

**T.C**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**BİRİNCİ JENERASYON ADENOVİRÜS ARACILI  
SİSTEMİK GEN AKTARIMININ DENEY  
HAYVAN MODELLERİNDE GİRİŞİMSSEL  
OLMAYAN YÖNTEMLERLE  
GÖRÜNTÜLENMESİ**

**Sevim KAHRAMAN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Antalya, 2009**

**T.C**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**BİRİNCİ JENERASYON ADENOVİRÜS ARACILI  
SİSTEMİK GEN AKTARIMININ DENEY  
HAYVAN MODELLERİNDE GİRİŞİMSSEL  
OLMAYAN YÖNTEMLERLE  
GÖRÜNTÜLENMESİ**

**Sevim KAHRAMAN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı**  
**Prof.Dr. Salih ŞANLIOĞLU**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi  
Tarafından desteklenmiştir.  
(Proje No: 2007.02.0122.016 )

**“Kaynakça Gösterilerek Tezinden Yararlanılabilir”**

**Antalya, 2009**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;**

Bu alışma, j¼rimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programında y¼ksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 15/06/2009

**Danışman:**

**Prof. Dr. Salih şANLIOğLU**

Akdeniz ¼niversitesi

Tıp Fak¼ltesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**¼ye:**

**Prof. Dr. H¼seyin BAğCI**

Akdeniz ¼niversitesi

Tıp Fak¼ltesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**¼ye:**

**Prof. Dr. Metin ERKILIÇ**

Akdeniz ¼niversitesi

Tıp Fak¼ltesi N¼kleer Tıp Anabilim Dalı

**¼ye:**

**Doç. Dr. İbrahim KESER**

Akdeniz ¼niversitesi

Tıp Fak¼ltesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**¼ye:**

**Doç. Dr. Ahter Dilşad şANLIOğLU**

Akdeniz ¼niversitesi

Tıp Fak¼ltesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**ONAY:**

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun .../.../2009 tarih ve .../.../... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**Prof.Dr. İsmail ¼ST¼NEL**

Enstit¼ M¼d¼r¼

## ÖZET

Moleküler görüntüleme, canlı organizmalardaki biyolojik olayların anlaşılmasını kolaylaştıran bir teknolojidir. Günümüzde belirteç gen ifadesinin girişimsel olmayan yöntemlerle *in vivo* olarak görüntülenmesi, cooled charge-coupled (CCD) kameraların kullanılmasıyla mümkündür. *In vivo* olarak belirteç gen ifadesinin takibi, hastalık modellerinde tedavi edici genin hedef hücredeki ifadesinin takip edilebilmesi açısından önemli bir yaklaşımdır. Belirteç gen ifadesinin organizmadaki ifade yeri, yoğunluğu ve süresi, girişimsel yöntemlere ihtiyaç duyulmaksızın belirlenebilmektedir.

Bu çalışmada, BALB/c farelerdeki transgen ifadesini *in vivo* olarak görüntüleyebilmek için yeni bir cihaz olan CCD kameranın kullanımı amaçlandı. Bu nedenle yeşil floresan protein geni taşıyan adenoviral vektörler (AdEGFP), BALB/c farelerin kuyruk veninden sistemik olarak farklı dozlarda enjekte edildi. Vektör enjeksiyonundan sonra, belirli zaman aralıklarında farelerdeki AdEGFP aracılı transgen ifadesi CCD kamera ile görüntüldü.

Sonuçlarımız, adenoviral vektörlerle sistemik gen transferi sonrasında transgen ifadesinin karaciğerde olduğunu ve sentez miktarının 4. gün en üst seviye ulaşarak sonraki günlerde azaldığını ve en az 30 gün boyunca CCD kamera ile takip edilebileceğini göstermiştir. Bunun yanı sıra, derin dokulardaki transgen sentezine bağlı sinyallerin, cerrahi yöntemler ile %36 daha kolay tespit edildiği gösterilmiştir. Bu bulgular, girişimsel olmayan görüntüleme tekniğinin canlı organizmalarda transgen ifadesinin yeri, miktarı ve süresi ile ilgili bilgi verici olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Girişimsel olmayan görüntüleme yöntemi, CCD kamera, EGFP, adenoviral vektör, gen tedavisi



## ABSTRACT

Molecular imaging is a technology that enhances our understanding of biological process in living organisms. Lately, noninvasive imaging of reporter gene expression *in vivo* became feasible by cooled charge-coupled device (CCD) camera. Tracing and quantifying the reporter gene expression *in vivo* is an important approach to monitor the expression of therapeutic genes in targeted tissues in disease models. Detection of the location, intensity, and time variation of reporter gene expression without need of invasive techniques is now possible.

For this reason, in this study we wanted to apply a new light detection CCD camera for *in vivo* imaging of EGFP transgene expression in BALB/c mice. Various titers of first generation adenoviral vectors encoding enhanced green fluorescent protein (AdEGFP) was injected into BALB/c mice via tail-vein. After vector administration, AdEGFP mediated transgene expression was imaged at different time points by using a CCD camera.

Our results showed that adenovirus delivered transgene expression was observed only in the liver after systemic vector administration. It peaked at day 4 and then remained detectable for at least 30 days by CCD camera. However, based on our results fluorescent signal detection in deep tissue could be enhanced 36% by surgical methods. These findings demonstrate that, noninvasive imaging provides functional data indicating the approximate location, magnitude, and duration of transgene expression for living organisms.

**Key words:** Non invasive imaging, CCD camera, EGFP, adenoviral vector, gene therapy

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca yol göstericiliği ve desteği için ve tez çalışmamda kurmuş olduğu Gen Tedavi Ünitesi'nin imkanlarından yararlanmamı sağladığı için danışman hocam Prof.Dr. Salih ŞANLIOĞLU'na,

Çalışmada ikinci danışmanım olarak görev aldığı süre boyunca verdiği destek ve tezime katkıları için Prof.Dr. Metin ERKILIÇ'a,

Tez çalışmama önerileri ile katkıda bulunan, destek ve ilgisini esirgemeyen Prof.Dr. Hüseyin BAĞCI'ya, Doç.Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU'na ve Dr. Thomas S. Griffith'e,

Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyeleri olan; Prof.Dr. Güven LÜLECI'ye, Prof.Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM'e, Doç.Dr. İbrahim KESER'e, Doç.Dr. Osman Nidai ÖZEŞ'e, Doç.Dr. Özgül ALPER'e ve Yard.Doç.Dr. Esra MANGUOĞLU'na,

Tez savunma sınavımda jüri üyeliği yapan hocalarıma ve yedek jüri üyesi olan Doç.Dr. Murat CANPOLAT'a,

Tez çalışmamda yardımcı araştırmacı olarak katkıda bulunan, destek ve ilgisini esirgemeyen Dr. Ercüment DİRİCE'ye,

Çalışmam süresince destekleri ve yardımları için Akdeniz Üniversitesi Gen Tedavi Ünitesi elemanları; Dr. Burçak Yoldaş'a, Araş.Gör.Dr. Atıl BİŞGİN'e, Araş.Gör. Çiğdem AYDIN ACAR'a, stajerimiz Fatma Zehra HAPİL'e ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına,

Yüksek lisans tez çalışmam ile ilgili resmi işlemleri yürüten Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Yüksek lisans tez sürecinde inançları ve göstermiş olduğu sabır ve destek için sevgili eşime,

Tüm eğitim hayatım boyunca yardımları ve desteklerini esirgemeyen sevgili babama, anneme ve abime içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>TEŞEKKÜR</b>	vi
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	vii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>	ix
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xii
<b>GİRİŞ ve AMAÇ</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	2
2.1. Gen Tedavisi	2
2.1.1. Gen Tedavi Vektörleri	2
2.1.2. Adenovirüsler	3
2.1.3. Adenovirüslerin Yapısı	3
2.1.4. Adenovirüslerin Hücre İçine Girişi	5
2.1.5. Adenoviral Replikasyon	6
2.1.6. Birinci Jenerasyon Adenoviral Vektörler	7
2.1.7. İkinci ve Üçüncü Jenerasyon Adenoviral Vektörler	8
2.1.8. Adenoviral Vektörlerle Yapılan <i>In Vitro</i> ve <i>In Vivo</i> Çalışmalar	9
2.1.9. Adenoviral Vektörlere Karşı Gelişen İmmün Yanıt	11
2.2. Gen Tedavisinde <i>In Vivo</i> Görüntüleme	13
2.2.1. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)	15
2.2.2. Pozitron Yayılım Tomografisi (PET)	16
2.2.3. Tek Foton Yayılımlı Bilgisayarlı Tomografi (SPECT)	16
2.2.4. Optik görüntüleme	16
2.2.4.1. Yeşil Floresan Protein (GFP)	16
2.2.4.2. Lusiferaz (luc)	17
2.2.4.3. CCD (Cooled Charge-Coupled Device) Kamera	18
2.2.4.4. <i>In Vivo</i> Floresan ve Luminesan Görüntüleme	19
2.2.4.5. Transgen İfadesinin <i>In Vivo</i> Optik Görüntülenmesi	21
2.2.4.6. Hücrelerin <i>In Vivo</i> Takibi	22
<b>MATERYAL ve YÖNTEMLER</b>	23
3.1. Birinci jenerasyon rekombinant adenoviral vektörlerin çoğaltılması ve saflaştırılması	23
3.1.1. Adenoviral vektörlerin HEK293 hücrelerinde çoğaltılması	24
3.1.2. Adenoviral vektörlerin izolasyonu	24
3.1.3. Adenoviral vektörlerin saflaştırılması	24
3.1.3.1. Kolonun hazırlanması	25
3.1.3.2. Kolondan adenoviral vektör solüsyonunun geçirilmesi	25
3.1.4. Plak Titreleme	25

3.2.	A549 hücrelerinin adenoviral vektörlerle transdükte edilmesi	26
3.3.	BALB/c farelere sistemik olarak farklı dozlarda adenoviral vektör enjeksiyonu	26
3.4.	BALB/c farelerin CCD kamera ile görüntülenmesi	27
3.4.1.	<i>In vivo</i> görüntülerin alınması	27
3.4.2.	Floresan görüntülerin bilgisayarda analizi	27
3.4.3.	<i>Ex vivo</i> floresan görüntülerin alınması ve analiz edilmesi	27
3.5.	İstatistiksel analiz	28
<b>BULGULAR</b>		<b>29</b>
4.1.	<i>In vivo</i> uygulamalar için yüksek kalitede adenoviral vektörler çoğaltıldı	29
4.2.	Sistemik olarak adenoviral vektör enjeksiyonundan sonra farelerin sadece abdominal bölgelerinden güçlü sinyaller alındı	30
4.3.	Sistemik olarak adenoviral vektör enjeksiyonundan sonra BALB/c farelerden alınan <i>in vivo</i> floresan sinyaller zamanla değişti	30
4.4.	<i>In vivo</i> floresan sinyal yoğunluğunun verilen vektör dozuna bağlı olduğu gösterildi	32
4.5.	Sistemik vektör enjeksiyonu sonrasında floresan sinyalin analizi ve <i>ex vivo</i> yerleşimi	33
4.6.	EGFP sentezinin karaciğere dağılım profili	34
4.7.	Dokunun derinliği, CCD kameranın <i>in vivo</i> floresan sinyal alımını etkilemektedir	36
<b>TARTIŞMA ve SONUÇLAR</b>		<b>38</b>
<b>KAYNAKLAR</b>		<b>41</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>		<b>50</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AAV:</b>	: Adeno-Associated Virus
<b>Ad</b>	: Adenovirüs
<b>AdEGFP</b>	: EGFP Geni Taşıyan Rekombinant Adenovirüs
<b>AdCMVLacZ:</b>	LacZ Geni Taşıyan Rekombinant Adenovirüs
<b>AIDS</b>	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
<b>AMP</b>	: Adenosine Mono Phosphate
<b>ATP</b>	: Adenosine Tri Phosphate
<b>BALB/c</b>	: Bagg Albino/c substrain
<b>CAR</b>	: Coxsackie Virus-Adenovirus Receptor
<b>CCD</b>	: Cooled Charge-Coupled Device
<b>cDNA</b>	: Complementary Deoxyribonucleic Acid
<b>CMV</b>	: Cytomegalo Virus
<b>CsCl</b>	: Sezyum Klorid
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>D2R</b>	: Dopamin 2 Reseptörü
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>EDTA</b>	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
<b>EGFP</b>	: Enhanced Green Fluorescent Protein
<b>FDG</b>	: 2-Floro-2-Deoksiglukoz
<b>FDA</b>	: Fluoresan Diasetat
<b>FOV</b>	: Field of View
<b>GFP</b>	: Green Fluorescent Protein
<b>h<math>\alpha</math>-AT</b>	: Human alpha-1-antitrypsin
<b>HEK</b>	: Human Embriyonic Kidney
<b>HCl</b>	: Hidroklorik Asit
<b>HSV1-tk</b>	: Herpes Simplex Virüs-Timidin Kinaz

<b>IFN<math>\gamma</math></b>	: İnterferon Gama
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>IP-10</b>	: Interferon Gamma Inducible Protein
<b>ITR</b>	: Inverted Term Repeat
<b>Luc</b>	: Lusiferaz
<b>KCl</b>	: Potasyum Klorid
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	: Potasyum Fosfat
<b>MCP-1</b>	: Monocyte Chemotactic Protein-1
<b>Mg</b>	: Magnezyum
<b>MHC</b>	: Major Histocompatibility Complex
<b>MIP</b>	: Macrophage Inflammatory Protein
<b>MOI</b>	: Multiplicity of Infection
<b>MRG</b>	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
<b>NaCl</b>	: Sodyum Klorid
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	: Sodyum Dihidrojen Fosfat
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	: Sodyum Bikarbonat
<b>NaOH</b>	: Sodyum Hidroksid
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	: Nuclear Factor Kappa B
<b>NK</b>	: Natural Killer
<b>NIS</b>	: Sodium Iodide Symporter
<b>OD<sub>260</sub></b>	: Optical Density 260
<b>pA</b>	: Poly Adenine
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffered Saline
<b>PET</b>	: Pozitron Elektron Tomografi
<b>PP</b>	: Pirozin Fosfat
<b>PRG</b>	: PET Reporter Gene
<b>RANTES</b>	: Regulated Upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
<b>Rb</b>	: Retinoblastoma
<b>Rpm</b>	: Revolutions Per Minute
<b>SPECT</b>	: Single Photon Emission Computational Tomography
<b>ssDBP</b>	: Single Strand DNA Binding Protein
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	: Tumor Necrosis Factor Alpha

**TP** : Terminal Protein  
**Vp** : Viral partikül

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Adenovirüs yapısı	4
2.2. Ad2 ve Ad5'in epitel hücre içine alınma mekanizması	5
2.3. Ad5 genomunda erken ve geç genlerin organizasyonu	6
2.4. Birinci jenerasyon rekombinant adenoviral vektör hazırlanışı	7
2.5. Rekombinant adenoviral vektör jenerasyonları	8
2.6. Adenoviral vektöre karşı oluşan immün yanıt	12
2.7. Küçük deney hayvanlarının <i>in vivo</i> görüntüleri ve görüntülerin alındığı cihazlar	14
2.8. GFP'nin üç boyutlu yapısının uzaysal görünümü	16
2.9. CCD kamera ve çalışma prensibi	18
2.10. <i>In vivo</i> luminesan ve floresan görüntüleme sistemleri	20
2.11. Dokuda ışığın izlediği yol	21
4.1. A549 hücrelerinin AdEGFP vektörleri ile transdüksiyonu	29
4.2. CCD kamera ile alınan görüntüler	30
4.3. Vektör enjeksiyonu sonrasında farelerin CCD kamera ile takibi	31
4.4. CCD kamera kullanımı için uygun vektör dozunun belirlenmesi	32
4.5. CCD kamera ile farenin major organların <i>ex vivo</i> analizi	33
4.6. CCD kamera ile karaciğerin <i>ex vivo</i> analizi	34
4.7. CCD kamera ile karaciğer loblarının <i>ex vivo</i> analizi	35
4.8. Doku derinliğinin CCD kamera hassasiyeti üzerindeki etkisi	37



## GİRİŞ ve AMAÇ

Gen tedavisinin temel amacı, hücrelerin hastalığa yol açan eksik ya da kusurlu genlerin yerine, sağlıklı kopyalarının hücreye yerleştirilmesidir. İlk başlarda genetik hastalıkların tedavisi amacıyla planlanan gen tedavisi, artık kanser gibi kompleks hastalıklardan AIDS gibi viral enfeksiyon hastalıklarına kadar pek çok hastalığın tedavisi için kullanılmaktadır. Bugüne kadar transgen sentezinin varlığı, ifade süresi, miktarı ve yeri enzim aktivite deneyleri ya da immünohistokimyasal boyamalar gibi girişimsel yöntemlerle gösterilmiştir. Bu yöntemlere alternatif olarak, son zamanlarda girişimsel olmayan *in vivo* görüntüleme teknikleri kullanılmaktadır. *In vivo* görüntüleme tekniği; uygulaması kolay, hızlı ve oldukça elverişli bir yöntemdir. Özellikle optik görüntüleme; MRG ya da PET gibi diğer karmaşık yöntemlerle karşılaştırıldığında, daha basit ve daha düşük maliyetli bir yöntemdir. Bu teknoloji sayesinde pek çok hücresel ve moleküler düzeydeki olaylar kolayca takip edilebilmektedir.

Gen tedavi çalışmalarında, *in vivo* belirteç gen ifadesinin görüntülenmesi, hastalık modellerinde tedavi edici genin hedef hücredeki ifadesinin takip edilebilmesi açısından önemli bir yaklaşımdır. Bu çalışmada, adenoviral vektörlerle farelere aktarılan yeşil floresan protein gen ifadesinin floresan optik görüntüleme tekniği kullanılarak gösterilmesi amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra, floresan optik görüntüleme sisteminin belirteç gen ürünlerini görüntülemeadaki etkinliği ve hassasiyeti araştırılmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### 2. 1. Gen Tedavisi

Klinik uygulamalarda, dokulara gen transferi yaklaşık yarım yüzyıldır düşünülen bir konudur. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesiyle birlikte genetik materyalin işlenebilir olması, bu düşünceyi uygulamaya geçirmiştir. Gen tedavisi, ilk başlarda genetik hastalıkların (örneğin; kistik fibroz, bağışıklık sistem bozuklukları, kas distrofisi, hemofili ya da hatalı genlerin neden olduğu kanser gibi kompleks hastalıkların) tedavisi amacıyla planlanmıştır. Fakat, diğer bazı hastalıklar için uygun tedavinin olmaması, gen tedavisinin kullanım alanını genişletmiş ve gen tedavisi genetik hastalıkların dışında, pek çok hastalığın araştırılmasında kullanılmaya başlanmıştır. Gen tedavisi, hala gelişim aşamasındadır ve biyoteknolojik ilerlemelerle birlikte, 20 yıl içerisinde klinik uygulamalardaki yerini alacağı düşünülmektedir [1].

Gen transfer vektörleri kullanılarak yapılan ilk klinik gen tedavisi, 1990 yılında rapor edilmiştir [2]. Bu çalışmadan sonra, gen tedavi çalışmaları artmış ve 1340'dan fazla klinik gen tedavi denemesi rapor edilmiştir. 28 ülkede, 100'den fazla farklı gen kullanılarak klinik gen tedavi denemeleri yapılmıştır [3].

#### 2.1.1. Gen Tedavi Vektörleri

Gen transferinin en kolay yolu, transgeni içeren çıplak DNA'yı dokuya enjekte etmektir. Fakat, bu yolun gen transfer etkinliği düşük olduğundan, yeni moleküllere ve metodlara ihtiyaç duyulmuştur. Bu nedenle, hedef hücrelerin çekirdeğine gen transfer etmek, bu genin hücre içinde yıkımına karşı koruma oluşturmak ve gen transkripsiyonunu sağlamak gibi birçok işlevi yerine getirebilen vektörler tasarlanmıştır. Gen tedavi vektörlerinin, güvenli ve hedefe özgü olmasıyla birlikte, yıkıma ve immün atağa karşı korunmalı olmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte, gen tedavi vektörlerinin maliyetinin az olması, yüksek yoğunlukta ve fazla miktarda üretilebilmesi ve saflaştırılmasının kolay olması istenmektedir. Ayrıca, ideal bir vektörün klinik uygulamalar için de elverişli olması gerekmektedir [4]. Hücrelere gen aktarımında, viral (retroviral, adenoviral, adeno benzeri viral vektörler gibi) ya da viral olmayan (elektroporasyon, gen tabancası, lipozomlar gibi) yöntemler kullanılmaktadır. Her yöntemin farklı avantajları ve dezavantajları vardır. Örneğin; viral vektörler gen transferinde oldukça etkilidirler, fakat *in vivo* koşullarda immün yanıt oluştururlar. Viral olmayan vektörler ise toksik olmaması ve immün cevabı uyandırmaması açısından *in vivo* uygulamalarda daha güvenlidirler. Fakat, gen transferinde viral vektörler kadar etkili gen aktarımı yapamazlar. Şimdiye kadar rapor edilen klinik gen tedavi çalışmalarının yaklaşık %70'inde viral vektörler kullanılmıştır [3]. Viral vektörler ile *in vivo* gen aktarımında iki gereksinim vardır. Birincisi, hedef hücrenin virüs enfeksiyonu için uygun olması, ikincisi ise sadece hedef hücrelere özgü, kolay ve etkili transdüksiyon yapılarak uzun süre transgen sentezinin sağlanmasıdır.

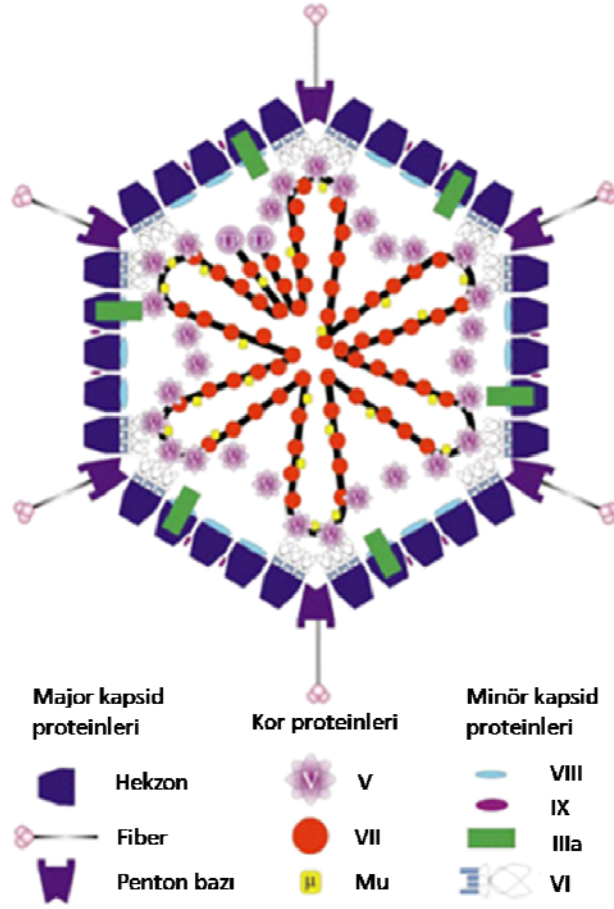
İnsan gen tedavi çalışmalarında ilk kez kullanılan vektörler, fare retrovirüslerinden oluşturulan vektörlerdir. Viral genleri çıkartılan rekombinant retrovirüsler, çoğunlukla hayvan modellerinde çalışılmış ve bu vektörlerin kalıcı, fakat az sayıda hücrede transgen sentezi sağlayabildiği gösterilmiştir. Retroviral vektörlerin sadece bölünebilen hücreleri enfekte edebilmesi, bu vektörün kullanım alanını kısıtlamaktadır. Bununla birlikte, retroviral genomun konak genomuna yerleşmesi sonucunda, kalıcı transgen sentezi sağlanmaktadır. Viral genomun, konak genomunda rastgele yerleşimi, konak genlerinde mutasyon oluşturarak malignansi riski taşımaktadır. Ayrıca, retroviral vektörlerin yüksek yoğunlukta üretilmesi ve saflaştırılması oldukça zordur. Adenoviral vektörlerin yüksek yoğunluklarda üretilmesinin ve saflaştırılmasının kolay olması, bölünmeyen hücreleri de transdükte edebilmesi, bu vektörlerin *in vivo* gen tedavisinde kullanımını gündeme getirmiştir. Ayrıca, deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda birçok dokuda, yüksek seviyede gen transferi yapabildiği, fakat immün sistemi uyardığı gösterilmiştir [5].

