

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

BAKULOVİRAL VEKTÖRLER ARACILI SİTOKİN VE İNTİHAR GEN
TEDAVİLERİ

SEDEF HANDE AKTAŞ

ŞUBAT

2015

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

BAKULOVİRAL VEKTÖRLER ARACILI SİTOKİN VE İNTİHAR GEN
TEDAVİLERİ

SEDEF HANDE AKTAŞ

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. HAKAN AKBULUT

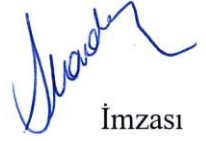
ŞUBAT

2015

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayımlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Sedef Hande AKTAŞ



İmzası

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Hakan AKBULUT danışmanlığında **Sedef Hande AKTAŞ** tarafından hazırlanan bu çalışma 02/02/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Fikri İğli

İmza: 

Üye: Prof. Dr. Hakan AKBULUT

İmza: 

Üye: Prof. Dr. Kamil Can Akcah

İmza: 

Üye: Doç. Dr. Dr. Mustafa İnce

İmza: 

Üye: Prof. Dr. Özden Tocal

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Kanser Tedavisinde Mezenkimal Kök Hücre Aracılı İntihar Gen Tedavisi

Sedef Hande AKTAŞ

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof.Dr. Hakan AKBULUT

Son yıllarda kanser gen tedavisi ajanlarının kanser hücrelerine ulaştırılmasında kök hücrelerin taşıyıcı araçlar olarak kullanımı önem kazanmıştır. Mezenkimal kök hücreler (MKH) de bu amaçla daha fazla kullanılmaya başlanmıştır. MKH sistemik verildiğinde büyük oranda tümör dokularına göç ederler. Gen tedavisi ajanları ile yüklenmiş MKH bu özellikleri nedeniyle metastatik odaklara tedavi ajanlarının ulaştırılmasında büyük umut vadetmektedir. MKH'e doğrudan plazmidler yüklenebileceği gibi terapötik genler viral vektörler aracılığıyla da yüklenebilmektedir. Geçici ekspresyon yapmaları ve mutasyon riski taşımamaları nedeniyle kanser gen tedavisinde çok kullanılan adeno viruslar MKH'i transdükte etme kapasitelerinin az olması nedeniyle kök hücrelere gen aktarmada pek fazla başarı sağlayamamaktadır. Bakuloviral vektörlerin memeli hücrelerde ifade edilmemeleri ve toksik etkileri olmaması nedeniyle kanser gen tedavisi çalışmalarında son yıllarda daha fazla kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca bu vektörlerin MKH'i transdükte edebilme özellikleri terapötik genlerin kök hücrelere aktarılmasında önemli bir avantaj sağlamaktadır. Henüz MKH'in bakuloviral vektörler aracılığıyla terapötik genlerle yüklenmesi ve bunların kanserin sistemik tedavisinde kullanımı ile ilgili çalışmalar bulunmamaktadır.

Bu çalışmada intihar geni (sitozin deaminaz) ve/veya immün stimulan gen (GM-CSF) taşıyan bakuloviral vektörler inşa ederek bunların ex-vivo olarak kemik iliği mezenkimal kök hücrelere yüklenmesi ve kanser tedavisindeki etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2015, 118 sayfa

Anahtar kelimeler: Mezenkimal kök hücre, bakuloviral vektör, sitozin deaminaz, GM-CSF, kolon kanseri.

ABSTRACT

PhD Thesis

Mesenchymal stem cell mediated suicide gene therapy of cancer

Sedef Hande AKTAŞ

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Hakan AKBULUT

Recently, various types of stem cells have been widely used as vehicles to distribute the therapeutic genes to metastatic deposits in cancer gene therapy. Mesenchymal stem cells (MSCs) have been widely used for this purpose. The improved migration of mesenchymal stem cells (MSCs) to the tumor tissues has made them an attractive vehicle for gene therapy. Therapeutic genes can be loaded by using plasmids and viral vectors. Adenoviruses are popular gene delivery vehicles in cancer gene therapy because of its transient episomal expression in mammalian cells and no risk of mutagenesis. However, they can not easily transduce the MSCs. Very recently, due to lack of toxicity to the mammalian cells, the baculo viral vectors have been studied extensively in experimental cancer models. Baculoviral vectors seem to have advantage of efficient transduction of MSCs.

In this study, we aimed to construct recombinant baculoviral vectors carrying cytosine deaminase (CD) or/and GM-CSF transcription units and to load these vectors to the bone marrow mesenchymal stem cells. Finally, we tested those vectors in a mouse model of colon carcinoma.

2015, 118 pages

Keywords: Mesenchymal stem cell, baculoviral vector, cytosine deaminase, GM-CSF, colon cancer

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim dahil doktora eğitimim boyunca da bana her türlü desteği sağlayan, tez çalışmalarımda bilgi ve tavsiyeleriyle bana yol gösteren, bunların yanısıra laboratuvarından yararlanmamı sağlayan çok değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Hakan AKBULUT'a,

Tez çalışmamın deneysel bölümünü gerçekleştirmem için her türlü imkan ve olanakları sunan başta bölüm başkanımız Sayın Prof.Dr. Fikri İÇLİ olmak üzere Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bölümü ve Gen Tedavisi Araştırma Ünitesi Laboratuvarı çalışanlarına,

Enstitümün bilinen ve gizli kahramanlarına, özellikle güleryüzünü ve yardımını hiç eksik etmeyen Öğrenci İşleri Koordinatörü Sayın Asuman Erzincan'a,

Mezenkimal kök hücre hazırlanması ve sağlanması konusunda değerli katkıları için Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Murat Elçin ve ekibine,

Böcek hücre kültürü ile ilgili tecrübelerini esirgemeyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Öğretim Üyesi Sayın Prof.Dr. Zihni Demirbağ'a,

Doktora eğitimim süresince 111S241 no.lu proje kapsamında sağladığı burs ve ayrıca tez çalışmamızın gerçekleşebilmesindeki maddi katkılarından dolayı TÜBİTAK'a,

Eğitimim süresince gösterdiği sonsuz destek, anlayış, hoşgörü ve yorulduğum her zaman sırtımı dayayabildiğim sevgili eşim Tamer AKTAŞ'a, her koşulda bana destek olan annem Nurcan ENFEZ, babam MUSTAFA ENFEZ ve kardeşim Hakan ENFEZ'e, moral ve desteğini esirgemeyen dostlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bundan önceki tezim, bu tezim, bu alanda aldığım her başarı ve yaptığım her şey...

Bu yola girmemdeki ve belki devam etmemdeki en büyük etken olan ve ne yazık ki kanserden kaybettiğim dedem için...

