler. Eğer lokal alanda anjiogenik faktörler fazla ise, neovaskülarite kapillerler olarak devam eder ya da olgun venüller ya da arteriollere farklılaşır. Eğer anjiostatik faktörler fazla ise yeni oluşan damarlar geriler. Gerilemeye neden olan anjiostatik faktörler, ya endotelial hücrelerin apoptozisini indüklerler ya da

hücre siklusunu durdururlar. Normal dokularda anjiogenez inhibitörleri fazladır, bu nedenle endotelial hücreler fizyolojik durumda sessiz kalırlar. (32, 33).

2.5. Anjiogenez Bağımlı Metastaz

Kanserle ilişkili ölümlerin primer nedeni, tümörün uzak organlara metastazıdır. İlerleyen metastatik kanserler çoğunlukla tedavi edilemez ve mevcut tedaviler sınırlı oranda yaşam süresini uzatır. Birçok tümör tipinde, tümör hücrelerinin farklı lokasyonlara yayılması ve organlarda kolonizasyonu arasında uzun bir lag fazı vardır, klinik olarak görülen metastazların oluşumu aylar sürebilir. Bu uzun süreli sessizlik, yayılan tümör hücrelerinin yeni lokal çevreden gelen büyümeyi inhibe edici sinyallerin üstesinden gelmek içindir. Primer bölgede tümör büyümesinde mikroçevrenin rolü çalışılmıştır, bununla birlikte metastatik organdaki stromal hücreler ve yayılan kanser hücreleri arasındaki moleküler etkileşimler ve metastatik çevrenin rolünün aydınlatılmaya ihtiyacı vardır. (30, 34).

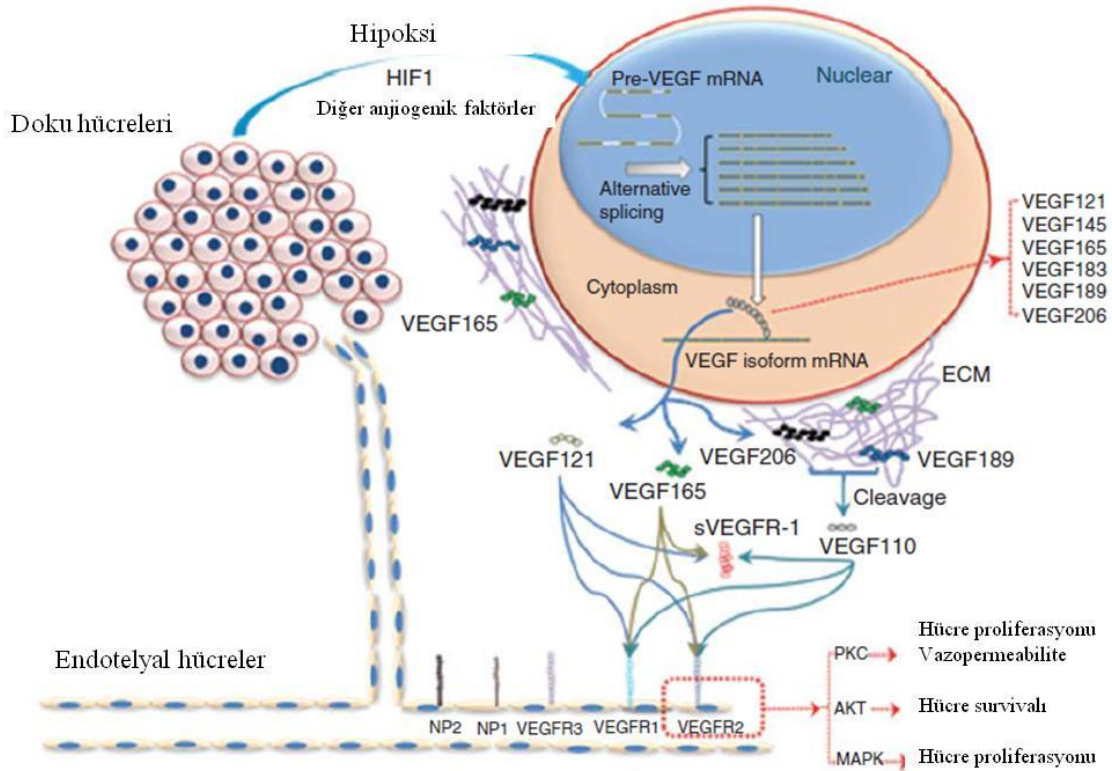
Endotelial hücreler tarafından sekrete edilen trombospondin protein-1 (TSP-1) tümör hücrelerinin büyümesini baskılar. Bu büyüme baskılayıcı çevre yalnızca stabil mikrovasküler endoteliumda bulunur. Yeni oluşan damarların dışarı doğru uzayan uç kısımları ise tümör hücrelerinin proliferasyonunu hızlandıran etkiye sahiptir. Bu uzanan uçlarda periostin, tenascin-C, fibronektin ve tümör büyüme faktör-beta1(TGF- β 1) proteinlerinin ekspresyon artışı olur ve bunlar metastatik nişin oluşumuna katılırlar. Sessiz tümörler metabolik olarak aktiftir, sessiz durum anjiogenik inhibitörler ve stimülatörler arasındaki dengenin bozulup angiogenezin stimüle olmasına kadar devam eder. Bununla birlikte bir sessiz tümör hücrelerinin anjiogenezini nasıl indüklediği açık değildir. Bu durumda tek olarak bulunan sessiz ayrılmış tümör hücreleri (dormant disseminated tumor cells, DTC) pro-anjiogenik sinyaller üretebilir mi sorusu akla gelmektedir (34).



Şekil 2.1. Sessiz tümör hücrelerinden (dormant tumor cells, DTC) kaynaklanan tümör hücresinin anjiogenezisi teşvik etmesi (34).

2.6. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörleri (VEGF)

Kanser hücrelerinde onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin mutasyonu VEGF'nin upregülasyonuna neden olur. VEGF parakrin sinyal aracılığıyla endotelial hücreleri aktive eder, endotelial hücre göçü ve proliferasyonunu stimüle eder. Ayrıca vasküler permeabiliteyi de artırır (35). VEGF ailesi VEGF-A, -B, -C, -D, -E faktörleri ve plasenta büyüme faktöründen (PlGF) oluşur. En iyi karakterize edilen üye VEGF-A'dır. VEGF-A, hipoksi ile indüklenen, tümör hücreleri tarafından sekrete edilen ve hem normal hem de tümörle-ilişkili anjiogenezde önemli rol oynayan bir büyüme faktörüdür. VEGF-A'nın biyolojik etkisi hücre yüzey reseptörleri ile etkileşimiyle ortaya çıkar; VEGFR-1 (flt-1) ve VEGFR-2 (KDR/flk-1) vasküler endotelialyumda, VEGFR-3 lenfatiklerde lokalizedir ve anjiogenez süresince upregüle olurlar. VEGFR-1, vasküler dallanma ve metastaza katkıda bulunmasına rağmen anjiogenezini negatif olarak regüle edebildiğinden kompleks bir role sahiptir. VEGF-A /VEGFR-2 etkileşimi, progenitor endotelial hücrelerin farklılaşması, endotelial hücre proliferasyonu ve göçü aracılığıyla anjiogenezde önemli rol oynar. İnsan VEGF-A geni 6q21.3 de haritalanmıştır. VEGF-A heparine bağlanan bir glikoprotein olup en az 6 moleküler izoformdan oluşur (121, 145, 165, 183, 189 ve 206 amino asit). Bu izoformlar mRNA'nın alternatif splyası ile oluşur (36). VEGF-B anjiogenik bir faktör olmasından çok vasküler devamlılık için gereklidir ve kalp, iskelet kası ve düz kasta eksprese olur. VEGF-B, VEGF-A ile heterodimer oluşturur ve VEGF-A'nın normal fizyolojik etkilerini düzenleyebilir.



Şekil 2.2. VEGF ekspresyonu ve isoformları (37).

2.7. VEGF Yolağı

VEGF, yüksek affinite ile reseptörlerine bağlanarak inositolün hidrolizi aracılığıyla ikinci habercilerin oluşumuna katkıda bulunur. Böylece heparin-benzeri moleküllerin varlığında reseptörlerin otofosforilasyonunu indükler. Fosfotidilinositol, metabolik sinyal transdüksiyon yolunu ve endotelial hücrelerde MAP kinazları aktive eder. Bu nedenle VEGF, endotelial hücre proliferasyonuna katkıda bulunarak mitojenik etkiyi ortaya çıkarır. VEGF sinyallerinde üç anahtar yol rol oynar; Raf-MEK (mitojen-aktif ya da ekstraselüler sinyal-regüle protein kinaz)-MAPK (mitojen-aktif olan protein kinaz) yolu, PI3K (fosfotidilinositol 3-kinaz)-Akt yolu ve Src-FAK (fokal adezyon kinaz) yolu (38).

Ayrıca VEGF, integrin ($\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$ ve $\alpha v\beta3$ - integrinler) ekspresyonunu indükleyerek de anjiogenik etki gösterebilir. Hücre göçü, proliferasyonu ve matriksin yeniden organizasyonuna katkıda bulunabilir. Bu nedenle bu integrinlerin antagonistleri kanser ile ilişkili VEGF ile oluşan anjiogenezi inhibe edebilir.

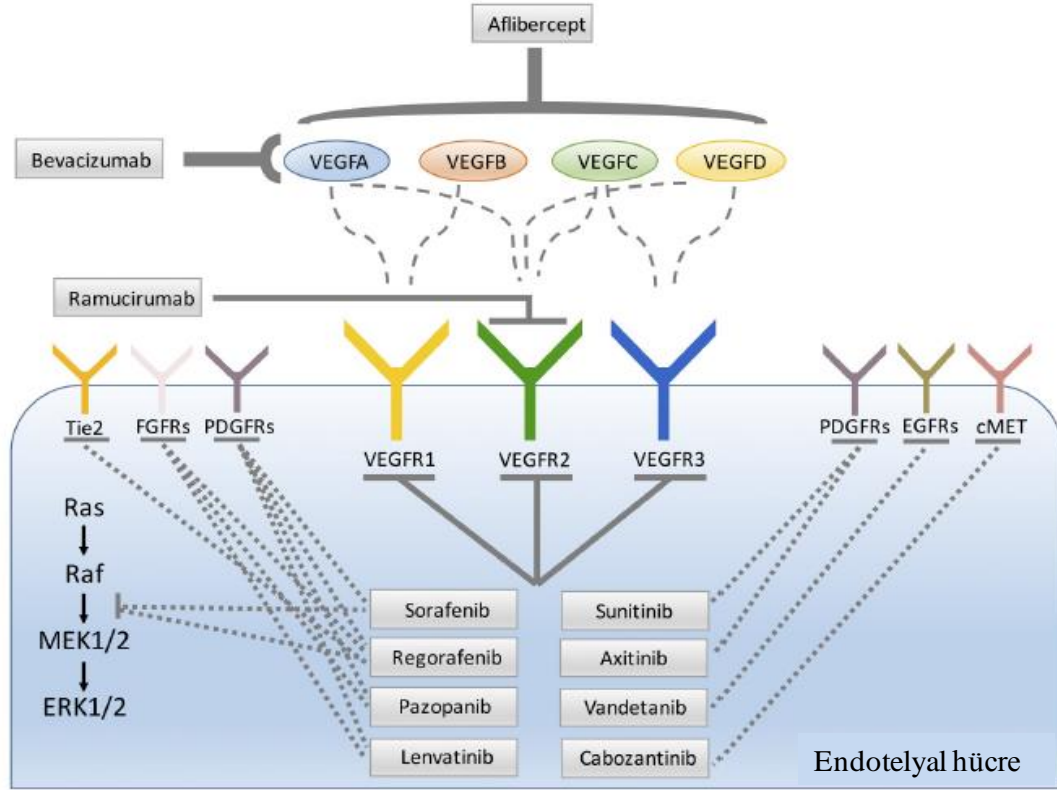
VEGF, endotelial hücreler için çok spesifik bir mitojendir, yeni oluşan ve olgunlaşmamış kan damarları için gerekli bir faktördür. Birkaç endotelial faktör

(VEGF, angiopoetin-1 ve $\alpha v\beta 3$) p53, p21, p16, p27 ve proapoptotik protein Bax'ı baskılar, fakat PI3K/Akt, p42/44 MAP kinazlar, bcl-2, A1 ve survivin yollarını ise aktive ederler. Ayrıca ras-bağımlı sinyal yolları da VEGF sinyali açısından önemli rol oynarlar (29).

VEGF, ekstraselüler matriksin (ECM) proteolizis dengeleyici sistemini değiştirerek anjiogenez için gerekli ECM komponentlerini yeniden modelleyebilir. VEGF, urokinaz-benzeri plasminojen aktivatörü (uPA), doku tip plasminojen aktivatörü (tPA) ve plasminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1), proteolitik enzimler, doku faktörleri ve interstisyel kollajenazın endotelial hücrelerde sentezini uyarır. Plasminojen aktivatörleri plasminojenin plazmine dönüşümünü aktive ederler. Böylece ECM komponentleri yıkılabilir. Bazal membranın yeniden modellenmesine ek olarak, uPA, urokinaz-benzeri plasminojen aktivatörü reseptörüne (uPAR) bağlanır ve endotelial hücrelerde intraselüler sinyal transdüksiyonuna aracılık eder. Endotelial hücrelerde uPAR, fokal adezyon proteinlerinin fosforilasyonuna yol açar ve uPA'nın endotelial hücre göçü ve proliferasyonunu etkilemesi MAPK aktivasyonu ile sonuçlanır (29).

2.8. Anti-Anjiogenik Tedavi

Tümörün primer bölgeden uzak organlara doğru yayılmasında rol alan tümör mikrometastazlarının dönüşümü anjiogenez bağımlıdır. Anti-anjiogenik tedavi invaziv tümör hücrelerinin yayılmasını engelleyemezse bile, durağan mikrometastazların hızlı büyüyen anjiogenik makrometastazlara geçişini önlemek için güçlü bir strateji sağlayacaktır (30). Bu durum bazı kanserler için çok önemlidir, örneğin meme kanserinde bitişik dokulardan tümör hücrelerinin ayrılması ve uzak bölgelere gitmesi, tümör oluşum sürecinde çok erken safhada gelişen bir olaydır. Solid tümörlerde anti-anjiogenik tedavi ile durağan/sessiz mikrometastazların anjiogenik dönüşümünün önlenmesi, lokal olarak ilerleyen kanserlerde adjuvan bir etki oluşturur. Bununla birlikte tümör hücrelerinin uzak organlarda farklı mikro çevrelere erken yayılması, primer ve metastatik tümörlerin muhtemelen paralel geliştiğini de gösterebilir. Bu durum anti-anjiogenik tedavi açısından önemlidir. Farklı metastatik bölge tümörleri arasında ya da primer ve metastatik tümörlerin anjiogenik profilleri arasında farklılıklar vardır. Sonuçta bu gibi farklılıklar primer tümörün anjiogenik profilini hedefleyen anti-anjiogenik tedaviden metastatik tümörlerin kaçışını açıklayabilir (30, 39).



Şekil 2.3 Tedavi için onay alan anti-anjiogenik ilaçların başlıca moleküler hedefleri (6).

Anti-anjiogenik yaklaşımlar, birçok solid tümörün tedavisinde kullanılan standard tedavilerden biridir. VEGF ve reseptörlerinin hedeflenerek tümör anjiogenezinin bloklanması için klinikte kullanılan 10'dan fazla onaylanmış ilaç bulunmaktadır.

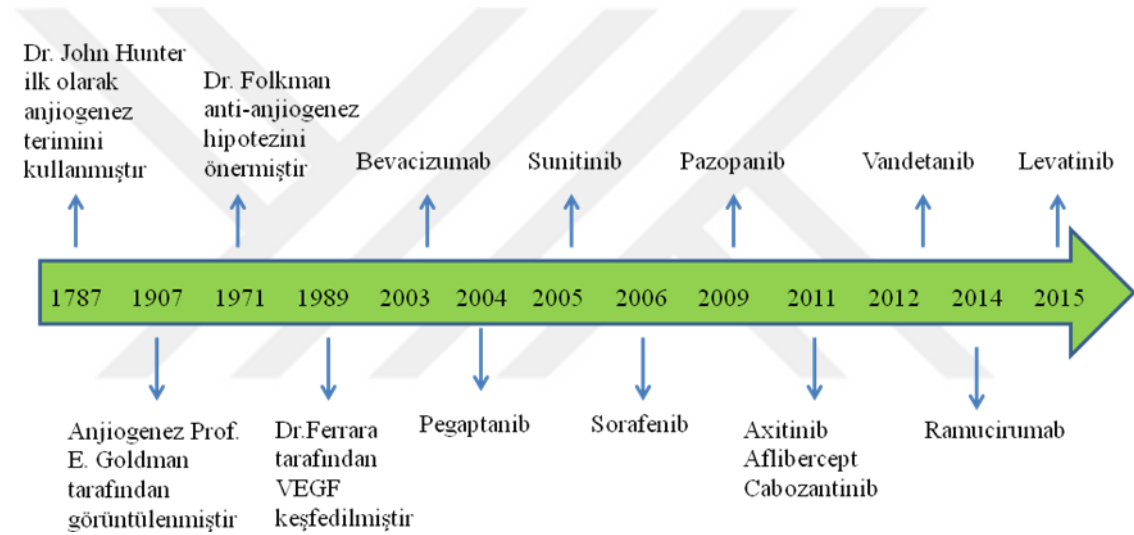
Anti-anjiogenik tedavi için 2003'de FDA'den onay alan bevacizumab, VEGF-A'ya hedeflenen ve metastatik kolon kanserli hastalarda kullanılan ilk monoklonal antikör ilacıdır. Daha sonra bevacizumab küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) ve ilerlemiş servikal kanserde hayatta kalışın uzaması amacıyla kemoterapötik ilaçlar ile kombine olarak da kullanılmaktadır. FDA'den 2014 yılında onay alan VEGFR-2'ye hedeflenen ramucirumab, VEGF ligandının bağlanmasını bloklayan solid tümörlerin tedavisinde kullanılan bir monoklonal antikördür (40).

Sorafenib, VEGFR'ünü hedefleyen multi-tirozin kinaz inhibitörüdür, ilerlemiş renal kanserlerde kullanımı için 2005'de FDA'den onay almıştır. Diğer anti-anjiogenik ilaçların tümü VEGF reseptörlerini hedeflemektedir; sunitinib, pazopanib, vandetanib,

axitinib, regorafenib, cabozantinib ve lenvatinib farklı kanserlerin tedavilerinde FDA’ den onay almıştır (41).

FDA’den onay alan rekombinant füzyon proteini olan aflibercept VEGF-A, VEGF-B ve plasental büyüme faktörünü (PGF) hedefleyen bir ilaçtır. İnsan VEGFR-1 ve 2’nin ekstraselüler domainleri IgG1’in Fc kısmı ile kaynaşan bir dimerik glikoproteindir. VEGF Trap gibi etki gösterir. Ziv-Aflibercept ise kolorektal karsinomada kullanılmaktadır (42).

Pegaptanib, VEGF’ye yüksek affinite ile bağlanan PEG’lenmiş ilk aptamer ilacı olup 2004’de FDA’den onay almıştır. VEGF-165’e spesifik tek iplikli RNA aptameridir, yaşla ilişkili makular dejenerasyon hastalığının tedavisinde kullanılır (43).



Şekil 2.4. Anjiogenez ve onay alan anti-anjiogenik ilaçların zaman çizelgesi (43).

Bu şekilde onkojenik ya da anjiogenik yolları hedefleyen ajanlar ile ilerlemiş tümürlü hastalar tedavi edilmektedir. Bununla birlikte bu tedavilerin medikal başarısı sınırlıdır, hastanın yaşam süresini bazı tümörlerde birkaç ay/yıl uzatmaktadır. Çünkü tedavinin başlamasından sonra ilaç direnci gelişmektedir. Diğer yandan, VEGF ve reseptörlerinin inhibisyonu ile tümörde olgulaşmamış kan damarlarının oluşumu seçici olarak bloke edilmektedir, fakat geride olgun ve fonksiyonel damarlar kalmaktadır (43). Preklinik çalışmalar, anti-anjiogenik tedavinin devamlı olarak sürdürülmesinin düşük tümör damar yoğunluğunu koruduğunu ve tümör büyümesini azalttığını, fakat tümör tedavisinin durdurulması ile bu etkilerin hızlıca gerilediğini göstermiştir (44).

2.9. RNA Engellemesi (RNA İnterferans, RNAi)

RNAi, sekansa spesifik gen susturulmasında etkili olan postranskripsiyonel gen regülasyonu işlemidir. Regülatör RNA molekülleri olan küçük engelleyici (small interfering) RNA'lar (siRNAs) ve kısa saç tokası (short hairpin) RNA'lar (shRNAs) memeli hücrelerinde hedef mRNA'nın spesifik degradasyonunu sağlarlar. RNAi yolağında çift iplikli RNA (dsRNA, yaklaşık 100 nt) endoribonükleaz Dicer ya da RNaz tip III enzim ile siRNA olarak adlandırılan 21-23 nükleotidlik çift zincirli RNA'lara kesilir. Kesilen siRNA lar 5' ucunda fosfat ve 3' ucunda 2 nükleotidlik uzantılar içerirler. siRNA'lar endojen RNA-indüklenen susturma kompleksi (RNA induced silencing complex, RISC) ile birleşirler. siRNA'nın iki ipliğinden biri rehber (antisens) diğeri pessenger (sense) ipliklidir. siRNA dupleks RNA helikaz aktivitesi ile açılır. Antisens iplik RISC'e bağlanırken, diğeri iplik degrede olur. Aktive olmuş RISC yapısı komplementer mRNA'nın sekansa spesifik degradasyonu için baz eşleşmesi ile hedef mRNA'ya bağlanır. mRNA fragmentleri Argonat (Ago) proteinleri ile kesilir, RISC'den salınır ve endojen nükleazlar ile degrede olur. mRNA degradasyonundan sonra RISC rejenere olur ve diğeri bir RNAi yolağına katılır. Sonuçta RNAi süreci spesifik mRNA seviyesini azaltır ve hedef gen ekspresyonunu susturur (10, 45).

siRNA'ların spesifik gen susturma etkisi, hedef tanımlama ve validasyonda ayrıca ilaç keşfi ve geliştirilmesinde kullanılır. siRNA'lar kanser tedavisinde ümit verici yeni ilaç adaylarıdır. Kanserde aşırı eksprese olan genlerin siRNA kullanılarak susturulması önemli bir terapötik yaklaşımdır. siRNA ile tedavinin avantajları; 1) sekansa spesifik gen tedavisi sağlar ve ilacı bulunmayan birçok gene hedeflenebilir ve gen susturması sağlayabilir, 2) siRNA'lar güvenli terapötiklerdir, 3) siRNA'lar oldukça etkin moleküller olup yüksek düzeyde gen susturma aktiviteleri vardır, 4) herhangi bir hastalık için hedef gene yönelik olarak kolaylıkla dizayn edilebilirler (10).

siRNA temelli ilaçların, küçük moleküller ve protein temelli ilaçlar ile karşılaştırılması Tablo 2.3'de verilmiştir (46). siRNA'lar ile küçük ilaç molekülleri ve yalnızca belli bir sınıfa hedeflenen protein ilaçlarının kullanımı ile ilgili sorunların üstesinden gelinebilir. Monoklonal antikorlar oldukça spesifiktir, bununla birlikte yalnızca hücre yüzey reseptörlerine ve sirküle proteinlere hedeflenebilir. Aksine siRNA'lar tüm genlere hedeflenebilir ve mRNA transkriptlerinin ifadesini

baskılayabilirler. Çünkü birçok hastalık istenmeyen ya da mutasyona uğrayan genlerin ya da normal genlerin aşırı ekspresyonundan kaynaklanır (46).