### 2.1.2. Adenovirüsler

Adenovirüsler (Ad) ilk kez 1953 yılında, insan adenoid doku kültüründen izole edilmiş [6] ve adenovirüs ismi Enders ve arkadaşları tarafından verilmiştir [7]. O zamandan bu yana 50'den fazla insan adenovirüs serotipi izole edilerek, karakterize edilmiştir. Memeli, kuş, sürüngen, amfibi ve balık türlerinde *Adenoviridae* ailesine ait birçok adenovirüs serotipi olduğu belirlenmiştir. İnsan adenovirüs serotipleri, genetik çeşitliliğe ve virüs DNA'sının GC içeriğine göre altı alt gruplara ayrılmıştır (A, B, C, D, E ve F alt grupları). Yapısı ve biyolojisi iyi bilindiği için, gen tedavi çalışmalarında çoğunlukla C alt grubunun 2. ve 5. serotipleri kullanılmaktadır [8]. Adenovirüslerin farklı serotipleri farklı organları hedefleyerek akut enfeksiyonlara neden olurlar. Örneğin, Ad1, Ad2 ve Ad5 serotipleri çocuklarda üst solunum yolu enfeksiyonlarına, A ve F alt grubu adenovirüsler, gastrointestinal yolların enfeksiyonuna, bazı serotipler zatüre (Ad4 ve Ad7) ya da meningoensefalit (Ad7, Ad12, Ad32) gibi ölümcül hastalıklara sebep olurlar. Diğer bazı serotiplerin ise kemirgenlerde onkojenik olduğu belirlenmiş, fakat şimdiye kadar adenovirüslerin insanlarda malignansi ile ilişkisi gösterilmemiştir [9].

### 2.1.3. Adenovirüslerin Yapısı

Adenovirüsler; zarfsız, yaklaşık 90 nm çapında, yirmi yüzlü protein kapsidten oluşan ve kapsidin içinde yaklaşık 36 kilobaz büyüklüğünde çift iplikli DNA bulunan, 150 MDa ağırlığındaki partiküllerdir. Yirmi üçgen yüzü ve on iki köşesi olan adenovirüs kapsidi üç major protein içerir; hekzon, penton bazı ve fiber proteinleri. Kapsidin yüzleri 240 adet hekzon proteininden, köşeleri ise 12 adet penton proteininden oluşur. Her köşeden bir fiber proteini dışarı doğru uzanır. Bu üç major kapsid proteinine ek olarak, kapsid yapısını sabitleyen minör kapsid proteinleri bulunmaktadır; IIIa, VI, VIII ve IX. Kapsid içerisinde de DNA'nın paketlenmesini sağlayan histon benzeri viral kor proteinleri bulunur; V, VII, Mu ve TP. Bu proteinlerden VII, DNA'yı sararak paketler, TP (terminal protein) ise DNA zincirinin 5' uçlarına bağlanır (Şekil 2.1). Bununla birlikte, virion içerisinde adenovirüsün hücre içi endozomdan kaçmak için kullandığı düşünülen adenoviral proteazlar bulunur [10].



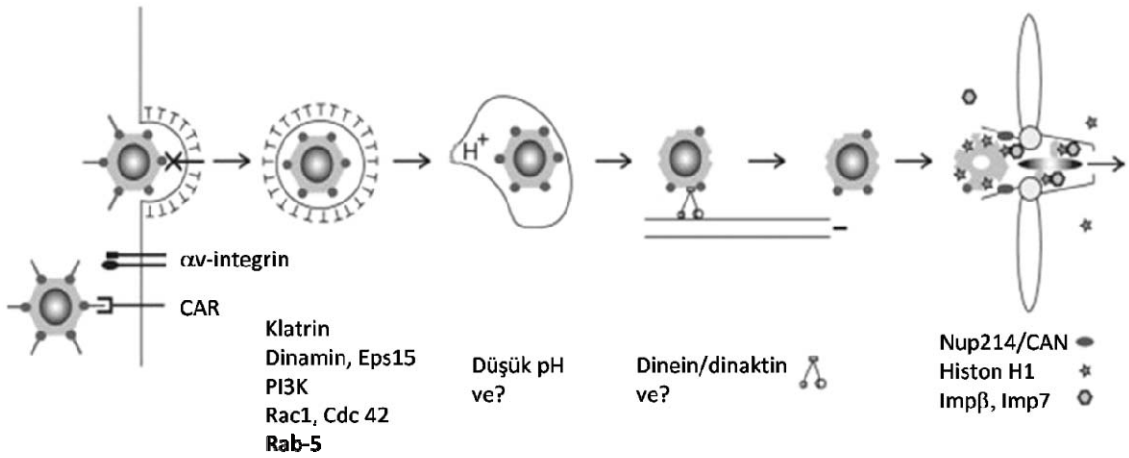
Şekil 2.1. Adenovirüs yapısı [11].

Major kapsid proteinleri, adenovirüsün çevresiyle bağlantısını sağlayan bazı özelliklere sahiptir. Örneğin; hekzon proteinleri *in vivo* koşullarda nötralize edici antikorlar tarafından hedef alınır. Hekzon proteinlerinin yapısındaki dışarı doğru katlanmış yapılara bağlanan nötralize edici antikorlar bu şekilde virüsü nötralize ederler. Farklı adenovirüs serotipleri karşılaştırıldığında, çoğunlukla hekzon katlantılarında farklılıklar olduğu belirlenmiştir [12]. Adenovirüs kapsidinin köşelerinde yer alan penton bazları ise, virüsün hücre içine alınmasında rol oynar. Ad2 ve Ad5 kapsidinin penton bazında yer alan amino asit motifi, arjinin-glisin-aspartat (RGD), hücre yüzeyindeki  $\alpha_v\beta_3$  ve  $\alpha_v\beta_5$  integrinlere bağlanır. Bu bağlanma, virüsün etkili bir şekilde hücre içine alınmasını sağlar [13]. Diğer bir major kapsid proteini olan fiber proteini de yine virüsün hücre içine alınmasında görev yapar. Fiber proteini; baz, şaft ve topuz olmak üzere üç birimden oluşur. Baz birimi; N-terminalinde penton bazı, C-terminalinde şaft ile bağlantılıdır. Şaft, 15 amino asitlik farklı sayılarda tekrar eden diziler içerir ve tekrar sayısına bağlı olarak şaftın uzunluğu değişir. Şaft uzunluğunun, adenovirüslerin hücre yüzeyine bağlanmasında etkili olduğu, şaft kısa ise adenovirüs-hücre bağlantılarının sterik engellenmeden dolayı zayıf olduğu belirlenmiştir [14]. Fiber proteininin diğer bir birimi olan topuz ise hedef hücre yüzeyindeki coxsackievirüs-adenovirüs reseptörlerine (CAR) bağlanmada rol oynar [15]. Adenovirüs-hücre arasında CAR ve integrin proteinleri ile kapsid proteinlerinin bağlantıları sağlandığında adenovirüs hücre içine alınır. A,

C, D, E, F alt grubu adenovirüsler için CAR proteini yüksek afiniteli bir reseptör görevi yapar. Coxsackie virüsleri ve adenovirüsler için ortak reseptör görevi gördüğü için “Coxsackie virüs-Adenovirüs Reseptörü” ismini almıştır [16]. CAR proteini, iki adet ekstraselüler immünoglobulin benzeri birime sahip, 46 kDa ağırlığında bir membran proteinidir. Mürin CAR homologunun, insan CAR proteini ile oldukça benzer yapı gösterdiği [17] ve insan CAR reseptörü gibi görev yaptığı belirlenmiştir [18]. CAR proteininin, coxsackie virüs ve adenovirüsler için reseptör olarak görev yapması dışında fonksiyonu henüz bilinmemektedir.

#### 2.1.4. Adenovirüslerin Hücre İçine Girişi

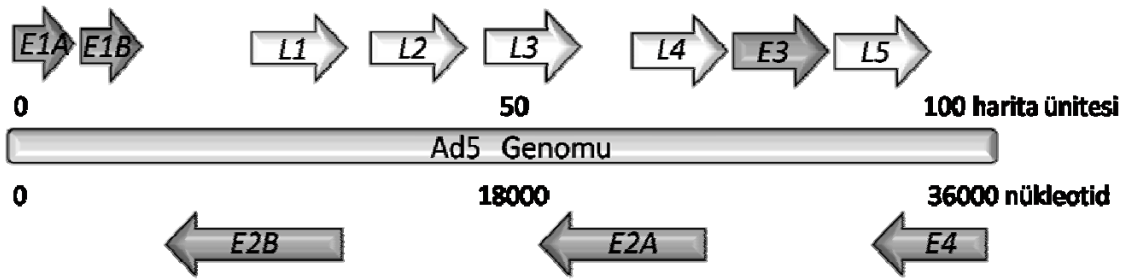
Ad2 ve Ad5’in konak hücre içine girerek, genomlarını çekirdeğe aktarma mekanizması 1997’de CAR proteinin bulunmasıyla daha iyi anlaşılmıştır. Adenovirüsler, fiber proteinin C-terminalinde yer alan topuz birimleri ile hücre yüzeyindeki CAR proteinlerine bağlanırlar. Adenovirüslerin hücre içine alınması için ikinci bir bağlanma daha gereklidir. Bu bağlanma, adenovirüsün penton bazı üzerindeki RGD motifi ile hücre yüzeyindeki  $\alpha v$  integrinler arasında gerçekleşir. Bu bağlanmalar sonucunda, adenovirüs partikülünün klatrin aracılı endositozu tetiklenir ve adenovirüs asidik erken endozom içine alınır. Adenovirüsler, endozomdan kaçabilmek için bazı stratejiler geliştirmişlerdir. Örneğin, penton bazının  $\alpha v$ -integrin ile bağlanması sonucu endozom zarının geçirgenliği artırılır. Aynı zamanda, asidik ortamda aktive olan viral proteazlar kapsid proteinlerini değişime uğrattırır. Adenovirüsler, değişime uğrayan kapsid proteinlerinin yardımıyla endozomdan hızlıca kaçarlar. Böylece adenovirüslerin yaklaşık %90’ı 5 dakika içinde sitozole salınmış olur. Sitoplazmadaki virüs partikülleri, mikrotübüller üzerinden hızlıca çekirdeğe doğru ilerlerler ve hücreye girişinden yaklaşık 40 dakika sonra çekirdek por kompleksine ulaşmış olurlar. Çekirdek por kompleks reseptörüne (Nup214/CAN) tutunduktan sonra adenovirüs genomu kapsidten ayrılır ve kor protein VII ve terminal proteinlerle birlikte viral genom çekirdek içine girer [19]. Bu mekanizma Şekil 2.2’de gösterilmektedir [20]. Floresan madde ile işaretlenen adenoviral vektörlerin hücre içinde kullandığı yol takip edilmiş ve adenoviral vektörlerin %80’den fazlasının bir saat içerisinde çekirdeğe girdiği gösterilmiştir [21].



Şekil 2.2. Ad2 ve Ad5’in epitel hücre içine alınma mekanizması [20].

### 2.1.5. Adenoviral Replikasyon

Adenovirüsler, hücre çekirdeğine girdikten sonra hızlıca genlerini transkribe ederler. Bu genler; erken (E) ve geç (L) genler olmak üzere ikiye ayrılır (Şekil 2.3). Aynı şekilde, adenovirüslerin enfeksiyon döngüsü de erken faz ve geç faz olarak ikiye ayrılabilir. Erken faz; virüsün konak hücreye girişini ve virüs genomunun çekirdeğe aktarılışını takiben, erken genlerin ifadesini kapsar. Geç faz ise; geç genlerin ifadesini ve adenovirüs partikülünün paketlenmesini kapsar. Erken fazda, viral DNA replikasyonunu ve geç genlerin ifadesini kolaylaştırmak amacıyla konak hücre görevleri yönlendirilir. Böylece, yapısal proteinlerin çekirdekte toplanmasına ve enfeksiyöz virüsün olgunlaşmasına olanak sağlanır. Erken faz, dış faktörlere bağlı olarak değişmekle birlikte yaklaşık olarak 6-8 saat içinde tamamlanırken, geç faz 4-6 saat içinde tamamlanır [11].



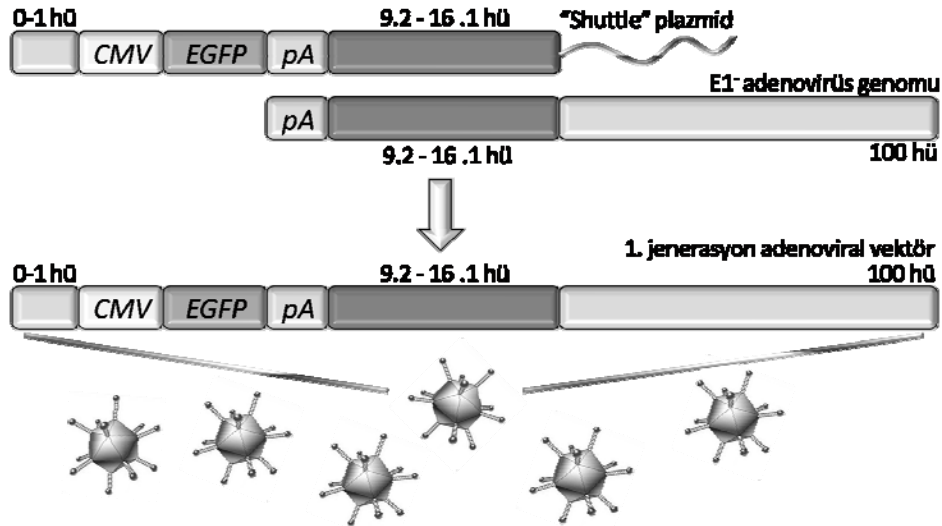
Şekil 2.3. Ad5 genomunda erken ve geç genlerin organizasyonu. 1 harita ünitesi (hü), 360 nükleotidi göstermektedir. Şekil 8. kaynaktan uyarlanmıştır.

Viral replikasyonun erken fazında, genomun dört ayrı bölgesinde yer alan erken genler ifade olur; E1, E2, E3 ve E4. Bu erken genler, viral gen transkripsiyonunun esas düzenleyicilerdir [22]. E1 geni, E1A ve E1B geni olmak üzere ikiye ayrılır. İlk ifade olan viral gen E1A genidir ve iki farklı ürün oluşturur. Bu ürünlerden biri, birçok hücrel transkripsiyon faktörü ile bağlantı kurarak erken viral genlerin transkripsiyonuna öncülük eder. Diğer E1A gen ürünü ise konak hücrenin S fazına girişini baskılayan retinoblastoma proteini (Rb) ile bağlantı kurarak, hücrenin S fazına girişi kolaylaştırır ve DNA replikasyonu için gerekli olan hücrel genlerin sentezine öncülük eder. E1A öncülüğünde oluşan E1B proteini, p53 ile bağlantı kurarak apoptotik yolu engeller ve böylece virüsün çoğalması için yeterli süre sağlanır. E2 bölgesi ise viral DNA replikasyonu için gerekli olan; DNA polimeraz, tek zincirli DNA'ya bağlanma proteini (ssDBP) ve öncül terminal proteini kodlar [19]. E3 bölgesi, immün baskılayıcı görevi olan oldukça önemli proteinleri kodlar. Örneğin, kodladığı proteinlerden biri (gp19K), MHC sınıf I ağır zincirine bağlanır ve MHC sınıf I moleküllerinin hücre yüzeyine geçişini engelleyerek sitotoksik T lenfosit aracılı tanınmayı önler. Ayrıca, MHC sınıf I proteininin sentezini geciktirir [11]. E3 bölgesinin işlevi için E1 ürününe ihtiyaç vardır. Dolayısıyla E1 bölgesi çıkartılmış adenovirüslerde, E3 bölgesi işlev göremez. E4 bölgesi, hücrel genler içinden viral genlere seçim avantajı sağlayarak viral hayat döngüsünde oldukça önemli rol oynar. Örneğin, E4-ORF3 ve ORF6 proteinleri hücrel gen transkriptlerinin çekirdekte sitozole geçişini engellerken, geç viral gen transkriptlerinin sitozole geçişine olanak sağlar [19]. Bu dört erken gen transkripti, viral DNA replikasyonundan önce üretilir ve böylece DNA replikasyonu için gerekli

proteinlerin sentezi gerçekleşir. E2 ve E4 gen ürünleri, geç gen (L1, L2, L3, L4 ve L5) transkriptlerinin üretilmesi için gereklidir [23]. Viral enfeksiyondan yaklaşık altı saat sonra kapsid proteinlerini kodlayan geç genler ifade olur. Bu sırada viral DNA replikasyonu da gerçekleşir. Yeni oluşan virionların çekirdek içerisinde paketlenmesi için kapsid proteinleri çekirdeğe geçer. Enfeksiyondan yaklaşık sekiz saat sonra çekirdek içinde virüs paketlenmesi gerçekleşir ve enfeksiyondan yaklaşık 30-40 saat sonra da hücre lizisi gerçekleşerek  $10^4$ - $10^5$  virüs partikülü salınır. Böylece viral yaşam döngüsü tamamlanmış olur [8].

### 2.1.6. Birinci Jenerasyon Adenoviral Vektörler

Yabani tip adenovirüs enfeksiyonları genellikle hafif seyirli olsa da, gen transferlerinde  $E1^+$  adenoviral vektörler kullanmak, konakta oluşacak yangı cevabı açısından potansiyel bir risk oluşturur. Bağışıklık sistemi bozuk konaklarda, adenoviral replikasyonun ilerleyerek enfeksiyonun baskın hale gelmesi söz konusu olabilir. E1A ürünleri, hem DNA replikasyonu hem de erken ve geç genlerin ifadesi için gerekli olduğundan, viral replikasyonu engellemenin en kestirme yolu E1A genlerinin viral genomdan çıkartılmasıdır [24]. Birçok laboratuvar, birinci jenerasyon adenoviral vektör elde etmek için, “shuttle” plazmid ve E1 geni çıkartılmış adenovirüs genomu arasında homolog rekombinasyonu kapsayan standart metodu uygulamaktadır (Şekil 2.4) [25]. Hazırlanan  $E1^-$  adenoviral vektörlerin çoğaltılabilmesi için insan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK 293) kullanılmaktadır. HEK 293 hücre hattı, primer hücrelerin Ad5 vektörleri ile transforme edilmesi sonucu 1977 yılında Frank Graham tarafından oluşturulmuş özel bir hücre soyudur. 293 hücreleri, Ad5 genomunun E1 geni dahil, yaklaşık 11 harita ünitelik DNA’sını içermektedir [26].

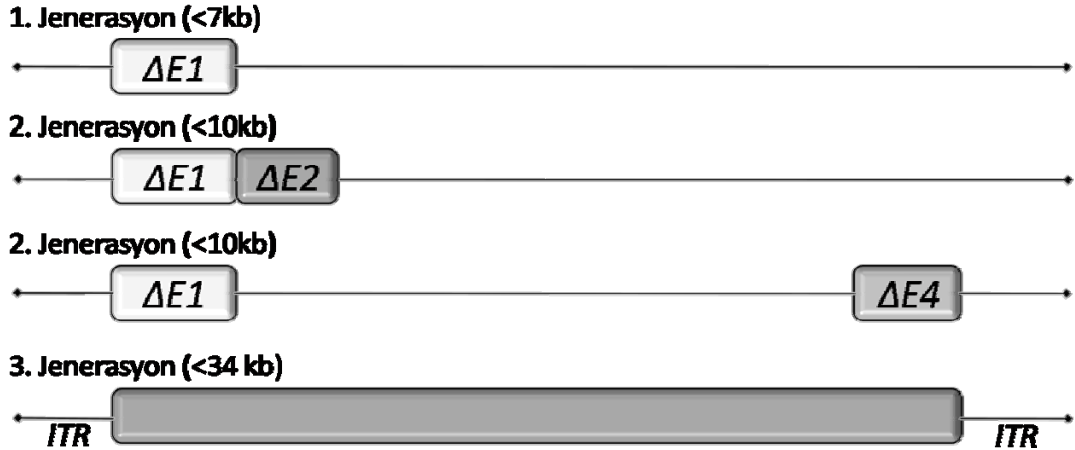


**Şekil 2.4.** Birinci jenerasyon rekombinant adenoviral vektör hazırlanışı. Shuttle plazmid; terminal tekrarlar ve replikasyon orijini (0-1 hü), güçlü bir promotor (CMV), transgen (EGFP), poliadenilasyon bölgesi (pA) ve adenovirüs genomunun bir parçasını (9.2-16.1 hü) içerir. E1 geni çıkartılmış adenovirüs genomu ise poliA bölgesi ve adenovirüs genomunun bir parçasını (9.2-100 hü) içerir. 9.2-16.1 hü bölgelerinin eşleşmesi sonucu homolog rekombinasyon gerçekleşir ve böylece birinci jenerasyon adenoviral vektörler oluşturulur. Şekil 25. kaynaktan uyarlanmıştır.

Birinci jenerasyon adenovirüslerde, E1 ile birlikte E3 bölgesi de çıkartılarak transgen kapasitesi 8 kilobaza yükseltilebilir. *In vitro* koşullarda E3 bölgesi zorunlu değildir ve E3 geninin çıkartılması replikasyon kusurlu adenovirüslerin çoğalmasını etkilemez. Ayrıca, E1 fonksiyonu olmadan E3 promotörü çalışmayacağı için, E3 geninin kaybı önemli olmayacaktır. E1<sup>-</sup> ve E1<sup>-</sup>/E3<sup>-</sup> virüsler, birinci jenerasyon adenoviral vektörleri oluştururlar [24].