Sedef Hande AKTAŞ
ANKARA, Şubat 2015

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY SAYFASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	2
2.1. Gen Tedavisi ve Tarihçe	2
2.2. Gen tedavisinde güncel durum.....	4
2.3. Gen Tedavisinde Kullanılan Vektörler.....	5
2.3.1. Gen Tedavisinde Kullanılan <i>Viral Olmayan</i> Vektörler.....	6
2.3.2. Gen Tedavisinde Kullanılan <i>Viral</i> Vektörler.....	7
2.3.2.1. Retrovirüsler	8
2.3.2.2. Lentivirüsler	9
2.3.2.3. Adenovirüsler	9
2.3.2.4. Adeno Bağlantılı Virüsler (AAV)	10
2.3.2.5. Bakulovirüsler	11
2.4. Bakulovirüs Ekspresyon Vektör Sistemi (BEVS).....	15
2.4.1. MSC (ÇKB): Çoklu Klonlama Bölgesi	16
2.4.2. PPH: Polihedrin Promoter	16
2.4.3. SV40 pA: SV40 Poliadenilasyon Sinyali	17
2.4.4. Tn7 Transpozon.....	17
2.4.5. Replikasyon orijini	18
2.4.6. Antibiyotik Direnç Genleri	18
2.5. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH).....	19
2.6. İntihar Gen Tedavisi	22
2.6.1. İntihar Gen Tedavisinde Sıklıkla Kullanılan Genler ve Üretilen İlaçlar	24

2.6.1.1. Timidin Kinaz/ Gansiklovir Sistemi.....	24
2.6.1.2. Sitozin Deaminaz (CD)/ 5-FC Sistemi	25
2.7. Kanser Gen Tedavisinde Kullanılan Diğer Genler	26
2.7.1. Sitokin Genleri.....	26
2.7.1.1. Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör (GM-CSF)	28
2.8. Bakuloviral Gen Tedavi Vektörü Yapım Aşamaları	28
2.8.1. Rekombinant Plazmid Vektör İnşası	28
2.8.2. Rekombinant Bacmid Vektör İnşası.....	30
2.8.3. Rekombinant Vektörlerde Kullanılan İşaretleyici Genler	33
2.8.3.1. Yeşil Floresan Protein (GFP)	33
2.8.3.2. LacZ- α	33
2.8.3.3. Lusiferaz	34
2.9. Amaç ve Mantıksal Temeller	34
<u>3. GEREKÇE VE AMAC</u>	<u>39</u>
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM</u>	<u>41</u>
4.1. Materyal	41
4.1.1. Deney Hayvanları	41
4.1.2. Plazmidler, cDNA Dizileri	41
4.1.3. Kitler.....	41
4.1.4. PZR Primer ve Probları	42
4.1.5. Kompetent <i>E.coli</i> Suşları.....	42
4.1.6. Hücre Hatları	42
4.1.7. Besiyerleri.....	42
4.1.8. Diğer	43
4.1.9. Kullanılan Cihazlar.....	43
4.2. Yöntem.....	44
4.2.1. Plazmid İnşası	44
4.2.2. Primer Dizayını.....	44
4.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	45
4.2.4. Genlerin pCR-Blunt Vektöre Klonlanması	46
4.2.5. CMV Promotorunun pcDNA Vektörüne Klonlanması	48
4.2.6. CMV Promotorunun PZR ile Çoğaltılması	49
4.2.7. PZR ile Çoğaltılan CMV Promotorunun Agaroz Jele Yüklenecek Sonrasında Jelden Saflaştırılması.....	49
4.2.8. CMV Promotoru ile pcDNA Vektörünün Ligasyonu.....	50
4.2.9. CMV Promotorunun pfastBAC Vektörü ile Ligasyonu	50
4.2.10. Genlerin pfastBAC-CMV Vektöre Klonlanması	51
4.2.11. pCRBlunt Vektörden Uygun Restriksiyon Endonükleazlar ile Genlerin Kesilmesi	52
4.2.12. pfastBAC-CMV Vektörünün İlgili Genin Kesildiği Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile Kesilmesi.....	53
4.2.13. pfastBAC-CMV Vektörüne İlgili Genlerin Ligasyonu	53

4.2.14. Dizi Analizi ve Genom Veritabanından (BLAST) Dizinin Karşılaştırılması	54
4.2.15. Rekombinant Bacmid DNA Eldesi.....	54
4.2.16. Western Blotlama	54
4.2.16.1. Hücre Kültüründen Lizat Hazırlama	55
4.2.16.2. Bradford Analizi	55
4.2.16.3. Örneklerin Jele Yüklenmek Üzere Hazırlanması	55
4.2.16.3.1. Denatüre, İndirgenmiş Örnekler	55
4.2.16.3.2. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Jelin Yürütülmesi	55
4.2.16.4. Proteinlerin Membrane Transferi, Membran Bloklama ve Antikorlar ile Muamele	56
4.2.17. Rekombinant Bakulovirüsün Hazırlanması ve Çoğaltılması.....	56
4.2.18. Bakuloviral Stoğun Üretimi	57
4.2.19. Bakulovirüs Titrasyonunun Belirlenmesi	57
4.2.19.1. Viral Plak Deneyi	57
4.2.20. Sitotoksosite Deneyi	58
4.2.21. Bakulovirüsün Mezenkimal Kök Hücreye Yüklenmesi	58
4.2.22. MKH'in Transfeksiyon Veriminin Akım Sitometri ile Belirlenmesi.....	59
4.2.23. Frozen Tekniği ile Transfeksiyonun Belirlenmesi	59
4.2.23. Farelerde Tümör Oluşturma	59
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	60
5.1. Genlerin PZR ile Çoğaltılarak Agaroz Jelde Görüntülenmesi	60
5.2. PCR Blunt Vektörüne Klonlamanın Doğrulanması	60
5.3. pFastBAC1 Vektörüne Klonlamanın Doğrulanması	62
5.4. Dizi Analizi Sonuçları.....	63
5.5. Genom Veri Tabanından Karşılaştırma Sonuçları.....	67
5.6. Rekombinant Bacmid DNA Eldesi.....	68
5.7. Rekombinant Bacmid DNA'nın PZR ile Çoğaltılıp Doğrulanması.....	69
5.8. In vivo Bakulovirüs Transfeksiyonunun Doğrulanması.....	70
5.8.1. Floresan Mikroskop ile Doğrulama	70
5.8.2. Frozen ile Doğrulama	70
5.8.2. Mezenkimal Kök Hücrelerde Bakulovirus Transfeksiyonunun Akım Sitometri ile Doğrulanması.....	72
5.9. Western Blot ile Rekombinant Vektör ile Memeli Hücrelerinde İfade Edilen Proteinlerin Gösterilmesi.....	73
5.10. Bakulovirüs Titrasyonunun Belirlenmesi	74
5.10.1. Viral Plak Deneyi ile Belirleme	74
5.11. Hayvan Deneyleri	75
5.11.1. Deney Hayvanlarında Tümör Oluşturma	75