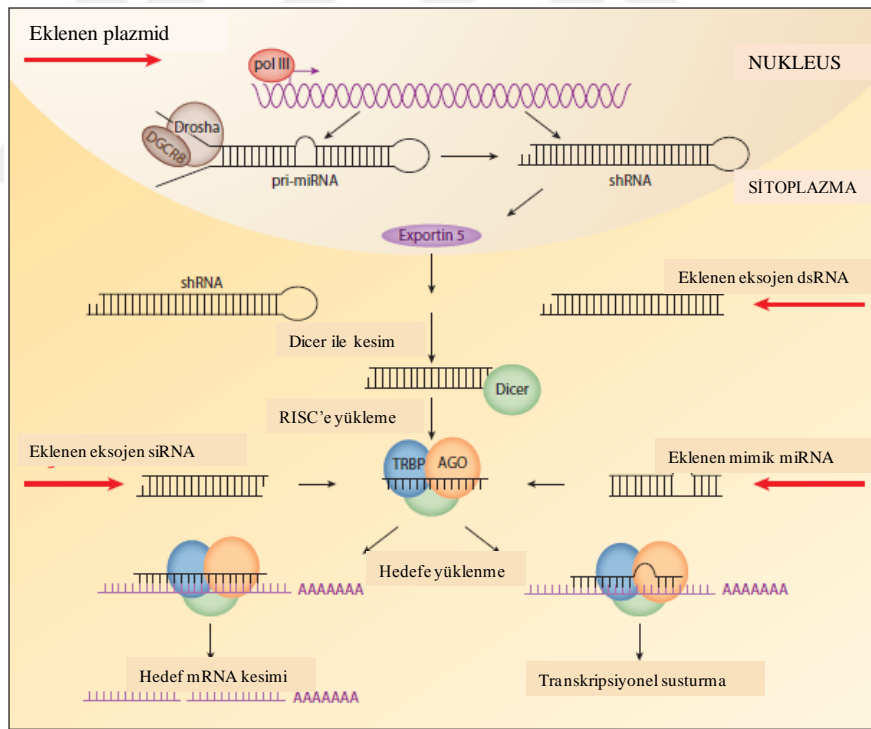
Tablo 2.3. Küçük moleküller, protein temelli ilaçlar (monoklonal antikorlar dahil) ve siRNA temelli ilaçların karşılaştırılması (46).

Özellikler	Küçük Moleküller	Protein-temelli ilaçlar	siRNA temelli ilaçlar
Faaliyet yapısı	Hedeflerin aktivasyonu ya da inhibisyonu	Hedeflerin aktivasyonu ya da inhibisyonu	Hedeflerin inhibisyonu
Hedef protein bölgesi	Ekstraselüler ve intraselüler	Çoğunlukla ekstraselüler	Herhangi bir bölge
Seçicilik ve potenslik	Değişken (bağlanma bölgesine, ligand spesifitesine affinitesi ve etkililiğine bağlı)	Oldukça spesifik ve potent	Oldukça spesifik ve potent
Optimizasyon	Yavaş	Yavaş	Hızlı
Üretim	Kolay	Zor	Kolay
Stabilite	Stabil	Stabil değil	Stabil değil
Taşıma	Kolay	Zor	Zor

Günümüzde hedef genlerin ekspresyonunu baskılamak için memeli hücrelerine siRNA'nın verilmesinde 2 temel strateji uygulanmaktadır. Hücrede RNAi süreci, RNA temelli (sentetik/efektör siRNA'lar, 21 bp dupleks) ya da DNA temelli yaklaşımlar (vektör-temelli siRNA yada kısa hairpin RNA'lar, shRNA) ile başlatılır. RNAi, küçük RNA dupleksleri olan siRNA'lar, shRNA'lar, Dicer substrat RNA'lar (dsiRNAs) ve mikroRNA (miRNA) mimiklerinin verilmesi ya da hücreye taşınması ile çalışır (47, 48).

RNA temelli yaklaşımda siRNA'lar, in vitro kimyasal sentez, in vitro transkripsiyon ya da Dicer gibi RNaz III-benzeri endonükleazlar ile uzun dsRNA'ların kesilmesi ile hazırlanırlar. siRNA'lar ve miRNA'lar kısa oligonükleotidler şeklinde hücreye verildikten sonra sitoplazmada RISC kompleksi ile birleşirler ve RNAi mekanizmasını başlatırlar. miRNA'lar hedef sekanslara %100 komplementer değildir, fakat siRNA'lar tam komplementerlik gösterir. Bu farklılık susturma sonucunu etkiler; miRNA'lar translasyonel baskılamayı indüklerken, siRNA'lar mRNA'ların Argonat2- aracılı degradasyonunu indüklerler (49).

DNA temelli yaklaşımda siRNA ekspresyon vektörleri kullanılır. siRNA ekspresyon vektörleri primer olarak plazmidler ya da viral vektörler olarak düzenlenirler. Tipik bir siRNA ekspresyon vektörü, fonksiyonel ekspresyon ünitesi (siRNA ekspresyon kaseti) içerir. siRNA ekspresyon kaseti içerisinde U6 promotor (transkript splicing'e katılan U6snRNA için promotor) ve H1 promotoru (RNaz P nin bir komponenti olan H1 RNA için promotor) gibi bir Pol III promotoru gereklidir. Ayrıca iki özgün restriksiyon bölgesi, eklenecek geni hedefleyen shRNA'yı kodlayan DNA sekansının vektöre klonlanması için promotorun devamında oluşturulur. Pol III için transkripsiyon durdurma sinyali (TTTTT) eklenen DNA sekansının (insert) 3' ucuna dahil edilir. Hedef DNA sekansını içeren vektörler memeli hücrelerine verildiği zaman shRNA eksprese ederler (11). shRNA'lar stem loop (saç tokası şeklinde) RNA'lardır. Eksprese edilen uzun RNA hairpin transkriptleri intraselüler süreç için sitoplazmaya geçtikten sonra Dicer ile kesilip siRNA'lar oluşturulur (50). Şekil 2.5'de siRNA ve shRNA'ların hücre içindeki süreçleri verilmiştir.



Şekil 2.5. RNAi mekanizmasında vektör temelli shRNA'lar ve siRNA'ların prosesi (50).

Vektör temelli siRNA ekspresyon sistemlerinin avantajları; 1) hem kalıcı (stabil), hem de geçici ekspresyon başarılabilir ve böylece siRNA aracılı gen inhibisyon süresi uzar, 2) DNA yapısında olduklarından daha stabildirler, 3) Promotor/enhancer

seçimi, loop yapısı, ipliğin uzunluğu ve restriksiyon bölgelerinin oryantasyonu gibi vektör modifikasyonları yapılabilir (10).

Sentetik siRNA'ların avantajları; 1) fazla miktarda kolayca sentezlenebilir, 2) stabiliteelerini artırmak için modifiye edilebilir, 3) potent gen susturma etkisine sahiptir. Dezavantajları; siRNA moleküllerinin susturma etkisi geçicidir, çünkü hücre bölünmeleri ile hücrel siRNA konsantrasyonu dereceli olarak azalır ve bazen bu durum etkin olmayan gen susturmasına yol açar. Geçici ekspresyonları nedeniyle sık ve tekrarlayan verilmeleri gereklidir ve tekrarlayan tedaviler nedeniyle masraflıdır ve toksisite problemi oluşur (10, 49).

2.10. Kısa Saç Tokası RNA'lar (Short Hairpin RNA'lar, shRNA)

Öncül shRNA'lar (pre-shRNAs) saç tokası benzeri halka yapısında olup nükleusta sentezlenir ve exportin-5 yardımıyla nükleus zarında bulunan nükleer por komplekslerinden (NPC) geçerek sitoplazmaya girerler. Sitoplazma da Dicer enzimi ile kesilerek 3' ucunda 2 nükleotidlik uzantıya sahip çift iplikli siRNA yapısı oluşur ve bu siRNA'lar RISC aktivitesine katılırlar (47).

shRNA sistemleri ekspresyonlarını sürdürmede kullanılan RNA polimerazlar (II ve III) ile kategorize edilebilir; sınıf I (RNA pol III) ve sınıf II (RNA pol II) hairpinler. Daha popüler bir strateji olarak sunulan Sınıf I hairpinler ya da basit hairpinler 19-29 bp'lik dsRNA içerirler ve ekspresyonları RNA polimeraz III promotorları ile sürdürülür (insan ya da fare U6-snrRNA ya da insan RNazP (H1) RNA promotorları). Halka yapısı 4-9 nükleotidden oluşan, exportin-5 ile shRNA'nın NPC'den nükleer çıkışı ve Dicer'in PAZ domaini ile etkileşerek RNAi yolağına geçişi için kritiktir. Pol III sistemleri geçici ya da devamlı ekspresyon için kullanılır. Çoğu pol III temelli promotorlar oldukça güçlüdür ve uzun dönemli susturma sağlarlar. Pol III ile sürdürülen shRNA ekspresyonunun dezavantajı ise, pol III transkripsiyonunun doku spesifitesinden yoksun olmasıdır. Bu problem kısmen loxP rekombinasyonu ile aktive olan pol III kullanılarak çözülür. Fonksiyonel ve çok yönlüdür, çünkü hedef transgen farklı dokularda Cre rekombinaz eksprese edenler ile kombine edilebilir. Bununla birlikte loxP stratejisi bazen daha komplikedir, çünkü iki transgen ve rekombinasyon taraması gereklidir. Sınıf I hairpinler klasik miRNA'ya benzer, prosese uğramazlar. Sınıf II hairpinler ise miRNA öncüllerinden modellenirler (51).

İkinci shRNA ekspresyon stratejisi olan sınıf II hairpinlerde, shRNA'lar endojen miRNA'lardan şekillenir, RNA pol II promotorlarından eksprese edilir. Bu miRNA-temelli shRNA'lar Drosha enzimi aracılığı ile yolağa girerler. miRNA-temelli bu shRNA'ların basit hairpinlere göre birkaç avantajı vardır. İlk olarak shRNA ekspresyon platformu geniştir, Pol II ekspresyon sistemlerinden eksprese edilebilir (örn; tet-regüle olabilen ya da doku-spesifik promotorlar). İkincisi 22 nt sekans, Drosha ve Dicer prosesi aracılığıyla RISC'e inkorpore olur. Bu özellik etkin hedef sekansları tahmin eden algoritmalar kullanılarak dizaynedilebilir (47, 51).

Eksprese edilen shRNA'ların yanı sıra, kimyasal olarak ve in vitro sentezlenen shRNA'lar da oldukça etkindir. Kimyasal sentezlenen shRNA'lar 25-29 nt dsRNA ve 2 nt 3' çıkıntı içerirler, özellikle aynı hedef sekansı içeren siRNA lardan daha etkindirler, çünkü bunlar direkt RISC inkorporasyonundan ziyade Dicer süreci ile RNAi yolağını başlatırlar (52).

Ekspresyonun düzenlenmesi için bir yöntem de indüklenebilir sistemlerin kullanılmasıdır. Bu sistemler sistemler indükleyiciler (inducerlar) ile sıkı kontrol altındadır ve transkripsiyon doz-bağımlı ve reversibl regülasyon ile kontrol edilir. İndüklenebilir Pol III-temelli sistemler ya tetrasiklin ya da ekdison cevabı için düzenlenir. Doksisiklin gibi tetrasiklin analogları *in vivo* çalışmalarda kullanılmaktadır. Ekdisonun kullanımı ise hücre kültürü çalışmaları ile sınırlıdır (51).

siRNA'lar, shRNA'lar ve geçici olarak transfekte edilen shRNA vektörlerinin başlıca sınırlaması ise memeli hücrelerinde stabil ya da indüklenebilir gen susturma yeteneklerinin olmamasıdır. Memeli hücre sistemlerinde RNAi yolağının başlatıcıları olan uzun dsRNA, siRNA ya da shRNA'ların geçici transfeksiyonu, 2-7 gün süren geçici etki ile sonuçlanır. Bu durumda siRNA'ların yarılanma ömrü, hücre bölünmesi ve RISC kompleksinin geri dönüşümü önemlidir (51, 53).

2.11. Çoklu RNA kasetleri

RNAi yolağının siRNA'lar ve shRNA'lar ile aktive edilerek yapılan gen susturması çalışmaları hastalıkların tedavisinde ümit vericidir. Bununla birlikte, tek bir shRNA eksprese eden sekans içeren vektörler ile elde edilen susturma etkinliği düşüktür. shRNA kullanılarak susturma etkinliğini artırmak için, birden fazla shRNA-eksprese eden sekanslar tek bir plazmid vektöre verilmektedir. Konvansiyonel tek

shRNA ekspresyon vektörü ile karşılaştırıldığında, çoklu shRNA ekspresyon vektörleri ile elde edilen stabil klonlar ile daha etkin bir susturma sağlanmaktadır (54).

Bu vektörler aynı anda birkaç gene ya da bir genin farklı mRNA'larına hedeflenebilir. Bazı mRNA'ların etkin olarak susturulması zordur, birkaç shRNA vektörü susturma etkinliğini artırmak için tek bir mRNA içerisinde bulunan birçok bölgeyi hedeflemede kullanılabilir. Böylece bu shRNA vektörleri birçok organizmada bir gen içerisindeki birçok bölgeyi ya da birçok geni hedeflemek için kullanılmaktadır. Xu ve ark. (13) çoklu shRNA kasetlerinin tekrarlayan insersiyonunu kolaylaştırmak için özel bir vektör dizayn etmişlerdir. Ayrıca farklı promotorlu (H1 ya da 7SK) diğer vektörleri modifiye etmek için kendi yöntemlerini kullanmışlardır. Farklı promotorlu çoklu kasetlerin etkin kombinasyonu, birbiri ile uyumlu farklı vektörlerden promotor-shRNA kasetlerinin restriksiyon enzim bölgelerinin yapılması ile başarılabilir. Çoklu shRNA'lar ekspresyon kasetleri (1 kaset=promotor, shRNA ve terminator) ile tek bir ekspresyon vektöründe kombine edilebilir. Buna alternatif olarak, birçok shRNA domainleri tek bir transkriptte kombine edilebilir (55).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Materyaller

3.1.1. Alet ve Cihazlar

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Cihazın Adı	Marka
Agaroz DNA Elektroforezi	Biorad
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
Mikrosantrifüj	Sigma
Jel Görüntüleme Sistemi	Biorad
Etüv	Thermo
Su Banyosu	Nüve
Vorteks	IKA
Manyetik karıştırıcı	IKA
Laminar flow kabin	Thermo
İnvert mikroskop	Olympus
Karbondioksitli inkübatör	Sanyo
Spektrofotometre	Perkin Elmer
-80°C derin dondurucu	Haier
Otoklav	Hirayama
Saf su cihazı	Millipore
Buz makinası	Nüve

3.1.2. Enzimler

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan enzimler

Enzim	Firma	Konsantrasyon
BpiI (Bbs I)	Thermo Scientific	1 µg/1 µl
Hind III	Thermo Scientific	1 µg/1 µl
Sda I	Thermo Scientific	1 µg/1 µl
Acc65I	Thermo Scientific	1 µg/1 µl
T4 DNA ligaz	Thermo Scientific	5U/ µl

3.1.3. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan madde, malzeme ve kitleler

Kimyasal Malzeme ve Kitleler	Firma
Kimyasal madde ve malzemeler	Sigma, Fluka, Thermo,
Plazmid DNA İzolasyon Kiti	Thermo Scientific
Hızlı DNA ligation kiti	Thermo Scientific
Gel Ekstraksiyon kit	Thermo Scientific
1 kb DNA ladder	Thermo Scientific
λ DNA Hind III marker	Thermo Scientific
psiRNA-DUO-GFPzeo	İnvivogen
ChemiComp <i>E.coli</i> GT115 bakterisi	İnvivogen
Fast-Media Zeo Agar X-Gal ve X-Gluc	İnvivogen

3.1.4. Besiyerleri ve Çözeltiler

Luria Bertani (LB)

10 g toz LB besiyeri bidistile su içerisinde çözündürülerek hacmi 500 mL'ye tamamlandı. 121 ° C' de ve 1 atm basınç altında 20 dakika otoklavda steril edildi.

Luria Bertani Agar (LBA)

Yukarıda formülü verilen sıvı LB besiyerine % 1.5 (a/h) oranında agar eklenerek hazırlandı ve 1 atmosfer basınçta, 121°C'da 20 dakika otoklavda tutularak sterilize edildi. Gerekli koşullarda besiyerlerine 25 µg/mL final konsantrasyonda zeocin eklendi.

Fast Media Zeo Agar

Toz halindeki TB besiyeri steril bidistile su içerisinde çözündürülerek hacmi 200 mililitreye tamamlandı. İçerisinde Zeocin bulunduğu için mikrodalga fırında çözündürüldü.

5XTris-Borik Asit-EDTA (TBE) Çözeltisi

54 g Tris ve 27.5 g borik asit 800 mL bidistile su içerisinde çözündürüldü. Çözelti üzerine 20 mL 0.5 M EDTA çözeltisi (pH 8.0) eklendi. Çözeltinin hacmi bidistile su ile 1 litreye tamamlandı. Elektroforez tamponu olarak veya agaroz jellerin hazırlanmasında 1/5 oranında seyreltikten sonra kullanıldı.

Tris / EDTA (TE) Tamponu (10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH 8.0)

10 mL M Tris-HCl tamponu (pH 8.0) ve 2 mL 0.5 M EDTA çözeltisi (pH 8.0) bidistile su ile 1 litreye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti otoklavda 121°C'de 1

atmosfer basınç altında 20 dakika sterilize edildi.

3.2. Metot

3.2.1. Plazmid DNA'nın bakteri hücrelerine transformasyonu ve çoğaltılması

Çalışmamızda shRNA dizilerinin insersiyonu için psiRNA-DUO-GFPzeo vektörü kullanıldı. Kontrol plazmidi olarak da psiLuc-Lac kullanıldı. Plazmid ticari olarak satın alındıktan sonra psiRNA vektörünün transformasyonu amacıyla *Escherichia coli* GT116 suşu kullanıldı. Transformasyon üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak yapıldı.

Bu yöntemde; *E.coli* GT115 liyofilize edilmiş kompetant hücreler buzda 5 dakika bekletildi. Üzerine 1 ml soğuk rekonstitüf solüsyon eklenip buz üzerine koyuldu. Hafifçe homojenize edilip, 25-30 dakika buzda hücrelerin tamamıyla rehidrate olması sağlandı. Önceden soğutulan ependorf tüpe 1 µg supercoil psiRNA ilave edilip, buza koyuldu. Hücreler homojenize edilip DNA içeren tüplere 100 µl hücre eklendi. Hafifçe karıştırıldı ve tüpler buzda 30 dakika bekletildi. 42°C'lik su banyosunda tüpler 30 sn inkübe edildi, daha sonra tüpler 1-2 dk süreyle buza yerleştirildi. Her bir reaksiyona 900 µl LB vasatı ilave edildi. Tüpler 250 rpm'de hafifçe çalkalanarak 37°C'de 1,5 saat inkübe edildi. Zeocin içeren besiyeri ile hazırlanan agar içeren petriye 100µl LB vasatından koyularak bagetle yayıldı. Ekim sonrası petriler bir gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Petrilerde gelişen tekli kolonilerden gliserine stok alındı. Alınan stoklardan psiRNA izolasyonu ve kontrolleri yapıldı.

Stoğa alınmış psiRNA içeren *E.coli* suşlarından plazmid DNA izolasyonu, üretici firmanın kit protokolüne uygun olarak yapıldı. Buna göre; psiRNA-DUO plazmidi ile transforme edilen *E.coli* GT115'in, 25 µg/ml konsantrasyonda Zeocin içeren 25 ml LB besiyerinde doymuş kültürü hazırlandı. Hazırlanan ön kültürden 500 ml antibiyotikli LB besiyerine ekim yapıldı ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı ve plazmid DNA izolasyonu yapıldı.

3.2.3. Plazmid siRNA'nın Elektroforetik Kontrolü

İzole edilen plazmid siRNA'ların saflığı, içerdiği formlar ve plazmid yapısının doğruluğu agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak kontrol edildi. Bu amaçla, agaroz % 0.7 (a/h) konsantrasyonda Tris-Borik asit-EDTA (TBE, pH 8.0) tamponu içerisinde kaynatılarak çözündürüldü. Çözelti, sıcaklığı 60°C'a kadar soğutulduktan sonra 0.5 µg/ml konsantrasyonda etidyum bromür ilave edilerek yatay agaroz jel kasetlerine döküldü. Hazırlanan agaroz jel kasetleri, jelin donmasını takiben içerisinde pH 8.0 TBE tamponu bulunan yürütme tankına alındı. Elektroforetik analiz için izolasyon sonrası spektrofotometrik kontrolleri yapılmış örnekler, 5:1 (örnek: elektroforez yükleme tamponu) oranında 6x agaroz jel yükleme boyası ile karıştırılarak jele uygulanacak ve elektroforez işlemi sabit 80 volt akımda 1.5 saatte tamamlandı. Elektroforez işlemi sonrası, UV transillüminatör üzerinde incelenen jeller, Biorad Camera ve Image Analysis Software sistemi kullanılarak değerlendirildi.

Kalitatif kontrolleri yapılan plazmid siRNA'ları uygun restriksiyon endonükleazları ile kesildikten sonra, agaroz jel elektroforezinde verdikleri DNA bantları ve boyutları değerlendirilerek doğrulukları kontrol edildi. Bunun için psiRNA-DUO plazmid DNA'sı Acc 65I, Hind III ve Bbs I restriksiyon endonükleazları ile kesildi. Kesim işlemi 20 µl reaksiyon ortamında gerçekleştirildi. 1 µg psiRNA, fast digest enzim ve 1Xdigest tamponu bidistile su ile 20 µl'ye tamamlandı ve 37°C'de su banyosu içerisinde 10-30 dakika süreyle kesime bırakıldı ve kesilen psiRNA örnekleri % 0.7'lik agaroz jel elektroforezi ile incelendi.

3.2.4. VEGF-A ve VEGFR-2'ye spesifik shRNA hedef bölgelerinin seçilmesi ve oligonükleotid dizaynı

Hedef VEGF-A ve VEGFR-2 gen dizileri NCBI'dan yararlanılarak belirlendi. Daha sonra, insert edilecek shRNA dizilerinin dizaynı için siRNA Wizard (Invivogen) programından yararlanıldı. İlgili genin kodlanan bölgesinde yer alan nükleotid sekansları seçildi. Bu dizilerin uç kısımlarında vektöre girecekleri bölge ile uyumlu uygun restriksiyon kesim bölgeleri yer alacak şekilde tasarlandı. Dizilerin uç kısımlarına BbsI/BbsI ve Acc65I/HindIII restriksiyon kesim bölgeleri yerleştirildi.