### 2.1.7. İkinci ve Üçüncü Jenerasyon Adenoviral Vektörler

Birinci jenerasyon vektörlerle yapılan gen tedavi çalışmaları sonucu, bu vektörlerin immün cevabı uyandırdığı ve transgen sentezinin kısa süreli olduğu belirlenmiştir. E1 geni çıkarılmış olmasına rağmen, birinci jenerasyon adenoviral vektörlerle enfekte edilen hücrelerde, düşük seviyede erken ve geç viral gen ifadesi gözlenmiştir [27]. Bunun sebebi tam olarak açıklanamamış, fakat hücresel E1 benzeri faktörlerin aktivitesi sonucu olduğu ileri sürülmüştür. Bu viral proteinlerin immün sistem hücrelerine sunulması ile sitotoksik T lenfosit aracılı immün cevap gelişmekte ve vektör ile enfekte olan hücreler yıkılarak, transgen ifadesi kısa süreli olmaktadır [28]. Bu dezavantajların üstesinden gelmek, ayrıca transgen kapasitesini artırmak amacıyla, E1 ile birlikte E2 veya E4 geni çıkartılarak ya da inaktive edilerek ikinci jenerasyon adenoviral vektörler oluşturulmuştur. İkinci jenerasyon adenoviral vektörler daha az immünojenik bulunmuştur [4]. E1 ve E2A genleri çıkartılmış adenovirüslerle enfekte edilen farelerde uzun süreli transgen sentezinin olduğu ve daha az immün cevap uyandırdığı gösterilmiştir [29].



Şekil 2.5. Rekombinant adenoviral vektör jenerasyonları. Dikdörtgen içine alınan bölgeler adenovirüs genomundan çıkartılan genleri göstermektedir. Şekil referans 4'ten uyarlanmıştır.

Üçüncü jenerasyon vektörler ya da “gutless” vektörler, terminal tekrar dizileri (ITR) ve paketlenme sinyal dizileri dışında tüm adenovirüs genomunun çıkartılmasıyla oluşturulmuştur. Bu sayede, üçüncü jenerasyon vektörlerin 34 kb transgen alabilme kapasitesi vardır ve immünojenik özellikleri oldukça azalmıştır. Tüm genlerinin çıkartılmış olması sebebiyle, üçüncü jenerasyon vektörler ancak özel hücre hatları kullanılarak çoğaltılabilirler [4].



Adenoviral vektörler, gen tedavi çalışmalarında en sıklıkla kullanılan vektörlerdir. Adenoviral vektörleri, hücre kültüründe çoğaltmak ve işlemek oldukça kolaydır. Ayrıca *in vivo* ve *in vitro* koşullarda bölünen ya da bölünmeyen birçok hücre tipini enfekte edebilirler. En önemli avantajları, oldukça etkili transdüksiyon yapabilmeleri ve konak hücrelerde yüksek düzeyde gen ifadesi sağlamalarıdır. Bununla birlikte, adenovirüs genomu konak hücre genomuna yerleşmediği için “insersiyonel mutagenез” riski taşımaz. Fakat, aynı sebepten ötürü transgen ifadesi geçici olmaktadır. Diğer bir dezavantajı ise, adenoviral vektörlerin immünojenik özellikte olmasından dolayı transgen ifadesinin kısa süreli olmasıdır [3].

### 2.1.8. Adenoviral Vektörlerle Yapılan *In Vitro* ve *In Vivo* Çalışmalar

Rekombinant DNA teknolojisinden yararlanarak, farklı promotörleri ya da farklı transgenleri taşıyan adenoviral vektörler oluşturmak mümkündür. Araştırmalarda, çoğunlukla  $\beta$ -galaktozidaz, lusiferaz ya da yeşil floresan protein gibi belirteç genler taşıyan adenoviral vektörler kullanılmaktadır.

Belirteç gen taşıyan adenoviral vektörler ile farklı primer hücrelere ya da hücre hatlarına gen aktarımı yapılarak, bu vektörlerin etkinliği kolayca belirlenebilmektedir. Örneğin, bazı primer epitel hücreler adenovirüslerle kolaylıkla transdükte olurken, endotel, fibroblast, hematopoietik hücreler, birçok tümör hücresi, iskelet ve düz kas hücreleri adenoviral vektör transdüksiyonuna dirençlidir [30]. Adenoviral vektörlerle transdükte olabilen hücreler, adenoviral gen tedavisinin uygulanacağı aday hastalık modellerinin belirlenmesinde yardımcı olmaktadır.

Adenoviral vektörlerin transdüksiyon etkinliği, bu vektörlerin hücre içine alınmasında görevli olan proteinlerin (CAR ve  $\alpha$ -integrinlerin) hücrelerdeki sentez miktarlarına bağlı olarak değişmektedir. Eğer hücre yüzeyinde  $\alpha$ -integrin sentezi yoksa, adenoviral vektörlerin hücre içine alımı yavaş olmaktadır. Eğer CAR sentezi yoksa,  $\alpha$ -integrin sentezininin olmadığı duruma göre çok daha düşük etkinlikte transdüksiyon gerçekleşmektedir. Hem  $\alpha$ -integrin hem de CAR sentezinin olmadığı hücre tiplerinin ise adenoviral transdüksiyona karşı dirençli olduğu gösterilmiştir [31]. CAR ve  $\alpha$ -integrinlerin dokulardaki dağılımları, farklı türler arasında değişiklik göstermektedir. Mürinlerde, CAR proteininin en fazla karaciğerde sentezlendiği,  $\alpha$ -integrinlerin ise farklı dokular arasında daha homojen dağılım gösterdiği bulunmuştur [32]. Tüm hücrelerde CAR ve  $\alpha$ -integrin sentezinin yüksek olmaması nedeniyle, adenoviral gen transferleri her hücre tipinde yüksek etkinlikle gerçekleşmez. İnsan CAR proteinine sahip transgenik farelerle yapılan bir çalışmada, normalde adenovirüs transdüksiyonuna dirençli olan hücrelerin, adenoviral vektörlerle kolayca transdükte olabildiği gösterilmiştir [31].

Mürlere sistemik olarak, adenoviral vektör verildiğinde transgen sentezi yüksek oranda karaciğerde, çok düşük oranlarda ise kalp, dalak, böbrek, beyin ve akciğerlerde gerçekleşmektedir [33-35]. Bu organlardaki transdüksiyon oranlarının aslında, organlardaki CAR ve  $\alpha$ -integrinlerin sentez profiline çok fazla uymadığı görülmüştür. Bunun sebebi olarak, adenoviral vektörlerin *in vivo* koşullarda anatomik bariyerlere takıldığı ve bazı dokulara ulaşamadığı gösterilmiştir. Bu

anatomik bariyerlerin, vasküler endotelyum ve subendotel matris olduğu düşünülmektedir. Kalp, akciğer, kas ve beyin gibi birçok organda vasküler endotelyum oldukça sıkıdır ve bazal bir membran üzerinde yer alır. Ayrıca, kan damarları yoğun interselüler bağ doku ile çevrilidir. Bu durum adenovirüslerin geçişini tamamen ya da kısmen engellemektedir. Aksine; karaciğer, dalak ve kemik iliği gibi birçok organ, 100 nm çapına varan porlara sahip, geniş aralıklı bazal membran ve gevşek bağ dokusu içermektedir. Bu nedenle adenovirüsler, reseptörleri olduğu müddetçe, bu organlara kolaylıkla ulaşabilmektedirler. Karaciğerin geniş endotelial porlara sahip olması ve her iki reseptörünün olmasından dolayı adenoviral vektörlerle etkili bir şekilde transdükte edildiği düşünülmektedir. Dalak, geniş porlara sahip olmasına rağmen, düşük seviyede CAR ve  $\alpha$ -integrin sentezinden dolayı adenoviral transdüksiyona dirençlidir [32]. Topuzu ve fiber bazının RGD motifi mutant olan Ad vektörler sistemik olarak verildiğinde karaciğer transdüksiyonunun 270 kattan fazla azaldığı gösterilmiştir. Bunlara ek olarak, şaft proteini de mutant olan, üçlü mutant Ad vektörler sisteme verildiğinde, karaciğer transdüksiyonu 30.000 kattan fazla azalmıştır [14].

Karaciğer dışındaki organlara etkili gen aktarımı yapabilmek için, kapsid proteinleri değiştirilmiş adenoviral vektörler kullanılmakta ya da direkt hedef bölgeye adenoviral vektör enjeksiyonu uygulanmaktadır. Örneğin; mesane [36], kas, tükürük bezleri [37], beyin, prostat, kemik iliği [38], pankreas [39], akciğer [40], tümör dokusu [41] gibi dokulara adenoviral vektörlerle bölgesel gen aktarımı uygulanmıştır.

*In vivo* koşullarda adenoviral vektör aracılı gen aktarım etkinliği; vektörün uygulanış yeri, alıcının yaşı ve genetik yapısı gibi pek çok parametreye bağlıdır. Adenoviral vektör aracılı gen tedavisinde, hedeflenen dokuda yüksek transdüksiyon etkinliği sağlamak için adenoviral vektörün verilmiş yeri göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin; adenoviral vektörler intra-arteryal (sol karıncık) yolla verildiğinde; kalp, diyafram, interkostal kaslar ve timusta yüksek transdüksiyon etkinliği gözlenirken, intravenöz yolla verildiğinde karaciğerde yüksek transdüksiyon etkinliği gözlenmiştir [42]. Eğer hedef organ karaciğer ise, adenoviral vektörler intrahepatik ya da intravenöz yolla alıcıya verilebilir. Daha etkin transdüksiyon sağlamak için hangi yolun tercih edileceğine dair çeşitli çalışmalar vardır. Farelerde yapılan bir çalışmada intrahepatik yolun, intravenöz yola göre karaciğerde daha etkili transdüksiyon sağladığı belirtilirken [33], sıçanlarda yapılan bir çalışmada tam tersi, intravenöz yolun transdüksiyon açısından daha etkili olduğu gösterilmiştir [35]. Transdüksiyon etkinliği, aynı zamanda yaşa bağlı olarak da değişiklik göstermektedir. Yetişkin ve yeni doğan farelerde; tüm yeni doğan dokularının (özellikle iskelet kaslarının) yetişkinin dokularına göre daha yüksek etkinlikle transdükte edildiği bulunmuştur. Kalp dokusunda transdüksiyon etkinliği eşit bulunurken, beyin dokusunda transdüksiyon etkinliği yetişkinlerin yeni doğan dokusuna göre daha yüksek bulunmuştur [43].

Transdüksiyon etkinliği dışında, hedef dokuda sentezlenen transgen ürününün miktarı da genetik yapıya bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Adenoviral vektörler ile gen aktarımından sonra, farklı genetik yapıya sahip sıçanlarda farklı

miktarlarda transgen ürünü bulunmuştur. Bireyler arası farklılık gösteren bu durum klinikte oldukça önemli yer tutmaktadır. Bu durumda transgen ürününün tedavi edici etkisi bir hastadan diğerine değişiklik gösterebilir. Lefesvre ve arkadaşları transgen ürün miktarındaki bu farklılığın, transkripsiyonel aşamadan kaynaklandığını göstermişlerdir [34]. Transkripsiyon etkinliğindeki bu farklılık, adenoviral enfeksiyon sonrası hücre içinde oluşan sitokin cevaplarının farklı olması ile açıklanabilmiştir. Etkili ve güvenli adenoviral vektör aracılı gen tedavisi için, adenoviral vektörlere karşı gelişen immün yanıtı iyi anlamak gerekmektedir.

### **2.1.9. Adenoviral Vektörlere Karşı Gelişen İmmün Yanıt**

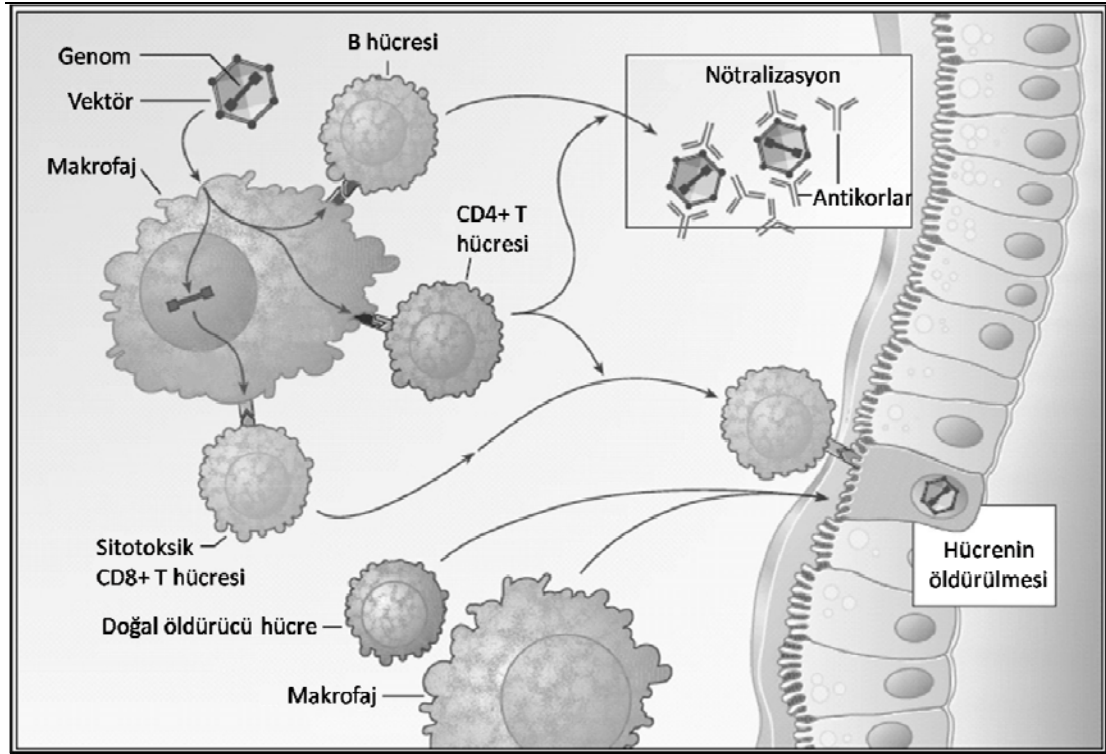
Adenoviral vektörler gen tedavi alanında gelecek için umut verici olsa da en önemli dezavantajları konakta immün yanıt uyandırmalarıdır. Adenoviral vektörlere karşı gelişen immün yanıtın dolaylı olarak aktarılan tedavi edici gen ürünü, iki ya da üç hafta içerisinde tespit edilemeyecek kadar azalmakta ve vektörün ikinci kez uygulanması transgen sentezini artırmamaktadır. Bu sorunların temelinde, konağın doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemi yer almaktadır. Adenoviral vektörler vücuda girdiğinde, ilk olarak doğal bağışıklığı uyarır ve enfekte olan dokularda yangı başlatır. Ardından kazanılmış bağışıklık devreye girer ve kısa bir süre içinde adenoviral vektörlerle transdükte olan dokular ve adenoviral vektörler yıkılırlar [44].

Adenoviral vektörler, transdükte ettikleri hedef hücrelerde ya da doğal bağışıklık hücrelerinde çeşitli sitokinlerin ve yangı ile ilişkili genlerinin ifadesini tetiklerler. Sistemik olarak verilen adenoviral vektörler, 15 dakika gibi kısa bir süre içinde karaciğerde NF $\kappa$ B aktivasyonunu tetikleyerek, 3 ila 6 saat içinde tümör nekroz faktörü  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interlökin 6 (IL-6), interlökin 12 (IL-12) salınmasına neden olurlar. 6 ila 16 saat içinde de birçok kemokin (MIP-2, MCP-1, IP-10, MIP-1 $\beta$  ve RANTES) salınır ve yangı ile ilişkili efektör hücreler enfeksiyon bölgesine toplanırlar [45]. Yangı bölgesine gelen efektör hücreler (monosit/makrofaj, doğal öldürücü hücreler ve granülositler), sitolitik fonksiyon yaparlar ve daha fazla sitokin ve kemokin salgılayarak immün cevabı şiddetlendirirler. Yangı bölgesine gelen makrofajlar ise antijen sunumu yaparak kazanılmış bağışıklık cevabını tetiklerler [46].

Adenoviral vektörlerin, sıçanlara sistemik enjeksiyonunu takiben retikuloendotelial sistem tarafından, özellikle Kupffer hücrelerince (karaciğerin sinüzoidal makrofajları), alınarak sirkülasyondan hızlıca uzaklaştırıldığı gösterilmiştir. 24 saat içerisinde adenoviral vektörlerin %90'ının karaciğerde yıkıldığı, 24 saati takiben 3 hafta içerisinde de verilen adenoviral vektörlerin %9'unun yıkıma uğradığı belirlenmiştir [47]. Adenoviral vektörlerin karaciğere alınışı ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bu mekanizmalara göre, adenoviral vektörlerin direkt hücresel reseptörlere bağlanarak ya da kan komponentlerinin yardımıyla karaciğere alındığı düşünülmektedir [48]. Sistemik olarak verilen adenoviral vektörler, karaciğer loblarındaki (medyan, kaudal, sağ ve sol lateral) Kupffer hücrelerine eşit miktarda dağılırlar. Bununla birlikte; verilen adenoviral vektör miktarı, Kupffer hücrelerine alınan vektör miktarı ile doğru orantılıdır. Fakat, Kupffer hücrelerinin vektör alımı belirli bir doygunluk sınırına

ulaştığında, sisteme verilen vektör miktarı artırılrsa da Kupffer hücrelerine alınan vektör miktarı artmaz. [49].  $1 \times 10^{11}$  viral partikül/kg ya da daha yüksek dozda adenoviral vektör verildiğinde ise Kupffer hücrelerinde hızlı bir şekilde nekroz gerçekleşir. Adenoviral vektör enjeksiyonundan 4 saat sonra, karaciğerdeki Kupffer hücrelerinin sayısı yaklaşık %60 azalır [50]. Adenoviral vektörlerin Kupffer hücrelerince alınarak kandan uzaklaştırılması ve virüsün sirkülasyonda kısa ömürlü olması, adenoviral vektörlerin hedef hücrelere ulaşmasını ve transgenin ifade olmasını engeller. İlk 24 saat içerisinde adenoviral vektörlerin büyük bir kısmının yıkılması, bu yıkımda doğal bağışıklığın görevli olduğunu ve transgen ya da viral genomdan sentezlenen viral proteinlerden bağımsız olarak, viral partikül ya da kapsid tarafından uyarıldığını işaret etmektedir. Bu gözlemler, adenoviral vektörlerin iki fazda yıkıldığını göstermektedir: doğal bağışıklığın rol oynadığı erken faz ve kazanılmış bağışıklığın devreye girdiği geç faz [44].

Kazanılmış bağışıklık yanıtı, antijen sunan hücrelerin sunumuyla başlamaktadır (Şekil 2.6). Makrofajlarda sentezlenen viral proteinler ve transgen ürünleri, hücre yüzeyindeki MHC sınıf I molekülleri ile CD8+ T hücrelerine, viral kapsid antijenleri ise MHC sınıf II molekülleri ile CD4+ T hücrelerine sunulur. CD4+ T hücreleri, CD8+ T hücrelerini tetikler ve CD8+ T hücreleri vektörle transdükte olan hücrelere saldırır. Diğer taraftan, B hücreleri vektörü nötralize edici antikorların salınımı için harekete geçer. Üretilen antiviral antikorlar, daha sonra aynı vektörle karşılaştıklarında bu vektörlerin nötralize edilmesini sağlar. Sonuç olarak, transgen ifadesi yok edilir ve yangı başlatılır [51].



Şekil 2.6. Adenoviral vektöre karşı oluşan immün yanıt [51].

*In vivo* çalışmalarda adenoviral vektör aracılı transgen ifadesinin kısa süreli olması, sürekli sentez sağlanması istenen bazı gen tedavi çalışmalarında önemli bir sorun oluşturmaktadır. Genellikle transgen ifadesinin 1-7 gün içinde en üst düzeylere ulaştığı ve 2-4 hafta içerisinde tespit edilemeyecek düzeylere indiği gösterilmiştir. Bu durum; türler arası genetik farklılığa, adenoviral vektörlerin uygulanış yerine ve transgen ürününe göre farklılıklar göstermektedir. Örneğin, insan alfa-antitripsin ( $\alpha$ -AT) kodlayan E1<sup>-</sup> adenoviral vektörler, intravenöz olarak verildiğinde  $\alpha$ -AT proteininin, C57Bl/6 farelerde daha uzun, C3H/HeJ ve BALB/c farelerde ise daha kısa süre sentez olduğu belirtilmiştir. Transgen ifadesinin türe bağlı değişikliğin söz konusu olup olmadığı incelendiğinde, gözlenen varyasyonların antijene özgü immün cevabı etkileyen henüz tanımlanmamış genetik lokuslarla ilgili olabileceği düşünülmüştür [52]. Daha sonra yapılan bir çalışmada, C57Bl/6 ve BALB/c fareler arasında transgen ifade süresinin farklılık göstermesinin sebebi olarak, IL-12 ve  $\gamma$ IFN üretimindeki ve NK hücre aktivasyonundaki farklılıklar gösterilmiştir [53]. Adenoviral vektörlerin uygulanış yeri de immün sistemi uyandırması açısından farklılık göstermektedir. Örneğin, adenoviral vektörler intrahepatik yolla verildiğinde, intravenöz yola kıyasla daha az yangı uyandırmakta ve Kupffer hücrelerince daha az alınmaktadır [33].

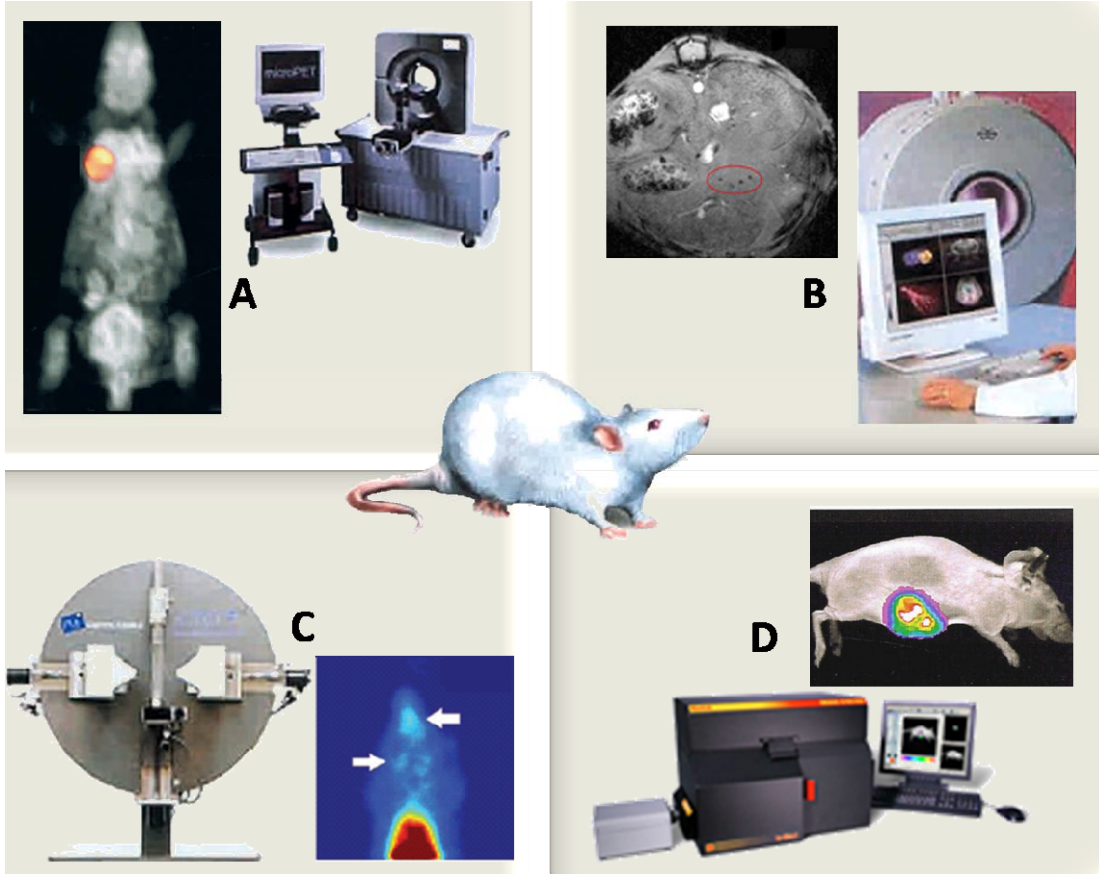
Transgen ifade süresini etkileyen diğer bir durum da transgen ürününün özelliğidir. Mürin ya da insan eritropoietin proteini kodlayan Ad vektörler intramuskular olarak nude farelere (immün sistemi bozuk mutant fareler) verildiğinde, yabancı protein sentezi sonucu transgen ifadesinin kısa süreli olduğu, fakat mürin eritropoietin sentezinin daha uzun süreli olduğu gözlenmiştir [54]. Transgen ifadesinin yanı sıra adenoviral proteinler de kazanılmış bağışıklık cevabını uyandırır. Adenoviral vektörler ile transdükte olan hücrelerin yıkılmasında, viral antijenlere karşı gelişen immün cevabın daha küçük rol oynadığı, transgen ürünlerinin transgen ifadesinin kısa süreli olmasında daha etkili olduğu gösterilmiştir [55].