5.11.2. Tümör Büyüme ve Sağkalım Eğrileri.....	77
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ</u>	<u>78</u>
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>82</u>
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>91</u>
<u>TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR</u>	<u>95</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Gen tedavi araştırmaları	3
Şekil 2.2.	Viral olmayan kanser gen terapileri	7
Şekil 2.3.	Retrovirüs yapısı.....	8
Şekil 2.4.	Adenovirüs yapısı.....	10
Şekil 2.5.	Adeno-bağlantılı virüs yapısı	11
Şekil 2.6.	Bakulovirüs yapısı	12
Şekil 2.7.	Sistemik enfektesiyona neden olanbakulovirüs hücre siklusu	12
Şekil 2.8.	pfastBAC ekspresyon vektörü.....	15
Şekil 2.9.	pfastBAC vektörü promoter ve enzim kesim yerleri gösterimi.....	17
Şekil 2.10.	Tn7 transpozon	18
Şekil 2.11.	MKH hücre kültüründe farklı zamanlardaki görüntüleri.....	19
Şekil 2.12.	Fare mezenkimal kök hücre (MKH) akım sitometri görüntüleri-1	20
Şekil 2.13.	Fare mezenkimal kök hücre (MKH) akım sitometri görüntüleri-2	21
Şekil 2.14.	MKH kaynakları ve etkileri.....	22
Şekil 2.15.	İntihar gen tedavisi	23
Şekil 2.16.	Transfekte olmayan ancak regresyon gösteren tümör hücrelerinin durumuna ait hipotezler.....	24
Şekil 2.17.	5-FU fonksiyonları	26
Şekil 2.18.	Bazı restriksiyon endonükleazların kesim paterni örnekleri	29
Şekil 2.19.	Künt uç ligasyonu.....	29
Şekil 2.20.	Plazmid vektör kullanarak moleküler klonlama.....	30
Şekil 2.21.	Rekombinant Bacmid Vektör İnşası.....	30
Şekil 2.22.	Rekombinant Bacmid Vektör inşasında transpozisyon.....	32
Şekil 4.1.	pfastBAC-CMV-CD vektörü enzimleri ve bölgeleri	44
Şekil 4.2.	pfastBAC-CMV-GMCSF vektörü enzimleri ve bölgeleri	44
Şekil 4.3.	pfastBAC-CMV-GFP vektörü enzimleri ve bölgeleri.....	44
Şekil 4.4.	İnşa edilen vektörler ve inşa aşamaları.....	44
Şekil 4.5.	pCR-Blunt vektörü	46
Şekil 4.6.	pcDNA3.1/V5-His-TOPO vektörü.....	49
Şekil 4.7.	pFastBac1 vektörü	52
Şekil 5.1.1.	GFP ve GM-CSF PZR.....	60
Şekil 5.1.2.	CD PZR	60

Şekil 5.2.1.	pCRBlunt-GMCSF ligasyonunun EcoR I enzimi ile kesilerek doğrulanması	61
Şekil 5.2.2.	pCRBlunt-GFP ligasyonunun EcoR I enzimi ile kesilerek doğrulanması	61
Şekil 5.2.3.	pCRBlunt-CD ligasyonunun EcoR I enzimi ile kesilerek doğrulanması	61
Şekil 5.3.1.	pfastBAC-CD ligasyonunun EcoR I enzimi ile kesilerek doğrulanması	62
Şekil 5.3.2.	Axygen 1 kb	62
Şekil 5.3.3.	CD ve CMV geni ligasyon doğrulama, %1 lik agaroz jel.....	62
Şekil 5.3.4.	GM-CSF geni ligasyon doğrulama, %1 lik agaroz jel	62
Şekil 5.3.5.	GFP geni ligasyon doğrulama, %1 lik agaroz jel	62
Şekil 5.6.1.	Dilüsyon yapılmadan ekilen örnek	68
Şekil 5.6.2.	Dilüsyon yapılarak ekilen örnek.....	68
Şekil 5.6.3.	Dilüsyon yapılarak ekilen örnekten tek koloni ekimi.....	68
Şekil 5.7.1.	CD-Bacmid PZR	69
Şekil 5.7.2.	CD-Bacmid PZR (3 ng DNA ile tekrarı).....	69
Şekil 5.8.1.	Sf-9 hücrelerinde GFP ekspresyonu	70
Şekil 5.8.2.	Kontrol grubunun ışık mikroskopundaki görünümü	71
Şekil 5.8.3.	Kontrol grubunun floresan mikroskoptaki görünümü.....	71
Şekil 5.8.4.	GFP geni içeren grubun ışık mikroskopundaki görünümü-1	71
Şekil 5.8.5.	GFP geni içeren grubun floresan mikroskoptaki görünümü-1	71
Şekil 5.8.6.	GFP geni içeren grubun ışık mikroskopundaki görünümü-2	72
Şekil 5.8.7.	GFP geni içeren grubun floresan mikroskoptaki görünümü-2.....	72
Şekil 5.8.8.	GFP geni içeren virüsün MKHlere transfeksiyonun akım sitometri ile doğrulanması	73
Şekil 5.9.1.	2D jel görüntüsü	74
Şekil 5.9.2.	Transfer sonrası membranın ponza boyası ile boyanması (GM-CSF)	74
Şekil 5.9.3.	Filmde GM-CSF antikoru ile muamele sonrası GM-CSF'nin gösterilmesi.....	74
Şekil 5.10.1.	Kristal viyole ile boyama.....	75
Şekil 5.10.2.	Nötral kırmızı ile boyama.....	75
Şekil 5.11.1.	CRL2638 hücresinin subkutan olarak enjeksiyonu	76
Şekil 5.11.2.	Gelişen tümörler (10. Gün).....	76

Şekil 5.11.3. Tumor büyüme eğriler	77
Şekil 5.11.4. Sağkalım eğrileri	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Son test aşamasına geçen gen tedavileri	5
Çizelge 2.2. Bakuloviral ürünler	13
Çizelge 2.3. Kanser gen tedavisinde kullanılan taşıyıcılar	14
Çizelge 2.4. Sitokin grupları ve örnekleri	27

SİMGELER DİZİNİ

5F-C	5-Fluorourasil
AAV	Adeno bağlantılı virüsler
AcMNPV	Autographa californica çoklu nükleer polihedrosis virüsü
Ad2	Adenovirüs serotip 2
ADA	Adenozin Deaminaz Eksikliği
ADA-SCID	Adenozin Deaminaz eksikliği -Ciddi Kombine Bağışıklık Yetmezliği
aFGF	Asidik fibroblast büyüme faktörü
Ampisilin	Ampisilin direnç geni
Ampr	Ampisilin direnci
ATP	Adenozintrifosfat
BALB/c	Eşsoylu
Bam HI	Bacillus amyloliquefaciens restriksiyon endonükleaz
BEVS	Bakulovirüs Ekspresyon Vektör Sistemi
bFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü
BmNPV	Bombyx mori (ipek böceği) nükleer polihedrosis virüsü
BSA	Sığır serum albümin
BV	Tomurcuklanan virion
BVV	Bakuloviral vektörler
CD	Sitozin deaminaz
CD105	Farklılaşma kümesi 105
CD11b	Farklılaşma kümesi 11b
CD14	Farklılaşma kümesi 14
CD19	Farklılaşma kümesi 19
CD34	Farklılaşma kümesi 34
CD45	Farklılaşma kümesi 45
CD73	Farklılaşma kümesi 73
CD79a	Farklılaşma kümesi 79a
CD90	Farklılaşma kümesi 90
cDNA	Komplementer DNA
cfu	Koloni oluşturan birim
CMV	Sitomegalovirüs

CRL2638 hücre hattı	Fare kolon karsinom hücreleri
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid
dsDNA	Çift zincirli Deoksiribonükleik asit
dTMP	Deoksitimidinmonofosfat
dUMP	Deoksiürinmonofosfat
E.coli	Escherichia coli
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EPO	Eritropoietin
f1 ori	f1 replikasyon orijini
FBS	Fötal sığır serumu
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
GAD	Glutamik asit dekarboksilaz
G-CSF	Granülosit koloni uyarıcı faktör
Gentamisin	Gentamisin direnç geni
GFP	Yeşil Floresan Protein
glmS	Glukozamin sentetaz
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
GRP	Glukozla ilgili protein
GSV	Gansiklovir
HA	Hemaglutinin
HBV	Hepatit B virüsü
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HLA	İnsan lökosit antijeni
HPS	Isı şok proteini
HRF	Histamin salgılayan faktörler
HSV1-TK	Herpes simpleks virüs timidin kinaz
HT29	İnsan kolorektal adenokarsinom hücre hattı
ICAM	İntraselüler adezyon molekülü
IFN- γ	İnterferon- γ
IFN- α	İnterferon- α
IL-1	İnterlökin 1
IL-10	İnterlökin 10
IL-2	İnterlökin 2