VEGF-A için; %GC:47,62 Genom pozisyonu:1500, 66 bp, psiRNA-DUO için klonlama bölgesi Acc65I/HindIII

Oligo 1

5'
GTACCTCGCGCAAGAAATCCCGGTATAATCAAGAGTTATACCGGGATT
TCTTGCGCTTTTGGAAA 3'

Oligo 2

5'AGCTTTTCCAAAAAGCGCAAGAAATCCCGGTATAACTCTTGATTATA
CCGGGATTTCTTGCGCGAG 3'

VEGF-R2 için; %GC:47,62 Genom pozisyonu:1203, 56 bp, psiRNA-DUO için klonlama bölgesi BbsI/BbsI

Oligo 1

5'ACCTCGACCAAGGATTGTACACCTGTCAAGAGACAGGTGTACAATC
CTTGGTCTT 3'

Oligo 2

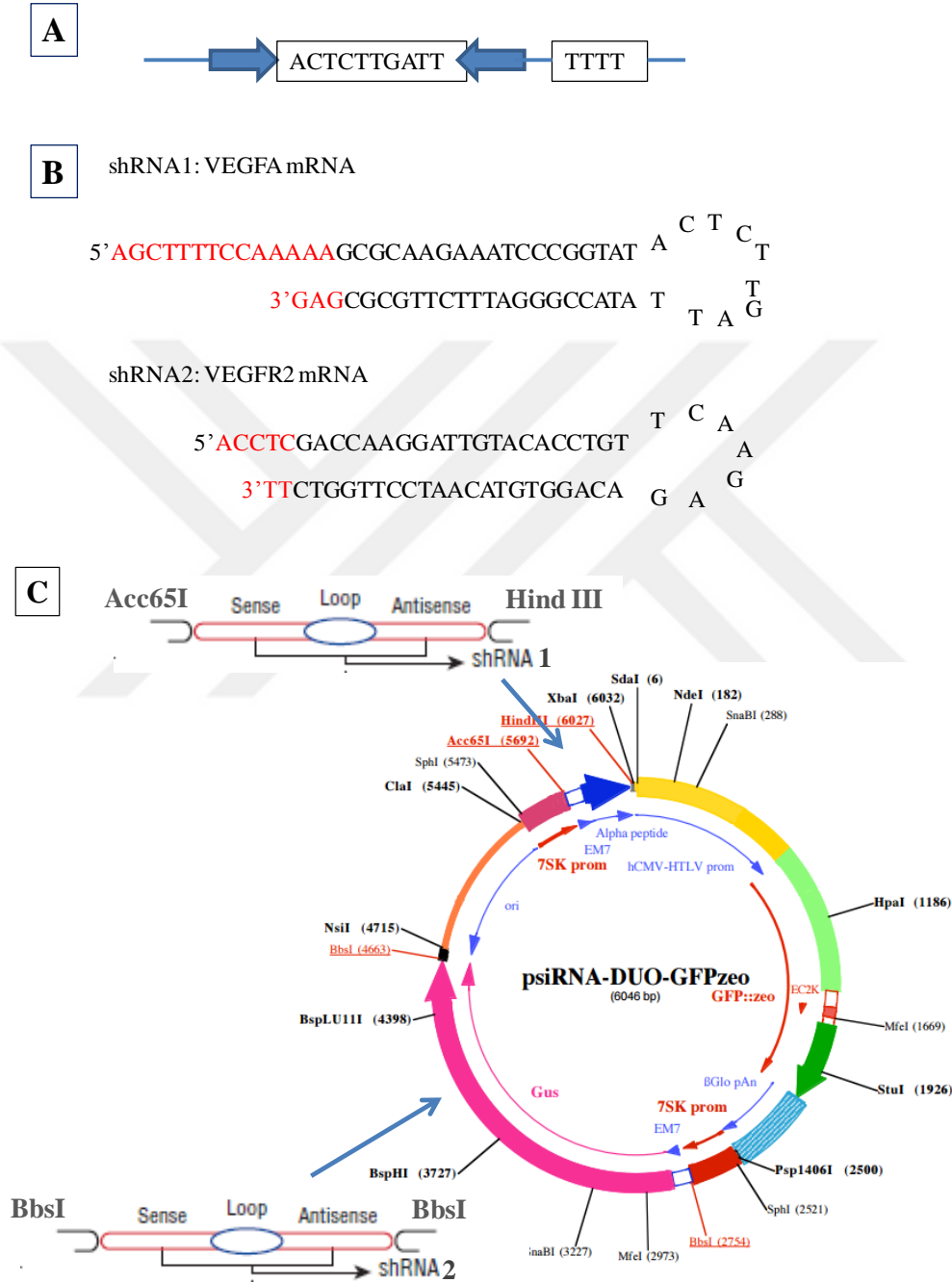
5'
CAAAAAACCAAGGATTGTACACCTGTCTTTGAACAGGTGTACAATC
CTTGGTCTG 3'

3.2.5. Tek iplikli shRNA dizilerinin bağlanması

Sentezi yapılan liyofilize ileri (forward) ve geri (reverse) oligonükleotidler (ON) 100 µM konsantrasyon olacak şekilde TE tampon ile çözündürüldü. Her bir oligonükleotid solüsyonu 25 µM'a dilüe edildi. 25 µM ileri ON ve 25 µM geri ON, 0,5 M NaCl bağlanma (annealing) solüsyonu içerisine eklendi. 2 dakika 80°C de inkübe edildikten sonra sıcaklık 35°C 'ye gelinceye kadar su banyosunda bekletildi. Bağlanması tamamlanan çift iplikli shRNA'lar kullanılıncaya kadar -20°C de bekletildi. shRNA dizilerinin bağlanması %1 agaroz jelde elektroforetik olarak kontrol edildi.

3.2.6. psiRNA-DUO plazmid DNA'sı içerisinde shRNA dizilerinin klonlanması

Farklı restriksiyon enzim kesim bölgeleri yerleştirilen oligonükleotidlerin plazmid yapısına klonlanması tek basamaklı ve 2 basamaklı olarak gerçekleştirildi.



Şekil 3.2. psiRNA-DUO plazmidine shRNA'ların klonlanması. A. Ekspresyon kaseti, B. Klonlanacak shRNA dizileri, C. shRNA'ların plazmide klonlama bölgeleri.

2 basamaklı klonlama:

psiRNA-DUO plazmidi ilk olarak Acc65I/HindIII restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesilen plazmid agaroz jele yüklenerak plazmid kesimi elektroforetik olarak kontrol edildi. Daha sonra VEGF-A shRNA'nın Acc65I/HindIII restriksiyon enzimi ile kesilen psiRNA-DUO'ya ligasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla ilk olarak ligasyon solüsyonu (100 ng psiRNA, shRNA insert, T4 DNA ligaz, 10xligasyon tampon, DNaz-RNaz free su) hazırlandı. 16°C'de 1 gece boyunca inkübe edildi. Ligasyon elektroforetik olarak kontrol edildi. Ertesi gün VEGF-A shRNA'nın klonlandığı psiRNA-DUO plazmidi kompetant *E.coli* GT115 hücrelerine transforme edildi ve Fast-Media Zeo içeren Agar X-Gal besiyeri içeren petrilere ekimi yapıldı. 37°C'de 1 gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün petrilere tek koloni açısından morfolojik olarak incelendi.

Tekli beyaz rekombinant kolonilerden öze yardımıyla 25 ml Zeo içeren LB besiyerlerine ekim yapıldı ve 37°C'de 1 gece boyunca inkübe edildi. Sıvı besiyerinde üreyen bakterilerden 1 ml alınarak 500 ml besiyerine ekim yapıldı. 37°C'de 1 gece boyunca inküsyona bırakıldı. Ertesi gün miniprep ve maxiprep psiRNA izolasyonları yapıldı. shVEGF-A'nın klonlandığı psiRNA'ların spektrofotometrik ve elektroforetik kontrolleri yapıldı. Spektrofotometrik ve elektroforetik kontrolleri yapılan psiRNA-DUO-VEGFA plazmidine ikinci basamakta klonlama yapmak için bu plazmidler BbsI/BbsI restriksiyon enzimi ile kesildi ve VEGFR-2 shRNA'nın ligasyonu yapıldı. Ligasyon elektroforetik olarak kontrol edildi.

Ligasyonu yapılan VEGF-A ve VEGFR-2 shRNA'ların klonlandığı psiRNA-VEGFA-VEGFR2 plazmidi kompetant *E.coli* GT115 hücrelerine transforme edildi ve Fast-Media Zeo içeren Agar X-Gal besiyeri içeren petrilere ekimi yapıldı. 37°C'de 1 gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün petrilere tek koloni açısından morfolojik olarak incelendi. shVEGF-A ve shVEGFR-2'nin klonlandığı hücreler, yani rekombinant klonlar beyaz olarak görülürken, klonlama yapılmayan parental klonlar mavi renkli olarak gözlemlendi.

Tekli beyaz rekombinant kolonilerden öze yardımıyla 25 ml Zeo içeren LB besiyerlerine ekim yapıldı ve 37°C'de 1 gece boyunca inkübe edildi. Sıvı besiyerinde üreyen bakterilerden 1 ml alınarak 500 ml besiyerine ekim yapıldı. 37°C'de 1 gece boyunca inküsyona bırakıldı. Ertesi gün miniprep psiRNA izolasyonları yapıldı.

shVEGF-A ve shVEGFR-2'nin klonlandığı psiRNA'ların spektrofotometrik ve elektroforetik kontrolleri yapıldı.

Tek basamaklı klonlama:

Tek basamakta klonlama için psiRNA-DUO, Acc65I/HindIII/BbsI restriksiyon enzimleri ile kesildi ve kesilme elektroforetik olarak kontrol edildi. Ligasyonu tamamlanan psiRNA-DUO-VEGFA/VEGFR2 plazmidi -20°C'de saklandı.

İki shRNA dizisinin klonlandığı plazmid kompetant *E.coli* GT115 hücresine transforme edildi ve Fast-Media Zeo içeren Agar X-Gal ve X-Gluc besiyeri içeren petrilere ekimi yapıldı. 37°C'de 1 gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün petrilere tek koloni açısından morfolojik olarak incelendi. shRNA'ların klonlandığı hücreler yani rekombinant klonlar beyaz olarak görünürken, klonlama yapılmayan parental klonlar mavi renkli olarak gözlemlendi.

Tekli beyaz rekombinant kolonilerden öze yardımıyla 25 ml Zeo içeren LB besiyerlerine ekim yapıldı ve 37°C'de 1 gece boyunca inkübe edildi. Sıvı besiyerinde üreyen bakterilerden 1 ml alınarak 500 ml besiyerine ekim yapıldı. 37°C'de 1 gece boyunca inküsyona bırakıldı. Ertesi gün miniprep ve maxiprep psiRNA izolasyonları yapıldı. shVEGF-A ve shVEGFR-2'nin klonlandığı psiRNA'ların spektrofotometrik ve elektroforetik kontrolleri yapıldı.

3.2.7. shRNA Dizilerinin Klonlandığı Vektörlerde Klonlamanın Doğruluğunun Nükleik Asit Sekanslama Yöntemi ile Tespit Edilmesi

DNA sekanslama Medsantek firmasından hizmet alımı yapılarak gerçekleştirildi. Sekanslama çalışması Applied Biosystems sekanslama cihazı kullanılarak yapıldı. Yaklaşık olarak 500 ng plasmid DNA ve primer olarak 20 ng sekanslama primeri kullanıldı. Sonuçlanan sekanslama reaksiyonları Applied Biosystems sequencer kullanılarak yapıldı. Veriler Chromas programı kullanılarak analiz edildi.

3.3. In vitro Transfeksiyon Çalışmaları

3.3.1. Hücre Kültürü Pasajı ve Hücre Kültürünün Devamlılığının Sürdürülmesi Çalışmaları

In vitro transfeksiyon çalışmalarında, MCF-7 (ATCC® HTB-22) ve MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26) meme kanser hücre hatları kullanıldı. *In vitro* transfeksiyon çalışmaları; T-25 cm² hücre kültürü şişeleri ile 6 ve/veya 24 kuyucuklu kültür kapları kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre pasajları ve hücre kültürünün devamlılığının sağlanması çalışmalarında, % 10 fetal bovin serum, 100 mM L-glutamin ve 100 mM antibiyotik çözeltisi içeren 0.22 µm 'lik filtre kullanılarak steril edilmiş DMEM doku kültürü besiyeri kullanıldı.

Pasajlama işlemi hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak 3-4 günde bir yapıldı. Pasajlama için besiyeri ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra kalan hücre tabakası 2 ml steril PBS (pH 7.4) tamponu ile 2 kez yıkandı. Tripsin-EDTA (%0.05) ilave edildi ve 37°C'de 2-3 dakika kadar bekletilerek hücre kültür şişesine tutunmuş haldeki hücrelerin tamamen kalkması sağlandı. Daha sonra hücrelerin üzerine taze besiyeri ilave edilerek kültürler % 5 karbondioksit ve % 98 nem içeren 37°C'lik etüvde inkübe edildi.

3.3.2. Transfeksiyon Öncesi Hücre Ekimi ve Transfeksiyon

Transfeksiyon için hücreler tek tabaka halinde çoğaltıldı ve hücre ekimi için tripsinize edilen hücrelerin üzerine besiyeri eklendi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Süpernatant atıldı ve çökelti halindeki hücreler 1 ml besiyeri içerisinde tekrar dağıtıldı. Steril bir ependorfa 100 µl hücre süspansiyonu, 400 µl besiyeri ve 500 µl % 0.4'lük tripan mavisi çözeltisi konuldu. Hücreler Thoma lamının 16 büyük karelik alanının en üst ve en sağ çizgisi dışında kalan alan üzerindeki toplam ölü ve canlı hücre sayısı şeklinde ters fazlı mikroskoptan gözlenerek sayıldı. Bu işlem Thoma lamının diğer 16 büyük karelik bölmesi için de tekrarlandı ve ortalama hücre sayısı hesaplandı (Hücre sayısı/ml= Ortalama hücre sayısı/10⁻⁴ x (dilüsyon faktörü)).

Hücre kültürü plağına (6 kuyucuklu) her bir kuyucuğa 0,3x10⁶ tane hücre olmak üzere ekim yapıldı. Hücreler bir gece 37°C'lik CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. psiRNA plazmidleri ile transfeksiyon işleminden önce hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve daha sonra serumsuz taze besiyeri ilave edildi. Çalışmamızda

transfeksiyon için ticari transfeksiyon ajanı Dharmafect (Dharmacon, USA) kullanıldı. Tekli ve ikili shRNA içeren plazmidler, kuyucuk başına 2.5 µg psiRNA plazmidi verilecek şekilde Opti-MEM (Gibco, UK) besiyeri içinde süspande edildi. Hücrelerin üzerindeki serumlu besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra tekli ve ikili shRNA içeren plazmidler hücrelere verildi. Plazmidlerin transfeksiyonundan 48 ve 72 saat sonra toplanan süpernatantlar ve hücre peletlerinde gen inhibisyonunu tayin etmek amacıyla ELISA yapıldı.

3.3.3. Plazmidlerin Hücreye Girişinin Floresan Mikroskobu İle İncelenmesi

VEGF-A ve VEGFR-2 shRNA'larını içeren psiRNA-DUO plazmidinin hücreye girişinin izlenmesi amacıyla vektör yapısında bulunan *GFP* geninden yararlanıldı. Hücre kültürü plağına ekim yapılan meme kanser hücre hatlarına psiRNA içeren kompleksler uygulandı. Hücrelerin üzerindeki besiyeri 48 saat sonra uzaklaştırıldı, PBS ile yıkanıp, hücreler floresan mikroskobu altında incelendi.

3.3.4. ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) Yöntemi İle VEGF-A ve VEGFR2'nin Gen İnhibisyonunun Belirlenmesi

Hücre kültür süpernatantında VEGF-A ve VEGFR2 proteinlerinin tayini ELISA yöntemi ile üretici protokolüne uygun olarak yapıldı. Kültür vasatında biriken protein ve rekombinant protein standardın dilüsyonları katı faz sandviç ELISA yöntemi kullanılarak analiz edildi. Kültür süpernatantı (insan VEGF-A ve VEGFR2 antijeni), insan VEGF165 ve VEGFR-2'ye özgü poliklonal antikor ile kaplı kuyularda inkübe edildi. Yıkamadan sonra, proteine özgü biotinlenmiş monoklonal antikor eklendi. İnkübasyondan sonra streptavidin-peroksidaz enzimi ilave edildi. Ardından enzime bağlanarak renk oluşturan substrat solüsyonu eklendi ve bu renkli ürünün yoğunluğu, orjinal numunede var olan VEGF konsantrasyonuna orantılanarak elde edildi. Absorbans 450 nm'de spektrofotometrik okuma ile belirlendi. Kültür süpernatantındaki protein miktarı, VEGF standartlarının absorbansı ile oluşturulan standard blanklere dayanarak belirlendi. psiRNA transfeksiyonu ile VEGF ve reseptörünün sekresyonunun inhibisyonu (%), numunelerde ki VEGF-A ve VEGFR-2'nin kontrolleri ile karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Tüm çalışmalar üç kere tekrarlandı ve standard sapmaları (\pm) hesaplandı.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

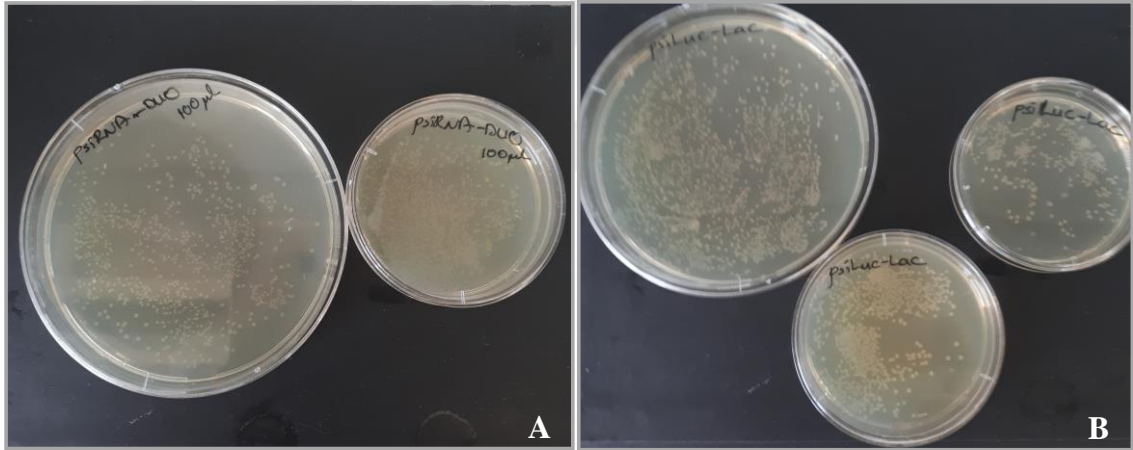
Tez kapsamında elde edilen *in vitro* alışmalara ilişkin sonuçların değerlendirilmesinde, ELISA çalışmasında vektörlerin transfekte edildiği farklı hücre hatları arasındaki gen susturma etkinlikleri Student t test ile belirlendi. $P < 0,05$ istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. psiRNA-DUO Plazmidinin *E.coli*'ye Transformasyonu ve Kontrolüne İlişkin Bulgular

psiRNA-DUO plazmidi yöntem 3.2.1'de belirtildiği şekilde *E.coli* GT115 suşuna transforme edildi. Transformasyon sonrası zeocin içeren LB agar petrilerine ekilen transformantlar 37°C'de bir gece inkübe edildikten sonra ertesi gün her petride tek tek koloni oluşumu gözlemlendi (Şekil 4.1). Daha sonra tekli koloniler öze yardımıyla zeocin içeren LB besiyeri ortamına ekildi. İnkübatörde 37°C'de bir gece inkübe edildikten sonra belli bir optik dansite değerine ulaşan doymuş bakteri kültüründen pDNA izolasyonu miniprep ve maxiprep izolasyon kitleri ile yapıldı.



Şekil 4.1. psiRNA-DUO (A) ve psiRNA-Luc-Lac'ın (B) *E.coli* GT115 hücrelerine transformasyonu sonrası besiyerlerinden tek koloni seçimi.

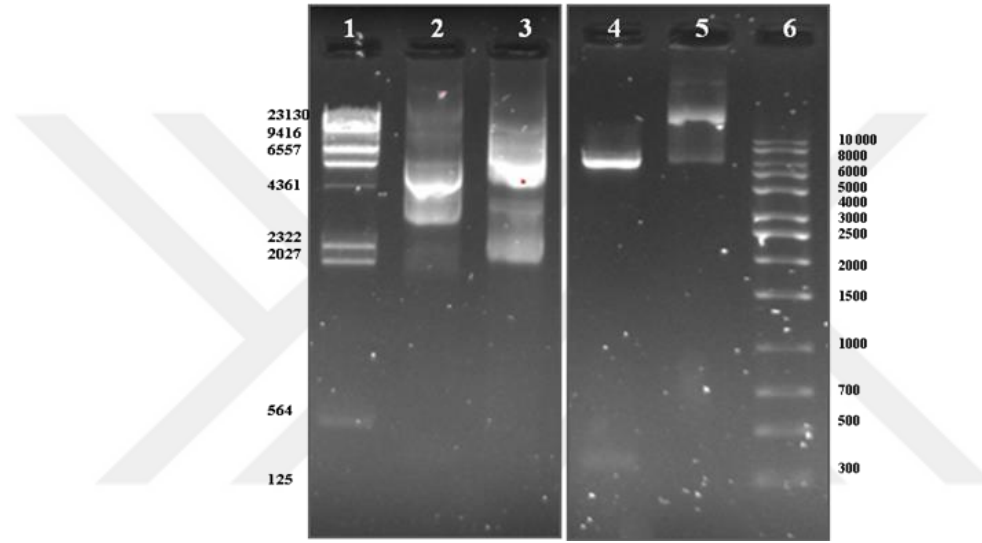
4.2. Plazmid siRNA'nın Spektrofotometrik ve Elektroforetik Kontrolüne İlişkin Bulgular

Plazmid siRNA'ların izolasyon sonrasında, konsantrasyonu ve saflık derecesi 260 ve 280 nm dalga boylarındaki ölçüm sonuçlarından yararlanılarak spektrofotometrik olarak tayin edildi. İzole edilen psiRNA örneklerinde saflık derecesinin yani A260/A280 oranının moleküler ve gen aktarımı çalışmalarına uygun olarak 1.80-1.90 arasında değiştiği görüldü.

Tablo 4.1. İzole edilen plazmidlerin spektrofotometrik kontrolü

Plazmid	A260/280	DNA Conc. (µg/ml)
psiRNA-DUO	1,890	185,87
psiLuc-Lac	1,895	191,88

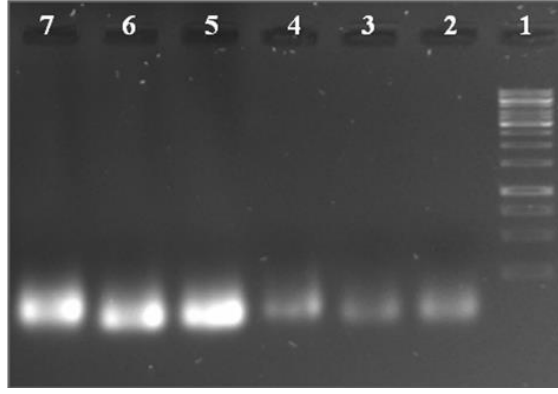
İzole edilen plazmid siRNA'ların saflığı, içerdiği formlar, restriksiyon enzim haritasının ve plazmid yapısının doğruluğu % 0.7 (a/h) agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak kontrol edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. psiRNA-DUO'nun elektroforetik kontrolü. 1. Lambda DNA Hind III marker, 2. psiLuc-Luc (3906 bp), 3. psiRNA-DUO (6046 bp), 4. Acc/Hind III restriksiyon enzimi ile kesim, 5. Stok psiRNA-DUO, 6. 1 kb DNA ladder.

4.3. shRNA Dizilerinin Bağlanması İlişkin Bulgular

Tek iplikli shRNA dizilerinin bağlanarak çift iplikli hale getirilmesinin sonucunda elde edilen shRNA'lar %1 agaroz jelde elektroforetik olarak kontrol edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. İleri ve geri oligonükleotidlerin tek zincirli ON'ler ve bağlanmış ON'ler. 1.1 kb DNA ladder, 2- 4. Tek zincirli ON'ler, 5-7. Bağlanan çift zincirli ON'ler.

4.4. psiRNA-DUO İçerisine shRNA Dizilerinin Klonlanmasına İlişkin

Bulgular

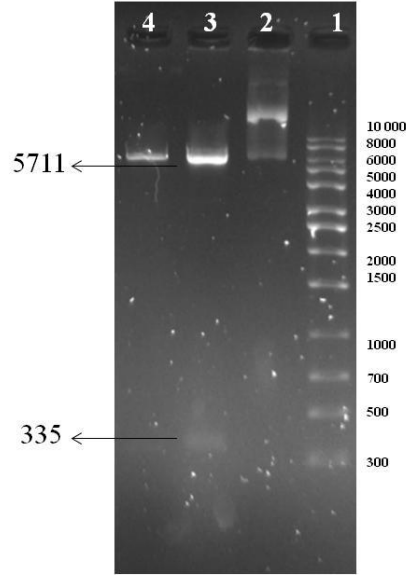
shRNA'ların vektör içerisine klonlanmasında iki farklı yöntem kullanıldı. Yöntem 3.2.6'da belirtildiği şekilde klonlanma tek basamaklı ve 2 basamaklı olarak gerçekleştirildi. Tablo 4.2'de klonlama yapılan psiRNA-DUO'nun restriksiyon kesim bölgeleri ve kesim sonucu oluşacak bant uzunlukları yer almaktadır. Elde edilen plazmid kesim ürünlerinde ve klonlanan plazmidlerde bant uzunlukları dikkate alınarak kesim kontrolleri yapılmıştır.