## 2.2. Gen Tedavisinde *In Vivo* Görüntüleme

Bugüne kadar transgen sentezinin varlığı, ifade süresi, miktarı ve yeri enzim aktivite deneyleri ya da immünohistokimyasal boyamalar gibi girişimsel yöntemlerle gösterilmiştir. Bu yöntemlere alternatif olarak, son zamanlarda girişimsel olmayan *in vivo* görüntüleme teknikleri kullanılmaktadır. *In vivo* görüntüleme tekniği; uygulaması kolay, hızlı ve oldukça elverişli bir yöntemdir. Bunların yanı sıra, en önemli avantajı gen ifadesinin aynı hayvanda tekrar tekrar ölçülebilir ve takip edilebilir olmasıdır. Bu sayede, deneylerde daha az sayıda laboratuvar hayvanı kullanılmakla birlikte, çalışmanın aynı hayvan üzerinde yapılması istatistiksel analizi de güçlendirir. Girişimsel olmayan *in vivo* görüntüleme yöntemleri; dokulardaki vektörleri takip etmek, uygun vektör dozunu belirlemek, tedavi edici genin ifade seviyesini ve toksisiteyi analiz etmek için gerekli bir tekniktir. Yeni ve güvenli bir gen tedavi vektörü geliştirmek ya da hastalığın seyrinde uygulanan gen tedavisinin etkinliğini belirlemek için bu parametrelerin anlaşılması oldukça önemlidir [56].

Gen aktarımını ve transgen ifadesini, girişimsel olmayan yöntemlerle görüntüleyen birçok yöntem vardır. Örneğin; manyetik rezonans görüntüleme

(MRG), foton yayılım tomografisi (PET), tek foton yayımlı bilgisayarlı tomografi (SPECT) ve optik görüntüleme (floresan ve luminesan) teknikleri kullanılmaktadır (Şekil 2.7). Bu görüntüleme teknikleri; mekanizma, maliyet, duyarlılık ve sinyal ölçüm gücü bakımından birbirlerinden farklılık gösterirler [57].



**Şekil 2.7.** Küçük deney hayvanlarının *in vivo* görüntüleri ve görüntülerin alındığı cihazlar. (A) İşaretli tümör hücrelerinin,  $^{18}\text{F}$ FDG enjeksiyonu sonrası mikroPET tekniği ile farede takibi [58] (B) İşaretli insan adacıklarının, intrahepatik nakil sonrası karaciğerdeki yerleşiminin (kırmızı halka içinde) mikroMRG yöntemi ile gösterimi [59] (C)  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  işaretli virüslerin sistemik enjeksiyonundan 60 dakika sonra nazal bölgede ve lenfatik nodlarda (ok ile gösterilen) mikroSPECT yöntemi ile gösterimi [60] (D) Optik görüntüleme ile nude farede tümör hücrelerinin gösterimi. Şekil 57. kaynaktan uyarlanmıştır.

### 2.2.1. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)

Manyetik rezonans görüntüleme tekniği, dokulardaki hidrojen atomlarının dağılımından ve hareketinden yararlanır. Dokulardaki hidrojen atomları, dışarıdan verilen radyo frekans dalgaları ile uyarılır ve dokulardan gelen sinyaller, bilgisayar ortamında çözümlenerek görüntüye dönüştürülür. Bunun için kullanılan manyetik alan çok güçlüdür (dünyanın manyetik alan gücünün yaklaşık 30 bin katı). MRG, manyetik alan gücünden yararlanarak görüntü elde ettiği için, zararlı olabilecek X ışınlarını içermemektedir. Yüksek çözümleme gücüne sahiptir ve üç düzlemde görüntü alınabilir [61]. MRG tekniği kullanılarak vektörlerle gen aktarımı direkt olarak tespit edilemez. Fakat, dışarıdan kontrastı sağlayan ajanlar verilerek bu sorunun üstesinden gelinir. Kontrast ajanlar ile vektörler ya da hücreler

belirlenebilir ve anatomik-morfolojik bilgi sağlanabilir. MRG tekniği ile manyetik nano partiküllerle işaretli siRNA molekülleri [62], viral vektörler [63, 64], transgen ifadesi [65] ya da hücreler [59] *in vivo* koşullarda takip edilebilmektedir.

### 2.2.2. Pozitron Yayılım Tomografisi (PET)

PET tekniğinde; radyoizotoplarla bağlanmış, pozitron yayılımı yapan ajanlar kullanılır. Pozitron yayılımı, bir tür radyoaktif bozunmadır ve hücre çekirdeğindeki protonun, nötron ve pozitif yüklü elektrona (pozitron) dönüşümü sonucunda gerçekleşir. Çekirdekte salınan pozitron, çevredeki bir elektrona çarpar ve iki adet foton oluşur. Bu iki foton birbirlerine 180° aksi yönde hareket ederler ve bu hareket PET cihazlarında bulunan detektörler yardımı ile algılanarak, gelişmiş elektronik yapı ve bilgisayarlar aracılığı ile görüntü haline dönüştürülür [66]. Oldukça hassas bir teknik olan PET, özellikle merkezi sinir sisteminin görüntülenmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca, gen tedavi vektörlerinin ve transgen ifadesinin görüntülenmesi amacıyla da kullanılmaktadır [67]. Örneğin; viral vektörlerle aktarılan PET belirteç geni (PRG), hücre içinde ürüne dönüşür ve bu ürün dışarıdan verilen radyoizotop işaretli ajanlara bağlanarak ya da ajanları metabolize ederek PET görüntüsü için lokal yoğunluk sağlar. PRG olarak başlıca; enzim (HSV1-tk), reseptör (D2R) ve transportör (NIS) genleri kullanılmaktadır [68, 69].

### 2.2.3. Tek Foton Yayılımlı Bilgisayarlı Tomografi (SPECT)

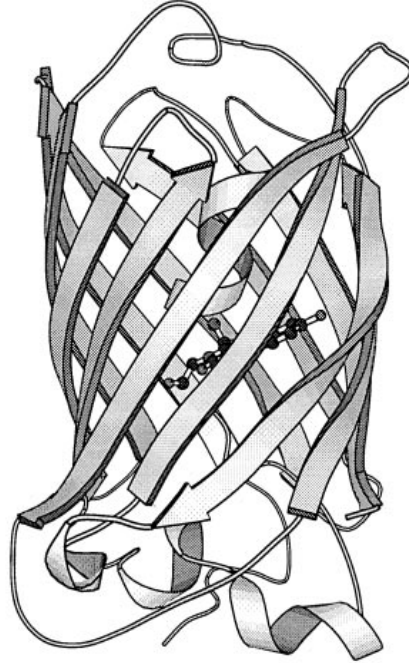
SPECT tekniği, radyoaktif ajan kullanımı açısından PET ile benzerdir. Fakat, PET tekniğinden farklı olarak, kullanılan ajanların oluşturduğu gama radyasyonundan yararlanılarak ölçüm yapılır. Ayrıca, SPECT cihazları daha az hassaslıkla ölçüm yapar ve maliyetleri daha düşüktür. SPECT tekniği kullanılarak, radyoaktif ajanlarla işaretlenmiş gen tedavi vektörleri *in vivo* koşullarda takip edilebilmektedir [60]. Ayrıca, dışarıdan radyoaktif işaretli substrat verildiğinde gen tedavi vektörleriyle aktarılan transgen ifadesi, SPECT ile görüntülenebilmektedir [70].

### 2.2.4. Optik Görüntüleme

MRG ve PET/SPECT tekniklerinin kullanım alanları oldukça fazla olsa da, görüntü elde edebilmek için radyoaktif ajanların kullanılması, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda sorun oluşturabilmektedir. Optik görüntüleme; MRG ya da PET gibi diğer karmaşık yöntemlerle karşılaştırıldığında, daha basit ve daha düşük maliyetli bir yöntemdir. Dokulara aktarılan belirteç genlerin hücre içinde ürünlerini sentezlemesiyle yayılan ışık, detektörler tarafından algılanır ve görüntü bilgisayara aktarılır. Bu teknoloji sayesinde pek çok hücresel ve moleküler düzeydeki olaylar takip edilebilmektedir. Örneğin; gen tedavi vektörlerinin etkinlikleri, transgen ifadesi, tümörün seyri, metastaz ve nakledilen hücrelerin seyri *in vivo* olarak belirlenmektedir. Bu görüntüleme yöntemi, florometrik ve luminometrik görüntüleme olarak iki sınıfa ayrılmaktadır ve çoğunlukla kullanılan belirteç proteinler; floresan (yeşil floresan protein) veya luminesan (lusiferaz) özellikteki proteinlerdir [71].

#### 2.2.4.1. Yeşil Floresan Protein (GFP)

Yeşil floresan protein (GFP), en sık kullanılan belirteç proteinlerden biridir. GFP, *Aequorea victoria* isimli denizanası türünden saflaştırılmış, 238 amino asitten oluşan, 26.9 kDa ağırlığa sahip bir proteindir. Mavi ışık altında ya da ultra viyole ışık altında parlak yeşil floresan ışık verir. GFP molekülü; beta tabakaları ve alfa heliksten oluşan, merkezinde kromofor bulunan,  $\beta$  fiçisi yapısında bir moleküldür (Şekil 2.8). Sıkıca paketlenmiş fiçi yapısı, moleküle floresan özelliğini veren kromoforu mikro çevreden korur ve kromoforun floresan özelliğinin kaybolmasını önler. Kromofor, kendine özgü dalga boyundaki enerjiyi emerek uyarılır ve farklı bir dalga boyunda bu enerjiyi ışık olarak yayar. En yüksek uyarım 488 nm dalga boyunda ve en yüksek yayılım 507 nm dalga boyunda gerçekleşir. Yayılımın gerçekleştiği dalga boyu ve yayılan enerjinin miktarı, hem kromofora hem de kromoforun kimyasal çevresine bağlıdır. GFP'nin yapısı incelendiğinde, kromoforun üç amino asitlik (Ser65, Tyr66 ve Gly67) bir diziden oluştuğu ve 4-(*p*-hidroksibenziliden) imidazolidin-5-1 adı verilen bir molekül olduğu belirlenmiştir [72].



**Şekil 2.8.** GFP'nin üç boyutlu yapısının uzaysal görünümü. 11 tane  $\beta$  zinciri, kromofor (top-ve-çubuk modeli) ve  $\alpha$  heliksten oluşturmaktadır [72].

GFP molekülü 40 yılı aşkın süredir bilinmesine rağmen, 1992 yılında *gfp* geninin klonlanması ve dizilenmesinden sonra dikkatleri çekmiştir [73]. 2008 yılında kimya dalındaki nobel ödülü, GFP'yi keşfeden ve geliştirilmesini sağlayan üç bilim insanına verilmiştir [74]. Yabani tip GFP molekülünde yapılan birkaç mutasyon sonucu, GFP'nin insana uyarlanmış en iyi bilinen türü, EGFP (enhanced green fluorescent protein) elde edilmiştir. Yabani tip GFP molekülünün en yüksek uyarılımı 395 nm dalga boyunda gerçekleştirmesi ve bu dalga boyundaki uyarılımı sağlamak için gereken yoğun ultra viyole ışığın hücrelere hasar vermesi nedeniyle,

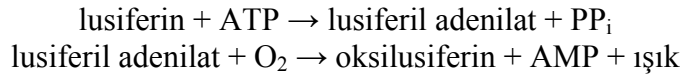


yabanıl tipte S65T mutasyonu yapılmıştır. Bu mutasyon ile GFP molekülünün kromofor iyonizasyonu yükseltilmiş ve böylece daha parlak floresan ışık veren bir türev elde edilmiştir. İkinci olarak, GFP türevinin memeli hücrelerine uygun bir molekül haline getirilmesi için F64L mutasyonu oluşturulmuş ve molekülün 37°C'de düzgün katlanabilmesi sağlanmıştır. Son olarak, *gfp* genine başlangıç dizisi (GTG) eklenerek GFP türevinin translasyonu memelilerde uygun hale getirilmiştir [72], [75]. Yabanıl tipte oluşturulan mutasyonlarla elde edilen EGFP molekülünün, hücreler için toksik olmadığı ve normal hücresel aktiviteyi engellemediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, EGFP'nin zor şartlar altında bile kararlı yapısını koruduğu bildirilmiştir [76].

#### 2.2.4.2. Lusiferaz (*luc*)

Lusiferaz enzim ailesi belirli bazı böceklerde, deniz canlılarında, balıklarda ve bakterilerde bulunan proteinleri kapsamaktadır. Bu proteinler, oksijen ve ATP varlığında, enzime özgü substratları oksitleyerek görünür ışık oluştururlar. Başka bir deyişle, bu reaksiyonlar sırasında oluşan kimyasal enerjinin bir kısmı görünür ışık olarak açığa çıkar. Biyoluminesan görüntüleme en sık kullanılan lusiferaz geni, Kuzey Amerikan ateş böceği *Photinus pyralis* türünden elde edilen lusiferaz (*luc*) genidir. *luc* geni, 550 amino asitlik bir protein olan lusiferazı kodlar ve *in vivo* görüntüleme için uygun dalga boyunda (560-600 nm) ışık üretimi sağlar. 1985 yılında lusiferaz cDNA'sı oluşturulduktan sonra, bu belirteç gen üzerinde pek çok genetik değişiklik yapılmıştır. Öncelikle, *luc* DNA dizisinin memelilerde translasyonunun daha uygun hale gelmesi için kodon değişikliği yapılmıştır. Bununla birlikte, lusiferazın peroksizoma yerleşmesini sağlayan hedefleyici dizi çıkartılarak, proteinin sitoplazmada yerleşmesi sağlanmıştır.

İkinci olarak en çok kullanılan lusiferaz proteini, *Renilla reniformis* türü deniz menekşesinden saflaştırılan lusiferazdır. *Renilla* lusiferazı substrat olarak koelenterazini kullanır. Reaksiyon ATP molekülünden bağımsız olarak gerçekleşir ve 480 nm dalga boyunda ışık yayılımı olur [77]. Lusiferaz ise substrat olarak D-lusiferini [D(-)-2-(6'-hidroksi-2'-benzotiazolil) tiazon-4-karboksilik asit] kullanır. Mg<sup>2+</sup> ve ATP varlığında lusiferin okside olur ve oldukça kararsız bir molekül olan oksilusiferin oluşur [78]. Bu reaksiyon iki basamaklı olarak gerçekleşir:



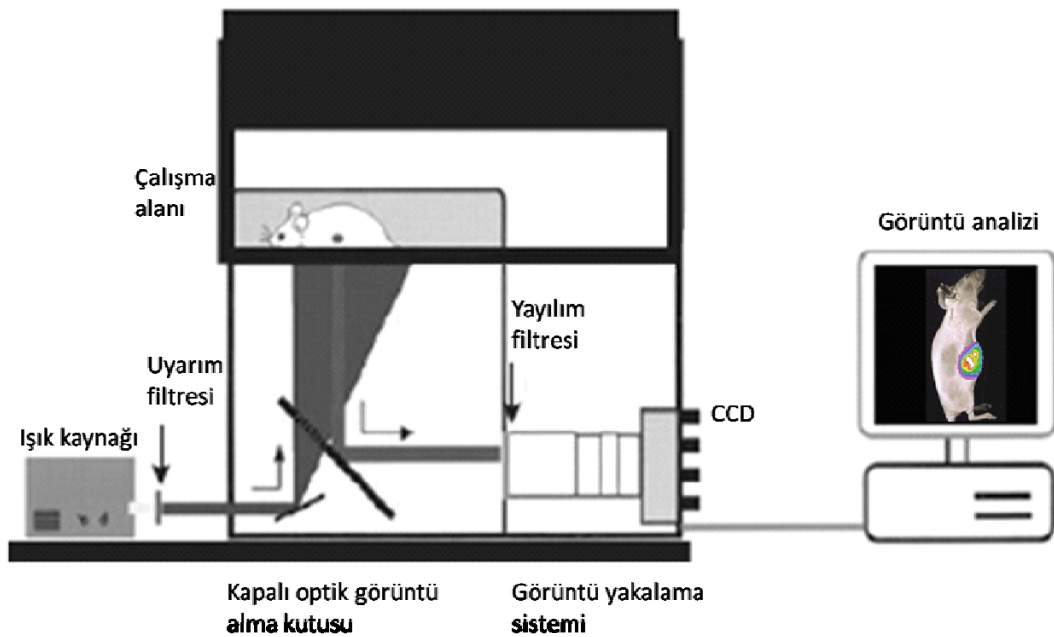
Lusiferaz reaksiyonunun, *in vivo* işaretleyici olarak kullanılabilmesi için vücuda substrat verilmesi gerekir. Bu nedenle, substratın toksik olmaması ve tüm dokulara ulaşabilmesi önemlidir. Vücuda substrat enjeksiyonu intraperitonel, subkutan, intravenöz ya da intranazal yolla olabilmektedir. Lusiferinin, vücuda verilmesinden 20 dakika sonra ışık miktarı en yüksek düzeye ulaşır ve enzim yarı ömrüne bağlı olarak bir saatten fazla süre ışık varlığı tespit edilebilmektedir. Vücuda substrat enjeksiyonu ve gerçekleşen reaksiyon ile ilgili olarak şimdiye kadar bir toksisite çalışması yapılmamıştır [77]. Fakat, birçok çalışmada lusiferinin hücrelere alınışının düşük toksisiteye sebep olduğundan ya da belirgin bir toksisiteye sebep

olmadığından bahsedilmiştir [79, 80]. Lusiferinin dokulara dağılımı araştırıldığında, tüm organlara ulaşabildiği, hatta kan-beyin bariyeri ya da plasenta bariyerinden bile geçtiği gösterilmiştir [37, 78].

### 2.2.4.3. CCD (Cooled Charge-Coupled Device) Kamera

*In vivo* luminesan ve floresan görüntüleme tekniğinde önemli olan, transfekte edilen dokudan yayılan ışığın nasıl tespit edileceğidir. Canlı objelerden yayılan düşük seviyelerdeki ışığın tespiti için, birçok teknik ilerleme kaydedilmiş ve oldukça hassas detektörler yapılmıştır. Silikon kristallerinden yapılan bu CCD detektörleri, ışığa oldukça duyarlıdır ve görünür ışık ile yakın kızılaltı ışık aralığındaki fotonları algılayabilmektedir. CCD kameralar, CCD pikseline çarpan fotonları elektronlara dönüştürür ve yakalanan elektronlar sayıya çevrilerek, bilgisayara görüntü olarak aktarılır. Fakat, CCD kameralar ile ilgili bazı sınırlamalar vardır. Birincisi, CCD pikseline çarpan fotonların sinyal oluşturması için, foton sayısının eşik değerinin üzerinde (en az 150 elektron) olması gerekmektedir. İkincisi, sadece 400-1000 nm dalga boyu aralığındaki fotonlar elektronlara dönüştürülmektedir. Üçüncüsü ise, ısı enerjisi ya da gama ışınları gibi kaynaklardan alınan fotonlar, elektronlara dönüştürülerek yanlış pozitiflik yaratabilmekte ve bu durum detektör soğutulmuş olarak önlenmektedir [81].

Kodak Image Station 2000MM model cihaz; görüntü alımının hızlı, bilgisayar programının kolay kullanımlı olduğu, oldukça güçlü, dijital bir sistemdir. Işık geçirmeyen kabini içinde, floresan ya da luminesan moleküllerden yayılan ışık, CCD kamera tarafından etkili bir şekilde yakalanır. Yüksek duyarlılıkta moleküler tarama sağlamak için tasarlanan CCD kamera ile yüksek çözünürlükte görüntü oluşturulur [82].



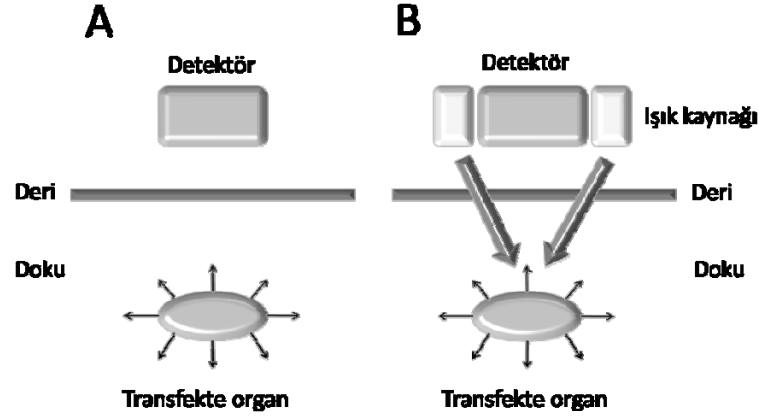
Şekil 2.9. CCD kamera ve çalışma prensibi. Dokudan yayılan ışık, CCD kamera tarafından algılanır ve oluşturulan görüntü bilgisayarda analiz edilir. Şekil 84. kaynaktan uyarlanmıştır.