IL-4	İnterlökin 4
IL-5	İnterlökin 5
IL-6	İnterlökin 6
IL-7	İnterlökin 7
IL-8	İnterlökin 8
INAP-2	Nötrofil aktive edici protein-2
kb	kilobaz
kDa	kilodalton
lacZ	β - galaktozidaz proteini kodlayan gen
LAK hücresi	Lenfokin ile aktive edilen öldürücü hücre
LMIF	Lökosit göçünü inhibe edici faktör
LPD-PEG-Folat	Lipid-Polietilen glikol-Folat
M1	Matriks protein
MAF	Makrofaj aktive edici faktör
MCF	Makrofaj kemotaktik faktör
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein 1
MCP-3	Monosit kemoatraktan protein 3
M-CSF	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
Mg (++)	Magnezyum
MICA	Pro-enflamatuar bağışıklık ligandı
MIP-1- α	Makrofaj inflamatuvar protein 1- α
MIP-1- β	Makrofaj inflamatuvar protein 1- β
MMIF	Makrofaj göçünü inhibe edici faktör
MOI:	Enfeksiyon katsayısı
MPS	Mononükleer fagositik sistem
mRNA	Haberci RNA
MSC (vektörde)	Çoklu klonlama bölgesi
MSC	Mezenkimal Kök Hücreler
NA	Nörominidaz
NGF	Sinir büyüme faktörü
NK hücreler	Doğal Öldürücü Hücreler
Not I	Nocardia otitidis-caviarumdan klonlanan NotI geni taşıyan E. coli suşu restriksiyon enzimi
ODV	Sıkıştırılmış (occluded) virion

ORF 2	Açık okuma çerçevesi
pBR322	p: plazmid, BR: Bolivar ve Rodriguez
PBS	Fosfat tamponlu tuz
PDGF	Plateler kaynaklı büyüme faktörü
PEG	Polietilen glikol
PF-4	Platelet faktör-4
pfu DNA polimeraz	Pyrococcus furiosus polimeraz
Phpma	Polihidroksi propilmetakrilamit
PPH	Polihedrin promoter
pUC ori	pUC replikasyon orijini
Puc	p: plazmid, UC: University of California
pVPyrr	Polivinil pirolidin
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RANTES	Aktivasyon üzerine düzenlenen normal T hücresi ekspresyonlu ve salınımlı protein
RNA	Ribonükleik asit
RNase	Ribonükleaz
RPMI 1640 besiyeri	Roswell Park Memorial Enstitüsü (RPMI) 1640 besiyeri
SCID	Ciddi Kombine Bağışıklık Yetmezliği
Sf-9 böcek hücresi	Spodoptera frugiperda 9 böcek hücresi
SOC besiyeri	Glukoz eklenmiş süper optimal broth besiyeri
SOM 157d	Üveal melanoma hücreleri
Spe I	Sphaerotilus speciesdan klonlanan SpeI geni taşıyan E. coli suşu restriksiyon enzimi
Sph I	Streptomyces phaeochromogenesdan klonlanan SphI geni taşıyan E. coli suşu restriksiyon enzimi
ssDNA	Tek zincirli Deoksiribonükleik asit
ssRNA	Tek zincirli ribonükleik asit
SV40 pA	SV40 poliadenilasyon sinyali
SV40	Simian virüs 40
Taq polimeraz	Thermus aquaticus polimeraz
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TE tampon	Tris EDTA tamponu
TIL	Tümör infiltrasyon yapan lenfositler

Tn7L	Tn7 transpozon -sol
Tn7R	Tn7 transpozon -sağ
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör α
TnsABCD	Transpozisyon bölge hedef seçimi proteinleri ABCD
TnsCD	Transpozisyon bölge hedef seçimi proteinleri CD
TnsD	Transpozisyon bölge hedef seçimi protein D
TRAIL	TNF ile bağlantılı apoptozu uyarıcı ligand
T-VEC	Talimogene laherparepvec
UV	Ultraviyole
Xgal	5-bromo -4chloro -3-indolyl -beta- D- galactopyronoside
Xho I	Xanthomonas holcicoladan klonlanan XhoI geni taşıyan E. coli suşu restriksiyon enzimi
XTT	2,3-Bis (2-Metoksi-4-nitro-5-sülfofenil) -2H-tetrazolyum-5-karboksanilid
VEGF	Damar endotelyal büyüme faktörü
VLP	Virüs benzeri partikül
α -MEM besiyeri	Minimum gerekli besiyeri
β -TG	β -Tromboglobulin

1. GİRİŞ

Kanser günümüzün önemli sağlık problemlerinden biridir. Son yıllarda artan mortalite ve insidansı, kanseri bir halk sağlığı sorunu olarak ele almamızı sağlar. Her ne kadar tanısal ve sağlık kurumlarından yararlanmadaki artış hastalığın erken teşhisi için önemli olsa da halen kardiyovasküler hastalıklardan sonra 2.ölüm nedenidir (1).

Kanser tedavisinde mortaliteyi azaltmak ve sağkalımı artırmak için farklı birçok tedavi modaliteleri kullanılır. Bunlar: cerrahi, radyoterapi, kemoterapi-hormon tedavisi ve yeni tedavi yöntemlerinden immunoterapi, sinyal ileti sistemi inhibitörleri, ve anjiyogenez inhibitörleri olarak sayılabilir (2). Günümüzde kanser teşhis ve tedavisi için geliştirilen yöntemler anlamlı olsa da hastalık gelişim sürecinin karmaşıklığı tedavi için net bir yöntem ortaya koyamamaktadır.

Son yıllarda gen tedavisindeki gelişmeler ve FDA tarafından onaylanan ürünler ümit vaad edici olmuş, gen tedavisinin katkısını ortaya koymuştur. Bunun yanı sıra mezenkimal kök hücreler ile ilgili araştırmalar hız kazanmış ve gen tedavisindeki yerleri anlamlandırılmaya çalışılmıştır. Kanser gen tedavisinde ilgili genlerin tümör dokusuna spesifik taşınmaları ve kullanılan vektörlerin konakçıda yaratacağı etkiler bu tedavideki etkinlikte kritik rol oynamaktadır.

Biz bu çalışmada rekombinant protein üretiminde başarı ile kullanılan bakuloviral vektörlerin gen tedavi ajanı olarak ve tümöre yönelimleri olduğu bilinen mezenkimal kök hücrelerinde taşıyıcı olarak kullanılmasını amaçladık. Çalışmamızda tümör dokusuna spesifik taşınımı gerçekleştirerek insanda bilinen herhangi bir hastalığa yol açmayan bakuloviral vektörlerin gen tedavi ajanı olarak etkinliğini araştırdık.