Tablo 4.2. psiRNA-DUO'nun klonlama için uygun restriksiyon kesim bölgeleri ve bant uzunlukları

Plazmid	Uzunluk (bp)	Materyalin Kesildiği Nokta(lar) (bp)			Kesim Sonucu Beklenen Bant Uzunlukları (bp)		
		Acc65I	HindIII	BbsI	Acc65I/HindIII	BbsI/BbsI	Acc65I/HindIII/Bbs I
psiRNA -DUO	6046	5692	6027	2754	335	1909	3273
				4663	5711	4137	1909
							1029
							335

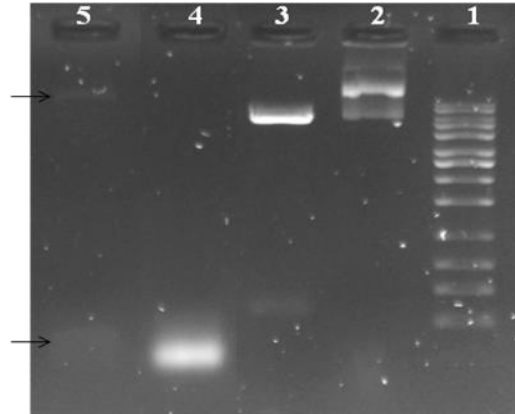
İki basamakta klonlamaya ilişkin bulgular;

psiRNA-DUO plazmidi ilk olarak Acc65I/HindIII restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesim ürünü agaroz jele yüklenerek elektroforetik olarak kontrol edildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. shVEGF-A ligasyonu için psiRNA-DUO'nun Acc65I/HindIII restriksiyon enzimi ile kesilmesi 1. 1 kb DNA Ladder, 2. Stok psiRNA-DUO, 3. Acc65I/HindIII ile kesilen psiRNA-DUO (Green buffer içeren), 4. Acc65I/HindIII ile kesilen psiRNA-DUO (Transformasyon için kullanılan)

Acc65I/HindIII restriksiyon enzimi ile kesilen vektöre shVEGF-A'nın ligasyonu için, ligasyon solüsyonu (100 ng psiRNA, shRNA insert, T4 DNA ligaz, 10xligasyon tampon, DNaz-RNaz free su) hazırlandı. 27°C'de 2 saat boyunca inkübe edildi ve ligasyon elektroforetik olarak kontrol edildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. shVEGF-A'nın psiRNA-DUO'ya ligasyonunun elektroforetik kontrolü. 1. DNA ladder, 2. Stok psiRNA, 3. Acc65I/HindIII ile kesilen psiRNA-DUO, 4. Bağlanan çift zincirli shVEGF-A, 5. shVEGF'nin psiRNA-DUO'ya ligasyonu.

Ligasyon sonrası shVEGF-A'nın klonlandığı psiRNA-VEGFA plazmidini kompetant *E.coli* GT115 hücresine transforme edildi ve Fast-Media Zeo içeren Agar X-Gal besiyeri içeren petrilere ekimi yapıldı. 37°C'de 1 gece boyunca inkübasyonun ardından petrilere ki renkli beyaz koloniler morfolojik olarak incelendi. shVEGF-A'nın klonlandığı hücreler yani rekombinant klonlar beyaz olarak görülürken, klonlama yapılmayan parental klonlar mavi renkli olarak gözlemlendi. Mavi rekombinant olmayan hücreler, psiRNA-DUO yapısında bulunan LacZ geni nedeniyle X-gal'i metabolize ederler. Klonlama yapılan vektörlerde ise LacZ geni çoklu klonlama bölgesinde yer aldığından hedef genin yerleştirilmesiyle inaktive olur ve beyaz rekombinant koloniler tarafından β -galaktozidaz sentezlenemediğinden X-gal metabolize edilemez. Bu nedenle plate de bulunan beyaz kolonilerden çalışmaya devam edilmiştir (Şekil 4.6).

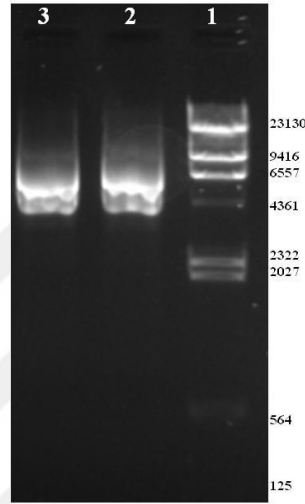


Şekil 4.6. shVEGF-A'nın klonlandığı plazmidleri içeren (beyaz renkli koloniler) ve kontrol olarak kullanılan petride içermeyen kolonilerin (plazmid BbsI ile kesildikten sonra shVEGFA'nın klonlanmadığı mavi renkli koloniler) morfolojik görünüşleri

Petrilerde ki tekli rekombinant beyaz kolonilerden LB besiyerlerine ekim yapılarak bu rekombinant hücrelerden psiRNA izolasyonları yapıldı. İzolasyon sonrası, psiRNA-VEGFA'nın spektrofotometrik ve elektroforetik kontrolleri yapıldı (Tablo 4.3 ve Şekil 4.7).

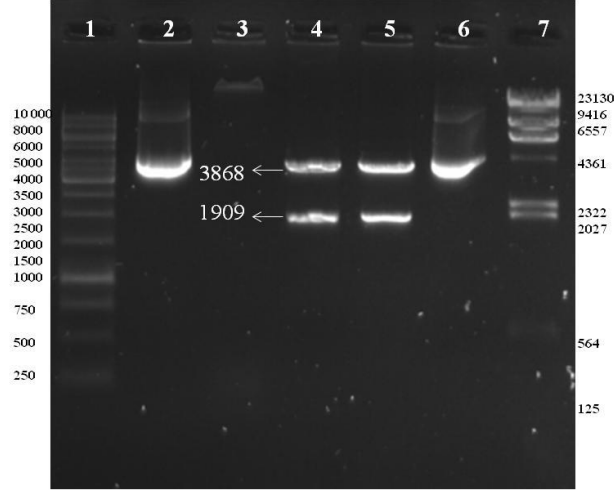
Tablo 4.3. psiRNA-DUO-VEGFA'nın spektrofotometrik kontrolü

Plazmid	A260/280	DNA Conc. ($\mu\text{g/ml}$)
psiRNA-DUO-VEGFA (miniprep izolasyonu)	1,9922	175,59
psiRNA-DUO-VEGFA (maxiprep izolasyonu)	1,8904	861,49



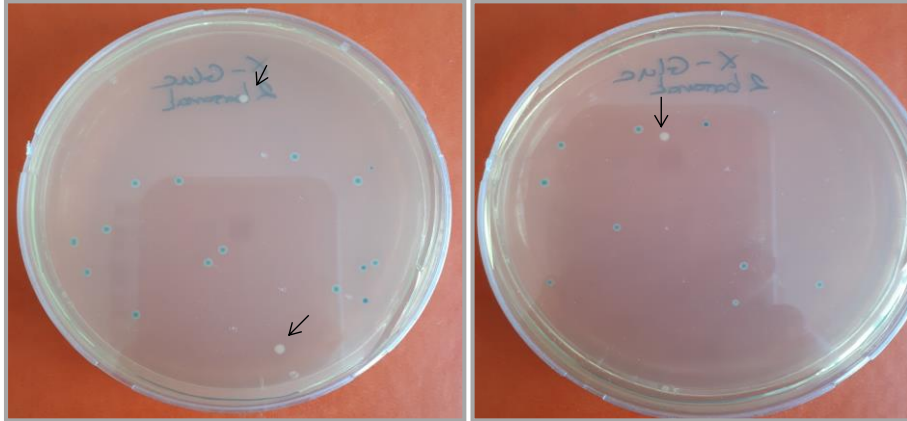
Şekil 4.7. psiRNA-VEGF-A'nın elektroforetik kontrolü 1. Lamda DNA HindIII marker, 2. Miniprep psiRNA izolasyonu, 3. Maxiprep psiRNA izolasyonu

Spektrofotometrik ve elektroforetik kontrolleri yapılan shVEGF-A'nın klonlandığı psiRNA plazmidine shVEGFR-2'nin klonlanması için psiVEGF-A plazmidini BbsI/BbsI restriksiyon enzimi ile kesildi ve kesimin başarılı olduğu görüldükten sonra shVEGFR-2'nin ligasyonu yapıldı ve elektroforetik olarak kontrol edildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. psiRNA-VEGFA'nın BbsI ile kesimi ve VEGFR-2 ile ligasyonu. 1. 1 kb DNA ladder, 2. psiRNA-VEGFA, 3. VEGFR-2 shRNA'nın ligasyonu, 4,5. BbsI ile kesim 6. psiRNA-VEGFA, 7. Lamda DNA HindIII marker.

Ligasyonu yapılan VEGF-A ve VEGFR-2 shRNA'ların klonlandığı psiRNA-VEGFA-VEGFR2 plazmidini kompetant hücreye transforme edilip, petrilere ekimi yapıldı. Petriler tek koloni açısından morfolojik olarak incelendi. shVEGF-A ve shVEGFR2'nin klonlandığı hücreler yani rekombinant klonlar beyaz olarak görülürken, klonlama yapılmayan parental klonlar mavi renkli olarak gözlendi (Şekil 4.9).



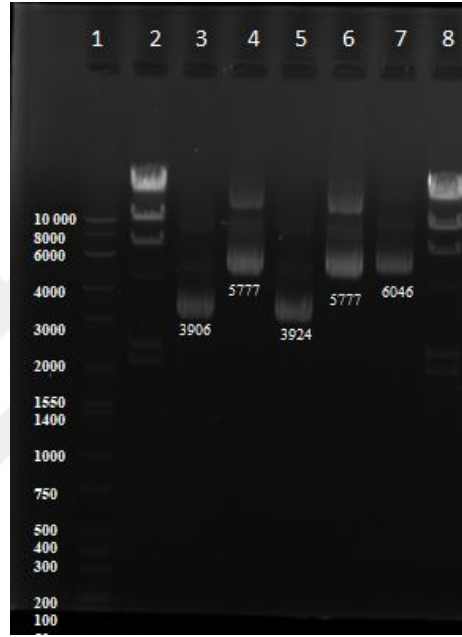
Şekil 4.9. shVEGFR-2'nin klonlandığı plazmidleri içeren (beyaz renkli koloniler, ok işareti ile gösterilmiştir) ve rekombinant vektörü içermeyen (mavi renkli koloniler) kolonilerin morfolojik görünüşleri.

Tekli beyaz rekombinant kolonilerden öze yardımıyla Zeo içeren LB besiyerlerine ekim yapıldı ve miniprep psiRNA izolasyonları yapıldı. shVEGF-A ve

shVEGFR-2'nin klonlandığı psiRNA'ların spektrofotometrik ve elektroforetik kontrolleri yapıldı (Tablo 4.4 ve Şekil 4.10). Klonlama yapılan plazmidlerin uzunlukları da tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.4. psiRNA-VEGFA-VEGFR-2'nin spektrofotometrik kontrolleri

Plazmid	A260/280	DNA Conc. (µg/ml)
psiRNA-VEGFA-VEGFR-2	1,9197	150,53



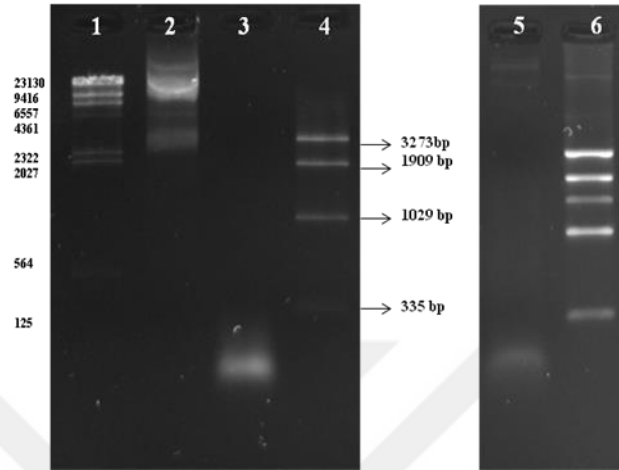
Şekil 4.10. psiRNA-VEGFA-VEGFR2'nin elektroforetik kontrolü 1.1 kb DNA ladder, 2.Lambda DNA HindIII marker, 3.psiLucLac plazmidi, 4.psiRNA-VEGF plazmidi, 5. İki basamakta klonlanan psiRNA-VEGFA-VEGFR2 plazmidi, 6.psiRNA-VEGF plazmidi, 7.psiRNA-DUO, 8. Lambda DNA HindIII marker

Tablo 4.5. Klonlama yapılan tüm plazmidlerin uzunlukları

Klonlama Yapılan Plazmidler	Uzunluk (bp)
psiRNA-VEGFA (+66)	5777
psiRNA-VEGFR2 (+56)	4193
psiRNA-VEGFA-VEGFR2 (+122)	3924
psiRNA-DUO	6046
psiLuc-Lac	3906

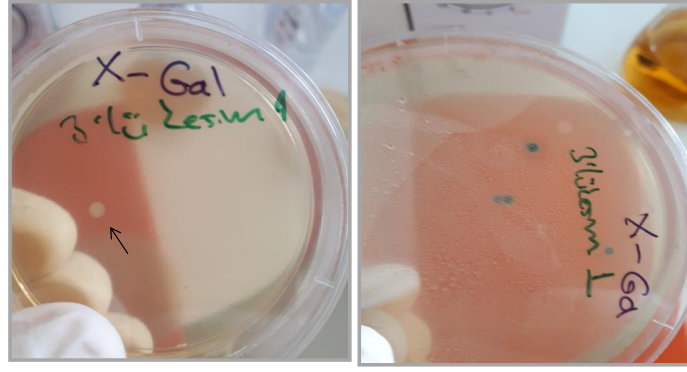
Tek basamakta klonlamaya ilişkin bulgular:

Tek basamakta klonlama için psiRNA-DUO, Acc65I/HindIII/BbsI restriksiyon enzimleri ile kesildi ve kesilme elektroforetik olarak kontrol edildi (Şekil 4.11). Ligasyonu tamamlanan psiRNA-VEGFA-VEGFR2 plasmidi -20°C’de saklandı.



Şekil 4.11. psiRNA-DUO’nun Acc65I/HindIII/BbsI restriksiyon enzimleri ile 3’lü kesim sonrası ve VEGF-A ve VEGFR-2 shRNA’larının bağlanması sonrası agaroz jel elektroforez görüntüleri. 1. Lamda DNA HindIII marker, 2.psiRNA-DUO, 3.VEGF-A shRNA, 4. Acc65I/HindIII/BbsI ile kesim, 5. VEGF-A ve VEGFR-2 shRNA’larının plazmide ligasyonu, 6. Acc65I/HindIII/BbsI ile kesim

VEGFA ve VEGFR2 shRNA’ların birlikte klonlandığı plazmid kompetant *E.coli* GT115 hücrelerine transforme edildi ve Fast-Media Zeo içeren Agar X-Gal ve X-Gluc besiyeri içeren petrilere ekimi yapıldı. 37°C’de 1 gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün petrilere tek koloni açısından morfolojik olarak incelendi. shRNA’ların klonlandığı hücreler yani rekombinant klonlar beyaz olarak görünürken, klonlama yapılmayan parental klonlar mavi renkli olarak gözlendi (Şekil 4.12).

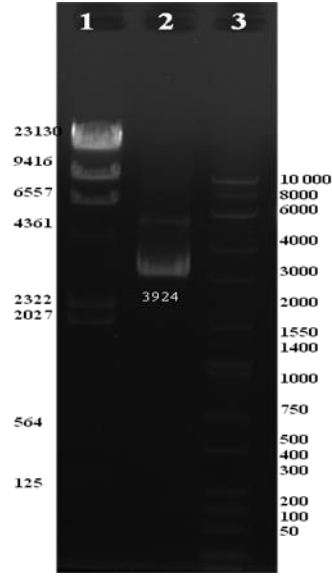


Şekil 4.12. shVEGF-A ve shVEGFR2'nin birlikte klonlandığı plazmidleri içeren (beyaz renkli, ok işareti ile gösterilmiştir) ve içermeyen (mavi renkli) kolonilerin morfolojik görünümleri.

Tekli beyaz rekombinant kolonilerden öze yardımıyla Zeo içeren LB besiyerlerine ekim yapıldı ve miniprep ve maxiprep psiRNA izolasyonları yapıldı. shVEGF-A ve shVEGFR2'nin klonlandığı psiRNA'ların spektrofotometrik ve elektroforetik kontrolleri yapıldı (Tablo 4.6 ve Şekil 4.13).

Tablo 4.6. psiRNA-VEGFA-VEGFR2'nin spektrofotometrik kontrolü

Plazmid	A260/280	DNA Conc. (µg/ml)
psiRNA-VEGFA-VEGFR2 (miniprep izolasyonu)	1,98	174,01
psiRNA-VEGFA-VEGFR2 (maxiprep izolasyonu)	2,25	949,27

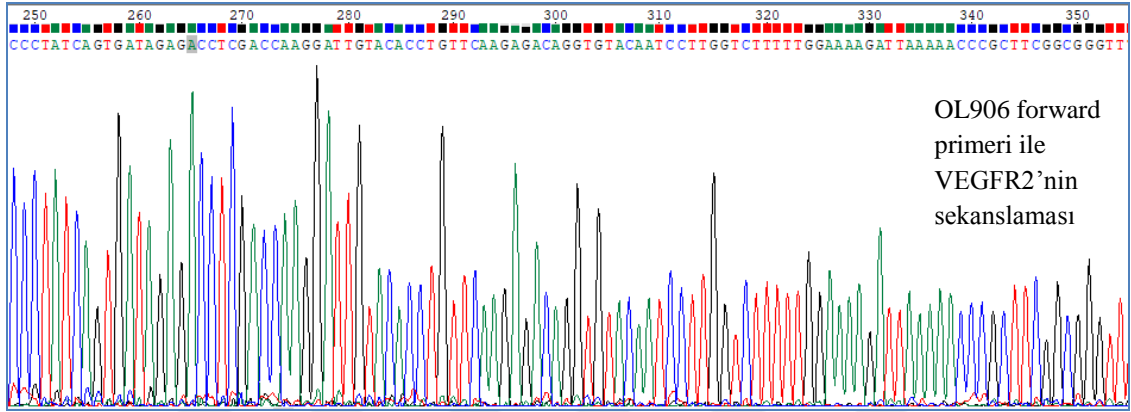
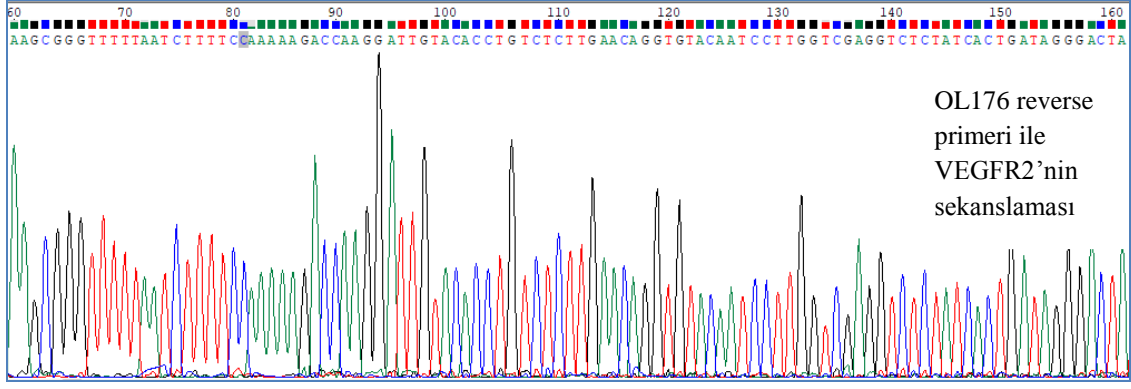


Şekil 4.13. psiRNA-DUO-VEGFA-VEGFR2'nin elektroforetik kontrolü 1. Lambda DNA HindIII marker, 2. psiRNA-VEGFA-VEGFR2 plazmidi, 3. 1 kb DNA ladder

4.5. Klonlanan Vektörlerin Doğruluğunun Nükleik Asit Sekanslama

Yöntemi İle Belirlenmesi

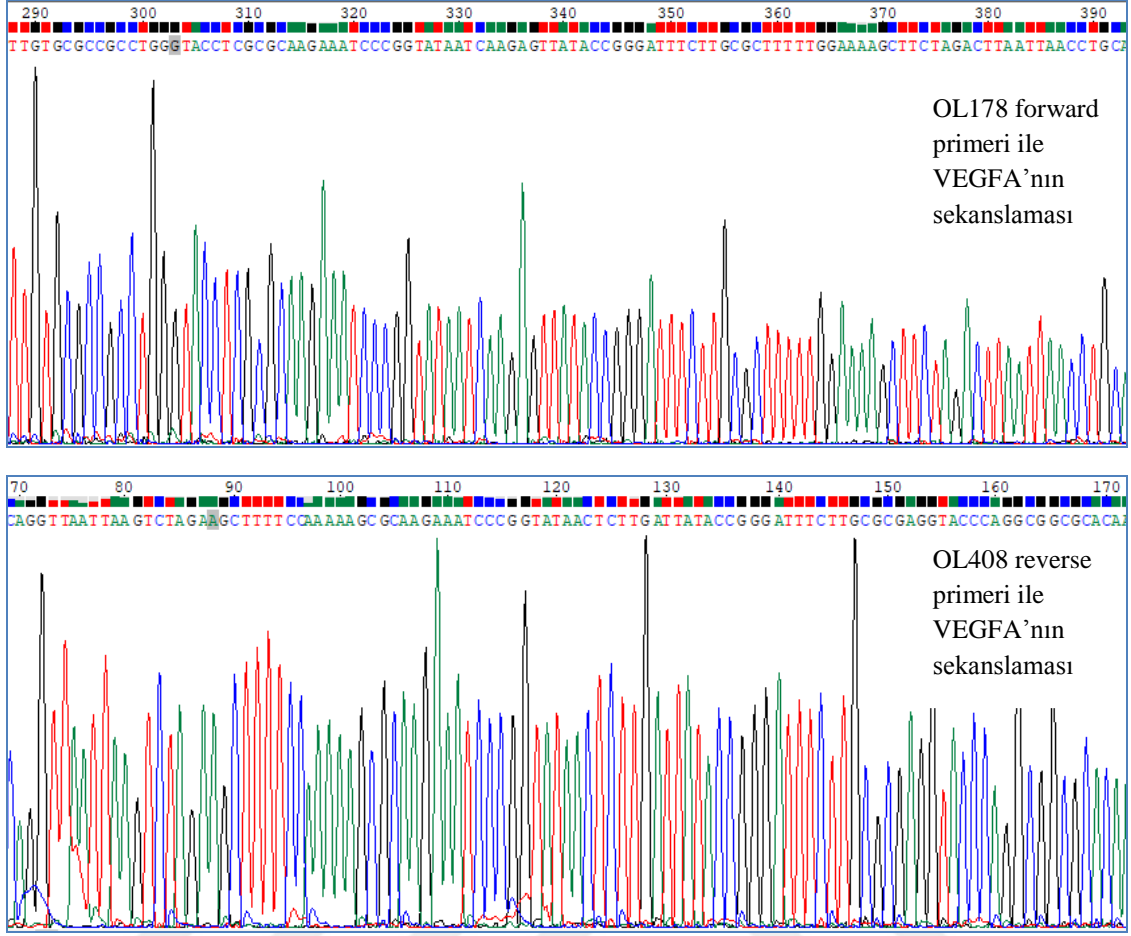
Sekanslama için gliserol stoklarından alınan bakterilerden psiRNA-DUO-VEGFA-VEGFR2 plazmidleri izole edildi. Sekanslama sonunda dizilerin analizleri yapıldı. VEGFA shRNA oligonükleotidlerinin klonlaması OL178 ve OL408 forward ve reverse primerleri kullanılarak doğrulanırken, VEGFR2 shRNA oligonükleotidlerinin klonlaması OL176 ve OL906 forward ve reverse primerleri kullanılarak doğrulandı (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).