Kodak Image Station 2000MM görüntüleme sistemi; çalışma alanı, ışık kaynağı, uyarım filtreleri, kapalı optik görüntü alma kutusu, görüntü yakalama sistemi, fan ve radyatörden oluşmaktadır (Şekil 2.9). *Çalışma alanı*, görüntülenmek istenen objenin yerleştirildiği bölmedir. Objeye, çalışma alanı içerisinde bulunan 20x20 cm boyutlarında “platen” adı verilen özel su geçirmez bir yüzey üzerine yerleştirilir. Çalışma alanının kapağı açık tutulduğunda, dışarıdan gelen ışık ile objenin normal görüntüsü alınabilir. Fakat, floresan ya da luminesan görüntü alınırken kapak kapatılarak, ışık geçirmeyen bir alan oluşturulur. *Işık kaynağı* ya da *iluminatör*, 150 wattlık halojen bir lambadır. Işık kaynağından gelen ışık, önce uyarım filtresinden geçer. *Uyarım filtresi*, ışığı süzerek sadece floresan molekülü uyaraabilen dalga boyundaki ışınların geçişine izin verir. Dolayısıyla uygun filtrenin seçimi çok önemlidir. Uyarım filtrelerinin bulunduğu kasette, farklı dalga boylarındaki ışığı geçirebilen uyarım filtreleri bulunmaktadır ve uygun filtre manuel olarak kaydırılarak seçilebilir. Uyarım filtresinden süzülen ışık kapalı optik görüntü alma kutusuna ulaşır. *Kapalı optik görüntü alma kutusuna* ulaşan ışık platen üzerine yansıtılır. Floresan molekülün uyarımı sağlanarak, farklı dalga boyunda ışık yayılımı olur. Objeden yayılan ışık, kapalı optik görüntü alma kutusunda bulunan ayna ile görüntü yakalama sistemine iletilir. *Görüntü yakalama sistemi*; yayılım filtresi, lens sistemi (odaklama, görüş alanı, ışık miktarı ayarları) ve CCD kamerayı içerir. Görüntü yakalama sistemine iletilen ışık ilk önce yayılım filtresinden geçer. *Yayılım filtresi*, objeden gelen ışığı süzerek, sadece floresan dalga boyundaki ışınların lens sistemine geçişine izin verir. Dolayısıyla uygun yayılım filtresinin seçimi çok önemlidir. Yayılım filtrelerinin bulunduğu kasette, farklı dalga boylarındaki ışığı algılayabilen yayılım filtreleri bulunmaktadır ve uygun filtre manuel olarak seçilebilir. Luminesan görüntüleme, ışık kaynağı ve filtre sistemleri kullanılmaz. Enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan ışık, direkt olarak kamera lens sistemine yansıtılır. Kamera lens sisteminin üzerinde yer alan segmentler oynatılarak, görüntü netliği, görüş alanı ve ışık miktarı manuel olarak ayarlanabilir. Kamera lens sisteminden geçen ışık CCD kameraya ulaşır. Termoelektrik olarak -29°C'ye soğutulan ve kamera hassasiyeti artırılan CCD kamera, 1024x1024 piksel görüntü toplar [82]. Bilgisayara aktarılan gri tonlamalı fotoğraf üzerinde, ışıma yoğunluğuna göre yalancı renklendirme uygulanır. Kırmızı renk, ışıma yoğunluğunun en fazla olduğu bölgeyi ve mor renk, ışıma yoğunluğunun en az olduğu bölgeyi gösterir. Fotoğraf üzerinde, ilgilenilen bölge seçilir ve bu bölgedeki ortalama ışıma yoğunluğu ya da en yüksek ışıma, santimetrekaireye saniyede düşen foton miktarı cinsinden (foton/saniye/cm<sup>2</sup>) belirlenebilir. Görüntü alınırken belirli bir standart oluşturulmalı ve görüntü alma koşulları (görüntü alma süresi, ışık miktarı, netlik ayarı) eşit tutulmalıdır [57].

#### **2.2.4.4. *In Vivo* Floresan ve Luminesan Görüntüleme**

*In vivo* floresan ve luminesan görüntüleme yöntemleri kıyaslandığında, iki yöntem arasında bazı farklılıkların olduğu görülmektedir. Örneğin; luminesan görüntüleme, dışarıdan substrat enjeksiyonuna ihtiyaç duyulur. Substrat, ATP, magnezyum ve oksijen varlığında transfekte olan dokularda biyokimyasal reaksiyon gerçekleşir ve reaksiyona özgü dalga boylarında ışık yayılımı olur. Oksijene ihtiyaç duyulması, luminesan sisteminin barsak lümeni ya da geniş tümörlerin nekrotik bölgeleri gibi aneorobik ortamlarda hipoksiden dolayı kullanımını sınırlar [83]. Floresan görüntüleme ise substrata değil, ışık kaynağına ihtiyaç duyulur. Işık

kaynağından gelen ışık, dokular arasına yayılır ve transfekte olan dokuya ulaştığında, EGFP molekülündeki kromofor yükseltgenerek daha yüksek bir dalga boyunda ışık yayılımı yapar (Şekil 2.10) [71].

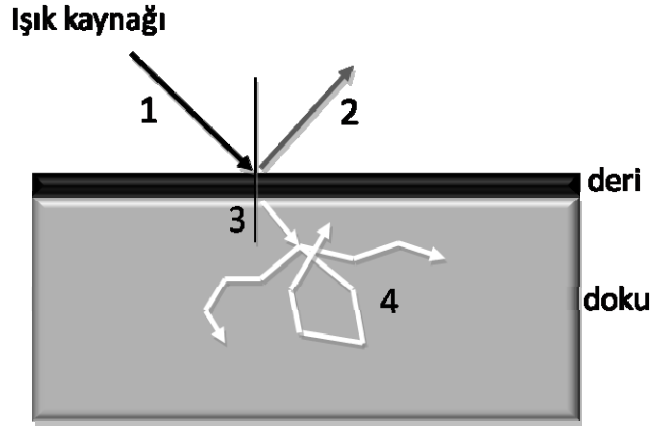


Şekil 2.10. *In vivo* luminesan (A) ve floresan (B) görüntüleme sistemleri. Şekil 71. kaynaktan uyarlanmıştır.

Floresan görüntüleme için gerek duyulan ışık kaynağı “otofloresana” neden olmaktadır. Otofloresan, dokunun kendi floroforları tarafından ışık emiliminin olması sonucu oluşan floresan ışımadır ve arka planda görüntü kirliliği oluşturur. Bazı yağlar, beta karoten gibi bazı pigmentler ve kollajen, elastin gibi endojen proteinler tüm vücutta otofloresana sebep olurlar. En büyük otofloresan kaynağı ise, birçok bitki temelli mürin yeminde bulunan klorofil molekülüdür [84]. Luminesan görüntülemelerde ise, ışık kaynağı kullanılmadığı için arka planda görüntü kirliliği olmaz ve düşük seviyelerdeki sinyaller bile kolayca algılanır [85]. Her iki görüntüleme yönteminde de dokudan yayılan ışığın yönü rastgeledir ve yayılan ışığın bir kısmı detektör tarafından toplanarak ölçülür.

Canlı organizmalarda görüntüleme yöntemi kullanılırken, dokuların optik özellikleri ile ilgili parametreler göz önünde bulundurulmalıdır. Canlı dokuda ışığın emilimi, dağılımı ya da yansımaları gibi attenüasyon faktörleri, *in vivo* transgen ifadesinin optik olarak ölçülmesinde spesifik sorunlar yaratmaktadır (Şekil 2.11). Bununla birlikte, CCD kameralar ile alınan görüntüler iki boyutludur ve derinlik bilgisi içermezler. Yüzeğe yakın dokular, derinlerdeki dokulara göre her zaman daha parlak görünürler. Derinlere inildikçe sinyal alımı zorlaşır. Örneğin, her santimetre derinlikteki doku için yaklaşık on kat luminesan sinyalde azalma olur [86]. *In vivo* görüntülemelerde sorun oluşturan bu durum, canlı dokunun ışığı emme özeliğinden yani absorpsiyondan kaynaklanır. Transfekte olan dokudan yayılan ışığın bir kısmı doku tarafından emilir ve sadece bir kısmı detektörler tarafından algılanır. Işığın memeli dokusundaki emilimi, genellikle dokularda ışık emilimi yapabilen hemoglobin, melanin ve diğer pigment molekülleri gibi kromoforların varlığına bağlıdır. Örneğin, beyaz renkli dokudan ışık kolay geçerken, melanin içeren koyu renkli dokularda önemli miktarda ışık emilimi olur. Aynı şekilde, deri ve kas dokusu ışığı geçirirken, karaciğer ve dalak gibi oksihemoglobin ve deoksihemoglobin

moleküllerini içeren vasküler içerikli organlar ışığı emerler [78]. Görüntü alınan bölgenin tüylü ya da tüysüz oluşu da sinyal alım gücünü etkilemektedir. Farelerde, tüyler tıraşlandığında transfekte dokulardan alınan sinyalin %18, deri uzaklaştırıldığında ise alınan sinyalin %57 arttığı gösterilmiştir [86]. Özellikle floresan görüntüleme, kameranın zayıf sinyalleri zor algılaması, cerrahi bir işlem ile çözülebilir. Deriyi açarak, derinde olan transfekte hücrelerden kolayca sinyal alınabilir [87, 88].



**Şekil 2.11.** Dokuda ışığın izlediği yol. Kaynaktan gelen ışık (1), deriden kısmen yansıyor dokuya içerisine geçer. Yansıyan ışık (2) kaybolurken, dokuya geçen ışık (3) dokuda dağılır (4). Dokuda kromofor bulunması durumunda ışığın emilimi gerçekleşir. Şekil 71. kaynaktan uyarlanmıştır.

#### 2.2.4.5. Transgen İfadesinin *In Vivo* Optik Görüntülenmesi

Gen tedavisi çalışmalarında, etkili gen aktarımı ve uzun süreli gen ifadesinin sağlanması oldukça önemlidir. Bazı durumlarda, transgen ifadesinin organa özgü olması amaçlanmaktadır. Ticari olarak temin edilebilen görüntüleme sistemleri kullanılarak, *in vivo* transgen ifadesinin yeri, miktarı ve süresi belirlenebilmektedir. Ayrıca, viral (adenovirüs, AAV, lentivirüs) ya da viral olmayan (balistik, elektroporatif, lipozomal yöntemler) yöntemlerin etkinlikleri hakkında bilgi elde edilebilir. Şimdiye kadar, *in vivo* transgen ifadesinin optik olarak çeşitli dokularda görüntülediği birçok çalışma yapılmıştır. Örneğin; C57Bl/6 ve nude farelere, lokal olarak EGFP geni taşıyan adenoviral vektörler enjekte edilmiş ve 5-8 saat sonra ilgili dokulardan (beyin, karaciğer, pankreas, prostat ve kemik) floresan sinyal alınmıştır. Nude farelerin karaciğerindeki transgen ifadesi 4 ay boyunca CCD kamera ile takip edilmiştir [38]. Swiss Webster türü farelerin iskelet kaslarına *luc* geni taşıyan adenoviral vektörler enjekte edildiğinde, iskelet kaslarından alınan sinyalin 2. günde en üst düzeye ulaştığı ve 10 gün içerisinde hızla azalarak yaklaşık 150 gün devam ettiği belirlenmiştir. Nude farelerde ise iskelet kaslarından 150 gün boyunca sürekli ve yoğun miktarda sinyal alınmıştır [86]. Başka bir çalışmada, tükürük bezi ve mesane dokularından da lokal adenoviral vektör enjeksiyonu sonrası luminesan sinyal alınarak, bu dokuların transdükte olabildiği gösterilmiştir [37]. GFP geni taşıyan lentiviral vektörler kullanılarak yapılan bir çalışmada, nude farelere intraportal vektör enjeksiyonundan 6 gün sonra karaciğerden, intraperitoneal enjeksiyondan sonra ise karaciğer ve dalaktan 6 aya kadar floresan sinyal alınmıştır

[89]. Lusiferaz geni taşıyan adeno benzeri virüslerin kullanıldığı bir çalışmada ise, gebe CD-1 farelere *in utero* vektör aktarımı sonrasında, doğan farelerin periton bölgelerinden 18 ay boyunca sinyal alınmıştır [90]. Sistemik olarak plazmid verildiğinde karaciğerden 30 gün boyunca, elektroporasyon ile birlikte iskelet kasına plazmid enjeksiyonu uygulandığında 70 gün boyunca luminesan sinyal alınmıştır [37].

#### 2.2.4.6. Hücrelerin *In Vivo* Takibi

Optik görüntüleme *in vivo* hücrelerin takibi için oldukça uygun bir yöntemdir. *Ex vivo* koşullarda belirteç gen aktarımı yapılan hücreler, deney hayvanlarına nakledildikten sonra belirli aralıklarla görüntülenerek dışarıdan takip edilebilmektedir. Örneğin, işaretli bakteri ya da virüsler kullanılarak konak-patojen ilişkisi çalışılabilmekte ya da antibiyotik tedavisinin etkinliği gerçek zamanlı olarak görüntülenebilmektedir. Yangı ya da immün sistem ilişkili hastalık modellerinde, hematopoietik kök hücreler ve olgun immün sistem hücrelerinin izlediği yol takip edilebilmektedir [80]. Hücrelerin girişimsel olmayan *in vivo* takip yöntemi, en çok kanser modellerinde tümör ilerleyişini görüntülemek için kullanılmaktadır. *Ex vivo* koşullarda belirteç genlerle transfekte edilen tümör hücreleri, nakil sonrasında izlenerek, tümörün büyümesi, ilerleyişi, metastaz ve tedavi edici yaklaşımların etkinliği görüntülenebilmektedir. Bu yöntem meme [87], prostat [91], akciğer [92], glioma [93] ve kolon [94] tümörlerinin gelişimini incelemek için kullanılmıştır. Diğer ilgi çekici yaklaşım ise organ ve doku nakillerinin *in vivo* olarak takip edilebilmesidir. Örneğin; tip 1 diyabet tedavisinde uygulanan pankreatik adacık naklinde, nakledilen hücreler *in vivo* olarak görüntülenebilmekte ve dışarıdan takip edilebilmektedir.

Moleküler görüntüleme, canlı organizmalardaki biyolojik olayların anlaşılmasını kolaylaştıran bir tekniktir. Ayrıca, *in vivo* olarak belirteç gen ifadesinin takibi, hastalık modellerinde tedavi edici genin hedef hücredeki ifadesinin takip edilebilmesi açısından önemli bir yaklaşımdır. Belirteç gen ifadesinin organizmadaki ifade yeri, yoğunluğu ve süresi, girişimsel yöntemlere ihtiyaç duyulmaksızın moleküler görüntüleme teknikleri kullanılarak belirlenebilmektedir. Biz de çalışmamızda, canlı organizmadaki transgen ifadesini *in vivo* olarak takip edebilmek amacıyla CCD kamerayı kullanmayı planladık. Transgen ifadesini görüntüleyebilmek için yeşil floresan protein (EGFP) geninden yararlandık. Bunun için, önce EGFP genini taşıyan adenoviral vektörleri (AdEGFP) çoğalttık ve daha sonra bu vektörleri farelerin kuyruk veninden sisteme enjekte ettik. Vektör enjeksiyonundan sonra, belirli zaman aralıklarında farelerdeki AdEGFP aracılı transgen ifadesini CCD kamera ile takip ettik.

## MATERYAL ve YÖNTEMLER

### 3.1. Birinci jenerasyon rekombinant adenoviral vektörlerin çoğaltılması ve saflaştırılması

#### **Kullanılan Solüsyonlar:**

##### **Serumsuz RPMI-1640 Besiyeri:**

10,26 g toz RPMI-1640 besiyeri (Sigma), 962 ml bidistile su içinde çözüldü ve pH'sı HCl ile 4.0 olarak ayarlandı. Hazırlanan besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Solüsyon oda sıcaklığına geldiğinde, üzerine 26.7 ml %7.5 steril sodyum bikarbonat (Sigma), 10,25 ml 200 mM steril L-glutamin (Biological Industries), 2 ml 80 mg gentamisin (Genta) eklendi. Hazırlanan besiyeri +4°C'de saklandı.

##### **Serumlu RPMI-1640 Besiyeri:**

1 lt serumsuz RPMI-1640 besiyerine 110 ml inaktif fetal sığır serumu (Biochrom AG) eklenerek %10 serumlu, 220 ml eklenerek %20 serumlu besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyeri +4°C'de saklandı.

##### **2XTripsin-EDTA:**

20 ml 10XTripsin-EDTA stok solüsyonu (Biological Industries), 80 ml serumsuz RPMI-1640 ile karıştırılarak 2XTripsin-EDTA hazırlandı.

##### **PBS Solüsyonu:**

8 g NaCl (Sigma), 0.2 g KCl (Sigma), 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma), 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma) tartılarak, 800 ml bidistile su içinde çözüldü. NaOH ile pH 7.4'e ayarlandı ve toplam hacim bidistile su ile 1 litreye tamamlandı. Solüsyon 121°C'de 15 dakika otoklavlandı ve +4°C'de saklandı.

##### **Transfeksiyon Solüsyonu:**

410 ml serumsuz besiyerine, 200 virüs partikülü/hücre (MOI, multiplicities of infection) yoğunlukta adenoviral vektör eklenerek buz üzerinde tutuldu.

##### **1 M Tris-Cl (Amresco):**

24,2 g Tris 160 ml distile su içinde çözüldü. HCl ile pH 8.1'e ayarlandı ve toplam hacim distile su ile 200 ml'ye tamamlandı. Solüsyon 121°C'de 15 dakika otoklavlandı ve +4°C'de saklandı.

##### **10 mM Tris-Cl (Amresco):**

1 M Tris-Cl'den 5 ml alınarak, distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 15 dakika otoklavlandı ve +4°C'de saklandı.

**Ağır CsCl Solüsyonu (Roche):**

42,33 g CsCl tartıldı ve 57,77 ml 10 mM Tris-Cl içinde çözüldü. HCl ile pH 8.1'e ayarlandı. 121°C'de 15 dakika otoklavlandı ve +4°C'de saklandı.

**Hafif CsCl Solüsyonu (Roche):**

22,39 g CsCl tartıldı ve 77,61 ml 10 mM Tris-Cl içinde çözüldü. HCl ile pH 8.1'e ayarlandı. 121°C'de 15 dakika otoklavlandı ve +4°C'de saklandı.

**3.1.1. Adenoviral vektörlerin HEK 293 hücrelerinde çoğaltılması**

HEK 293 hücre hattı, %10 serumlu RPMI-1640 besiyeri kullanılarak 150 mm hücre kültürü kaplarında (Sarstedt), 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub>'li nemli ortamda üretildi. HEK 293 hücreleri, 40 adet 150 mm'lik doku kültür kabını yaklaşık %80 yoğunlukta kaplayacak şekilde çoğaldığında, adenoviral vektörlerle transdükte edildi. Bunun için, doku kültür kaplarındaki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine 10'ar ml transfeksiyon solüsyonu eklenerek inkübatöre kaldırıldı. 2 saat sonra doku kültür kaplarına %20 serumlu besiyeri eklenerek, mevcut besiyerinin serum içeriği %10'a çıkarıldı. Transdüksiyonun 30-54. saat aralığında hücreler kontrol edildi. Sitopatik etkinin belirgin hale geldiği anda, yani hücrelerin yuvarlaklaşarak yüzeyden ayrılma eğiliminde oldukları anda, hücreler 25 ml'lik pipetler aracılığıyla toplanarak 250 ml'lik steril tüplere aktarıldı. Tüpler, 4°C 4000 rpm 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası dökelti atıldı ve çökelti 10 mM Tris-Cl ile (her 150 mm'lik kap için 0,5 ml 10mM Tris-Cl) çözülmek üzere 15 ml'lik tüplere aktarıldı.

**3.1.2. Adenoviral vektörlerin izolasyonu**

Tüpler, 3 kez etil alkol-kuru buz banyosunda hızlı donma-çözünme işleminden geçirildi. Daha sonra, 4°C 5000 rpm 10 dakika santifüj edildi ve dökelti temiz bir tüpe alınarak 10mM Tris-Cl ile 20 ml'ye tamamlandı. 40 ml'lik şeffaf ultrasantrifüj tüplerine (Beckman), önce 10 ml ağır CsCl, sonra 10 ml hafif CsCl ve en son viral dökelti eklendi ve tüpler ultrasantrifüj rotoruna (Beckman SW28) yerleştirilerek 4°C 20000'de rpm gece boyunca santifüj edildi. Santrifüj sonrasında oluşan viral band şırınga yardımı ile çekilerek, 10 mM'lık Tris-Cl ile 4 ml'ye tamamlandı. 16 ml'lik şeffaf ultrasantrifüj tüplerine (Beckman), önce 4 ml ağır CsCl, sonra 4 ml hafif CsCl ve en son viral band eklendi ve tüpler ultrasantrifüj rotoruna (Beckman SW41) yerleştirilerek 4°C 20000 rpm'de 6 saat santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan viral band şırınga ile çekilerek 15 ml tüp içerisine alındı. %25 oranında gliserol (Sigma) ile karıştırılarak -80°C'de saklandı.

**3.1.3. Adenoviral vektörlerin saflaştırılması****Kullanılan Solüsyonlar:****%10 Gliserol:**

450 ml PBS pH 7.4 içine 50 ml gliserol eklendi. 121°C'de 15 dakika otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.



### **Kolon dolgu materyali:**

10 g Sephadex G-50 (Fluka) tartıldı. Üzerine 160ml 10mM Tris pH 8.1 eklenerek çözüldü. 121°C’de 15 dakika otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

### **3.1.3.1. Kolonun hazırlanması:**

10 ml plastik tek kullanımlık pipet 9 ml hizasından kırıldı. Pipetin ince ucuna küçük bir parça otoklavlanmış cam yünü yerleştirildi. Pipetten geçecek olan sıvının akışını kontrol edebilmek için, pipetin ince ucuna dışardan plastik bir tüp geçirildi ve bu tüpün üzerine hemostat klemp yerleştirildi. Hazırlanan kolon ayaklığa yerleştirildi.

### **3.1.3.2. Kolondan adenoviral vektör solüsyonunun geçirilmesi:**

4 ml %10 gliserol kolon üzerine eklendi ve yaklaşık 3 ml’sinin akması sağlandı. Böylece cam yünüdeki hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Daha sonra, kolona 5ml kolon dolgu materyali eklendi. Üzerine 15-20 ml %10 gliserol eklenerek kolon yıkandı. Daha sonra Cs-Cl yöntemi ile çoğaltılan adenovirüs solüsyonu kolona eklendi. Kolona zarar vermeden bir miktar daha %10 gliserol eklendi ve virüs kolonun ucuna yaklaşıncaya dek tamponun damlaması sağlandı. Virüs kolonun ucuna yaklaştığında, sıvının steril mikrosantrifüj tüplerine damlaması sağlandı. Spektrofotometrede ölçüm yapılarak, OD<sub>260</sub> değeri belirlendi. Viral vektörlerin ortalama titreleri, 10<sup>13</sup> DNA partikülü/ml idi. Fonksiyonel titreler ise 293 hücrelerinde plak titreleme yoluyla ölçüldü. Elde edilen virüs stokları kullanıma kadar 4°C’de saklandı.

### **3.1.4. Plak titreleme**

#### **Kullanılan Solüsyonlar:**

#### **%2’lik agaroz:**

1 g agaroz (Roche) tartıldı ve 50 ml PBS (pH 7.4) içinde çözüldü. 121°C’de 15 dakika otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

#### **%0.03’lük Nötral Red Solüsyonu:**

%0.33’lük nötral red stoğundan (Sigma) 1 ml alındı ve 10 ml PBS ile karıştırıldı.

#### **%10 serumlu RPMI Besiyeri:**

#### **PBS:**

3.1’de anlatıldığı gibi hazırlandı.