2. KURAMSAL TEMELLER

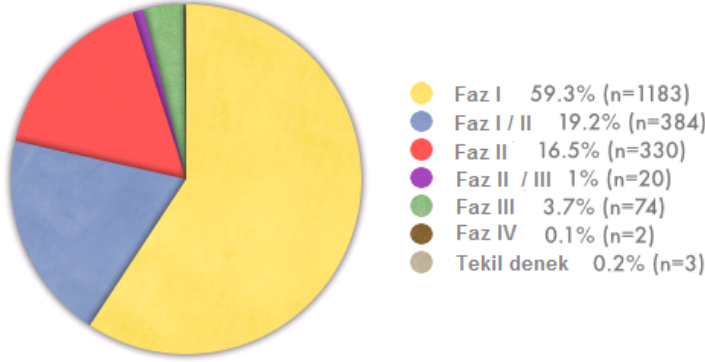
2.1. Gen Tedavisi ve Tarihçe

Gen tedavisi hastalıkları önlemek ya da onlarla savaşmak amacıyla kişiye genetik materyalin dışarıdan verilmesi yoluyla tedavi etme şeklidir. Bu tedavi kanser, hemofili, parkinson gibi pek çok önemli hastalığın tedavisi için araştırmacılar tarafından çalışılmış ve çalışılmaya devam etmektedir (3).

Gen tedavisi ilk kez 1972 yılında kavramsallaştırılmıştır. 1972 yılında Friedmann ve Roblin *Science* dergisinde “İnsan genetik hastalıkları için gen tedavisi” adlı bir makale yayımlamışlardır (4). Bu makalelerinde Munyon ve arkadaşlarının yanısıra Merrill ve arkadaşlarının yaptığı iki önemli araştırmaya da yer verilmiştir. Munyon ve arkadaşları yaptıkları çalışmada timidin kinaz geninden yoksun fare hücrelerini, UV radyasyona maruz bırakılan herpes simpleks virusü ile enfekte etmiş ve timidin kinaz enzimini sentezleyebilir duruma getirmiştir. Bu da timidin kinaz genini içeren herpes simpleks virüs DNA’sının fare hücreleriyle kalıtsal bir birleşme yapmış olabileceğini göstermiştir. Munyon ve arkadaşlarının çalışması ise galaktozemili hastaların fibroblastlarına dışarıdan verilen DNA ile kaybolan enzim aktivasyonunun yeniden sağlanabileceğini göstermiştir.

FDA onaylı gen tedavi araştırmaları ise ilk kez 1990 yılında, Amerika Birleşik Devletlerinde Ashanti DeSilva tarafından ADA-SCID (Adenozin Deaminaz eksikliği - Ciddi Kombine Bağışıklık Yetmezliği) tedavisinde kullanılmak üzere başlamıştır (5). “Gene Therapy Clinical Trials Online Database” verilerine göre 2014 yılına kadar toplam 1996 klinik araştırma yapılmıştır. Yapılan bu araştırmaların ise % 63.8 (n=1274) gibi ciddi bir oranı kanser ile ilgili olmuştur (bakınız şekil 2.1) (6).

Gen Tedavi Klinik Araştırmaları Fazları



The Journal of Gene Medicine, © 2014 John Wiley and Sons Ltd

www.wiley.co.uk/genmed/clinical

Gen Terapi Klinik Araştırmalarınca Ele Alınan Endikasyonlar



The Journal of Gene Medicine, © 2014 John Wiley and Sons Ltd

www.wiley.co.uk/genmed/clinical

Şekil 2.1. Gen tedavi araştırmaları (6)

Önemli gen tedavisi araştırmalarını incelediğimizde; Adenozin Deaminaz Eksikliği (ADA) gen tedavi yönteminde hastanın kan kök hücreleri uzaklaştırılır ve fonksiyonel ADA geninin kopyasını retroviral bir vektör aracılığı ile bu hücrelere yerleştirilerek hastaya geri verilir. Bu araştırmada hiçbir hasta lösemi geliştirmemiş ve tedavi başarıyla uygulanmıştır (5). Bunun dışında kalıtsal körlükte, hemofili de, beta talasemi, orak hücreli anemi gibi kan hastalıklarında, yağ metabolizması rahatsızlıklarında, kanserde, parkinson hastalığında gen tedavisi uygulamaları yapılmıştır (3). Ciddi Kombine Bağışıklık Yetmezliği (SCID) gen terapi ile tedavi edilen ilk genetik hastalıklardan biridir. Ancak viral vektör olarak kullanılan retrovirüslerin bazı hastalarda lösemiye tetiklediği kaydedilmiş ve bu sonuç kanser dışındaki gen tedavisi uygulamalarının ve klinik çalışmalarının durdurulmasına yol açmıştır (7, 8). Dolayısıyla bu durum araştırmacıları farklı viral vektör arayışına itmiştir.

Her ne kadar ilk klinik araştırmalar istenilen başarıyı yakalayamasa da son yıllarda ivmelenerek giden araştırmalar oldukça yüz güldürücü olmuştur. 2012 yılında Avrupa'da onay alan ilk viral gen tedavisi olan *Glybera* bunun kanıtıdır. Tedavide viral vektör olarak adeno bağlantılı virüsler (AAV) kullanılmaktadır. AAV kullanılarak lipoprotein lipaz geninin bir kopyası kas hücrelerine ulaştırılmaktadır (9).

Kanser açısından bakıldığında ise birkaç ümit verici tedavi gelişme aşamasındadır. Bir tanesi, herpes simpleks virüs 1'in modifiye edilerek melanoma karşı kullanılmasıdır. Tedavi T-VEC olarak adlandırılmaktadır (10, 11). Bir diğerisi ise lösemili 59 hastada denenilen bir çalışmadır. Bu çalışmada hastanın kendi immün hücreleri alınarak kanser hücrelerinin yüzeyinde bulunan bir proteinin tanınması için virüsün genetik olarak değiştirilmesi sağlanmaktadır. İmmün hücreler hastaya geri verildiğinde 32 yetişkin KLL (Kronik lenfositik lösemi) hastanın 15'i (%47) ve 22 pediatrik hastanın 19'unda (%86) tam remisyon gözlemlenmiştir (12).

2.2. Gen tedavisinde güncel durum

Bunların haricinde klinik çalışmalarda önemli mesafe kaydeden gen tedavisi ajanları şu şekildedir:

Çizelge 2.1. Son test aşamasına geçen gen tedavileri (13)

Şirket/Enstitü	Gen tedavi ajanı	Hedef hastalık	Durum
Advantagene	Adenovirüs	Prostat kanseri	Geç evre araştırmaların Eylül 2015'te biteceği tahmin edilmekte
Amgen	Herpes Virüs	Metastatik melanom	Ümit verici geç evre insan sonuçları
AnGes MG	Nonviral vektör, HGF kodlayan DNA plasmid vektörü	Uzuvlardaki arter rahatsızlıkları	Global geç evre testlerine başlanması için FDA'den onay aldı
Bluebird Bio	Lentivirüs	Erken nörodejenerasyonun genellikle ölümcül ve kalıtsal olan formu	Orta ve geç evre kombinasyon araştırması 2013 sonu başlatıldı
Children's Hospital of Philadelphia	AAV	Erken körlüğün kalıtsal formu	Geç evre araştırmaların Nisan 2015'te bitmesi planlanıyor.
Cold Genesys	Adenovirüs	Mesane kanseri	Orta ve geç evre kombinasyon araştırması 2013 Ekimde başlatıldı
Henry Ford Hospital	Adenovirüs	Prostat kanseri	Geç evre testleri için FDA'den onay aldı
UniQure	AAV	Vücudun yağ yakmasını önleyen kalıtsal ve bazen ölümcül rahatsızlıklar	Avrupada satış için onay aldı.