Şekil 4.14. VEGFR2'nin shRNA sekansı. Bu shRNA dizisini içeren vektör haritalandığında;

5' ACCTCGACCAAGGATTGTACACCTGT TCAAGAGACAGGTGTACAATCCTTGGTCTT 3'
 5' CAAAAAGACCAAGGATTGTACACCTGT CTCTTGAACAGGTGTACAATCCTTGGTGC 3'

şekildeki elektrofenogramlar elde edilmiştir. Sens stem sekansı GACCAAGGATTGTACACCTGT antisens stem sekansı ACAGGTGTACAATCCTTGGTC ve loop sekansı TCAAGAG'dir.



Şekil 4.15. VEGFA'nın shRNA sekansı. Bu shRNA dizisini içeren vektör haritalandığında;

5'GTACCTCGCGCAAGAAATCCCGGTATAATCAAGAGTTATACCGGGATTCTTGCGC
TTTTTGAAA 3'

5'AGCTTTTCCAAAAAGCGCAAGAAATCCCGGTATAACTCTTGATTATACCGGGATT
CTTGCGCGAG 3'

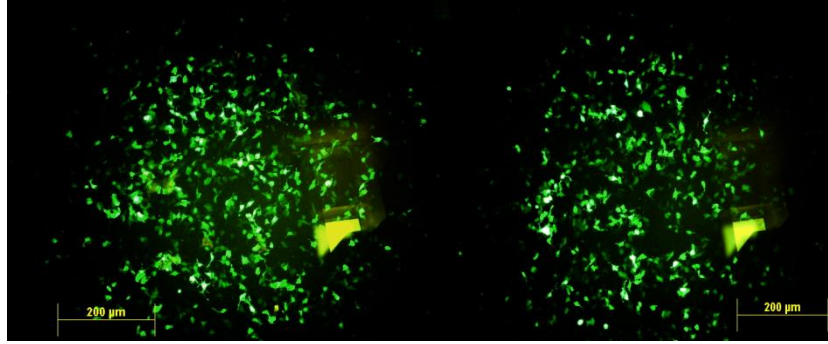
şekildeki elektrofenogramlar elde edilmiştir. Sens stem sekansı
GCGCAAGAAATCCCGGTATAAT antisens stem sekansı
TTATACCGGGATTCTTGCGC ve loop sekansı CAAGAG'dir.

4.6. In vitro Transfeksiyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular

4.6.1. Meme Kanser Hücrelerine psiVEGF-A/VEGFR-2 Plazmidinin Transfeksiyonunun Floresan Mikroskobu ile Görüntülenmesi

In vitro transfeksiyon ve gen susturma çalışmalarında, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücre hatları kullandı. Hücreler VEGF-A ve VEGFR-2 shRNA'larını içeren psiRNA-VEGFA-VEGFR2 plazmidinin hücreye girişinin izlenmesi amacıyla vektör yapısında bulunan *GFP* geninden yararlandı. 6 kuyucuklu hücre kültürü plağına

ekim yapılan meme kanser hücre hatlarına psiRNA'lar transfekte edildi. 48 saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı, PBS ile yıkanıp, hücreler floresan mikroskobu altında incelendi.

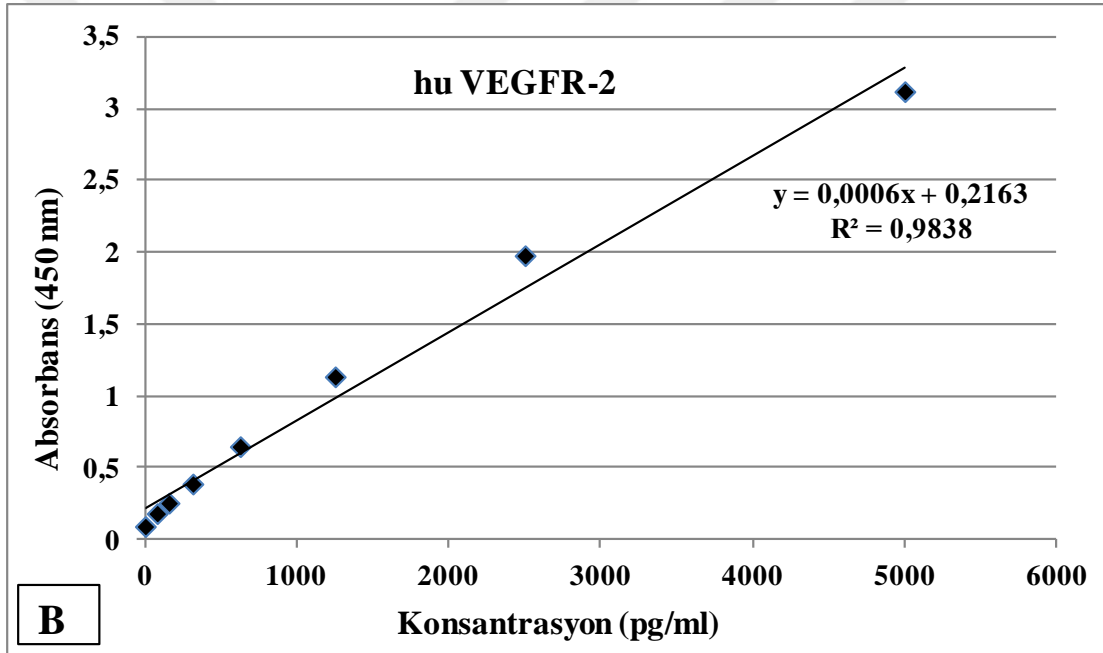
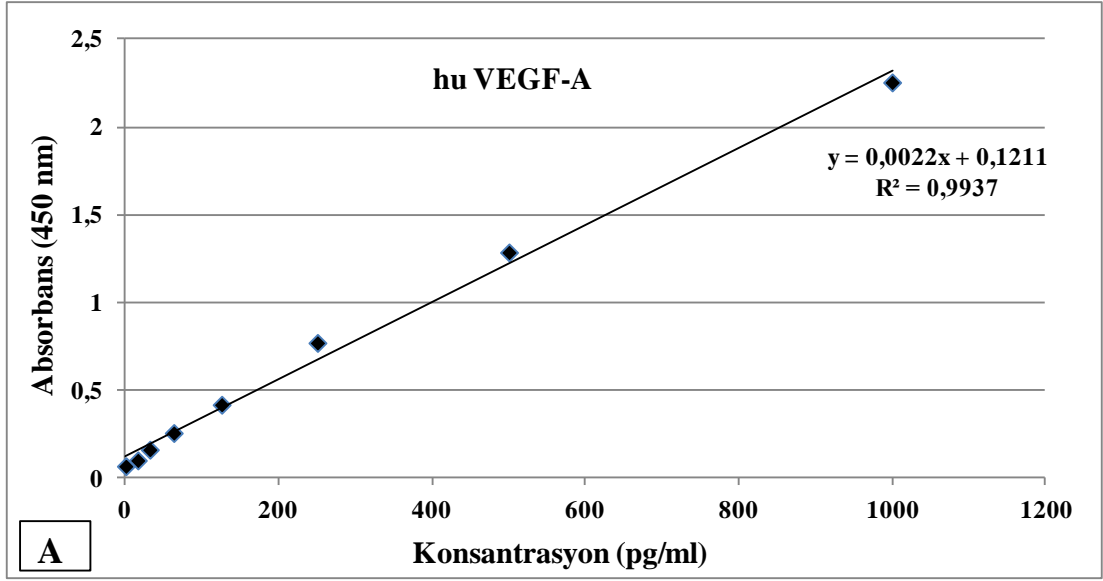


Şekil 4.16. psiVEGF-A/VEGFR-2'nin meme kanser hücre hatlarına transfeksiyonu sonrası floresan mikroskop görüntüleri (Soldaki MDA-MB-231, sağdaki resim MCF-7).

4.6.2. Klonlanan Plazmidlerin VEGF-A ve VEGFR-2 Gen Susturma Etkinliğinin ELISA Yöntemi İle İncelenmesi

Çalışmamızda klonladığımız psiRNA-VEGF-A/VEGFR-2 plazmidinin VEGF-A ve VEGFR-2 protein ekspresyonuna etkilerini incelemek amacıyla ELISA yöntemi kullanıldı. Klonlanması tamamlanan ve kontrolleri yapılan psiVEGF-A, psiVEGFR-2 ve psiRNA-VEGF-A/VEGFR-2 plazmidlerinin ticari ajan Dharmafect ile hazırlanan kompleksleri MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 ve 72 saat sonra süpernatantlar toplandı ve protein ekspresyon seviyeleri belirlendi. Herhangi bir şey verilmeyen kuyucuklar kontrol grubu olarak belirlendi. Bu kuyucuklarda bulunan hücrelerden endojen olarak eksprese edilen VEGF-A ve VEGFR-2 protein ekspresyon düzeyleri, diğer gruplarda ki gen baskılama düzeyini belirlemek için kullanıldı.

Klonlanan plazmidlerin gen susturma düzeylerini belirlemek için VEGF proteinin spektrofotometrik tayininde kullanmak üzere VEGF-A ve VEGFR-2'nin standard eğrileri hazırlandı. ELISA çalışması sonucunda belirli konsantrasyonlara karşılık gelen 450 nm'deki absorbans değerinden yararlanılarak standard eğri grafiği çizildi. Elde edilen grafikte yer alan değerlerin regresyon analizi yapılarak eğrinin kullanılabilirliği ve doğrusallığı saptandı. Elde edilen pg/ml VEGF konsantrasyonlarına karşılık gelen OD 450 nm'deki absorbans değerlerine göre çizilen huVEGF-A ve huVEGFR-2 standard eğri grafikleri Şekil 4.17'de verilmiştir.

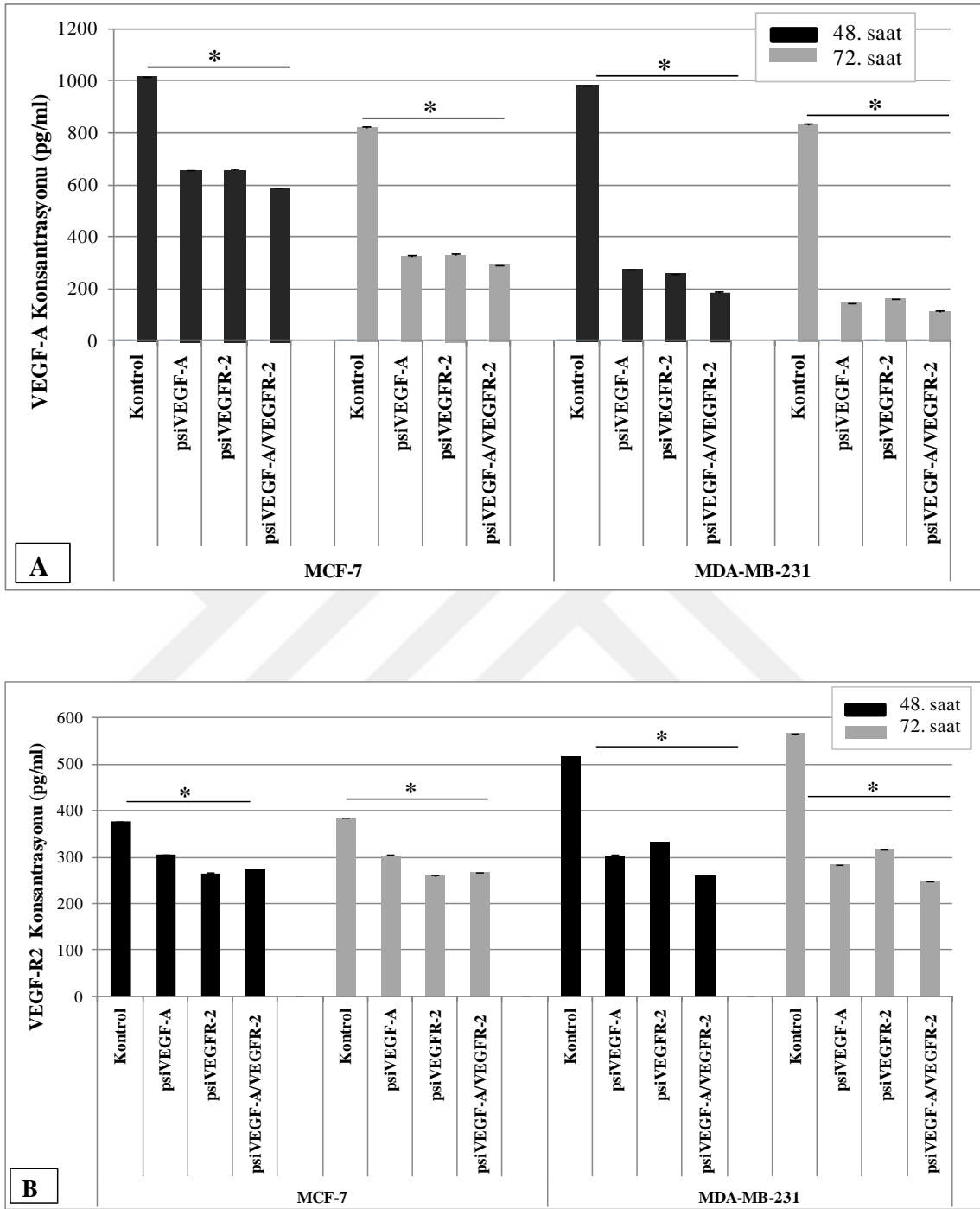


Şekil 4.17. huVEGF-A (A) ve huVEGFR-2 (B) standart eğrileri.

Hazırlanan VEGF-A ve VEGFR-2 standart eğrilerinin sırasıyla doğru denkleminin $y=0,0022x$ ve $y=0,0006x$, R^2 değerinin 0,9937 ve 0,9838 olduğu saptanmıştır. Elde edilen standart eğrinin in vitro transfeksiyon çalışmalarında insan VEGF-A ve VEGFR-2 gen ekspresyonlarının tayininde kullanılabileceğine karar verildi.

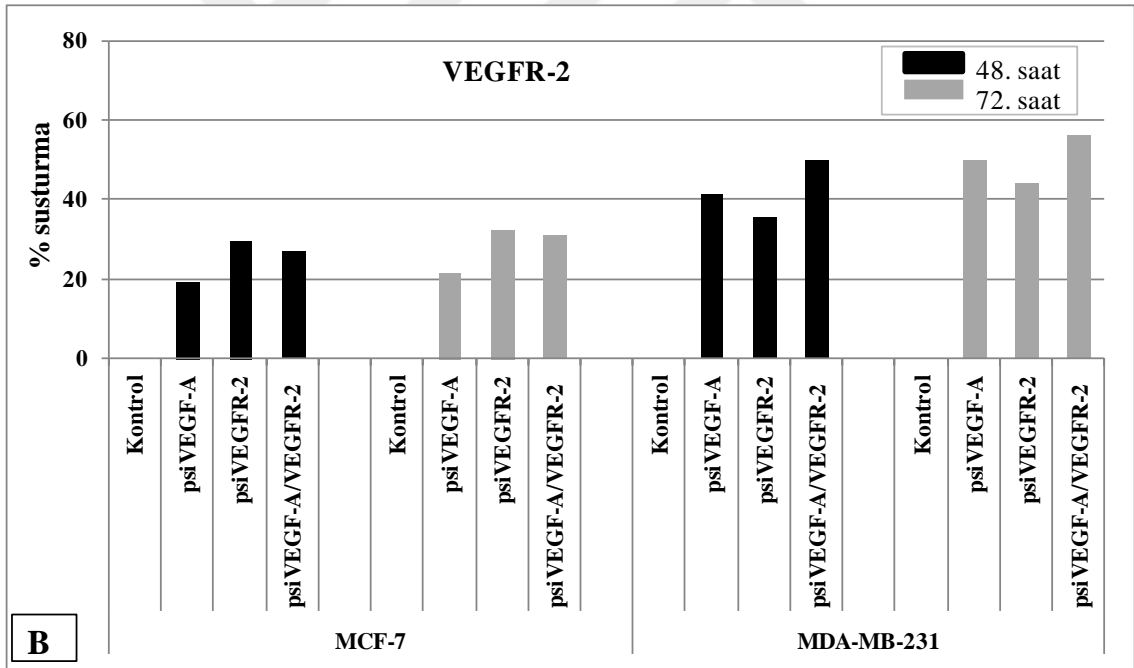
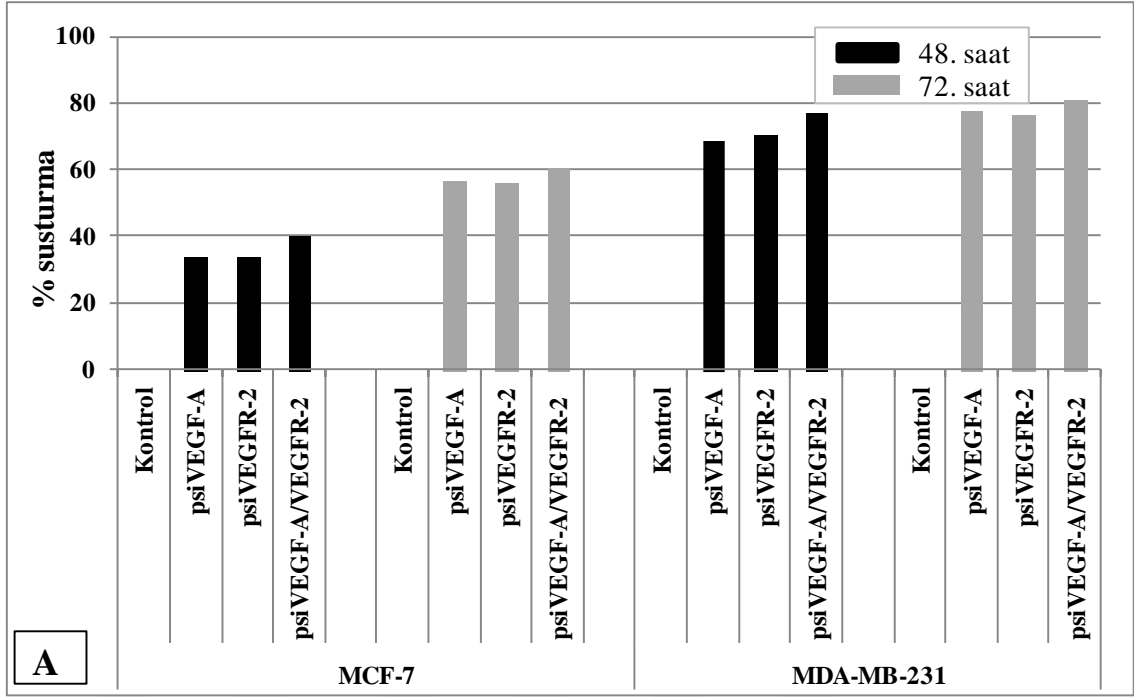
Klonlanan plazmidlerin ticari transfeksiyon ajanı Dharmafect ile transfeksiyonu sonucunda farklı zaman aralıklarında (48 ve 72. saatler) ve farklı meme kanser hücre

hatlarında elde edilen gen ekspresyonunun inhibisyonu açısından karşılaştırılmasına ilişkin bulgular Şekil 4.18 ve Şekil 4.19’da verilmiştir.



Şekil 4.18. MCF-7 ve MDAMB-231 hücre dizilerinde VEGF-A (A) ve VEGFR2 (B) gen ekspresyonlarının susturulması açısından karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlar.

*p<0,05.



Şekil 4.19. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına klonlanan plazmidlerin transfeksiyonu sonucu VEGF-A (A) ve VEGFR2 (B) gen susturma yüzdelерinin farklı zaman aralıklarında karşılaştırılması.

VEGF-A gen ekspresyonunu susturması açısından MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında gerçekleştirilen in vitro transfeksiyon çalışmasında psiVEGF-A ve psiVEGFR-2'nin birlikte klonlandığı plazmidler ile elde edilen gen susturması tekli klonlanan plazmidlere göre daha yüksek bulunmuştur. Gen susturma etkinliği açısından her iki hücre dizisi karşılaştırıldığında MDA-MB-231 hücre hattında elde edilen gen susturması MCF-7 hücresine göre daha yüksek bulunmuştur. Zaman açısından değerlendirildiğinde ise 72. saatte elde edilen gen susturma etkinliği 48. saate göre daha yüksek bulunmuştur.

Klonlanan plazmidlerin VEGFR-2 gen susturma etkinliği açısından değerlendirilmesi sonucunda ise en yüksek gen susturması psiVEGF-A/VEGFR-2 plazmidleri ile elde edilmiştir. MDA-MB-231 hücresinde elde edilen gen inhibisyonu psiVEGF-A/VEGFR-2 plazmidleri ile 72. saat sonunda %60 olarak bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Çoğu solid tümörde olduğu gibi meme kanserinin büyüme ve metastazında anjiogenez önemli bir süreçtir. Tümörde mikrodamar yoğunluğunun artması meme kanseri gibi malignensilerde ya metastazın ya da tümörün yeniden tekrarlanması ile ilişkilidir. Küçük *in situ* tümörler (3 mm çapından daha küçük) prevasküler durumdadır ve kan damarları ile perfüzyonu olmadığına sınırlı bir büyüme kapasitesine sahiptirler (56).

Anjiogenezde önemli rol oynayan VEGF, kanserin daha agresif ve kötü prognozlu olmasında etkin bir büyüme faktörüdür. Endotelial hücrelerdeki VEGF reseptörlerine, sirküle VEGF'nin bağlanması anjiogenezle sonuçlanan tirozin kinaz yolağını başlatır. VEGF reseptörlerinden olan VEGFR-1 ve VEGFR-2 endotelialda lokalize olup endotelial hücre göçü, proliferasyonu, permeabilitesi ve survival'ın stimülasyonuna yol açarlar. Özellikle VEGFR-2, mitojenik, anjiogenik ve permeabilite artırıcı etkilere sahip bir mediatördür. VEGFR-1 ise oldukça kompleks bir reseptördür, hem pozitif hem de negatif anjiogenik etkilere sahiptir (31, 57).

Şimdiye kadar üzerinde çalışılan anti-VEGF ajanlarının akut makular dejenerasyonla (AMD) ilişkili neovaskularizasyon, diabetik retinopati, makular ödem, glokom ve diğer neovaskularizasyon hastalıklarının tedavisinde etkin olduğu bulunmuştur. Tedavide küçük moleküller ya da monoklonal antikorlar kullanıldığında bu ajanlar proteinlere bağlanırlar ve inhibe ederler, fakat hastalıklara neden olan proteinleri elimine edemezler. Son yıllarda, post-transkripsiyonel gen susturmasında doğal bir mekanizma olan RNAi teknolojisinin ortaya çıkması ile anjiogenezin yüksek spesifite ve etkinlikte tedavisi ile ilgili ümit verici çalışmalar yapılmıştır. Kanser tedavisinde anormal patojenik proteinlerin mRNA seviyesinde inhibisyonu ya hücreye dsRNA'ların ya da sentetik siRNA'ların verilmesi ile başarılıdır. Şimdiye kadar 22 RNAi temelli yaklaşım klinik çalışmalara girmiştir (58). VEGF ve reseptörlerine hedeflenen anti-anjiogenik terapötikler olarak kullanılan sentetik siRNA ve plazmid temelli siRNA ile ilgili *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar mevcuttur (37, 59-65).