6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1x10<sup>5</sup> hücre/kuyu olacak şekilde HEK 293 hücreleri ekildi. 24 saat 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub>’li nemli ortamda tutularak yüzeyin %80-90 oranında hücrelerle kaplanması sağlandı. Çoğaltılan adenovirüs stoğu, PBS ile 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> ve 10<sup>5</sup> kat sulandırıldı ve ayrı ayrı kuyulara sulandırılmış virüs solüsyonundan eklendi. Kültür kapları, 2 saat süresince 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub>’li nemli ortamda tutularak hücrelerin virüslerle enfekte edilmesi sağlandı. Bu süre zarfında, %2’lik agaroz mikrodalga fırında eritildi, sıcaklığı 44°C’ye getirildi ve

44°C'ye ısıtılmış RPMI besiyeri ile 1/10 oranında karıştırıldı. Enfekte edilen hücrelerin üzerine, hazırlanan %0.2'lik agaroz besiyeri karışımı yavaşça eklendi ve hücreler 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub>'li nemli ortamda 7 gün tutuldu. Plaklar oluşmaya başlayınca, her kuyuya 1 ml nötral red solüsyonu eklendi ve plakların boyanması için 2-3 saat 37°C'de tutuldu. Süre sonunda, boya aspire edildi ve kuyulara ışık altında bakılarak kırmızı ile boyanan plaklar sayıldı. Viral titre hesabı yapılarak partikül/plak oluşturma birimi 25 olarak bulundu.

AdEGFP [95] adenoviral stokları, yukarıda tanımlandığı şekilde hazırlandı.

### **3.2. A549 hücrelerinin adenoviral vektörlerle transdükte edilmesi**

**Kullanılan Solüsyonlar:**

**2XTripsin-EDTA:**

**PBS Solüsyonu:**

**RPMI-1640 Besiyeri:**

**Transfeksiyon Solüsyonu:**

3.1'de açıklandığı gibi hazırlandı.

Akciğer kanser hücre hattı (A549), %10 serumlu RPMI-1640 besiyeri kullanılarak 35 mm hücre kültürü kaplarında (Sarstedt), 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub>'li nemli ortamda yetiştirildi. A549 hücreleri, 35 mm'lik doku kültür kabını yaklaşık %80 yoğunlukta kaplayacak şekilde çoğaldığında, EGFP geni taşıyan adenoviral vektörlerle transdükte edildi. Bunun için, doku kültür kaplarındaki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine 10'ar ml transfeksiyon solüsyonu eklenerek inkübatöre kaldırıldı. Kontrol grubu için transfeksiyon solüsyonu olarak serumsuz besiyeri kullanıldı. 2 saat sonra doku kültür kaplarına %20 serumlu besiyeri eklenerek, mevcut besiyerinin serum içeriği %10'a çıkarıldı. Transdüksiyonun 24. saatinde hücreler floresan mikroskop ile görüntülendi ve alınan resimler kaydedildi.

### **3.3. BALB/c farelere sistemik olarak farklı dozlarda adenoviral vektör enjeksiyonu**

**Kullanılan Solüsyon:**

**Adenoviral Vektör Solüsyonu:**

Saflaştırılan adenoviral vektör stoklarından farklı miktarlar ( $10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$  ve  $2 \times 10^{12}$  DNA partikülü/fare) alındı ve toplam hacim 200 µl olacak şekilde steril PBS solüsyonu ile temiz bir mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı. Tüpler, adenoviral vektör solüsyonlarının farelere enjeksiyon aşamasına kadar buz üzerinde tutuldu.

**Kullanılan Deney Hayvanları:**

Deneylerde kullanılan hayvanlar, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edildi. Deneylerde yaklaşık 25-30 g ağırlığında, 10-12 haftalık, erkek BALB/c türü fareler kullanıldı. Farelere kobay yemi ve musluk suyu verildi. Fareler, 22±2°C sıcaklık, %50-60 nemli koşullarda tutuldu ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık periyod uygulandı.

Sistemik olarak adenoviral vektör enjeksiyonu yapılmadan önce fareler, intraperitoneal ketamin/ksilazin (%10 Alfamine/%2 Alfazyne) (100-10 mg/kg) enjeksiyonu ile uyutuldu. Bu esnada, buz üzerinde tutulan adenoviral vektör solüsyonları şırıngaya çekilerek, solüsyonlar oda sıcaklığına getirildi. Şırınganın ucuna takılan 26G Branül (BD Neoflon) yardımıyla farenin lateral kuyruk damarına girildi ve adenoviral vektör solüsyonu enjekte edildi. Deney grubundaki farelere farklı dozlarda adenoviral vektörler ( $10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{12}$  DNA partikülü/fare), kontrol grubundaki farelere ise 200 µl PBS solüsyonu verildi. Enjeksiyon bölgesine bir dakika boyunca tampon uygulandı ve daha sonra antiseptik solüsyon (Polyod) ile silindi. BALB/c fareler anestezinin etkisi geçinceye dek  $37^{\circ}\text{C}$  küvezde tutuldu. Uyanan fareler kafeslerine yerleştirildi ve bakım odalarına götürüldü.

### **3.4. BALB/c farelerin CCD kamera ile görüntülenmesi**

Adenoviral vektör enjeksiyonu yapılan farelerin ( $n=5/\text{doz}$ ), Kodak Image Station 2000MM cihazı ile belirli zaman aralıklarında görüntüleri alındı. Zaman aralıkları; birinci haftada her gün, ikinci haftada üç günde bir ve daha sonraki haftalarda haftada bir olarak belirlendi.

#### **3.4.1. *In vivo* görüntülerin alınması**

Görüntü alınmadan hemen önce, BALB/c fareler ketamin/ksilazin karışımı ile uyutuldu. Abdominal bölgeleri tıraşlandı ve yüz üstü olarak platen üzerine yerleştirildi. Işık kaynağı açıldı ve 0.05 saniye süresince farenin beyaz ışıkta normal görüntüsü alındı. Daha sonra, farenin pozisyonu değiştirilmeden sadece uygun filtreler elle ayarlanarak (uyarım filtresi 465 nm, yayılım filtresi 535 nm) 60 saniye süresince mavi ışıkta floresan görüntüsü alındı. Normal ve floresan görüntüleme işleminin ikisinde de uzak ve yakın çekim uygulandı (FOV 30 ve 100). Ayrıca ışık miktarının ayarı ( $f$ -stop) ve fokus ayarı tüm görüntülerde sabit olarak sıfırda tutuldu.

#### **3.4.2. Floresan görüntülerin bilgisayarda analizi**

Alınan floresan görüntüler, Kodak yazılım programı (Kodak Software 3.6.5) kullanılarak bilgisayarda analiz edildi. Bunun için, floresan sinyal alınan bölgeler, ilgilenilen bölgeler olarak (ROI, region of interest) seçildi ve bu bölgelerdeki net yoğunluk belirlendi. BALB/c farelerden alınan net yoğunluklar birbirlerine göre ve zamana göre kıyaslandı. Karaciğer loblarının *ex vivo* analizinde ortalama yoğunluk kullanıldı. Kodak yazılım programı kullanılarak alınan floresan sinyaller, yoğunluklarına göre özel renklendirme sistemi ile yapay olarak renklendirildi ve aynı karenin beyaz ışık görüntüsü ile renklendirilmiş görüntüsü üst üste çakıştırılarak elde edilen görüntüler kaydedildi. Her görüntüye ait sinyal yoğunluğunu belirten ve renklendirmeye bağlı olarak oluşan renk skalaları hazırlandı.

#### **3.4.3. *Ex vivo* görüntülerin alınması ve analiz edilmesi**

*In vivo* olarak alınan floresan sinyalleri teyid etmek için, sistemik olarak  $2 \times 10^{11}$  DNA partikülü enjeksiyonundan dört gün sonra (en yüksek sinyal alınan gün), fareler ( $n=6$ ) sakrifiye edildi. Cerrahi operasyon ile karaciğer, akciğer, dalak, böbrek, mide

ve kalp gibi major organlar çıkarıldı ve organlar serum fizyolojik solüsyonu (Eczacıbaşı) ile yıkandı. BALB/c organları 100 mm doku kültür kabına yerleştirildi, beyaz ışık ve floresan ışıktaki görüntüleri alındı. Transgen sentezine bağılı olarak floresan sinyal veren tek organ karaciğer olduğı için, karaciğer ve karaciğer lobları bir doku kültür kabına yerleştirilerek beyaz ışık ve floresan ışık görüntüleri alındı. CCD kameranın hassasiyetini ölçmek amacıyla, sistemik olarak  $2 \times 10^{11}$  DNA partikülü enjeksiyonundan bir gün sonra, fareler (n=4) sakrifiye edildi. Cerrahi operasyon ile önce deri kesilerek çıkartıldı ve fare platen üzerine yüzüstü yatırılarak, beyaz ışık ve floresan ışık görüntüleri alındı. Daha sonra, makas ile periton açıldı ve fare tekrar platen üzerine yüzüstü (iç organları üzerine) yatırılarak beyaz ışık ve floresan ışık görüntüleri alındı. Alınan tüm görüntüler, 3.4.2'de açıklandığı gibi analiz edildi; sinyal yoğunlukları belirlendi ve renklendirme sistemi uygulanarak elde edilen görüntüler kaydedildi.

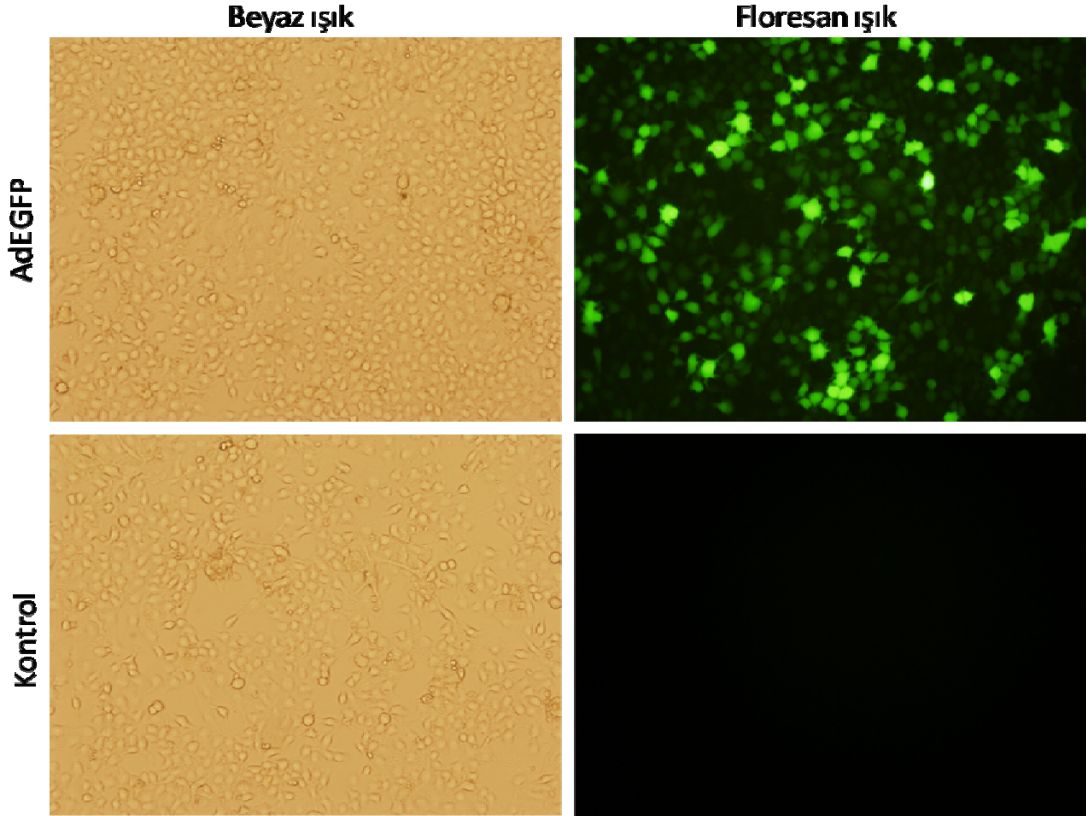
### **3.5. İstatistiksel analiz**

İstatistiksel analiz için, GraphPad Software'den (San Diego, CA) Prism programı kullanıldı. Herbir deney için istatistiksel sonuçlar, şekil açıklamalarında verilmiştir.

## BULGULAR

### 4.1. *In vivo* uygulamalar için yüksek kalitede adenoviral vektör saflaştırıldı

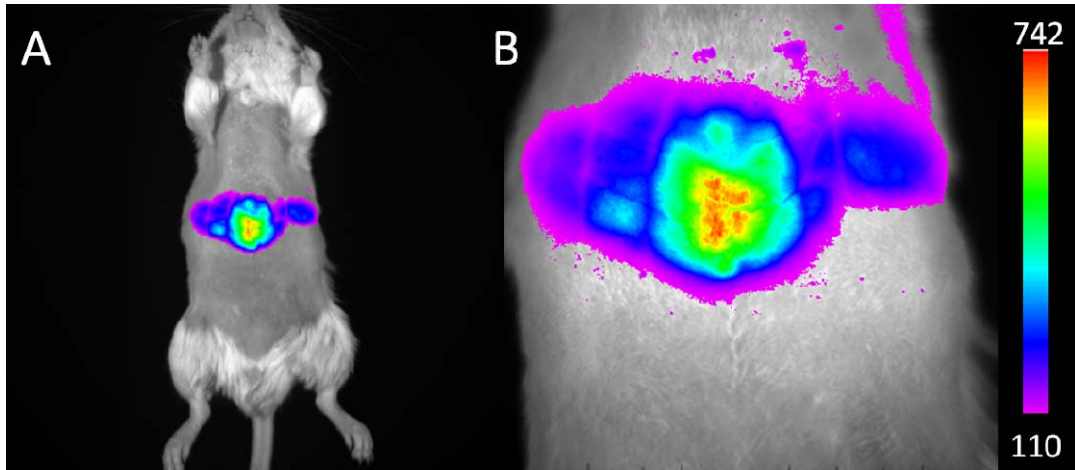
Elimizde bulunan adenoviral vektör stokları, Cs-Cl gradient yöntemi ile çoğaltıldı. Spektrofotometrik ölçümler sonucunda, elde edilen adenoviral vektör yoğunluğu  $1 \times 10^{13}$  partikül/ml olarak bulundu. Çoğaltılan bu adenoviral vektörler *in vivo* uygulamalarda kullanılmadan önce saflaştırıldı ve *in vitro* koşullarda kontrol edildi. Bunun için, E1 geni içermeyen A549 akciğer kanser hücre hattı kullanıldı. A549 hücreleri, AdEGFP vektörleri ile transdükte edildikten 24 saat sonra floresan mikroskop altında incelendi ve hücrelerde yoğun miktarda adenoviral vektör aracılı transgen sentezinin olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** A549 hücrelerinin AdEGFP vektörleri ile transdüksiyonu. Transdüksiyondan 24 saat sonra alınan beyaz ışık (sol) ve floresan görüntüleri (sağ). Floresan ışık altında A549 hücrelerinin yoğun miktarda yeşil floresan protein sentezlediği görülmektedir.

#### 4.2. Sistemik olarak adenoviral vektör enjeksiyonundan sonra farelerin sadece abdominal bölgelerinden güçlü sinyaller alındı

CMV promotörü altında EGFP geni taşıyan birinci jenerasyon adenoviral vektörler BALB/c farelere sistemik olarak kuyruk veninden enjekte edildi. EGFP sentezine bağlı olarak ölçülebilecek düzeyde sinyal elde edebilmek için farklı adenoviral vektör dozları ( $10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $10^{11}$  ve  $2 \times 10^{11}$  virüs partikülü) kullanıldı. Her doz grubunda ve kontrol grubunda beş fare kullanıldı. Enjeksiyonu takiben, belirli zaman aralıklarında cerrahi girişim olmaksızın BALB/c farelerin KODAK Image Station 2000MM model CCD kamera ile *in vivo* floresan görüntüleri alındı. CCD kamera ile çekilen floresan ışık görüntüleri yapay olarak renklendirildi ve beyaz ışıkta çekilen resim ile üst üste çakıştırılarak sinyalin alındığı bölge gösterildi. CCD kameraya ulaşan sinyallerin farelerin sadece abdominal bölgelerinden geldiği belirlendi (Şekil 4.2).

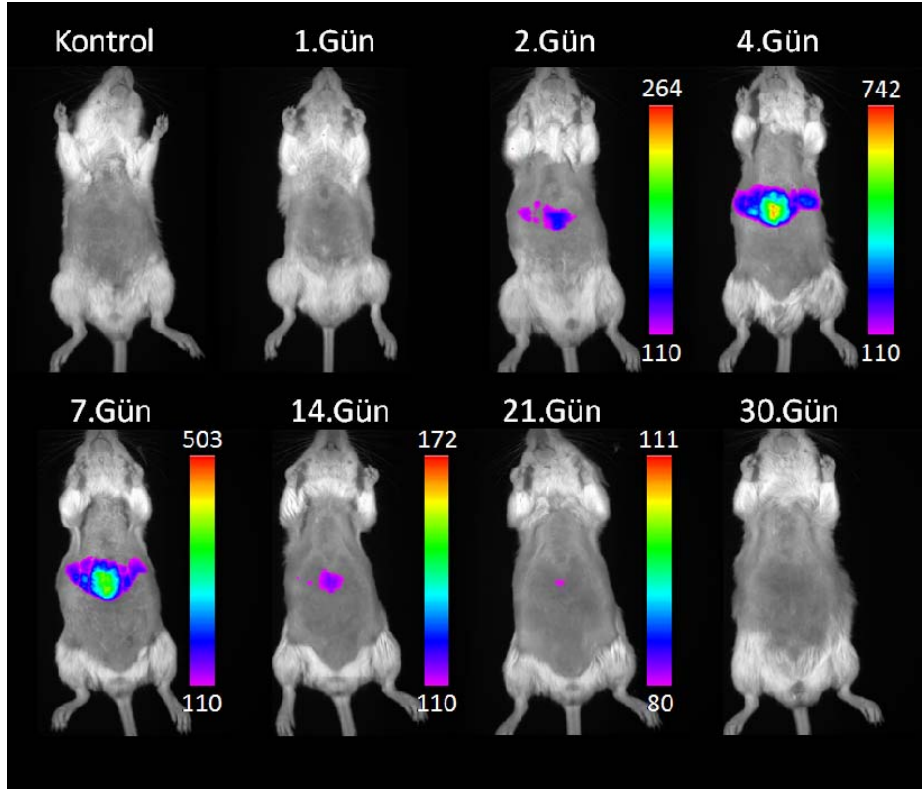


Şekil 4.2. CCD kamera ile alınan görüntüler. (A) Sistemik olarak  $2 \times 10^{11}$  virüs partikülü verildikten 4 gün sonra alınan görüntü (FOV 100). (B) Abdominal bölgenin yakından görüntüsü (FOV 30). Işık yoğunluğu mor renkten kırmızı renge doğru artmaktadır. Renk skalasının üstündeki rakam, alınan floresan sinyaldeki en yüksek foton sayısını, altındaki rakam ise en düşük foton sayısını göstermektedir.

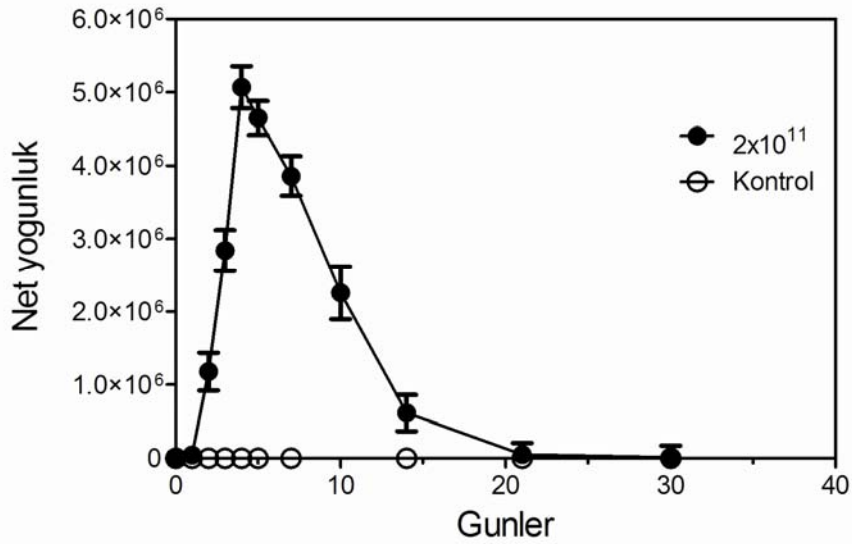
#### 4.3. Sistemik olarak adenoviral vektör enjeksiyonundan sonra BALB/c farelerden alınan *in vivo* floresan sinyaller zamanla değişti

Sistemik olarak farklı dozlarda adenoviral vektör enjeksiyonu yapılan farelerin belirli zaman aralıklarında *in vivo* floresan görüntüleri alındı. İlk günden itibaren BALB/c farelerin abdominal bölgelerinden alınan sinyaller analiz edilerek, floresan sinyal yoğunluklarının zamana göre değişimi belirlendi. BALB/c farelerin abdominal bölgelerinden alınan *in vivo* floresan sinyal yoğunluğunun 4. günde en üst seviyeye ulaştığı ve takip eden 17 gün içerisinde giderek azaldığı, 30.günde tespit edilemeyecek seviyeye indiği gösterildi (Şekil 4.3). Ancak yakından çekim yapıldığı takdirde (FOV 30), 30.günde düşük seviyede sinyal tespit edilebildi.

A



B

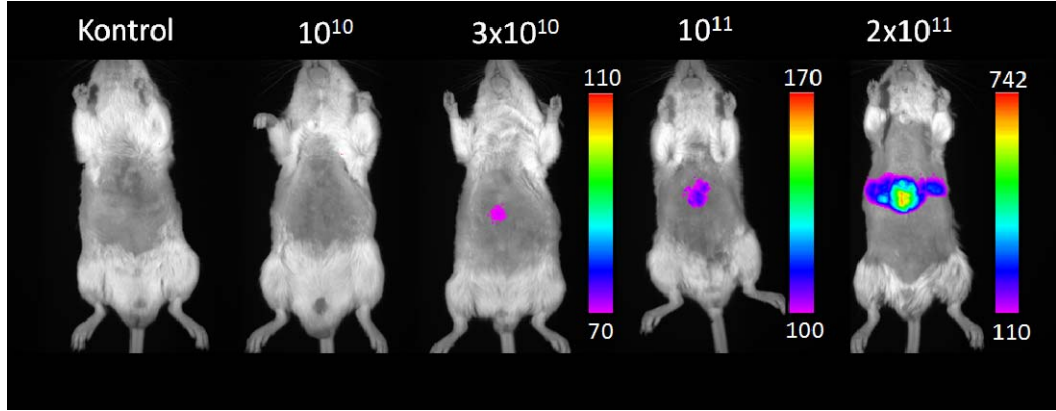


**Şekil 4.3.** Vektör enjeksiyonu sonrasında farelerin CCD kamera ile takibi. (A) Sistemik olarak en yüksek doz adenoviral vektör partikülü ( $2 \times 10^{11}$ ) verilen gruptaki farelerden alınan görüntü EGFP sentezinin zamanla vücuda dağılımını göstermektedir. Fareler  $2 \times 10^{11}$  virüs partikülü enjeksiyonundan 1, 2, 4, 7, 14, 21 ve 30 gün sonra CCD kamera ile görüntülenmiştir. (B)  $2 \times 10^{11}$  AdEGFP enjeksiyonundan sonra floresan yoğunluklarının sayısal olarak analizi. Daha düşük AdEGFP dozları ( $10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $10^{11}$  virüs partikülü/fare) grafiğin anlaşılır olması amacıyla grafikten çıkartılmıştır. Veriler, beş fareden alınan sinyallerin ortalamasını ( $\pm$  SEM) temsil etmektedir.