2.3. Gen Tedavisinde Kullanılan Vektörler

Gen tedavisi vektörleri viral ve viral olmayan vektörler olarak incelenebilir. Son yıllarda bu kavrama hücre tedavileri de eklenmiştir. Bu tedavilerde hematopoietik, mezankimal, nöronal, embriyonik kök hücreler kullanılmaktadır. Viral olmayan vektörlere örnekler arasında çıplak DNA'nın enjeksiyonu, elektroporasyon, gen tabancası, sonaporasyon, magnetofeksiyon ve oligonükleotidlerin, lipozomal komplekslerin, dendrimerlerin ve inorganik nanopartiküller sayılabilir (14, 15). Viral olmayan vektörlerin, büyük ölçekli üretim ve düşük konak immünitesi avantajları olsa da düşük gen ifadesi ve transfeksiyon seviyeleri önemli dezavantajlarını oluşturur. Örneğin; manyetik nanopartiküllerin düşük ilaç yükleme kapasitelerinin olması, homojen olmayan parçacık büyüklüğü dağılımı ve kapillerlerin tıkanmasına yol açan topaklanmalara eğilimli olmaları ilaç/gen taşıma ajanı

olarak kullanımlarını sınırlandırır. Lipoozomların retiküloendotelyal sistem tarafından kan dolaşımından hızlı bir şekilde tanınıp temizlenmesi bunların da taşıyıcı olarak kullanımını sınırlandırmaktadır. Çizelge 2.3 kanser tedavisinde kullanılan mevcut taşıyıcıların (viral olmayan vektörlerin) kullanım avantaj ve dezavantajları verilmiştir. İlgili tablo daha ziyade viral olmayan vektörlere örnekler sunmaktadır (16).

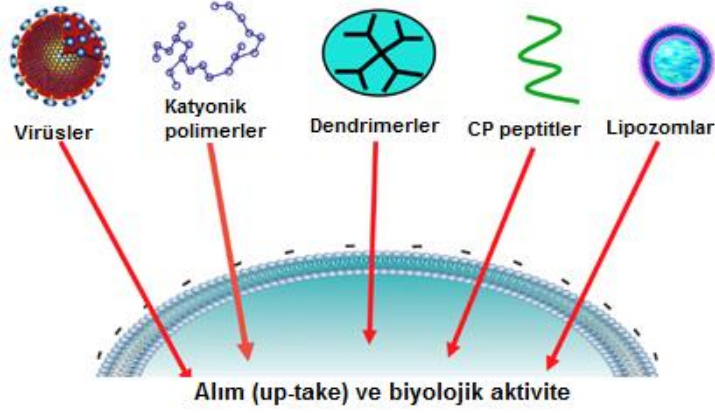
2.3.1. Gen Tedavisinde Kullanılan Viral Olmayan Vektörler

Sentetik gen taşıyıcıları olarak adlandırılan bu vektörler ile DNA ya da RNA molekülü hedef hücreye lipozom, peptit ya da polimer gibi bir taşıyıcı araç yardımıyla aktarılır. Bu taşıyıcıların bir avantajı nükleik asitle bir kompleks oluşturup hedef hücreye ulaşması için koruyucu görevi görmesidir. Çıplak DNA, en basit non-viral gen taşıma sistemidir. Ancak bu şekilde kullanılırsa verilen DNA parçacıkları nükleaz enzimleri tarafından kolaylıkla parçalanabilmektedir. Bunu engellemek amacıyla çeşitli stratejiler geliştirilmiştir (17, 18). **Katyonik lipidler** bu amaçla en çok kullanılan stratejilerden biridir. Temel mantığı, lipidlerin katyonik baş grubu DNA'ya bağlanırken kuyruk kısmı DNA lipid kompleksinin çökmesini sağlamasıdır. Katyonik lipid temelli gen taşıma sistemleri hedef hücreye endozomal yol aracılığıyla girer (19). Ancak, bu stratejinin dezavantajı transgen ekspresyon etkinliğinin oldukça düşük olmasıdır (20). Sistemik olarak enjekte edilen DNA'nın yalnızca çok az bir miktarının tümör dokusuna ulaştığı bilinmektedir (21).

Gen aktarımının lipid temelli formülasyonlarının uygulamaları sınırlıdır. Bu uygulamalar intratümoral ya da lokaldir. Sistemik uygulamada ise inflamatuvar yan etki ve immün reaksiyon riski görülebilir. Değişikliğe uğratılmış sistemik lipid aktarım sistemlerinin geliştirilmesi ile toksisite düşürülerek kanser gen tedavisinde kullanılabilir. Folat-hedeflenen lipid-protamin DNA kompleksleri (LPD-PEG-Folat) gibi hedeflenmiş lipid formülasyonlarının sistemik olarak uygulandığı prelinik modellerde, tümörün gerilediği ve sağkalımın arttığı gösterilmiştir (22).

DNA'nın taşınması için protamin, polilizin, poliarjinin ya da polihistidin gibi bazı **polikatonik taşıyıcı proteinler** de uygundur. Ayrıca bazı **hidrofobik polimerler**, örneğin PEG (polietilen glikol), PHEMA (polihidroksi propilmetakrilamit), pVPyrr (polivinil pirolidin) pozitif yüklü DNA'yı maskeleyerek kandaki yarılanma ömrünü uzatırlar.

Böylece sistemik uygulanan pozitif yüklü DNA'nın kanda bulunma süresi uzatılabilmektedir (23).



Şekil 2.2. Viral olmayan kanser gen terapileri (24)

2.3.2. Gen Tedavisinde Kullanılan *Viral* Vektörler

Bilindiği gibi virüsler enfekte ettiği hücreye genomlarını oldukça etkili bir şekilde aktarabilen zorunlu hücre içi parazitleridir. Bu özellikleri nedeniyle gen tedavisinde vektör olarak kullanılacakları düşünülmüş ve 1970lerden itibaren kullanılmaya başlanmıştır (25). Bir virüs tarafından gen taşınması işlemi transdüksiyon olarak adlandırılmaktadır. Virüslerin vektör olarak kullanılmalarının belirli avantajları vardır. Bu avantajlar; zorunlu hücre içi paraziti olmaları dolayısıyla konakçı hücreye girmek zorunda olmaları, yüksek gen transfeksiyonu ve gen ekspresyonu yapmaları ve etkili taşınım yapmalarından ileri gelir. Ayrıca kullanıma bağlı olarak büyük genlerin aktarımı için yüksek gen taşıma kapasitesine sahip olanları vardır (26). Bunun dışında, zorunlu olmayan viral genler çıkarılıp yerine dışarıdan gen takılabilir ve viral DNA'yı konak hücrelere etkili bir biçimde ulaştırabilir (27, 28).

Viral vektörlerin seçimi uygulama alanına göre farklılık göstermektedir. Her viral vektörün kullanım avantajları olduğu kadar kısıtlılıkları da söz konusudur. Bir doku için uygun olan bir vektörün diğer doku için uygun bir seçim olamayabilmektedir. Bu doktora tezinde bir böcek virusu olan bakuloviral vektörler kullandık. Bakuloviral vektörlerle ilgili detaylı bilgilere geçmeden aşağıda diğer vektörler hakkında kısa bilgiler sunulmuştur.