Anjiogenezin RNAi teknolojisi ile baskılanmasında farklı stratejiler kullanılmaktadır. Bu stratejilerden biri anti-VEGF siRNA moleküllerinin tek başına

kullanılmasıdır. İkinci strateji, VEGF'ye hedeflenen siRNA-eksprese eden plazmidlerin oluşturulmasıdır. pDNA nukleusa verildikten sonra shRNA'lar transkribe edilir ve RNAi aktivitesine katılmak için sitoplazmaya geçerler. Üçüncü strateji, anti-VEGF hedeflerinin kombine edilmesidir. Bu strateji ile angiogenезin farklı süreçlerinde ya da sürece katılan farklı proteinlerin bir ya da daha fazla siRNA ile susturulması, tedavinin başarı şansını artırıcı bir faktördür. Son strateji olarak da, siRNA ile kemoterapötik ajanların birlikte kullanılması ile gen tedavisi ve kemoterapinin kombine edilmesidir (57).

RNAi teknolojisinin anti-VEGF tedavisinde önemli etkilerine rağmen, uygulamada bazı sorunları bulunmaktadır. Bunlardan ilki, doğru hedefi seçmektir. VEGF'nin altı izoformu bulunmaktadır. Bunların her biri doğrudan ya da dolaylı olarak tümör anjiogenез kaskadını aktive edebilir. Ayrıca, VEGF'ye hedeflenen siRNA'lar ile anjiogenез tümüyle inhibe edebilir mi sorusu akla gelmektedir. Bu durumda birkaç VEGF izoformlarının inhibe edilmesi gerekmektedir. Ayrıca anti-VEGF tedavisini etkileyebilen hipoksi ile indüklenen faktör 1 (HIF-1) gibi diğer faktörlerin etkisi de göz ardı edilmemelidir (62). Anjiogenезde rol oynayan mekanizmaların açığa kavuşturulması tedavi etkinliğini artıracaktır. Ayrıca bu durumlarda çoklu hedef stratejileri de düşünülmelidir.

İkinci önemli nokta, hedeflenen hücrelerdir. Hemen hemen tüm hücreler VEGF sentezlerler ve sekrete ederler. Bu nedenle hedeflendirilmiş tedavi stratejileri ya da lokal uygulamalar tercih edilebilir. Örneğin, akut makular dejenerasyon (AMD) hastalığında siRNA'nın intravitreal enjeksiyonu, lokal dağılımı ve güvenlik açısından önemlidir. Tümörde ise tümör mikroçevresinin etkisi düşünülmelidir. Tümör hücreleri VEGF için önemli bir kaynak olmasına rağmen, mikroçevre stroması VEGF üretiminde diğer önemli bir bölgedir.

Üçüncü önemli nokta, hastalık ve VEGF arasında ki bağlantıdır. AMD gibi retinal hastalıklar için VEGF direkt olarak hastalığın patolojisi ile ilişkilidir. Bu durum AMD için anti-VEGF siRNA klinik denemelerinin ne denli önemli olduğunu açıklamaktadır. Tümör açısından da VEGF'nin inhibe edilmesi patojenik faktörlerden sadece biridir. Tümör büyümesi anjiogenезden bağımsız olabilir. Anti-VEGF tedavisi tümör büyümesini inhibe edebilir, fakat tümörü yok edemez ya da öldüremez. Bu nedenle antikanser ajanlarla ya da siRNA'larla birlikte formüle edilen terapötikler

kullanılabilmektedir. Örneğin ALN-VSP02'de kinesin spindle protein (KSP) ve VEGF'ye spesifik siRNA'ların lipid nanopartikül formülasyonunda birlikte enkapsülasyonu ile daha etkili bir antitümör aktivitesi gözlenmiştir (66).

Dördüncü önemli nokta da, siRNA'ların hedeflenmeyen veya istenmeyen (hedef dışı, off-target) etkileridir. Örneğin AMD hastalığının tedavisinde klinik çalışmalar aşamasında sonlandırılan bevasiranib'in anti-angiogenik etkisi hedefi susturamaması ve TLR3 aktivasyonuna neden olması açısından durdurulmuştur. Bu durum günümüzdeki klinik denemelerden çıkarılacak önemli bir derstir. Bu nedenle siRNA'ların off-target etkileri dikkatlice çalışılmalıdır (57).

siRNA terapötikleri için diğer önemli bir sorun ise stabilite sorunudur. Bu problemin üstesinden gelmek için taşıyıcı sistemlerle verilmesi ya da formüle edilmesi gereklidir. siRNA'lar *in vivo* olarak verildiğinde birçok bariyerle karşılaşılır aynı zamanda yapıları nedeniyle serumdaki endojen enzimlerle çok hızlı bir şekilde degrades olurlar. Hücreye ulaşırsalar bile ya da *in vitro* şartlarda negatif yükleri nedeniyle hücre zarından geçemezler. Bu nedenle siRNA'ların viral ya da non-viral taşıyıcı sistemlerle verilmesi gerekmektedir (67, 68).

Bu çalışmada, angiogeneze karşı etkin RNAi temelli gen tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için bu yolakta etkili iki shRNA'nın aynı anda ekspresyonu hedeflenmiştir. Şimdiye kadar VEGF-A ya da VEGFR-2 siRNA'larının tek olarak klonlandığı ve kanser tedavisindeki etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar olmakla birlikte (59, 60, 63, 69-73) her ikisinin birlikte klonlanarak tek bir vektör üzerinden çalışıldığı herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. Çalışmamızda, VEGF'ye spesifik VEGF-A ve bunun reseptörü VEGFR-2 shRNA'larının aynı plazmid vektöre klonlanması ve birlikte ekspresyonunun sağlanması ile *in vitro* olarak meme kanserinde ki tedavi etkinliğinin artırılması amaçlanmıştır.

Anjiogeneze tek bir gene hedeflendirilen shRNA içeren ekspresyon vektörlerini kullanarak meme kanserinde ki terapötik etkinlikleri *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırılmıştır. Şalva ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada vektör temelli shRNA ekspresyon sistemleri ile hazırlanan kitozan komplekslerinin meme kanserinde gen inhibisyon etkinlikleri *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırılmıştır (59, 60). Bu çalışmada VEGF hedefli shRNA karışımının (VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, NRP-1) sıçan meme kanserinde etkinliği incelenmiş, kitozan nanoplekslerinin intratümöral olarak

uygulanmasının, intraperitoneal (%89) uygulamaya kıyasla daha yüksek [(%96) *civarında*] tümör baskılaması gösterdiği saptanmıştır (60).

Bu tez çalışmasında ticari olarak satın alınan çift klonlama bölgesi içeren plazmide, VEGF-A ve VEGFR-2'ye spesifik çift iplikli oligonükleotidler tek ve iki basamaklı olarak klonlanmıştır. Klonlamanın doğruluğu elektroforetik olarak agaroz jel elektroforezi ve nükleik asit sekanslama teknikleri ile tespit edilmiştir. Klonlaması yapılan ikili plazmid meme kanser hücrelerine verildiğinde VEGF-A ve VEGFR-2 protein ekspresyonunun önemli ölçüde baskılandığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda iki dizinin aynı vektör içerisine ve dizilerin ayrı ayrı vektörlere klonlandığında gen susturma etkinliği açısından ikili klonlama ile daha yüksek gen baskılama sağlandığı gösterilmiştir (%81). Özellikle 72. saatte MDA-MB-231 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine göre protein ekspresyon seviyesinde belirgin bir azalma görülmüştür. Chen ve ark. (73) yaptıkları bir çalışmada insan telomeraz revers transkriptazın (hTERT) iki farklı mRNA'sına hedeflenen shRNA ekspresyon plazmidleri oluşturmuşlardır ve vektörlerin *in vitro* olarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu önemli ölçüde azalttığını ve telomeraz aktivitesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Chen ve ark (71) vektör temelli siRNA'nın hedef ve etkinliğini artırmak için 3 farklı genin (VEGF, hTERT ve Bcl-x1) mRNA'sına hedeflenen shRNA'ları shRNA ekspresyon vektörlerine klonlamışlardır. İnsan laringeal skuamoz kanser hücre hattında ve bu hücrenin implante edildiği farede oluşan kanser modelinde vektörün etkinliğini araştırmışlardır. *In vitro* çalışmalarda her 3 geni içeren vektörün verildiği hücrelerde her 3 protein ekspresyon seviyesini western blot yöntemi ile araştırmışlar ve %25-%40 gen susturma etkinliği elde etmişlerdir. *In vivo* çalışma sonucunda ise tümör büyümesinin ondördüncü gününde %91,2 oranında gerilediğini tespit etmişlerdir. Böylece araştırmacılar, vektör temelli RNAi teknolojisi kullanılarak birçok hedefin bloklanabileceğini ve birçok hedefin aynı anda susturulmasının kanser gen tedavisinde önemli bir terapötik strateji olacağını vurgulamışlardır. Yapılan bu çalışma ile birden fazla shRNA'nın aynı vektöre klonlanması ile elde edilen gen susturma etkinliğinde ki artış bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Dört farklı oligonükleotidin klonlanabildiği pGenesil 1 plazmidini kullanarak VEGF, c-myc, survivin ve HTERT genlerini içeren tek bir plazmid vektörün dizayn edildiği diğer bir çalışmada ise çoklu klonlamanın *in vitro* ve *in vivo* nazofarengal

kanser hücrelerinin gen tedavisinde ümit verici olduğu gösterilmiştir (74). Çoklu klonlama ile kanserde gen tedavi etkinliğini arttırmak için kullanılan bu strateji ile elde edilen sonuçlar bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Aynı zamanda vektör-temelli RNAi metodlarının etkinliğini geliştirmek için farklı yaklaşımlar kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız vektörün yapısında insan 7SK RNA polimeraz III promotörü bulunmaktadır. RNA polimeraz III promotörleri yüksek seviyede shRNA ekspresyonu sağlar ve oldukça etkin gen susturma elde edilir (68). Zhou ve ark. (68) polimeraz III promotörü yerine RNA polimeraz II promotörünü kullanmışlardır. Polimeraz II hairpin yapısının polimeraz III'e alternatif olarak kullanılabileceğini önermişlerdir. Gou ve ark. (75) dört farklı pol III promotörüne sahip dört farklı shRNA sekansı içeren ekspresyon vektörünü dizayn etmişlerdir. Bu vektör dört farklı geni aynı anda susturarak gen susturma etkinliği artırılmıştır. Weng ve ark (76) üç RNA polimeraz III U6 promotörlerinin kontrolü altında üç shRNA içeren bir RNAi vektörü dizayn etmişlerdir. Bir ya da iki shRNA içeren RNAi vektörlerini karşılaştırmışlardır. Akt2'ye hedeflenen multi-shRNA RNAi vektörünün insan over karsinoma hücrelerinde Akt2 ekspresyonunu güçlü bir şekilde downregüle ettiğini göstermişlerdir. Multi-shRNA RNAi vektörlerinin gen susturma etkinliğini artırmak için kullanılabileceğini önermişlerdir. Bizim çalışmamızda kullandığımız vektör yapısında her iki klonlama bölgesinde bulunan iki RNA polimeraz III promotörü ile her iki gen içinde yüksek düzeyde gen susturma etkinliği elde edilmiştir. Elde edilen sonuçların literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.

RNAi mekanizması multiple-turn bir enzim kompleksidir, aktive olur olmaz tek bir RISC kompleksi RNA hedeflerinin birçok kopyasını kesebilir ve bu özellik birçok hedefin aynı anda etkin olarak susturulmasını sağlayabilir. Eğer üretilen shRNA'lar düşük konsantrasyonları nedeniyle çalışması başarısız olursa etkin susturmayı başarmak için aynı plazmid içinde kombine edilerek RNAi kasetlerinin kopya sayısı artırılabilir (77). Çalışmamızda VEGF-A ve spesifik reseptörü VEGFR-2 kullanılmıştır ve her iki shRNA'nın aynı anda RNAi mekanizmasına gireceği teorik olarak düşünülmüştür. Bu durumu destekleyen veriler protein ekspresyon çalışmaları ile elde edilmiştir. Hem VEGF-A hem de VEGFR-2 protein ekspresyonlarına bakıldığında, her ikisinin birlikte klonlandığı vektörün verildiği hücrelerde hem VEGF-A hem de VEGFR-2 protein ekspresyonlarının etkin olarak baskılandığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumludur.

Jazag ve ark. (77) basit restriksiyon enzimi ile oluşturulan stabil RNAi tekniği ile tek bir RNAi vektörü ile birçok hedefi etkin olarak susturabilen bir vektör geliştirmişlerdir. Transforming büyüme faktörü beta (TGF- β) yolağında rol oynayan Smadların (Smad2, Smad 3 ve Smad4) aynı anda susturulmasını başarmışlardır. Böylece invazyon, yara iyileşmesi ve apoptozis gibi TGF- β bağımlı hücrel fonksiyonlarda belirgin fenotipik değişiklikleri gözlemlemişlerdir. Daha önceki çalışmalarda her bir siRNA ipliğini ayrı olarak eksprese eden ardarda dizili (tandem) tip U6 promotörle sürdürülen siRNA vektörleri ile endojen gen ekspresyonu baskılanmaktadır. Araştırmacılar bu çalışmada, daha iyi baskılama özelliği olduğu kanıtlanan hairpin tip siRNA ekspresyon vektörlerini kullanmışlardır. Böylece etkin ve stabil olarak birçok genin aynı anda susturulması sağlanabilmiştir.

Deng ve ark. (15) bir ya da daha fazla geni susturmak için birçok siRNA'nın aynı anda eksprese edilmesinin oluşturacağı zorluğun üstesinden gelmek için bir in vitro rekombinasyon sistemi olan Gibson DNA assembly (GDA) kullanmışlardır, GDA-temelli pSOK sistemi ile birçok siRNA bölgesini (4 farklı shRNA'yı içeren) eksprese eden tek bir vektör geliştirmişlerdir.

Bazı mRNA'ların tek bir siRNA içeren vektör ile etkin olarak susturulması zordur, bu durumda birkaç shRNA ile tek bir mRNA içerisindeki birçok bölgenin hedeflenmesi gereklidir.

Li ve ark. (78) tümör hücre büyümesi ve proliferasyonunda etkin olan TNF superailisinin bir üyesi olan APRIL (a proliferation-inducing ligand) geninin farklı bölgelerine hedeflenen dört farklı oligonükleotid sekansını dört farklı promotora sahip (mU6, hU6, h7SK ve hH1) pGenesil-T vektörüne klonlamışlardır. Dizayn ettikleri dört farklı shRNA'yı içeren vektörün, her birini ayrı ayrı eksprese eden shRNA ekspresyon plazmidlerine göre kolorektal kanserde tümör gerilemesini çok daha etkin olarak baskıladığını tespit etmişlerdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, anjiogenezde önemli rol oynayan *VEGF-A* ve *VEGFR-2* genlerine hedeflenen shRNA'ları içeren tek bir RNAi-temelli vektör modifikasyonu yapmak ve bu vektörü kullanarak hücrelerde RNAi etkisinin artırılması ve meme kanserinde ki terapötik etkinliğinin iyileştirilmesi amaçlandı. Bu amaçla;

1. Anjiogenezde etkin olan bu iki gen (*VEGF-A* ve *VEGFR-2*) tek bir RNAi vektörüne birlikte klonlanarak kalite kontrol çalışmaları yapıldı.
2. Tekli ve ikili klonlanan gen susturma vektörleri meme kanser hücrelerine transfekte edildiklerinde hücreye internalize oldukları gösterildi.
3. Tekli ve ikili klonlanan gen susturma vektörleri meme kanser hücrelerine transfekte edildiklerinde gen susturma etkinlikleri protein düzeyinde incelendi. Özellikle MDA-MB-231 gibi metastatik meme kanser hücresinde hem *VEGF-A* hem de *VEGFR-2* protein ekspresyonunun önemli ölçüde baskılandığı gözlemlendi.
4. İkili klonlanan vektörün tekli klonlanan vektörlere göre daha yüksek gen susturma aktivitesine sahip olduğu gösterildi.
5. Zamana bağlı olarak gen susturma etkinliğinin karşılaştırılması çalışmalarında 72 saat sonunda gen susturma etkinliğinin 48 saate göre daha yüksek olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak; çalışmamız, kanser tedavisinde farklı hedef genleri birlikte baskılayan çoklu shRNA vektör temelli RNAi teknolojisi stratejilerinin etkin olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bununla ilişkili olarak, vektör temelli RNAi yaklaşımı kullanılarak insan kanserlerinde birçok genin aynı anda bloklanması kanser gen tedavisi için oldukça umut vericidir.

KAYNAKLAR

1. Al-Abd AM, Alamoudi AJ, Abdel-Naim AB, Neamatallah TA, Ashour OM. Anti-angiogenic agents for the treatment of solid tumors: Potential pathways, therapy and current strategies – A review. *J Adv Res* 2017, 8: 591-605.
2. Atiqur RM, Toi M. Anti-angiogenic therapy in breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2003, 57(10): 463-70.
3. Lee TH, Seng S, Sekine M, Hinton C, Fu Y, Avraham HK, Avraham S. VEGF meditates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med* 2007, 4(6): 1101-10.
4. Ofek P, Tiram G, Ronit SF. Angiogenesis regulation by nanocarriers bearing RNA interference. *Adv Drug Del Rev* 2017, 119(15): 3-19.
5. Banerjee D, Harfouche R, Sengupta S. Nanotechnology-mediated targeting of tumor angiogenesis. *Vasc Cell* 2011, 3(3): 1-13.
6. Comunanza V, Bussolino F. Therapy for cancer: Strategy of combining anti-angiogenic and target therapies. *Front Cell Dev Biol* 2017, 5(101): 1-18.
7. Lin Z, Zhang Q, Luo W. Angiogenesis inhibitors as therapeutic agents in cancer: Challenges and future directions. *Eur J Pharmacol* 2016, 793: 76-81.
8. Ng EW, Shima DT, Calias P, Cunningham ET, Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2006, 5: 123-32.
9. Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys* 2013, 42: 217-39.
10. Şalva E, Ekentok C, Turan SO, Akbuğa J. Non viral siRNA and shRNA delivery systems in cancer therapy. In: Abdurakmonov IY (ed). *RNA Interference*, 1th ed. Croatia, Intech Open, 2016: 201-23.
11. Wang S, Shi Z, Liu W, Jules J, Feng X. Development and validation of vectors containing multiple siRNA expression cassettes for maximizing the efficiency of gene silencing. *BMC Biotechnol* 2006, 6(50): 1-7.
12. Song J, Giang A, Lu Y, Pang S, Chiu R. Multiple shRNA expressing vector enhances efficiency of gene silencing. *BMB Rep* 2008, 41(5): 358-62.
13. Xu XM, Yoo MH, Carlson BA, Gladyshev VN, Hatfield DL. Simultaneous knockdown of the expression of two genes using multiple shRNAs and subsequent knock-in of their expression. *Nat Protoc* 2009, 4(9): 1338-48.

14. Brake O, Hooft K, Liu YP, Centlivre M, Eije KJ, Berkh B. Lentiviral vector design for multiple shRNA expression and durable HIV-1 inhibition. *Mol Ther* 2008, 16(3): 557-64.
15. Deng F, Chen X, et al. A Simplified and Versatile System for the Simultaneous Expression of Multiple siRNAs in Mammalian Cells Using Gibson DNA Assembly. *PLoS One* 2014, 9(11): e113064.
16. Anaya-Ruiz M, Perez-Santos M. Innovation status of gene therapy for breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015, 16: 4133-36.
17. Desantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast Cancer Statistics. *Cancer J Clin* 2014, 64: 52-62.
18. Makki J. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. *Clin Med Insights Pathol* 2015, 8: 23-31.
19. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2010, 10(10): 955-60.
20. Pareja F, Marchio C, Reis-Filho JS. Molecular diagnosis in breast cancer. *Diagno Histopathol* 2018, 24(2): 71-82.
21. Onitilo AA, et al. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clin Med Res* 2009, 7(1-2): 4-13.
22. Daniel AR, Hagan CR, Lange CA. Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2011, 6(3): 359-69.
23. Zhang MH, Man HT, Zhao XD, Dong N, Ma SL. Estrogen receptor-positive breast cancer molecular signatures and therapeutic potentials. *Biomed Rep* 2014, 2: 41-52.
24. Parker JS, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009, 27(8): 1160-7.
25. Cheang MC, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009, 101(10): 736-50.
26. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000 406: 747-52.
27. Minami CA, Chung DU, Chang HR. Management options in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer (Auckl)* 2011, 5: 175-99.

28. Eliyatkin N, Yalçın E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Molecular classification of breast carcinoma: From traditional, old-fashioned way to a new age, and a new way. *J Breast Health* 2015, 11: 59-66.
29. Gupta MK, Qin R-Y. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis *World J Gastroenterol* 2003, 9(6): 1144-55.
30. Abdollahi A, Folkman J. Evading tumor evasion: Current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2010, 13: 16-28.
31. Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry* 2008, 73(7): 751-62.
32. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2009, 19: 329-37.
33. Rak J, Yu JL. Oncogenes and tumor angiogenesis The question of vascular 'supply' and vascular 'demand'. *Semin Cancer Biol* 2004, 14:93-104.
34. Erez N. Angiogenic awakening. *Nature* 2013, 500: 37-8.
35. Hida K, Maishi N, Annan DA, Hida Y. Contribution of tumor endothelial cells in cancer progression. *Int J Mol Sci* 2018, 19(1272): 1-12.
36. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2006, 2(3): 213-19.
37. Chen J, Sun X, Shao R, Xu Y, Gao J, Liang W. VEGF siRNA delivered by polycation liposome-encapsulated calcium phosphate nanoparticles for tumor angiogenesis inhibition in breast cancer. *Int J Nanomed* 2017, 12: 6075-88.
38. Guo D, Murdoch CE, Xu H, Shi H, Duan DD, Ahmed A, Gu Y. Vascular endothelial growth factor signaling requires glycine to promote angiogenesis. *Nat Sci Rep* 2017, 7(14749): 1-10.
39. Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 2009, 9: 302-12.
40. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2004, 3: 391-400.
41. Gotink KJ, Verheul HM. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis* 2010, 13: 1-14.
42. Zirlik K, Duyster J. Anti-Angiogenics: current situation and future perspectives. *Oncol Res Treat* 2018, 41: 166–71.
43. Yang WH, Xu J, Mu JB, Xie J. Revision of the concept of anti-angiogenesis and its applications in tumor treatment. *Chronic Dis Transl Med* 2017, 3: 33-40.

44. Bagri A, Berry L, Gunter B, et al. Effects of anti-VEGF treatment duration on tumor growth, tumor regrowth, and treatment efficacy. *Clin Cancer Res* 2010, 16: 3887e3900.
45. Zhou Y, Zhang C, Liang W. Development of RNAi technology for targeted therapy-A track of siRNA based agents to RNAi therapeutics. *J Control Rel* 2014, 193: 270-81.
46. Lam JKW, Chow MYT, Zhang Y, Leung SWS. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Mol Ther Nucleic Acids* 2015, 4(252): 1-20.
47. Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: Similarities and differences. *Adv Drug Del Rev* 2009, 61: 746-59.
48. Ashihara E, Kawata E, Maekawa T. Future prospect of RNA interference for cancer therapies. *Curr Drug Targets* 2010, 11: 345-60.
49. Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges. *Adv Drug Del Rev* 2007, 59: 75-86.
50. Bobbin ML, Rossi JJ. RNA interference (RNAi)-based therapeutics: Delivering on the promise? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2016, 56: 103-22.
51. Paddison PJ. Current topics on microbiology and immunology:RNA interference. In: Paddison PJ, Vogt PK (eds). *RNA Interference in Mammalian Cell Systems*, 1st ed. Springer, 2008: 1-13.
52. Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ, Hannon GJ, Cleary MA. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol* 2005, 23: 227-31.
53. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002, 296: 550-53.
54. Ishigaki Y, Nagao A, Matsunaga T. Optimized gene silencing by co-expression of multiple shRNAs in a single vector. In: Min WP, Ichim T (eds). *RNA interference: From Biology to Clinical Applications*. Humana Press 2010, 109-22
55. McIntyre GJ, Arndt AJ, Gillespie KM, Mak WM, Fanning GC. A comparison of multiple shRNA expression methods for combinatorial RNAi. *Genet Vaccines Ther* 2011, 9(9): 1-11.
56. Stoff-Khalili MA, Dall P, Curiel DT. Gene therapy for carcinoma of the breast Cancer. *Gene Ther* 2006, 13(7): 633-47.
57. Chen S, Feng J, Ma L, Liu Z, Yuan W. RNA interference technology for anti-VEGF treatment. *Expert Opin Drug Deliv* 2014, 11(9): 1471-80.