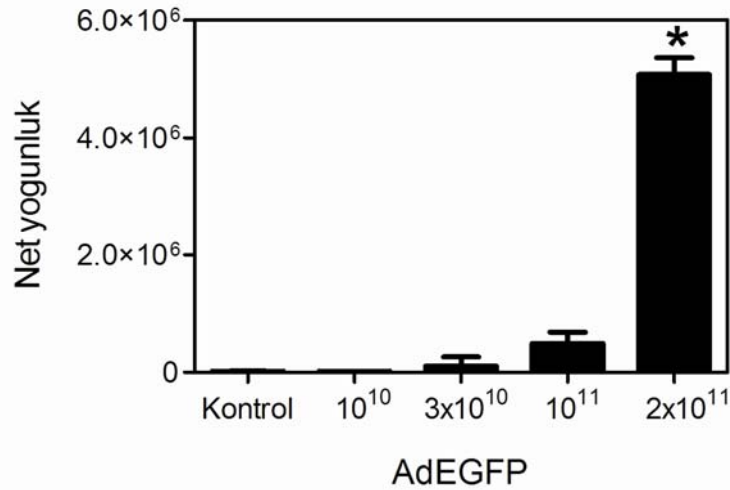
#### 4.4. *In vivo* floresan sinyal yoğunluğunun verilen vektör dozuna bağlı olduğu gösterildi

Sistemik olarak  $10^{10}$  virüs partikülü verilen gruptaki farelerden, takip süresince *in vivo* floresan sinyal alınmazken,  $3 \times 10^{10}$  ve  $10^{11}$  virüs partikülü verilen gruptaki farelerden takip süresince düşük seviyede sinyal alınabildi. Bunun yanı sıra  $2 \times 10^{11}$  virüs partikülü verilen gruptaki farelerden oldukça yoğun floresan sinyal alındı. Farelere verilen vektör dozunun artmasıyla, alınan floresan sinyalin arttığı ve  $2 \times 10^{11}$  partikül dozunun *in vivo* görüntü alımı için en uygun doz olduğu belirlendi (Şekil 4.4).  $2 \times 10^{12}$  virüs partikülü verilen fareler enjeksiyondan 4 gün sonra öldüğü için bu farelerden (n=3) görüntü alınamadı. One way ANOVA ve Bonferroni's Multiple Comparison Test sonucu sadece  $2 \times 10^{11}$  AdEGFP partikülü verilen grupta, diğer gruplara göre anlamlı derece yüksek floresan sinyal varlığı belirlenmiştir.

A



B

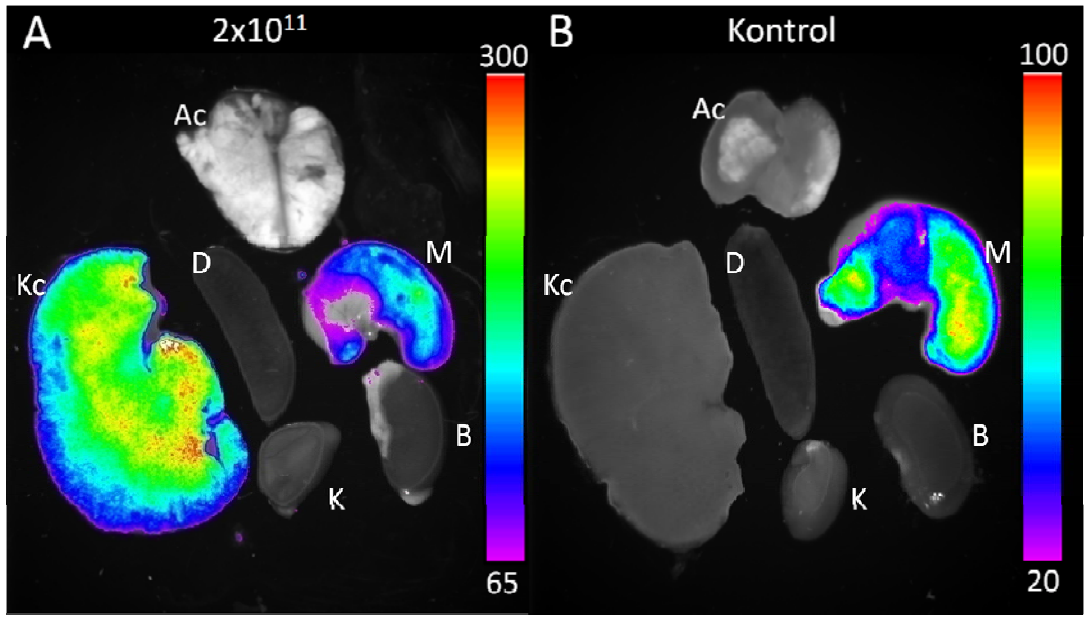


Şekil 4.4. CCD kamera kullanımı için uygun vektör dozunun belirlenmesi. (A) Sistemik olarak farklı dozlarda vektör verilen gruplar ve kontrol grubunun 4.gündeki görüntüleri. Verilen vektör dozları resimlerin üzerinde belirtilmiştir. (B) Grafikte, farelere verilen adenoviral vektör dozuna bağlı olarak alınan sinyal yoğunluklarının değiştiği gösterilmektedir. Değerler beş fareden alınan sinyallerin ortalamasını ( $\pm$  SEM) göstermektedir \*  $p < 0.05$ .



#### 4.5. Sistemik vektör enjeksiyonu sonrasında floresan sinyalin analizi ve *ex vivo* yerleşimi

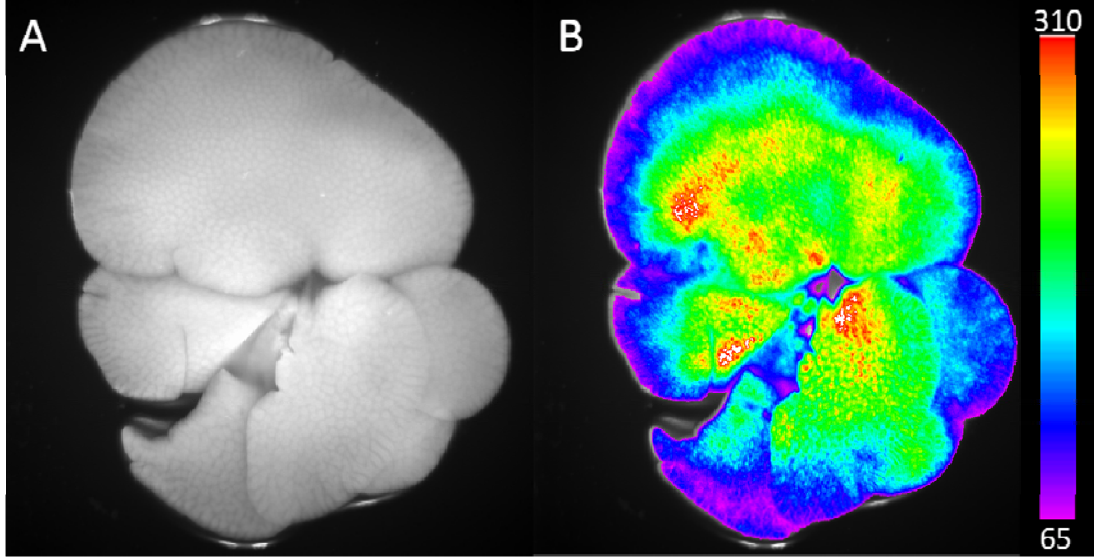
Sistemik vektör enjeksiyonu yapılan farelerin abdominal bölgelerinden gelen floresan sinyalin yerini belirlemek amacıyla,  $2 \times 10^{11}$  AdEGFP partikülü enjeksiyonundan dört gün sonra fareler sakrifiye edildi. Cerrahi operasyon ile major organları (karaciğer, akciğer, dalak, mide, böbrek, kalp) çıkartılarak *ex vivo* olarak analiz edildi. Vektör ya da PBS enjeksiyonu yapılan her iki grup farelerin (n=6) midelerinden floresan sinyal alındı. Buna rağmen sadece vektör enjeksiyonu yapılan gruptaki farelerin karaciğerlerinden sinyal alındı (Şekil 4.5). Dalak, kalp, akciğer, böbrek ya da diğer organlarda floresan sinyal tespit edilemedi.



Şekil 4.5. CCD kamera ile farenin major organların *ex vivo* analizi. Sistemik olarak (A)  $2 \times 10^{11}$  AdEGFP partikülü ya da (B) 200 µl PBS enjeksiyonu yapılan BALB/c farelerin enjeksiyondan dört gün sonra major organları (Kc; karaciğerin sol lateral lobu, Ac; akciğer, D; dalak, M; mide, B; böbrek, K; kalp) çıkartıldı ve CCD kamera ile görüntüleri alındı.

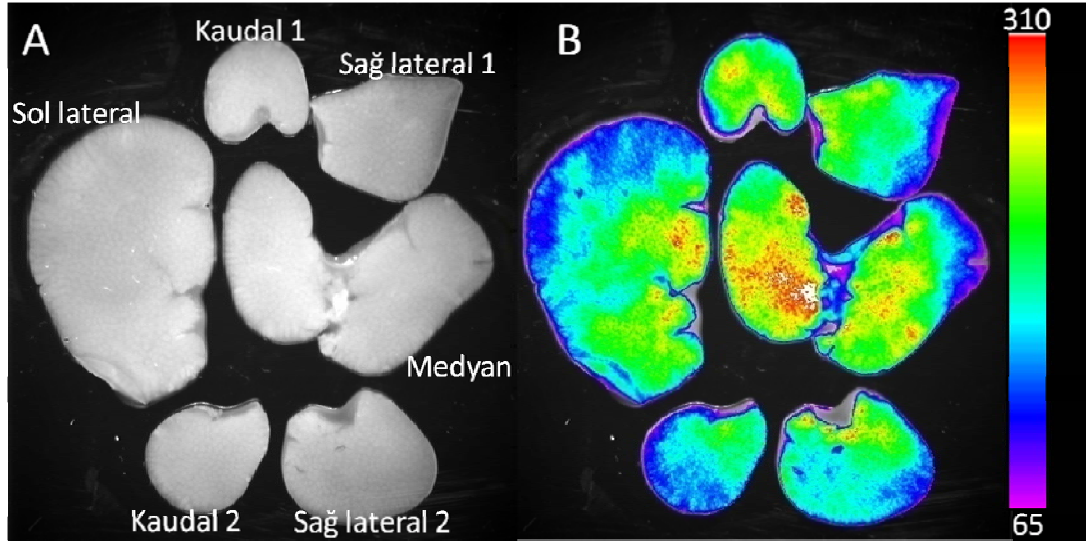
#### 4.6. EGFP sentezinin karaciğere dağılım profili

Karaciğerdeki EGFP sentezinin dağılımını göstermek amacıyla, fareler sistemik olarak  $2 \times 10^{11}$  AdEGFP partikülü enjeksiyonundan dört gün sonra sakrifiye edildi (n=6). Karaciğerleri çıkartıldı ve bir petri kabına yerleştirilerek CCD kamera ile floresan görüntüleri alındı. EGFP sentezine bağlı olarak karaciğerin tüm loblarından (medyan, kaudal, sol ve sağ lateral) floresan sinyal alındı (Şekil 4.6).

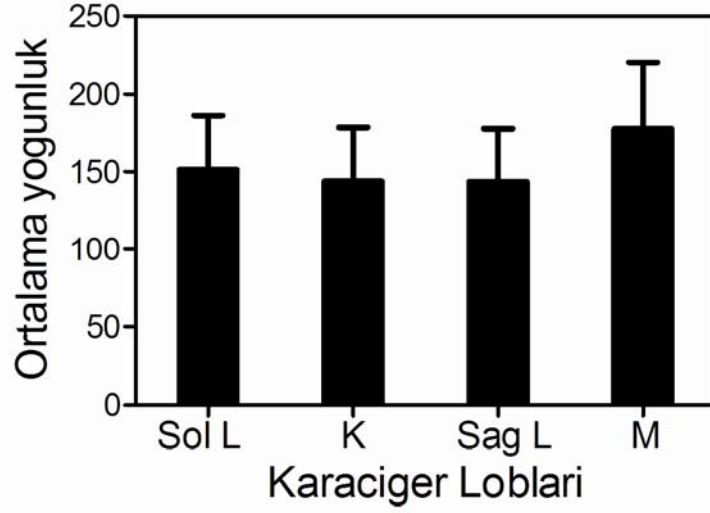


Şekil 4.6. CCD kamera ile karaciğerin *ex vivo* analizi. Sistemik olarak  $2 \times 10^{11}$  partikül enjeksiyonundan dört gün sonra farenin karaciğeri alınarak CCD kamera ile görüntülenmiştir. (A) Beyaz ışık, (B) renklendirilerek beyaz ışık görüntüsü ile üst üste çakıştırılmış floresan CCD görüntüsü.

Karaciğer loblarının daha ayrıntılı analizi için, loblar birbirlerinden ayrıldı ve floresan görüntüleri alındı. Ayrı ayrı loblardan alınan floresan sinyal yoğunluklarının ortalaması tespit edildi ve loblar birbirleriyle kıyaslandı. Sonuç olarak, transgen sentezine bağlı floresan sinyalin loblar arasında homojen bir şekilde dağılım gösterdiği belirlendi (Şekil 4.7).



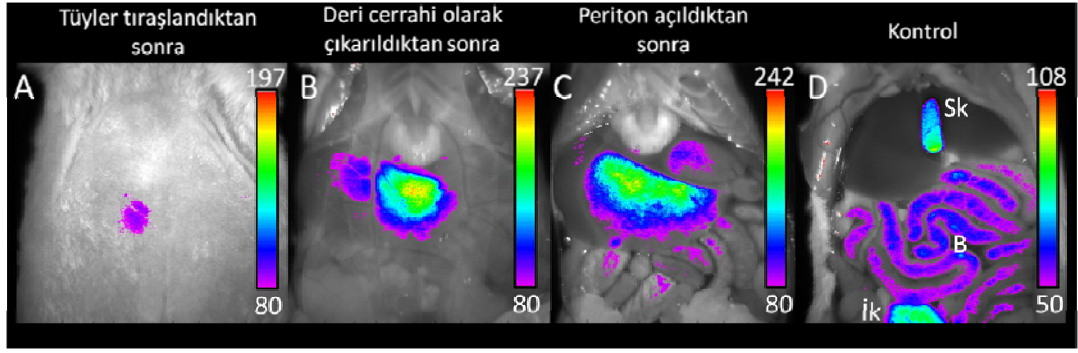
C



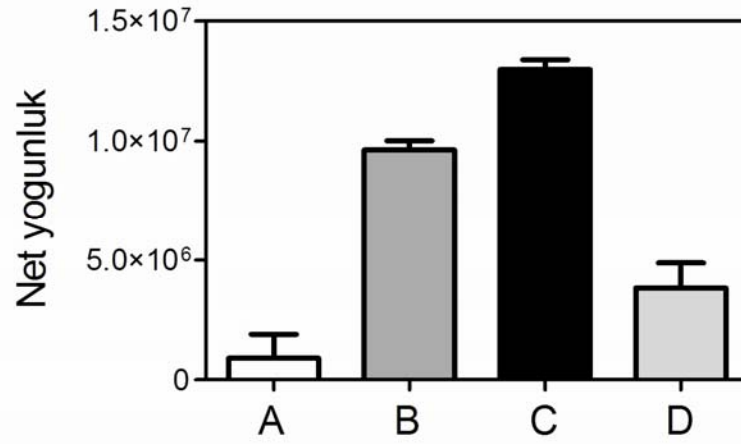
**Şekil 4.7.** CCD kamera ile karaciğer loblarının *ex vivo* analizi. Sistemik olarak  $2 \times 10^{11}$  virüs partikülü verilen BALB/c farelerin dört gün sonra, karaciğerleri alındı ve loblarına ayrıldı. Sağ lateral lob ve kaudal lob, görüntü analizinin doğruluğu için ikiye parçaya ayrılmıştır. Karaciğer loblarının; (A) beyaz ışık, (B) renklendirilerek beyaz ışık görüntüsü ile üst üste çakıştırılmış floresan CCD görüntüsü. (C) Grafikte  $n=6$  farklı farenin karaciğer loblarından alınan ortalama yoğunluk gösterilmiştir (Sol L: Sol lateral, K: Kaudal, Sağ L: Sağ lateral, M: Medyan). Değerler altı fareden alınan sinyallerin ortalamasını ( $\pm$  SEM) göstermektedir.

#### 4.7. Dokunun derinliği, CCD kameranın *in vivo* floresan sinyal alımını etkilemektedir

CCD kameranın, canlı organizmanın içindeki floresan sinyali algılayabilme kapasitesi üzerinde, doku derinliğinin ve deri katmanlarının etkisi ölçüldü. Bu amaçla,  $2 \times 10^{11}$  AdEGFP partikülü enjekte edildikten bir gün sonra (düşük seviyede sinyal tespit edildiği zaman), BALB/c farelerin (n=4) önce tüyleri tıraşarak görüntüleri alındı. Ardından farelerin abdominal derisi uzaklaştırılarak ve peritonu açılarak görüntüleri alındı. Elde edilen floresan sinyaller analiz edilerek birbirleriyle kıyaslandı. Tüyleri tıraşlandıktan sonra, deri uzaklaştırıldıktan ve peritonu açıldıktan sonra elde edilen floresan sinyallerin anlamlı derece farklı oldukları belirlendi. Bununla birlikte, kontrol farelerde transgenle ilgili sinyal alınmamasının yanında barsaklardan, idrar kesesi ve safra kesesinden otofloresan sinyaller alındı. Derinin uzaklaştırılmasının, floresan sinyal alım gücünü %19 artırdığı, peritonun açılarak iç organların direk kameraya tutulmasının ise sinyal alım gücünü %36 artırdığı bulundu (Şekil 4.8). One way of ANOVA analizi ve Bonferroni's Multiple Comparison Testi yapılarak tüyleri tıraşlanan fare grubuyla diğer gruplar arasında (derisi alınan ve peritonu açılan) istatistiksel olarak anlamlı derece fark bulundu. Kontrol grubu ve tüyleri tıraşlanan fare grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.



E



**Şekil 4.8.** Doku derinliğinin CCD kamera hassasiyeti üzerindeki etkisi. Sistemik olarak  $2 \times 10^{11}$  partikül enjeksiyonundan bir gün sonra, tüyleri tıraşlanan (A), derisi cerrahi olarak çıkartılan (B), peritonu açılan (C) ve kontrol grubu (D) BALB/c farelerin CCD görüntüleri alındı. Kontrol farelerin peritonu açılarak görüntüleri alındığında barsaklardan (B), safra kesesinden (Sk) ve idrar kesesinden (İk) otofloresan sinyaller alındı. (E) Farelerden alınan floresan sinyal yoğunlukları karşılaştırıldığında; tüyleri tıraşlanan (A sütunu), derisi uzaklaştırılan (B sütunu), peritonu açılan (C sütunu) ve kontrol grubu (D sütunu) BALB/c farelerden alınan sinyal yoğunluğunun doku derinlerine inildikçe arttığı gösterildi. Değerler dört fareden alınan sinyallerin ortalamasını ( $\pm$  SEM) göstermektedir.

## TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Adenoviral vektörlerin gen tedavisinde kullanımını uygun kılan birçok özelliği vardır [96]. Örneğin, adenovirüsler bölünen ya da bölünmeyen birçok hücre tipini, yüksek etkinlikte enfekte edebilme yeteneğine sahiptir [97]. Bununla birlikte, adenovirüsler enfekte ettikleri hücrelerde yüksek seviyede transgen sentezi sağlarlar [98]. Bu özelliklerinin yanı sıra, kolayca üretilmesi ve transgen alabilme kapasitesinin yüksek olması nedeniyle, adenovirüsler gen tedavi vektörleri olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [22]. Ayrıca, günümüze kadar yapılmış olan klinik gen tedavi çalışmalarına bakıldığında, %24.7 oranla en fazla kullanılan gen tedavi vektörünün adenovirüsler olduğu görülmektedir [3, 99].

Gen tedavi çalışmalarında, transgen sentezinin süresi ve miktarı tedavi açısından oldukça önemli parametrelerdir. Bu parametreler, moleküler görüntüleme teknikleri kullanılarak kolay ve hızlı bir şekilde belirlenebilmektedir. Bu nedenle, girişimsel olmayan moleküler görüntüleme tekniklerinin kullanımı son zamanlarda oldukça popüler hale gelmiştir. Floresan görüntüleme tekniğinin, biyoluminesan görüntüleme tekniğine göre bazı avantajları vardır. Örneğin, floresan görüntüleme yönteminde substrata ya da kofaktöre ihtiyaç yoktur [37, 86, 100]. Floresan görüntüleme tekniğinde, transfekte olan organın floresan yoğunluğu CCD kamera ile etkin bir şekilde algılanır. Ayrıca, doku yüzeyinden alınan görüntüler oldukça kısa süre içerisinde elde edilmektedir [78]. Genel olarak bakıldığında, canlı hayvanlarda transgen ifadesinin floresan görüntüleme tekniği ile takibi oldukça pratik, maliyet açısından uygun ve uygulanması kolay bir tekniktir. Bu nedenle, çalışmamızda floresan belirteç geni taşıyan adenoviral vektörler kullanılarak BALB/c farelerde floresan belirteç gen ifadesi sağlandı ve girişimsel olmayan görüntüleme yöntemi kullanıldı.

Bu amaçla, artan dozlarda AdEGFP vektörleri BALB/c farelere sistemik olarak enjekte edildi ve sadece  $2 \times 10^{11}$  vektör partikülü enjekte edilen grupta oldukça güçlü sinyaller alındı. Transgene bağlı sinyal sadece farenin üst abdominal bölgesinden alındı. Vektörün fareye enjeksiyonundan 4 gün sonra alınan sinyal miktarı en üst düzeye ulaştı ve 21 gün sonrasında aşamalı olarak sinyal miktarı azaldı. Transgen ifadesini yansıtan floresan sinyalin yoğunluğunun, verilen vektör dozuna bağlı olduğu belirlendi. Daha önce yapılan çalışmalarda, kuyruk veninden  $2 \times 10^{11}$  AdEGFP partikülü verildiğinde, adenoviral vektörlerin etkili bir şekilde karaciğer hücrelerini enfekte ettiği, karaciğer kesitlerinde yapılan *ex vivo* analizlerle gösterilmiştir [101, 102]. Başka bir çalışmada, lusiferaz geni taşıyan  $2 \times 10^{11}$  adenoviral vektör partikülü kuyruk veninden verilmiş ve *in vivo* olarak başarılı bir şekilde karaciğer görüntülenmiştir [33]. Diğer bir çalışmada ise, yine lusiferaz geni içeren adenoviral vektör enjeksiyonu ile ( $10^9$  pfu, yaklaşık olarak  $2 \times 10^{10}$  -  $5 \times 10^{10}$  adenoviral vektör partikülü) karaciğerde transgen ifadesi belirlenmiştir [86]. Bulgularımıza paralel

olarak, kullanılan vektör dozunun artırılması ( $2 \times 10^{12}$  vektör partikülü), şiddetli sistemik yangı reaksiyonuna neden olduğu ve daha önceden rapor edilen bazı durumlarda olduğu gibi ölümle sonuçlandığı görülmüştür [101, 103, 104].