2.3.2.1. Retrovirüsler

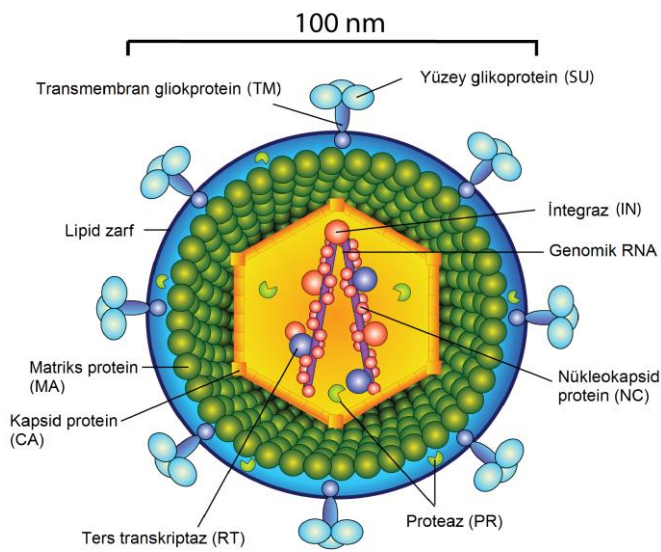
Familya:Retroviridae

Genom:ssRNA (+)

Genom büyüklüğü: 3-9 kb

Bu virüsler zarflı RNA virüsü ailesinden olup iki adet tek zincirli RNA taşırlar. İki önemli enzimi kodlayan genleri bulunur. Bunlar; revers (ters) transkriptaz ve integraz enzimleridir (29). Ters transkriptaz sayesinde RNA molekülünü DNA çevirebildikleri için “genetik bilgiyi değiştirebilen virüsler” olarak adlandırılırlar.

Retrovirüsler özellikle kanser dışındaki hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan viral vektörlerdir. Kanser tedavisinde kullanımlarının sınırlı kalmıştır. Taşıdıkları integraz enzimi sayesinde tedavi genini hedef hücrenin genoma rastgele entegre ederler. Tedavi genini hedef hücrenin genomuna entegre olması uzun süreli gen ekspresyonu sağlasa da bu rastgele entegrasyon mutasyon riski taşımaktadır. Öyle ki, bugüne kadar retroviral vektörler kullanılarak gerçekleştirilen en başarılı gen tedavisi çalışmalarının yapıldığı Fransa ve İngilterede yirmiden fazla X- bağlantılı kombine immun yetmezlikli hastada 10 hastadan 4’ünde lösemi gelişmiştir. Bunun yanında, bu vektörlerin kronik granülomatöz hastalıkta başarı ile uygulanabilmekte olduğunu biliyoruz (30-32).



Şekil 2.3. Retrovirüs yapısı (33)

2.3.2.2. Lentivirüsler

Familya: Retroviridae

Genom: ssRNA (+)

Genom büyüklüğü: 3-9 kb

Lentivirüsler retrovirüsler ile aynı familyadan olup retrovirüslerin bir alt sınıfını oluştururlar. Ancak, retrovirüsler bölünen hücreleri enfekte ederlerken lentivirüsler bölünmeyen hücreleri de enfekte ederler. Bu virüslerde de integras enziminin virüs DNAsını konakçı genomunda gelişigüzel bir yere entegre etmesi ve onkogen aktivasyonunu tetikleyerek kanser gelişimine zemin hazırlaması söz konusu olsa da lentivirüslerin gamma-retroviral vektörlere göre, karsinogeneze yol açabilecek yerlere entegrasyona daha az eğilimli olduğu ifade edilmektedir (34).

2.3.2.3. Adenovirüsler

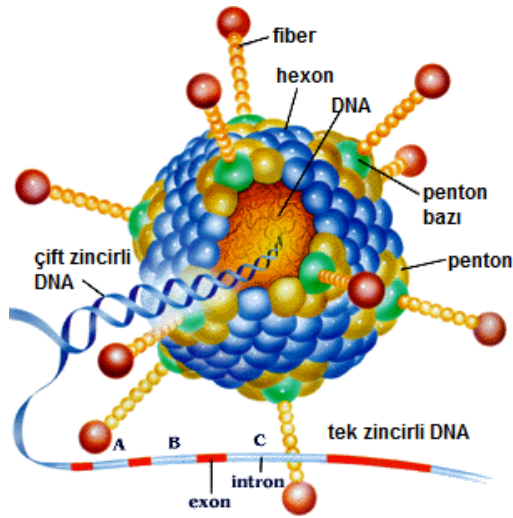
Familya: Adenoviridae

Genom: dsDNA

Genom büyüklüğü: 38-39 kb

Adenovirüsler çift iplikli DNA'ya sahip, zarfsız, ikozohedral yapıda virüslerdir. Genomları lineerdir. Genomun paketlenildiği zarfsız ikozahedral protein kapsid, virüsün konakçı hücreye penetrasyonundan ve girişinden sorumludur (35). 100'den fazla farklı serolojide adenovirüs bulunmaktadır. Üst solunum yolu hastalıklarına ve konjunktivite neden olur. İnsanda üst solunum yolu hastalıklarının %5-10'undan sorumludurlar ve 51 serotipi vardır (36, 37). Ad2 üzerinde en fazla çalışılan serotiptir. Adenoviral vektörler hem bölünen hem de istirahat halindeki hücrelerde çoğalabilirler. Virüsün E1 bölgesi replikasyonundan sorumludur. Replikasyon yapabilen adenoviral vektörlerin özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda ciddi riskler taşımaları nedeniyle bu bölge delesyon yapılarak replikasyon yapamaz (replikasyon defektif) hale getirilmek suretiyle kullanılabilir. Bugüne kadar adenoviral vektörlerle yapılan kanser tedavisi çalışmalarının pek çoğunda bu modifikasyonu barındıran vektörler kullanılmıştır. Bir diğer strateji viral vektörün inşası esnasında virusun koşullu çoğalabilecek şekilde düzenlenmesidir. Böylece vektör sadece belli koşulları sağlayan hücrelerde etkili olurken diğer hücreler tedavi etkisinden korunabilmektedir (35). Adenoviral vektörlerin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu

vektörler konakçı hücreyi enfekte ettiği zaman konakçı hücrenin genetik materyaline katılmaz, konakçı hücre çekirdeğinde serbest kalırlar. Diğer bir deyişle, hedef hücre bölündüğünde virus replike olmamaktadır. Dolayısıyla gen ekspresyonu süreleri kısıtlıdır (ortalama 7-10 gün). Bu durum bir açıdan bakıldığında dezavantajmış gibi görünmeyebilir, nitekim retrovirüslerde tedavi edici genin hedef genoma entegre olarak genin ekspresyon süresini uzattığını ancak rasgele entegrasyon sonucu kansere yol açabildiğini biliyoruz. Ancak burada durum farklıdır çünkü insanların büyük çoğunluğu zaten bu viruslarla yaşamlarının erken dönemlerinde karşılaşmış oldukları için virusun tedavi amaçlı tekrarlanan dozlarının verilmesi kişilerin virüse karşı immün cevap geliştirmesine neden olabilmektedir.