58. Singh MS, Peer D. RNA nanomedicines: the next generation drugs? *Curr Opin Biotechnol* 2016, 39: 28-34.
59. Şalva E, Akbuğa J. In vitro silencing effect of chitosan nanoplexes containing siRNA expressing vector targeting VEGF in breast cancer cell lines. *Pharmazie* 2010, 65(12): 896-902.
60. Şalva E, Kabasakal L, Eren F, Çakalağaoğlu F, Özkan N, Akbuğa J. Chitosan/short hairpin RNA complexes for vascular endothelial growth factor suppression invasive breast carcinoma. *Oligonucleotides* 2010, 20(4): 183-90.
61. Şalva E, Kabasakal L, Eren F, Özkan N, Çakalağaoğlu F, Akbuğa J. Local delivery of chitosan/VEGF siRNA nanoplexes reduces angiogenesis and growth of breast cancer in vivo. *Nuc Acid Ther* 2012, 22(1): 40-8.
62. Şalva E, Turan SO, Eren F, Akbuğa J. The enhancement of gene silencing efficiency with chitosan-coated liposome formulations of siRNAs targeting HIF-1a and VEGF. *Int J Pharm* 2015, 478(1): 147-54.
63. Şalva E, Turan SO, Kabasakal L, Eren F, Alan S, Özkan N, Akbuğa J. Investigation of the therapeutic efficacy of co-delivery of psiRNA-VEGF and pIL-4 into chitosan nanoparticles in a breast tumor model. *J Pharm Sci* 2014, 103(3): 785-95.
64. Şalva E, Turan SO, Akbuğa J. The development of ternary nanoplexes for efficient siRNA delivery. *Biol Pharm Bull* 2013, 36(12): 1907-14.
65. Doan CC, Le LT, Hoang SN, Do SM, Le DV. Simultaneous silencing of VEGF and KSP by siRNA cocktail inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma Hep3B cells. *Biol Res* 2014, 47(70): 1-15.
66. Tabernero J, Shapiro GI, LoRusso PM, Cervantes A, Schwartz GK, Weiss GJ, Paz-Ares L, Cho DC, Infante JR, Alsina M, et al. First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. *Cancer Discovery* 2013, 3: 406-17.
67. Gao K, Huang L. Achieving efficient RNAi therapy: progress and challenges. *Acta Pharm Sin B* 2013, 3(4): 213-25.
68. Zhou H, Xia XG, Xu Z. An RNA polymerase construct synthesizes shorthairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. *Nuc Acids Res* 2005, 33:62.
69. Schiffelers RM, Ansari A, Xu J, Zhou Q, Tang Q, Storm G, Molema G, Lu PY, Scaria PV, Woodle MC. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucl Acids Res* 2004, 32: 149.

70. Matsumoto G, Kushibiki T, Kinoshita Y, Lee U, Omi Y, Kubota E and Tabata Y: Cationized gelatin delivery of a plasmid DNA expressing small interference RNA for VEGF inhibits murine squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2006, 97(4): 313-21.
71. Chen SM, Wang Y, Xiao BK, Tao ZZ. Effect of blocking VEGF, hTERT and Bcl-xl by multiple shRNA expression vectors on the human laryngeal squamous carcinoma xenograft in nude mice. *Cancer Biol Ther* 2008, 7(5): 736-41.
72. Che J, Tao A, Chen S, Li X, Zhao Y, Yuan W. Biologically responsive carrier-mediated anti-angiogenesis shRNA delivery for tumor treatment. *Sci Rep* 2016, 6: 1-11.
73. Chen SM, Tao ZZ, Hua QQ, et al. Inhibition of human telomerase reverse transcriptase in Hep-2 cells using short hairpin RNA expression vectors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006, 132: 200-5.
74. Sun J, Wang L, Dong MM, Cao H, Tian XF. Construction and identification of multiple genes Co silence of plasmid shRNA. *Int J Clin Exp Med* 2015, 8(12): 22053-62.
75. Gou D, Weng T, Wang Y, Wang Z, Zhang H, Gao L, Chen Z, Wang P, Liu L. A novel approach for the construction of multiple shRNA expression vectors. *J Gene Med* 2007, 9(9): 751-63.
76. Weng Y, Shi Y, Xia X, Zhou W, Wang H, Wang C. A multi-shRNA vector enhances the silencing efficiency of exogenous and endogenous genes in human cells. *Oncol Lett* 2017, 13(3): 1553-62.
77. Jazag A, Kanai F, et al. Single small-interfering RNA expression vector for silencing multiple transforming growth factor- β pathway components. *Nucleic Acids Research* 2005 33(15):1-9.
78. Li H, Shao K, Wang J, Wang G, Xu J, Cao J, Ju S, Wang H. Simultaneous knockdown of APRIL via multiple shRNAs reduces the malignancy of SW480 cells. *Oncol Rep* 2012, 28(5): 1613-8.

EKLER

EK 1. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Emine Şalva

Doğum Yeri ve Tarihi: Malatya, 27.01.1976

Medeni Hali: Evli

Tel: 0 506 6019582 (gsm)

e-mail: emine.salva@inonu.edu.tr, emine_salva@yahoo.com

Eğitim:

2019-	Doçent- Farmasötik Biyoteknoloji
2015-	İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yükseklisans – Tıbbi Biyoloji ve Genetik (Tıp Programı), Malatya
2003-2009	Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora- Farmasötik Biyoteknoloji (Eczacılık Programı), İstanbul
2001-2003	İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yükseklisans – Biyokimya (Tıp Programı), Malatya
1998-2001	İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yükseklisans – Tıbbi Biyoloji ve Genetik (Tıp Programı) tamamlanmadı, Malatya
1997-1998	Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Dil Eğitim Programı- Yabancı Diller Yüksekokulu, Ankara
1993-1997	Hacettepe Üniversitesi Lisans- Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara

Akademik ve İdari Deneyim:

2019-	İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Doçent
2018-	Eczacılık Teknoloji Bölüm Başkanı
2012-	İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Bşk.
2013-2016	İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Dekan Yardımcısı
2013-2016	İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Teknoloji Bölüm Bşk.
2012-2019	İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yardımcı Doçent
2003-2012	Marmara Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Patoloji Laboratuvar Bölümü, Öğretim Görevlisi
2001-2003	Marmara Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Patoloji Laboratuvar Bölümü, Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil: İngilizce

SCI ve SCI-expanded ‘a giren dergilerde yayınlanan veya yayınlanmakta olan makaleler

1. Karakoyun B., Yüksel M., Ercan F., **Salva E.**, Işık I., Yeğen BC.: Halofuginone, a specific inhibitor of collagen type I synthesis, ameliorates oxidant colonic damage in rats with experimental colitis. *Digestive Diseases Sciences*. 55(3):607-616, 2010.

2. **Şalva**, J. Akbuğa. In vitro silencing effect of chitosan nanoplexes containing siRNA expressing vector targeting VEGF in breast cancer cell lines. *Die Pharmazie* 65(12): 896-902, 2010.
3. **Şalva E**, Kabasakal L, Eren F, Çakalağaoğlu F, Özkan N, Akbuğa J. Chitosan/short hairpin RNA complexes for vascular endothelial growth factor suppression invasive breast carcinoma. *Oligonucleotides*. 20(4): 183-190, 2010.
4. **E. Şalva**, S.O. Turan, J. Akbuğa. The increased of in vitro cell proliferation by using chitosan/pGM-CSF complexes. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 73(2): 131-138, 2011.
5. N. Özkan, **E. Şalva**, F. Çakalağaoğlu, B. Tüzüner. Honey as a substitute for formalin? *Biotechnic&Histochemistry*. 87(2): 148-153, 2012.
6. **Şalva E**, Kabasakal L, Eren F, Özkan N, Çakalağaoğlu F, Akbuğa J. Local delivery of chitosan/VEGF siRNA nanoplexes reduces angiogenesis and growth of breast cancer in vivo. *Nucleic Acid Therapeutics*. 22(1): 40-48, 2012.
7. Elçioğlu K., Kabasakal L., Alan S., **Şalva E.**, Tufan F., Karan A. Thalidomide attenuates learning and memory deficits induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin in rats. *Biotechnic&Histochemistry*, 88(3-4):145-152, 2013.
8. **E. Şalva**, S.O. Turan, J. Akbuğa. The development of ternary nanoplexes for efficient siRNA delivery, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(12):1907-1914, 2013.
9. **Şalva E**, Turan S.O., Kabasakal L, Eren F, Alan S, Özkan N, Akbuğa J. Investigation of the therapeutic efficacy of co-delivery of psiRNA-VEGF and pIL-4 into chitosan nanoparticles in a breast tumor model. *Journal of Pharmaceutical Science*, 103(3): 785-795, 2014.
10. Erdem-Çakmak F., Özbaş-Turan S., **Şalva E.**, Akbuğa J., Comparison of VEGF gene silencing efficiencies of chitosan and protamine complexes containing shRNA. *Cell Biology International*, 38(11): 1260-1270, 2014.
11. **Şalva E**, Turan S.O., Eren F., Akbuğa J. The enhancement of gene silencing efficiency with chitosan-coated liposome formulations of siRNAs targeting HIF-1a and VEGF. *International Journal of Pharmaceutics*, 478(1):147-154, 2015.
12. **Şalva E**, Turan S.O., Ekentok C., Akbuğa J. Generation of stable cell line by using chitosan as gene delivery system. *Cytotechnology*, 68(4):1033-1038, 2016.
13. Kaban K., **Şalva E.**, Akbuğa J. The effects of chitosan/miR-200c nanoplexes on different stages of cancers in breast cancer cell lines. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95:103-110, 2016.
14. Elçioğlu H.K., Aslan E., Ahmad S., Alan S., **Şalva E.**, Elçioğlu Ö.H., Kabasakal L. Tocilizumab's effect on cognitive deficits induced by intracerebroventricular administration of streptozotocin in Alzheimer's model. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 420 (1-2):21-28, 2016.
15. Kaban K., **Şalva E.**, Akbuğa J. In vitro dose studies on chitosan nanoplexes for microRNA delivery in breast cancer cells. *Nucleic Acid Therapeutics*, 27(1):45-55, 2017.
16. **Şalva E**, Turan S.O., Akbuğa J. The inhibition of glomerular mesangial cell proliferation by siPDGF-B and siPDGFR β containing chitosan nanoplexes, *AAPS PharmSciTech*, 18(4):1031-1042, 2017.
17. Halay E., Ay E., **Şalva E.**, Ay K., Karayıldırım T. Syntheses of 1,2,3-triazole-bridged pyranose sugars with purine and pyrimidine nucleobases and evaluation of their anticancer potential. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 36(9):598-619, 2017.
18. Halay E, Ay E, **Şalva E**, Ay K, Karayıldırım T. Synthesis of triazolylmethyl-linked nucleoside analogs via combination of azidofuranoses with propargylated nucleobases and study on their cytotoxicity. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 2018, 54(2), 158-166.
19. Karakuş, S. Tok, F. Türk, S. **Şalva, E.** Tatar, G. Taskın-Tok, T. ,Kocyigit Kaymakcioglu, B. Synthesis, anticancer activity and ADMET studies of N-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-4-[(3-substituted)ureido/thioureido] benzenesulfonamide derivatives. *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*, 2018, 193(8), 528-534.
20. Bozbey İ, Sarı S, **Şalva E**, Kart D, Karakurt A. p-Trifluoroacetophenone Oxime Ester Derivatives: Synthesis, Antimicrobial and Cytotoxic Evaluation, and Molecular Modeling Studies. *Letters in Drug Design & Discovery*. DOI. 10.2174/ 1570180816666181128112249.

21. Alan S, Şalva E, Yılmaz İ, Turan S, Akbuğa J. The effectiveness of chitosan-mediated silencing of PDGF-B and PDGFR-β in the mesangial proliferative glomerulonephritis therapy. *Experimental and Molecular Pathology*. Kabul edildi.

Kitaplar:

1. RNA Interference. Ed: İbrokchim Y. Abdurakmonov. Non viral siRNA and shRNA delivery systems in cancer therapy. **E. Şalva**, C. Ekentok, S.O. Turan, J. Akbuğa. 201-223, 2016.
2. Nagihan G., Uncuoğlu AA., Yıldız A., Hasdemir MU., Akbuğa J., Şalva E., Hücre ve Moleküler Biyoloji Sözlüğü. Nobel Tıp Kitabevleri, Ed: Nagihan G., Uncuoğlu AA., Yıldız A., ISBN: 978-605-335-061-3, 523 sayfa, 2014.
3. **E. Şalva**, S.O. Turan, J. Akbuğa. Chitosan of nanoparticles containing siRNA targeting VEGF for anti-angiogenic gene therapy. *Advances in Chitin Science*, Volume XIII, 248-252, 2011.
4. S.O. Turan, **E. Şalva**, J. Akbuğa. Physical and transfectional properties of aged pIL-2 loaded chitosan microspheres. *Advances in Chitin Science*, Volume XIII, 368-374, 2011.
5. Rabet Gözil. Geçmişten geleceğe Sağlık teknikliği – Gazi Üniversitesi SHMYO Ankara-2008; 83-85.

SCI ve SCI-expanded dışı dergilerde yayınlanan veya yayınlanmakta olan makaleler

1. **E. Şalva**. Kayıt ve arşiv dökümantasyonu. *Aegean Pathology Journal*, 2(3): 116-121, 2005
1. G. Ekicioğlu, N. Özkan, **E. Şalva**. Hematoksilin-Eozin. *Aegean Pathology Journal*, 2: 58-61, 2005.
2. **Şalva E.**, Özkan N., Kabasakal L., Özbaş-Turan S., Akbuğa J. The effect of chitosan complexes on biodistribution of siRNA, *Journal of Marmara University Institute of Health Sciences (MÜSBED)*, 1(1): 1-7, 2011.
3. **E. Şalva**, S.O. Turan, S. Alan, J. Akbuğa. *In Vitro* PDGF-B gene silencing studies and *in vivo* delivery of siRNA to the rat kidney using chitosan/siRNA nanoplexes. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 20(3):263-268, 2016.
4. **E. Şalva**, J. Akbuğa. The effects to GM-CSF expression and fibroblast proliferation of pGM-CSF containing chitosan/PVP hydrogels. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21(2): 223-229, 2017.

Uluslararası kongre, sempozyum, panel, çalıştay (workshop) gibi bilimsel, sanatsal, mesleki toplantılarda sözlü olarak sunulan ve özet metin olarak yayımlanan bildiri

1. N. Ozkan, F. Cakalagaoglu, B. Tuzuner, **E. Salva**. Honey as a substitute for formalin. 21st European Congress of Pathology, 8-13 Eylül 2007, İstanbul, Türkiye.
2. **E. Şalva**, S.O. Turan, J. Akbuğa. Comparison of silencing effect of chitosan/shRNA complexes in different cell lines. Winter School on Frontiers in Nanomedicine and Nanobiotechnology, 10-13 Ocak 2010, Bilkent Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
3. S.O. Turan, **E. Şalva**, J. Akbuğa. Skin gene therapy using chitosan coated liposomes. Winter School on Frontiers in Nanomedicine and Nanobiotechnology, 10-13 Ocak 2010, Bilkent Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
4. K. Elçioğlu, L. Kabasakal, S. Alan, **E. Şalva**, F. Tufan, A.A. Karan. İntraserebroventriküler streptozotosin uygulaması ile geliştirilen Alzheimer modelinde oluşan öğrenme ve bellek bozukluklarında Talidomid'in koruyucu etkisi. Akademik Geriatri Kongresi, 26-30 Mayıs 2010, KKTC.
5. **E. Şalva**, S.O. Turan, J. Akbuğa. Anti-angiogenic gene therapy with chitosan/siRNA nanoplexes. IPSMPS, 24-27 Haziran 2010, İzmir, Türkiye.
6. **E. Şalva**, The development of appropriate delivery systems for siRNA. Nanocarriers for gene silencing therapeutics workshop, 24-28 Haziran 2013, Aarhus University, Denmark.
7. **E. Şalva**, S.O. Turan, J. Akbuğa. The usage of siRNA in therapy. International Multidisciplinary of Drug Research and Development Symposium, 28-30 Kasım 2013, Antalya, Türkiye.
8. **E. Şalva**, S.O. Turan, C. Ekentok, T. Çanak, J. Akbuğa. The non-viral approaches for anti-angiogenic tumor therapy. XX. Annual Meeting German Society for Gene Therapy, "Virus vectors and the gene therapy" workshop, 19-22 Mart 2014, Ulm, Almanya.

9. **E. Şalva**. Gene Silencing Molecules and Using in Therapy. 4. Uluslararası Eczacılık Bilimleri Kongresi (IMPPS), Marmara Üniversitesi, 18-21 Eylül 2014, İstanbul, Türkiye.
10. **E Şalva**. Nucleic-acid based therapeutics (Gene drugs). International Multidisciplinary Symposium Drug Research&Development. Anadolu University, October 15-17, 2015, Türkiye.
11. J. Akbuğa, N. Betül Başmanav, Ağırbaşı M., **Salva E**, Turan SO. The in vitro investigation of PAI-1 containing chitosan nanoplexes in hepatocellular carcinoma. XVth International Workshop Molecular and Cellular Biology of Plasminogen Activation. Notre Dame University, September 22-26, 2015, Italy.
12. M Özgen, H Emmungil, **E Şalva**, NB Türkmen, O Çiftçi. Lapatinib sinovyal fibroblastlardan matriks metalloproteinazların salımını başlatır. XVI. Ulusal Romatoloji Kongresi Bildir Özetleri, 28 Ekim-1 Kasım, 2015, Antalya, Türkiye
13. E Halay, E Ay, Şalva E, Ay K, Karayıldırım T. Design, synthesis and anticancer potentials of some 1,2,3-triazole nucleosides. 1th International Conference on Advances in Science and Arts. 29-31.03. 2017, İstanbul, TÜRKİYE
14. Alagöz MA, Şalva E, Karakurt A, Önkol T. Some new 1-aryl-2-(3,5-dimethylpyrazole-1-il) ethanon derivatives: synthesis, anticancer activity and QSAR study. 3rd International Turkic World Conference on Chemical Sciences. 10-13.09.2017, Bakü, AZERBEYCAN
15. E. Şalva. Hipoksik Şartlar Altında Meme Kanseri Hücrelerinde siRNA İçeren Kitozan Nanopartikülleri ile HIF-1 α ve VEGF Gen Ekspresyonunun Baskılanması. Uluslararası Bilimsel Araştırma Kongresi, 09-13 Mayıs 2018, Mardin, TÜRKİYE

Uluslararası kongre, sempozyum, panel, çalıştay (workshop) gibi bilimsel, sanatsal, mesleki toplantılarda poster olarak sunulan ve özet metin olarak yayımlanan bildiri

1. **E.Şalva**, B.Enneli, J.Akbuğa. Delivery of GM-CSF gene by using chitosan complexes. 31. FEBS Congress, 24-29 June 2006, İstanbul. FEBS Journal, 273(1):132, 2006.
2. B.Enneli, **E.Şalva**, J.Akbuğa. Development of a novel delivery system for antisense oligonucleotides. 31. FEBS Congress, 24-29 June 2006, İstanbul. FEBS Journal, 273(1):132, 2006.
3. S. Karşlı, J. Akbuğa, M. Aktaş, **E. Şalva**, F. Çakalağaoğlu. "Wound healing potential of chitosan in diabetic rats" Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society European Chapter Meeting, Rotterdam- HOLLANDA, P76, 8-11 Ekim 2006.
4. F. Çakalagaoglu, N. Özkan, **E. Salva**, S. Arbak, B. Uslu. Effect of FK506 in experimental glomerulonephritis: light microscopic and ultrastructural study. 21st European Congress of Pathology, September 8-13, 2007, İstanbul. Virchows Archiv, 451(2): 513, 2007.
5. **E. Salva**, N. Ozkan, F. Cakalagaoglu, B. Karakoyun, J. Akbuga. The staining methods of chitosan as a natural biopolymer. 21st European Congress of Pathology, September 8-13, 2007, İstanbul. Virchows Archiv, 451(2): 539, 2007.
6. N. Ozkan, F. Cakalagaoglu, **E. Salva**. Double immunostaining method. What is the significance. 21st European Congress of Pathology, September 8-13, 2007, İstanbul. Virchows Archiv, 451(2): 565, 2007.
7. N. Ozkan, F. Cakalagaoglu, B. Tuzuner, **E. Salva**. Honey as a substitute for formalin. 21st European Congress of Pathology, September 8-13, 2007, İstanbul. Virchows Archiv, 451(2): 117, 2007.
8. **E. Salva**, N. Ozkan, F. Cakalagaoglu, B. Karakoyun, J. Akbuga. The effects in skin wound healing and cell proliferation of the plasmid DNA encoding GM-GSF and chitosan. 21st European Congress of Pathology, September 8-13, 2007, İstanbul. Virchows Archiv, 451(2): 565, 2007.
9. **E.Şalva**, J.Akbuğa. Characterization and in vitro silencing effect of chitosan/siRNA complexes. European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT), 13-16 November 2008, Brugge, Belgium. Human Gene Therapy, 19(10), October, 2008.
10. F Çakalağaoğlu, B Tüzüner, N Özkan, **E Şalva**. Expression MMP2,HPV in larynx skuamous cell carcinoma. XXVII International congress of the international academy of pathology. Athens,Greece 12-17 Ekim 2008. Histopathology, 53(1), 211, 2008.