Daha önce yapılan çalışmalarda, adenoviral vektöre ve adenoviral vektörle enfekte olan konak hücrelere karşı gelişen immün yanıt sonucu transgen ifadesinin geçici olduğunun gösterilmesi, floresan sinyal varlığının neden kısa süreli olduğunu açıklamaktadır. Bu durum, kalıtsal hastalıkların tedavisinde adenoviral vektörlerin tedavi edici etkinliğini sınırlamaktadır. Yine de tümör hücrelerinde immün yanıtın gelişmesi bakımından, adenoviral vektörlerin klinik kanser gen tedavi denemelerinde kullanılması oldukça avantajlı görünmektedir [105]. Daha önce belirtildiği gibi, adenovirüs aracılı transgen ifadesi genellikle iki ya da üç hafta içerisinde tespit edilemeyecek seviyeye inmektedir [51]. Çalışmamızda, adenoviral vektör aracılı transgen ifadesi yaklaşık 30 gün girişimsel olmayan floresan görüntüleme yöntemi ile gösterilmiştir.

AdEGFP enjekte edilen BALB/c farelerin major organları *ex vivo* olarak incelendiğinde, sadece karaciğerde oldukça yüksek seviyede floresan sinyalin varlığı belirlendi. Yapılan çalışmalarda karaciğerin adenovirüs enfeksiyonuna oldukça uygun olduğu belirtilmiştir [34]. Özellikle kuyruk veninden i.v. olarak verilen adenovirüslerin büyük bir kısmı karaciğere yerleşmektedir [102]. Karaciğerin dışındaki, dalak, akciğer, kalp ve böbrek gibi bazı organlar anatomik bariyerler ve [32] organlardaki CAR sentezinin az olması nedeniyle çok zayıf bir şekilde transdükte olurlar. Çalışmamızda da, karaciğer dışındaki diğer major organların *ex vivo* analizi sonucunda EGFP ifadesi tespit edilememiştir. Dahası, AdEGFP vektörlerinin i.v. enjeksiyonu, fare karaciğerinde EGFP'nin homojen bir şekilde sentezlenmesine neden olmuştur. Karaciğer lobları tek tek analiz edildiğinde, EGFP ifadesinin tüm karaciğere homojen bir şekilde yayıldığı gösterilmiştir [33]. Bu durum, karaciğerin tamamında transgen ifadesinin sağlanması istenen bazı klinik gen tedavi uygulamaları açısından oldukça avantajlıdır.

Tüm bunların yanısıra, floresan görüntüleme tekniği ile ilgili yaşanan bazı zorluklar vardır. Floresan görüntü alabilmek için ışık kaynağının kullanılması, bu ışığın dokular tarafından emilimine ve endojen doku floroforları tarafından yansıtılmasına neden olmaktadır. Bu durum otofloresan olarak adlandırılmakta ve arka planda yüksek derecede kirliliğe neden olarak, EGFP'ye ait floresan sinyali maskeleyebilmektedir [78]. Çalışmamızda, kontrol gruplarındaki farelerin safra kesesi, idrar kesesi, barsakları ve midesinden floresan sinyaller alınması üzerine; bu organların otofloresan özellikte olduğu ve yanlış pozitif sinyaller verdiği gösterilmiştir [84, 87]. Bu organların yanı sıra, tüyler de otofloresan sinyallere neden olmaktadır [106]. Bu nedenle görüntü alınacak bölgenin çok iyi traşlanması gerekmektedir. Fakat, tüyler traşlansa dahi vücudun derinlerinde yer alan dokulardan gelen floresan sinyali tespit etmek, canlı dokunun ışığı emme ve dağıtma özelliğinden dolayı oldukça zordur. Bu nedenle vücudun derinlerinde yer alan organların, cerrahi yöntemlerle vücut dışına çekilmesi floresan sinyal alımını kolaylaştırmaktadır. Çalışmamızda, floresan sinyal veren organların (karaciğerin) kameraya direkt olarak tutulmasıyla sinyal yoğunluğunda %36 artış tespit edildi. Bu

bulgu, daha önceden yapılan ve sinyal yoğunluğunun transfekte olan hücrelerin derinliğine bağlı olduğunu gösteren çalışma ile de uyumlu bulunmuştur [87]. Doku derinliğinin sinyal alım gücünü etkilemesi, ancak kırmızı floresan proteinlerin kullanılması ile çözülebilir. Kırmızı floresan proteinler, canlı dokunun ışık yayılımı yaptığı dalga boyundan daha yüksek dalga boylarındaki ışık ile uyarılmakta ve yüksek dalga boyunda ışık yayılımı yapmaktadır. Bu nedenle, dokuya bağlı ışık yayılımları engellenmektedir. Ayrıca, kırmızı floresan varyantlarının kullanımı ile derindeki dokular kolaylıkla görüntülenebilmektedir [107].

Sonuç olarak, bu çalışmada girişimsel olmayan *in vivo* görüntüleme yönteminin hayvanlardaki adenovirüs aracılı EGFP ifadesini belirlemek için oldukça kullanışlı bir yöntem olduğu gösterildi. Bununla birlikte, sistemik adenoviral vektörlerin enjeksiyonunun özellikle karaciğerde sinyal yığılmasına neden olduğu gösterildi. Bu yöntem oldukça pratik, maliyet açısından uygun ve uygulanabilir bir yöntemdir. Diğer gen tedavi vektörlerinin, floresan belirteçlerin ve hatta gen aktarım yollarının kullanılması girişimsel olmayan floresan görüntüleme tekniklerinin uygulanışını geliştirecektir.



## KAYNAKLAR

1. Cotrim, A.P. and B.J. Baum, Gene therapy: some history, applications, problems, and prospects. *Toxicol Pathol*, 2008. 36(1): p. 97-103.
2. Rosenberg, S.A., et al., Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*, 1990. 323(9): p. 570-8.
3. Edelstein, M.L., M.R. Abedi, and J. Wixon, Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J Gene Med*, 2007. 9(10): p. 833-42.
4. Gardlik, R., et al., Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit*, 2005. 11(4): p. RA110-21.
5. Wilson, J.M., Vectors--shuttle vehicles for gene therapy. *Clin Exp Immunol*, 1997. 107 Suppl 1: p. 31-2.
6. Rowe, W.P., et al., Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1953. 84(3): p. 570-3.
7. Enders, J.F., et al., Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science*, 1956. 124(3212): p. 119-20.
8. Volpers, C. and S. Kochanek, Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med*, 2004. 6 Suppl 1: p. S164-71.
9. Tatsis, N. and H.C. Ertl, Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther*, 2004. 10(4): p. 616-29.
10. Campos, S.K. and M.A. Barry, Current advances and future challenges in Adenoviral vector biology and targeting. *Curr Gene Ther*, 2007. 7(3): p. 189-204.
11. Russell, W.C., Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*, 2000. 81(Pt 11): p. 2573-604.

12. Crawford-Miksza, L. and D.P. Schnurr, Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues. *J Virol*, 1996. 70(3): p. 1836-44.
13. Mathias, P., et al., Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J Virol*, 1994. 68(10): p. 6811-4.
14. Koizumi, N., et al., Reduction of natural adenovirus tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and alphav integrin-binding ablation. *J Virol*, 2003. 77(24): p. 13062-72.
15. Bergelson, J.M., et al., Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 1997. 275(5304): p. 1320-3.
16. Roelvink, P.W., et al., The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol*, 1998. 72(10): p. 7909-15.
17. Tomko, R.P., R. Xu, and L. Philipson, HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(7): p. 3352-6.
18. Bergelson, J.M., et al., The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J Virol*, 1998. 72(1): p. 415-9.
19. Lee, T.W., D.A. Matthews, and G.E. Blair, Novel molecular approaches to cystic fibrosis gene therapy. *Biochem J*, 2005. 387(Pt 1): p. 1-15.
20. Meier, O. and U.F. Greber, Adenovirus endocytosis. *J Gene Med*, 2003. 5(6): p. 451-62.
21. Leopold, P.L., et al., Fluorescent virions: dynamic tracking of the pathway of adenoviral gene transfer vectors in living cells. *Hum Gene Ther*, 1998. 9(3): p. 367-78.
22. Vorburger, S.A. and K.K. Hunt, Adenoviral gene therapy. *Oncologist*, 2002. 7(1): p. 46-59.
23. Kay, M.A., J.C. Glorioso, and L. Naldini, Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med*, 2001. 7(1): p. 33-40.

24. Danthinne, X. and M.J. Imperiale, Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther*, 2000. 7(20): p. 1707-14.
25. Anderson, R.D., et al., A simple method for the rapid generation of recombinant adenovirus vectors. *Gene Ther*, 2000. 7(12): p. 1034-8.
26. Graham, F.L. and L. Prevec, Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol Biotechnol*, 1995. 3(3): p. 207-20.
27. Christ, M., et al., Gene therapy with recombinant adenovirus vectors: evaluation of the host immune response. *Immunol Lett*, 1997. 57(1-3): p. 19-25.
28. Yang, Y., et al., Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(10): p. 4407-11.
29. Engelhardt, J.F., et al., Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(13): p. 6196-200.
30. Hidaka, C., et al., CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts. *J Clin Invest*, 1999. 103(4): p. 579-87.
31. Tallone, T., et al., A mouse model for adenovirus gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(14): p. 7910-5.
32. Fechner, H., et al., Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther*, 1999. 6(9): p. 1520-35.
33. Crettaz, J., et al., Intrahepatic injection of adenovirus reduces inflammation and increases gene transfer and therapeutic effect in mice. *Hepatology*, 2006. 44(3): p. 623-32.
34. Lefesvre, P., et al., Genetic heterogeneity in response to adenovirus gene therapy. *BMC Mol Biol*, 2003. 4: p. 4.
35. Herrmann, J., et al., Comparative analysis of adenoviral transgene delivery via tail or portal vein into rat liver. *Arch Virol*, 2004. 149(8): p. 1611-7.

36. Wood, M., et al., Biodistribution of an adenoviral vector carrying the luciferase reporter gene following intravesical or intravenous administration to a mouse. *Cancer Gene Ther*, 1999. 6(4): p. 367-72.
37. Honigman, A., et al., Imaging transgene expression in live animals. *Mol Ther*, 2001. 4(3): p. 239-49.
38. Yang, M., et al., Visualizing gene expression by whole-body fluorescence imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(22): p. 12278-82.
39. Ayuso, E., et al., In vivo gene transfer to pancreatic beta cells by systemic delivery of adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*, 2004. 15(8): p. 805-12.
40. Sarkioja, M., et al., Noninvasive imaging for evaluation of the systemic delivery of capsid-modified adenoviruses in an orthotopic model of advanced lung cancer. *Cancer*, 2006. 107(7): p. 1578-88.
41. Hong, S.H., et al., In vivo reprogramming of hTERT by trans-splicing ribozyme to target tumor cells. *Mol Ther*, 2008. 16(1): p. 74-80.
42. Huard, J., et al., The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenoviral recombinants. *Gene Ther*, 1995. 2(2): p. 107-15.
43. Huard, J., et al., Differential short-term transduction efficiency of adult versus newborn mouse tissues by adenoviral recombinants. *Exp Mol Pathol*, 1995. 62(2): p. 131-43.
44. Liu, Q. and D.A. Muruve, Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther*, 2003. 10(11): p. 935-40.
45. Zhang, Y., et al., Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages. *Mol Ther*, 2001. 3(5 Pt 1): p. 697-707.
46. Muruve, D.A., The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther*, 2004. 15(12): p. 1157-66.
47. Worgall, S., et al., Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Hum Gene Ther*, 1997. 8(1): p. 37-44.

48. Shayakhmetov, D.M., et al., Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity. *J Virol*, 2005. 79(12): p. 7478-91.
49. Smith, J.S., Z. Xu, and A.P. Byrnes, A quantitative assay for measuring clearance of adenovirus vectors by Kupffer cells. *J Virol Methods*, 2008. 147(1): p. 54-60.
50. Manickan, E., et al., Rapid Kupffer cell death after intravenous injection of adenovirus vectors. *Mol Ther*, 2006. 13(1): p. 108-17.
51. Wilson, J.M., Adenoviruses as gene-delivery vehicles. *N Engl J Med*, 1996. 334(18): p. 1185-7.
52. Barr, D., et al., Strain related variations in adenovirally mediated transgene expression from mouse hepatocytes in vivo: comparisons between immunocompetent and immunodeficient inbred strains. *Gene Ther*, 1995. 2(2): p. 151-5.
53. Peng, Y., E. Falck-Pedersen, and K.B. Elkon, Variation in adenovirus transgene expression between BALB/c and C57BL/6 mice is associated with differences in interleukin-12 and gamma interferon production and NK cell activation. *J Virol*, 2001. 75(10): p. 4540-50.
54. Tripathy, S.K., et al., Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nat Med*, 1996. 2(5): p. 545-50.
55. Michou, A.I., et al., Adenovirus-mediated gene transfer: influence of transgene, mouse strain and type of immune response on persistence of transgene expression. *Gene Ther*, 1997. 4(5): p. 473-82.
56. Raty, J.K., et al., Non-invasive Imaging in Gene Therapy. *Mol Ther*, 2007. 15(9): p. 1579-86.
57. Massoud, T.F. and S.S. Gambhir, Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev*, 2003. 17(5): p. 545-80.
58. Gambhir, S.S., Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(9): p. 683-93.
59. Evgenov, N.V., et al., In vivo imaging of islet transplantation. *Nat Med*, 2006. 12(1): p. 144-8.

60. Zinn, K.R., et al., Imaging and tissue biodistribution of <sup>99m</sup>Tc-labeled adenovirus knob (serotype 5). *Gene Ther*, 1998. 5(6): p. 798-808.
61. Öztürk, B., Manyetik rezonans görüntüleme. *Biltek Magazin*, 2004. 25(3): p. 52-54.
62. Medarova, Z., et al., In vivo imaging of siRNA delivery and silencing in tumors. *Nat Med*, 2007. 13(3): p. 372-7.
63. Raty, J.K., et al., Magnetic resonance imaging of viral particle biodistribution in vivo. *Gene Ther*, 2006. 13(20): p. 1440-6.
64. Vasalatiy, O., et al., Labeling of adenovirus particles with PARACEST agents. *Bioconjug Chem*, 2008. 19(3): p. 598-606.
65. Louie, A.Y., et al., In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging. *Nat Biotechnol*, 2000. 18(3): p. 321-5.
66. Uğur, Ö., Pozitron Emisyon Tomografisi (PET), in XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Non-Hodgkin Lenfoma. 2004. p. 55-58.
67. Gambhir, S.S., et al., Imaging adenoviral-directed reporter gene expression in living animals with positron emission tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(5): p. 2333-8.
68. Penuelas, I., et al., Positron emission tomography and gene therapy: basic concepts and experimental approaches for in vivo gene expression imaging. *Mol Imaging Biol*, 2004. 6(4): p. 225-38.
69. Serganova, I. and R. Blasberg, Reporter gene imaging: potential impact on therapy. *Nucl Med Biol*, 2005. 32(7): p. 763-80.
70. Auricchio, A., et al., In vivo quantitative noninvasive imaging of gene transfer by single-photon emission computerized tomography. *Hum Gene Ther*, 2003. 14(3): p. 255-61.
71. Golzio, M., et al., Optical imaging of in vivo gene expression: a critical assessment of the methodology and associated technologies. *Gene Ther*, 2004. 11 Suppl 1: p. S85-91.

72. Tsien, R.Y., The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 1998. 67: p. 509-44.
73. Prasher, D.C., et al., Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 1992. 111(2): p. 229-33.
74. 2008 Nobel Ödülleri:  
[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/press.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/press.html).
75. Muller-Taubenberger, A. and K.I. Anderson, Recent advances using green and red fluorescent protein variants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007. 77(1): p. 1-12.
76. Ward, W.W. and S.H. Bokman, Reversible denaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry*, 1982. 21(19): p. 4535-40.
77. Bhaumik, S. and S.S. Gambhir, Optical imaging of *Renilla luciferase* reporter gene expression in living mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(1): p. 377-82.
78. Contag, C.H. and M.H. Bachmann, Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. *Annu Rev Biomed Eng*, 2002. 4: p. 235-60.
79. Park, S.Y. and G.I. Bell, Noninvasive monitoring of changes in pancreatic beta-cell mass by bioluminescent imaging in MIP-luc transgenic mice. *Horm Metab Res*, 2009. 41(1): p. 1-4.
80. Welsh, D.K. and S.A. Kay, Bioluminescence imaging in living organisms. *Curr Opin Biotechnol*, 2005. 16(1): p. 73-8.
81. Contag, C.H., et al., Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochem Photobiol*, 1997. 66(4): p. 523-31.
82. KODAK Image Station 2000MM, User's Manuel, Introduction, Section 2.
83. Contag, C.H., et al., Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Mol Microbiol*, 1995. 18(4): p. 593-603.
84. Bouchard, M.B., et al., Technical considerations in longitudinal multispectral small animal molecular imaging. *J Biomed Opt*, 2007. 12(5): p. 051601.

85. Contag, P.R., et al., Bioluminescent indicators in living mammals. *Nat Med*, 1998. 4(2): p. 245-7.
86. Wu, J.C., et al., Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice. *Mol Ther*, 2001. 4(4): p. 297-306.
87. Caceres, G., et al., Imaging of luciferase and GFP-transfected human tumours in nude mice. *Luminescence*, 2003. 18(4): p. 218-23.
88. Yang, M., et al., Whole-body and intravital optical imaging of angiogenesis in orthotopically implanted tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(5): p. 2616-21.
89. Pfeifer, A., et al., Transduction of liver cells by lentiviral vectors: analysis in living animals by fluorescence imaging. *Mol Ther*, 2001. 3(3): p. 319-22.
90. Lipshutz, G.S., et al., In utero delivery of adeno-associated viral vectors: intraperitoneal gene transfer produces long-term expression. *Mol Ther*, 2001. 3(3): p. 284-92.
91. Lyons, S.K., et al., Noninvasive bioluminescence imaging of normal and spontaneously transformed prostate tissue in mice. *Cancer Res*, 2006. 66(9): p. 4701-7.
92. Nogawa, M., et al., Monitoring luciferase-labeled cancer cell growth and metastasis in different in vivo models. *Cancer Lett*, 2005. 217(2): p. 243-53.
93. Shah, K., et al., Real-time imaging of TRAIL-induced apoptosis of glioma tumors in vivo. *Oncogene*, 2003. 22(44): p. 6865-72.
94. Yang, M., et al., Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(3): p. 1206-11.
95. Sanlioglu, S., G. Luleci, and K.W. Thomas, Simultaneous inhibition of Rac1 and IKK pathways sensitizes lung cancer cells to TNFalpha-mediated apoptosis. *Cancer Gene Ther*, 2001. 8(11): p. 897-905.
96. Aydin, C., et al., Decoy receptor-2 small interfering RNA (siRNA) strategy employing three different siRNA constructs in combination defeats adenovirus-transferred tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in lung cancer cells. *Hum Gene Ther*, 2007. 18(1): p. 39-50.



97. Yang, J., et al., Genetic redox preconditioning differentially modulates AP-1 and NF kappa B responses following cardiac ischemia/reperfusion injury and protects against necrosis and apoptosis. *Mol Ther*, 2003. 7(3): p. 341-53.
98. Sanlioglu, A.D., et al., DcR2 (TRAIL-R4) siRNA and adenovirus delivery of TRAIL (Ad5hTRAIL) break down in vitro tumorigenic potential of prostate carcinoma cells. *Cancer Gene Ther*, 2007. 14(12): p. 976-84.
99. Sanlioglu, A.D., Current progress in adenovirus mediated gene therapy for patients with prostate carcinoma. *Gene Ther Mol Biol*, 2003. 7: p. 113-133.
100. Hofherr, S.E., et al., Modification of adenoviral vectors with polyethylene glycol modulates in vivo tissue tropism and gene expression. *Mol Ther*, 2008. 16(7): p. 1276-82.
101. Doerschug, K., et al., First-generation adenovirus vectors shorten survival time in a murine model of sepsis. *J Immunol*, 2002. 169(11): p. 6539-45.
102. Dajani, R., et al., Pleiotropic functions of TNF-alpha determine distinct IKKbeta-dependent hepatocellular fates in response to LPS. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. 292(1): p. G242-52.
103. Varnavski, A.N., et al., Evaluation of toxicity from high-dose systemic administration of recombinant adenovirus vector in vector-naive and pre-immunized mice. *Gene Ther*, 2005. 12(5): p. 427-36.
104. Raper, S.E., et al., Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*, 2003. 80(1-2): p. 148-58.
105. Sanlioglu, A.D., et al., Fundamental principals of tumor necrosis factor-alpha gene therapy approach and implications for patients with lung carcinoma. *Lung Cancer*, 2004. 44(2): p. 199-211.
106. Wack, S., et al., Feasibility, sensitivity, and reliability of laser-induced fluorescence imaging of green fluorescent protein-expressing tumors in vivo. *Mol Ther*, 2003. 7(6): p. 765-73.
107. Kaijzel, E.L., G. van der Pluijm, and C.W. Lowik, Whole-body optical imaging in animal models to assess cancer development and progression. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(12): p. 3490-7.

## ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Çankırı’da doğan Sevim KAHRAMAN, ilköğrenimini 1990-1996 yılları arasında Bursa Hürriyet İlköğretim Okulunda yapmış, 1996 yılında babasının emekliliği nedeniyle Antalya H.Avni Çöllü İlköğretim okuluna 7.sınıftan devam etmiş ve 1998 yılında mezun olmuştur. Antalya Aldemir Atilla Anadolu Lisesi’ni kazanarak 1998-2002 yılları arasında lise öğrenimini görmüştür. 2002-2006 yılları arasında yüksek öğretim bursu ile kazandığı T.C. Haliç Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde lisans öğrenimini tamamlamıştır. 2006 yılında Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda, Tıbbi Genetik Yüksek Lisansı yapmaya hak kazanmıştır. Halen Tıbbi Genetik alanında yüksek lisans yapmakta olup, 2009 Mart’tan itibaren Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında araştırma görevlisi kadrosunda çalışmaktadır.

2008 yılında 3.Klinik Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresinde Pankreatik Adacık İzolasyonu ve Transplantasyonu Kursunun düzenleyicisi olarak görev almıştır. Science Citation Index’e kayıtlı bilimsel dergilerde 1 makalesi yayına kabul edilmiş, 1 makalesi yayına kabul edilme aşamasındadır. Uluslararası kongrelerde 2’si sözlü sunuma seçilen 10 bildirisi, ulusal kongrelerde 5’i sözlü sunuma seçilen 11 bildirisi bulunmaktadır.