11. **E.Şalva**, S.Ö. Turan, S.Alan, J.Akbuğa. Studies on shRNA-loaded chitosan nanopartides; in vitro stability and transfection efficiency. 4th EORTC Pathobiology Group Annual Meeting&1st International Multidisciplinary Cancer Research Congress. 21-24 May 2009, Antalya.
12. **E.Şalva**, S.Ö. Turan, J.Akbuğa. Development of in vitro stabilities of chitosan siRNA and shRNA complex. III. International Congress of Molecular Medicine. 5-8 Mayıs 2009, İstanbul
13. **E. Şalva**, J. Akbuga. Comparison of silencing effect of chitosan/psiRNA complexes in different cell lines. 9th International Conference of the European Chitin Society (EUCHIS). 23-26 May 2009, Venice-Italy.
14. F.Çakalağaoğlu, **E.Şalva**, N.Özkan, H.Kaya, L.Kabasakal, J.Akbuğa. Significance of IL-6 and PAI-1 Expression in Nucleic-Acid Based Therapy of Breast Cancer. 22nd European Congress of Pathology, 4-9 September 2009, Florence-Italy. Virchows Archiv, 455(2): 103, 2009.
15. S.O.Turan, **E. Salva**, J.Akbuğa. Chitosan-based carriers for gene transfer into the skin. The International Meeting on Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 9-12 Haziran 2010, Marmara Üniversitesi, İstanbul.
16. **E. Şalva**, L. Kabasakal, N.Özkan, F.Eren, F.Çakalağaoğlu, J.Akbuğa. Chitosan mediated VEGF shRNA transfer for the treatment of breast cancer. European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT), 22-25 October 2010, Milan, Italy. Human Gene Therapy, 21(10), October, 1411, 2010.
17. **E. Şalva**, S. Özbaş-Turan, J.Akbuğa. Chitosan nanoparticles containing shRNA targeting VEGF as cancer therapeutic. European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT), 22-25 October 2010, Milan, Italy. Human Gene Therapy, 21(10), October, 1412-1413, 2010.
18. S.O.Turan, J. Akbuğa, A.D. Sezer, **E. Şalva**. Intramuscular delivery of antisense oligonucleotides by chitosan nanoparticles. European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT), 22-25 October 2010, Milan, Italy. Human Gene Therapy, 21(10), October, 1452-1453, 2010.
19. **E. Şalva**, S.O. Turan, J. Akbuğa. Chitosan of nanoparticles containing siRNA targeting VEGF for anti-angiogenic gene therapy. 10th International Conference of the European Chitin Society, 20-24 Mayıs 2011, St.Petersburg, Rusya.
20. S.O. Turan, **E. Şalva**, J. Akbuğa. Physical and transfectional properties of aged pIL-2 loaded chitosan microspheres. 10th International Conference of the European Chitin Society, 20-24 Mayıs 2011, St.Petersburg, Rusya.
21. **E. Şalva**, S.O. Turan, N. Ozkan, J. Akbuğa. Development of a new siRNA delivery system in the anti-angiogenic gene therapy. Perspectives in Cell and Gene Based Medicines, 15-17 Mart 2012, Frankfurt, Almanya.
22. S.O. Turan, **E. Şalva**, N. Ozkan, J. Akbuğa. Comparison of chitosan based antisense oligonucleotide and siRNA for gene silencing. Perspectives in Cell and Gene Based Medicines, 15-17 Mart 2012, Frankfurt, Almanya.
23. F.Çakmak, S.O. Turan, **E. Şalva**, J. Akbuğa. Protamine Containing Chitosan:shRNA Complexes for Silencing of VEGF Expression, Molecular Therapy, 20(1): 106, 2012, 15th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy (ASGCT), Philadelphia, USA. 16-20 Mayıs 2012.
24. SO Turan, **E Şalva**, J Akbuğa. Comparison of in vitro gene silencing ability of antisense oligonucleotide and siRNA complexes. 19. Annual Meeting German Society for Gene Therapy. 28.02-02.03 2013, Hamburg, Almanya.
25. **Salva E**, Özbaş-Turan S, Kabasakal L, Eren F, Alan S, Özkan N, Akbuğa J. Co-delivery of VEGF siRNA and IL-4 into chitosan nanoparticles in breast tumor model of rat. Molecular Therapy, 21(1):S174, 2013., 16th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy (ASGCT), Utah, USA.
26. **E Şalva**, SO Turan, J Akbuğa. Comparison of chitosan-based systems for efficient siRNA delivery in the cancer therapy. XX. Annual Meeting- German Society for Gene Therapy. 20-22 Mart 2014, Ulm Üniversitesi, Almanya.

27. **E Şalva**, SO Turan, Eren F, J Akbuğa. The Investigation of inhibition of HIF-1 α and VEGF gene expression with different liposomal siRNA delivery systems in breast cancer cells under hypoxic conditions. 17th International Pharmaceutical Symposium, 8-10 Eylül 2014, Antalya, Türkiye.
28. **E Şalva**, SO Turan, Alan S, J Akbuğa The Silencing by Chitosan/PDGF-B Nanoplexes of Mesangial Cell Proliferation in Renal Disease. XXI. Annual Meeting German Society for Gene Therapy, 26-28 Şubat 2015, Viyana, Avusturya,.
29. Akbuğa J., Turan SO., Kabasakal L., **Salva E.**, Ozkan N. PDGF-D Inhibition by Using Chitosan:siRNA Complexes in Breast Cancer Model of Rat. Molecular Therapy, 23(1):S236, 2015, 18th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy (ASGCT), May 13-16, New Orleans, USA.
30. **E Şalva**, A. Kaymaz. The Assessment of Effects to Cell Invasion, Cell Proliferation and Colony Formation in the Breast Cancer Cell Lines of shVEGF Containing Chitosan Nanoplexes. 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara University, June 9-12, 2015, Türkiye
31. K. Kaban, **E. Şalva**, J. Akbuğa. The effect of tumor suppressive miR-200c and miR-141 optimization in breast cancer cell lines. 11th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, October 11-14, 2015, Hollanda.
32. J Akbuga, SO Turan, **E Salva**, N Ozkan, L Kabasakal, S Alan. Tumor Inhibition by Using Chitosan: siRNA PDGFR-beta in Breast Cancer Model of Rat. 19th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy (ASGCT). May 4-7, 2016, Washington, ABD.
33. **E Salva**, S Alan, İ Yılmaz, SO Turan, J Akbuga. The Silencing of PDGF-B Pathway by Chitosan/siRNA Nanoplexes in Therapy of the Experimental Mesangial Proliferative Glomerulonephritis. 24th ESGCT- Annual Congress, October 18-21, 2016, Floransa, İTALYA.
34. A Sirkeci, **E Şalva**, SO Turan, J Akbuga. The Investigation of Effects to Cell Proliferation and Adsorption of New Ternary and Binary Scaffolds. 24th ESGCT Annual Congress, October 18-21, 2016, Floransa, İtalya.
35. B. Çömez, **E Şalva**, J Akbuga. Comparison of short and long siVEGF/ Encapsulating Chitosan Nanoparticles in Breast Cancer Cell Lines. 24th ESGCT Annual Congress, October 18-21, 2016, Floransa, İtalya.
36. K. Kaban, **E. Salva**, S. Alan, L. Kabasakal, J. Akbuga. Chitosan-Mediated Co-delivery of miR-200c and miR-141 for Breast Cancer Treatment: In vivo Studies. 24th Annual Meeting DG-GT German Society for Gene Therapy, September 26-28, 2018, Freiburg, Almanya.
37. I. Bozbey, **E. Salva**, A. Karakurt, Cytotoxic effects of new trifluoromethyl oxime ester compounds bearing imidazole moiety on neuroblastoma cell line. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), June 26-29, 2018, Ankara, Türkiye.
38. I. Bozbey, H. Uslu, **E. Salva**, A. Karakurt. In vitro anticancer activity new naphthyl ethanone oxime ester derivatives bearing pyrazole moiety. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), June 26-29, 2018, Ankara, Türkiye.
39. B. Özkavak, A. Özkan, C. Ekentok, E. Salva, S. Özbaş-Turan In Vitro Studies on Inhibition of Chitosan / siRNA Nanoplexes and Mammaglobin Gene Expression in Breast Cancer Cell Lines. Uluslararası İvek Bio Kongresi, 26-28 Kasım 2018, İstanbul, Türkiye.
40. A. Özkan, C. Ekentok, E. Salva, S. Özbaş-Turan Kitozan/Mammaglobin shRNA Nanoplesklerinin Hazırlanması ve in vitro Karakterizasyonu. Uluslararası İvek Bio Kongresi, 26-28 Kasım 2018, İstanbul, Türkiye.

Ulusal kongre, sempozyum, panel, çalıştay (workshop) gibi bilimsel, sanatsal, mesleki toplantılarda sözlü olarak sunulan, özet ve tam metin olarak yayımlanan bildiri

1. **E. Şalva**. Kayıt ve Arşiv Dökümantasyonu. 17 Nisan 2004, Patolojide Temel Histopatolojik Laboratuvar Teknikleri Kursu, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
2. **E. Şalva**. Fiksasyon, Hematoksilen Eozin Boyama, Mikrotom ve Kesit Alma, Kayıt ve Arşiv. 2-3 Ekim 2004, Patoloji Teknik Elemanlar Uydu Toplantısı, Gaziantep.
3. **E. Şalva**. Temel İmmunoloji, İmmunohistokimyasal ve İmmunofloresan Yöntemler,

- Boyama Sorunları ve Çözümleri. 27 Kasım 2004, İmmunohistokimya Boyama Yöntemleri I Kursu, Marmara Üniversitesi, İstanbul.
4. **E. Şalva.** Temel İmmunoloji, İmmunohistokimyasal ve İmmunfloresan Yöntemler, Boyama Sorunları ve Çözümleri. 15 Ocak 2005, İmmunohistokimya Boyama Yöntemleri II Kursu, Marmara Üniversitesi, İstanbul.
 5. **E. Şalva.** Temel İmmunoloji, İmmunohistokimyasal ve İmmunfloresan Yöntemler, Boyama Sorunları ve Çözümleri. 19 Şubat 2005, İmmunohistokimya Boyama Yöntemleri III Kursu, Marmara Üniversitesi, İstanbul.
 6. N. Özkan, F. Çakalağaoğlu, B. Tüzüner, **E. Şalva.** Bal formalin yerine geçebilir mi? Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma günleri 3-6 Kasım 2008, İstanbul.
 7. B. Uslu, S.Özbaş Turan, **E.Şalva**, F. Ercan, J.Akbuğa, S. Erbak. Kitozan DNA kompleks ve nanopartikül formülasyonlarının in vitro transfeksiyon etkinliğinin araştırılması. 19. Ulusal Elektron Mikroskopik Kongresi, 22-25 Haziran 2009, Trabzon.
 8. **E. Şalva**, "Patoloji Laboratuvarında Güvenlik", 4 Kasım 2010, Taksim Eğt. Ve Arş. Hst. Tıbbi Patoloji Kliniği, İstanbul.
 9. **E. Şalva**, J.Akbuğa. "siRNA için uygun taşıyıcı sistem geliştirilmesi" 10. Yüksek Lisans ve Doktora Günleri, 17 Aralık 2010, Marmara Üniversitesi, İstanbul.
 10. **E. Şalva.** Kanser tedavisinde RNA interferans. 1. Ulusal Marmara Eczacılık Kongresi, 3-5 Kasım 2016, İstanbul, Türkiye.
 11. **E. Şalva.** Rekombinant DNA teknolojisi ile biyoteknolojik ilaç üretiminde hücre bankaları ve kontrolleri. Biyoteknolojik İlaçlarda Üretim ve Uygulamalar, 1. Farmasötik Biyoteknoloji Çalıştayı, 3-4 Kasım, 2017, İzmir, Türkiye.
 12. **E. Şalva.** Biyoteknolojik ilaç üretiminde hücre bankaları. Uluslararası İvek Bio Kongresi, 26-28 Kasım 2018, İstanbul, Türkiye.

Ulusal kongre, sempozyum, panel, çalıştay (workshop) gibi bilimsel, sanatsal, mesleki toplantılarda poster olarak sunulan, özet ve tam metin olarak yayımlanan bildiri

1. **E.Şalva**, N.Özkan, F. Çakalağaoğlu. Hangi postfiksatif hangi trikrom? XVII. Ulusal Patoloji Kongresi 1-6 Ekim 2004, Gaziantep
2. N.Özkan, **E.Şalva**, F. Çakalağaoğlu. Daha az toksik alternatif doku takibi (Ön çalışma). XVII. Ulusal Patoloji Kongresi 1-6 Ekim 2004, Gaziantep
3. N.Özkan, **E.Şalva**, F. Çakalağaoğlu. Double-İmmunohistokimya. XVII. Ulusal Patoloji Kongresi 1-6 Ekim 2004, Gaziantep
4. **E. Şalva**, N. Özkan, F. Çakalağaoğlu, B.Uslu, S. Erbak. Apoptozis-Tünel. VIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 27-30 Haziran 2006, Malatya
5. **E. Şalva**, N.Özkan , F.Çakalağaoğlu: Niçin Alkol Takibi VIII .Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 27-30 Haziran 2006, Malatya
6. N.Özkan, **E. Şalva**, F.Çakalağaoğlu. Parafine Gömülmüş Dokularda İn Situ Hibridizasyon-İmmunohistokimya VIII .Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 27-30 Haziran 2006, Malatya
7. F. Çakalağaoğlu, N. Özkan, **E. Şalva.** Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokullarında patoloji dersi kaç saat, kaç kredi. II. Ulusal Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulları Sempozyumu, 2-4 Eylül, İzmir 2007.
8. **E.Şalva**, N.Özkan, F.Çakalağaoğlu. Hangi Postfiksatif Hangi Trikrom. II. Ulusal Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulları Sempozyumu, 2-4 Eylül, İzmir, 2007.
9. N. Özkan, F. Çakalagaoglu, **E. Şalva.** How is effect of the Tween20 in immunohistochemistry. 17. Ulusal Patoloji Kongresi, 8-13 Eylül, İstanbul, 2007.
10. N. Özkan, F. Çakalağaoğlu, B. Tüzüner, **E. Şalva** Bal formalin yerine geçebilir mi?. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma günleri 3-6 Kasım 2008, İstanbul
11. N. Özkan, **E. Şalva**, K. Eken, A. Özbek, F. Çakalağaoğlu. Öğrenci gözünden patoloji laboratuvar programında eğitim öğretim. III.Ulusal Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulları Sempozyumu. 18-21 Haziran 2008, Van
12. S. Ozbas Turan, **E.Şalva**, B.Enneli, J.Akbuğa. Chitosan nanoparticles for nucleic acids delivery ; in vitro studies. 5. Ulusal nanobilim ve Nanoteknoloji Kongresi. 8-12 Haziran 2009,

Eskişehir

13. B. Uslu, S.Özbaş Turan, **E.Şalva**, F. Ercan, J.Akbuğa, S. Erbak. Kitozan DNA kompleks ve nanopartikül formülasyonlarının in vitro transfeksiyon etkinliğinin araştırılması. 19. Ulusal Elektron Mikroskopik Kongresi, 22-25 Haziran 2009, Trabzon.

14. **E.Şalva**, N.Özkan, S.Alan, N.Erdoğan, J.Akbuğa. Meme kanserinde nükleik asit temelli tedavide mast hücre varlığı. 20. Ulusal Patoloji Kongresi, 29 Eylül-3Ekim, Eskişehir, 2010. Turkish Journal of Pathology, cilt 26: 156, P-335, 2010.

Yürütücü olarak yer alınan ve Ulusal kuruluşlar tarafından desteklenen proje (proje adı, bütçesi ve destekleyen kuruluş)

1. **E. Şalva**, N. Özkan, F. Çakalağaoğlu, J.Akbuğa. "Moleküler patolojik tekniklerde ballı fiksatif" Marmara Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu (BAPKO) 2009-2012 (40.000 TL)

2. **E. Şalva**, S.O. Turan, J. Akbuğa. "siRNA'nın Kitozan Temelli Taşıyıcı Sistemler ile İnsan Meme Kanseri Hücrelerine Taşınması" 2010 yılı Novartis Farmasötik Teknoloji Proje Desteği, 2011- 2012 (15.000 TL)

3. **E. Şalva**, S.O. Turan, J. Akbuğa. "shRNA içeren kitozan nanoplekslerin in vitro stabilite ve gen inhibisyon etkinliklerinin araştırılması", İnönü Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu (BAP) 2012-2013 (24.500 TL)

4. **E. Şalva**, S.O. Turan, S. Alan, J. Akbuğa. "Glomerulonefrit tedavisinde siRNA taşıyıcı sistem olarak kitozan nanoplekslerinin kullanılması. TÜBİTAK, 3501 Kariyer Destek Projesi 2013-2016 (252.750 TL)

5. A. Kaymaz, **E. Şalva**. shVEGF içeren kitozan nanoplekslerinin meme kanser hücre hatlarında hücre invazyonu, proliferasyonu ve koloni oluşturma üzerine etkilerinin araştırılması. TÜBİTAK, 2209-B lisans projesi, 2016 (2500 TL).

6. **E. Şalva**, K. Kaban. Lentiviral vektörle NK hücre manipülasyonu ve eksozomlarının meme kanserinde etkinliği, İnönü Üniv. BAP, Sağlık-822 (07.12.2017- 19.10.2019) (50.000 TL)

7. **E. Şalva**, K. Kaban, S. Alan, S.S. Karadağlı, G. Kantarcı, J. Akbuğa. Bcl-2 Hedefli Sirna Yüklü NK-Kaynaklı Eksozomların Oluşturulması Ve Meme Kanseri Etkinliğinin Araştırılması, TÜBİTAK, 1001, 2018 (2018-2021) (360.000 TL)

Araştırmacı olarak yer alınan ve Ulusal kuruluşlar tarafından desteklenen proje (proje adı, bütçesi ve destekleyen kuruluş)

1. F. Çakalağaoğlu, **E.Şalva** "Anti ThyI glomerulonefrit deneysel modelinde Tacrolimus toksisitesinin immunohistokimyasal ve elektron mikroskop ile araştırılması" Marmara Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma fonu (BAPKO) 2003-2005 (10.000 TL)

2. **E.Şalva**, J. Akbuğa. "siRNA için uygun taşıyıcı sistem geliştirilmesi; in vitro ve in vivo çalışmalar" Marmara Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma fonu (BAPKO) 2006-2009 (20.000 TL).

3. **E.Şalva**, J. Akbuğa. "GM-CSF kodlayan gen taşıyıcı sistemler" TÜBİTAK (1002-b Hızlı destek) 2006-2008, (20.000 TL).

4. **E. Şalva**, J.Akbuğa. "Kanser tedavisinde siRNA uygulamaları için taşıyıcı sistem geliştirilmesi", Türk Kanser Araştırma ve Savaş kurumu, 2007-2010 (15.000 TL).

5. A.D.Sezer, S.Özbaş Turan, **E. Şalva**, J.Akbuğa. "Gen taşıyıcı nanopartiküller sistem geliştirilmesi" Marmara Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu (BAPKO) 2009-2011 (100.000 TL).

6. J.Akbuğa, S.O.Turan, **E. Şalva**, N. Özkan, L.Kabasakal. "PDGF-D ve PDGF-R siRNA:kitozan temelli sistemlerin sıçan meme kanseri modelinde etkinliğinin araştırılması" Marmara Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma fonu (BAPKO) 2012-2017 (50.000 TL)

7. M.S. Kaynak, **E. Şalva**, S. Günel, M. Geneş, Ü. Kayabaş. Brucella enfeksiyonlarının tedavi edilmesinde kullanılmak üzere antibiyotik içeren katı lipid partiküllerin geliştirilmesi ve karakterizasyonu, İnönü Üniv. BAP 2012- 2016 (19.000 TL)

8. **E. Şalva**, E. Yeşilada. İki farklı gene (VEGF-A ve VEGFR-2) özgü shRNA içeren vektör tasarımı ve bunun meme kanserinde gen susturma etkinliğinin araştırılması, İnönü Üniv. BAP 2016-2018 (17.000 TL).

9. S. Ünüvar, E. Şalva, R. Melekoğlu. Guanozin Trifosfat Yolağında Tetrahydrobiyopterin Bağımlı Nitrik Oksit Düzeylerindeki Değişikliklerin Gestasyonel Diabetes Mellitusta Değerlendirilmesi. İnönü Ün. BAP, Sağlık-1103, (09.05.2018-11.05.2020) (50.000 TL)
10. U. Özgen, M. Badem, S.Ö. Şener, N. Korkmaz, Ş. Akkaya, R. Aliyazıcıoğlu, S. Yıldırım, E. Şalva, K. Kaban, A.K. Şengül, A. Kandemir. Bazı Barbarea Türleri Üzerinde Biyolojik Aktivite Çalışmaları ve Fitokimyasal Çalışmalar. Karadeniz Teknik Ün. BAP, Sağlık, (09.03.2018-)
11. SO.Turan, E. Şalva, C. Ekentok, Çanak T. Meme kanser hücreleri ve meme kanser kök hücrelerinde gen tedavisi: VEGF'in kitozan/CRISPR-Cas9/protamin nanopleksleri ile baskılanması TUBİTAK, 3001 (2018), (60.000 TL).

Ulusal ve Uluslararası bilimsel, sanatsal, mesleki nitelikli ödül

1. Terry Fox Kanser Araştırma Proje Grant, 2007
2. TUBİTAK Yayın Teşvik Ödülü, 2010, 2011, 2012
3. Bildiri Birincilik Ödülü, Akademik Geriatri Kongresi, KKTC, 26-30 Mayıs 2010
4. Marmara Üniversitesi Yayın Teşvik Ödülü, İstanbul, 17 Aralık 2010
5. 2010 yılı Novartis Farmasötik Teknoloji Proje Destek Ödülü, 14 Nisan 2011
6. En iyi poster ödülü, Perspectives in Cell and Gene Based Medicines, 15-17 Mart 2012, Frankfurt, Almanya.
7. Poster 2.'lik ödülü. B. Özkavak, A. Özkan, C. Ekentok, E. Salva, S. Özbaş-Turan In Vitro Studies on Inhibition of Chitosan / siRNA Nanoplexes and Mammaglobin Gene Expression in Breast Cancer Cell Lines. Uluslararası İvek Bio Kongresi, 26-28 Kasım 2018, İstanbul, Türkiye.

Dinleyici olarak katıldığı bilimsel toplantılar ve kurslar:

1. 20-24 Nisan 1999, The First International Biosciences Days, Antalya
2. 19-20 Mayıs 1999, Experimental Research Workshop, Kayseri
3. 3-6 Mayıs 2000, IV.Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, İzmir
4. 17 Nisan 2004, Patolojide Temel Histopatolojik Laboratuvar Teknikleri, İstanbul
5. 15-21 Ağustos 2004, Biyoinformatik-II, Lisansüstü Yaz Okulu, İstanbul
6. 12-15 Eylül 2004, 12. International Pharmaceutical Technology Symposium, (IPTS) İstanbul
7. 2-3 Ekim 2004, Patoloji Teknik Elemanlar Uydu Toplantısı, Gaziantep
8. 3-6 Ekim 2004, 17. Ulusal Patoloji Sempozyumu, Gaziantep
9. 26 Ekim 2004, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deney Hayvanı Kullanımı ve Etik Yaklaşım, "Deney Hayvanları Kullanma Sertifikası" İstanbul
10. 16-19 Nisan 2005, 1. Ulusal Moleküler Tıp Kongresi, İstanbul
11. 16-19 Nisan 2005, 1. Ulusal Moleküler Tıp Kongresi, "Proteomik Kursu", İstanbul
12. 16-19 Nisan 2005, 1. Ulusal Moleküler Tıp Kongresi "Reproduktif Tıp ve Real-Time PCR Klinik Uygulaması Kursu", İstanbul
13. 9-13 Mayıs 2005, TUBİTAK, İleri Moleküler Hücre Biyolojisi Teknikleri Uygulamalı Eğitim Kursu- Gebze, Kocaeli
14. 25 Nisan 2006, Mikroskopi Semineri, İstanbul
15. 24-29 Haziran 2006, Federation of European Biochemical Societies, İstanbul
16. 27-30 Haziran 2006, VIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Malatya
17. 08-09 Kasım 2007, "Uygulamalı RNA İnterferans Kursu", Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara
18. 22-26 Aralık 2008, Eğitim Becerileri Kursu, Marmara Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İstanbul.
19. 5-8 Mayıs 2009, "Stem Cells:From analysis to clinical applications". III. International Congress of Molecular Medicine. İstanbul
20. 5-8 Mayıs 2009, "Genetics and Statistics, Quality Control". III. International Congress of Molecular Medicine. İstanbul
21. 3-4 Nisan 2009, 4. Ulusal Kanserli Hastalar Kongresi, Ankara.

22. 20 Kasım 2009, Nanofarmasötik: Gelişmeler ve Uygulamalar, Gazi Üniversitesi, Ankara
23. 13-16 Ocak 2010, Workshop on Current Trends in Molecular Nanobiosciences. Bilkent Üniversitesi, Ankara
24. 5 Mart 2010, I. Kök Hücre Sempozyumu. Marmara Üniversitesi, İstanbul.
25. 9 Şubat 2011, Mezenkimal Kök Hücre Kursu. İzmir İleri teknoloji Enstitüsü, İzmir.
26. 10-13 Şubat 2011, II. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi, İzmir.
27. 23 Aralık 2011, 2. Kök Hücre Sempozyumu, Marmara Üniversitesi, İstanbul.
28. Nanocarriers for gene silencing therapeutics workshop, 24-28 Haziran 2013, Aarhus University, Denmark.
29. Virus vectors and the gene therapy workshop, 19-22 Mart 2014, Ulm, Almanya.
30. Spring School-ESGCT, 20-22 Nisan 2016, Hannover, Almanya



EK 2. ETİK KURUL YAZISI

13 Nisan 2013 tarihli ve 28617 sayılı Resmi Gazete’de yayınlanan "Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik" gereğince bu tez çalışmasında etik kurul onayına gerek yoktur.

Prof.Dr.Elif YEŞİLADA