Şekil 2.4. Adenovirüs yapısı (38)

2.3.2.4. Adeno Bağlantılı Virüsler (AAV)

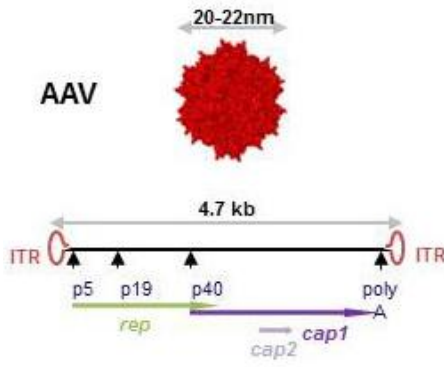
Familiya: Parvoviridae

Genom: ssDNA

Genom büyüklüğü: 5 kb

AAV'ler *Parvoviridae* ailesinden, tek iplikli, zarfsız, replikasyon defektif, küçük (25 nm) virüslerdir. İnsanları enfekte ettikleri bilinmekte ancak herhangi bir hastalığa yol açtıkları bilinmemektedir. Gen tedavisi için kullanılan önemli vektörlerdendirler. Oldukça ılımlı bir immün cevap oluşturmaları, hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte etmeleri ve konakçı genomuna entegre olmaksızın ekstrakromozomal fazda kalmaları ve genellikle bir toksisiteye sebep olmamaları ve konakçı genomuna rastgele entegrasyon oranının çok

düşük olması önemli avantajlarıdır. AAV'lerin konakçı genomuna entegrasyonları insan kromozom 19'daki spesifik bir bölgesinden olmaktadır. Mutasyon riski açısından bakıldığında bu durumun retroviruslara göre daha güvenlidir. Bunun yanında, AAV'lerin bazı dezavantajları da mevcuttur. Vektörün klonlama kapasitesi göreceli olarak sınırlı (5kb den az) olduğundan büyük genlerin bu vektörlerde kullanımları çok uygun değildir. Ayrıca taşıdıkları genlerin hedef dokulara transdüksiyonu belirli hücrelerle sınırlı olduğundan tüm kanser modellerinde kullanılmaları mümkün görünmemektedir. AAV'nin çeşitli dokularda transdüksiyon etkinliğini artırmak için, viral kapsidin inşası, monoklonal antikorlar ve bispesifik peptitler gibi yeniden hedefleme stratejileri geliştirilmiştir (39, 40).

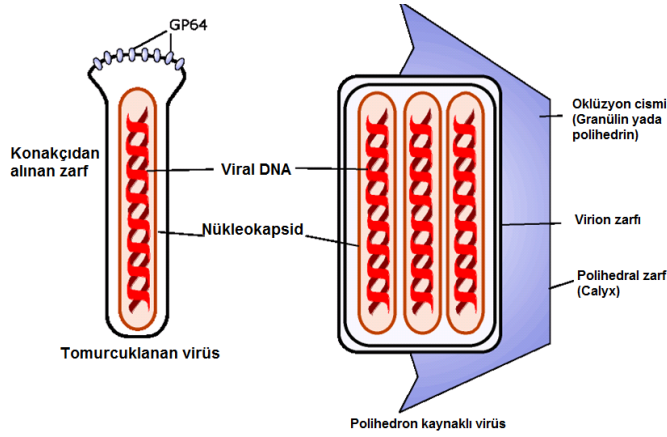


Şekil 2.5. Adeno-bağlantılı virüs yapısı (41)

2.3.2.5. Bakulovirüsler

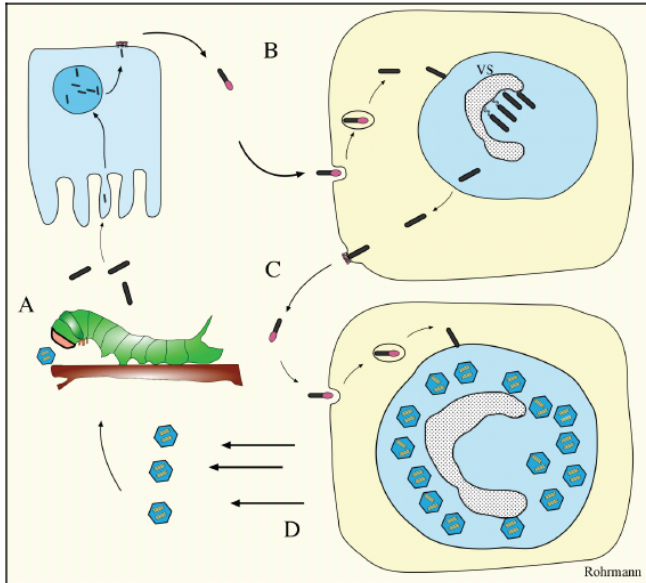
Bakulovirüsler, taşıdıkları çift zincirli, halkasal, süperkoil genom ile büyüklükleri 80 kb'den 180 kb'ye değişen oldukça farklı bir virüs grubudur. Virüsün genomunun 90-180 arası gen kodladığı bilinmektedir (42).

Genom, uzunluğu 220-385 nm ve genişliği ise 40-60 nm olan çubuk şekilli virionlara paketlenmiştir. Oldukça iyi tanımlanan bakulovirüslerde virionların iki çeşidinin olduğu gözlemlenmiştir. Bunlar sıkıştırılmış (ODV) ve tomurcuklanan virion (BV) lardır. Bu iki çeşit virion nükleokapsit yapıları itibarıyla benzer olsalar da zarflarının köken aldığı yapı açısından farklılıklar gösterirler (43). Aşağıda tomurcuklanan virüsün ve polihedron kaynaklı virüsün zarf yapıları daha ayrıntılı olarak görülmektedir.



Şekil 2.6. Bakulovirüs yapısı (44)

Yabancı genin ekspresyonu için en sık kullanılan iki izolat, *Autographa californica* çoklu nükleer polihedrosis virüsü (AcMNPV) ve *Bombyx mori* (ipek böceği) nükleer polihedrosis virüsü (BmNPV) dür. Yabancıl tip bakulovirüsler hem litik hem de virüs replikasyonunun üç fazından bağımsız oklüzyonlu yaşam siklusu sergilerler (45). Aşağıda üç fazın karakteristikleri verilmiştir:



Şekil 2.7. Sistemik enfeksiyona neden olan bakulovirüs hücre siklusu (45)

Oklüzyon cisimleri böcek tarafından parçalanır, orta bağısağında çözülür ve ODVler serbest kalarak epitelyal hücreleri enfekte ederler (A). Virionlar hücreden tomurcuklanarak çıkarlar ve sistemik enfeksiyonu başlatırlar (B) Sistemik enfeksiyonun başlangıcında daha çok BVler üretilir (C). Enfeksiyonun geç döneminde sıkıştırılmış virionlar (ODV) üretilir ve hücre daha sonra oklüzyon cisimlerini salarak ölür.

Bakulovirüsler gen tedavisi açısından çok önemli birtakım özellikler barındırırlar. Örneğin; kolaylıkla işlenebilirler, büyük (en az 38 kbp) ve çoklu DNA parçaları taşıyabilirler, kolaylıkla üretiler ve yüksek titlerde saflaştırılabilirler. Bunların yanısıra memeli hücrelerinde çoğalmadıkları ve düşük toksisiteye sahip oldukları için terapötik amaçlı gen

taşıyımında da güvenlidirler (47). Nitelik taşıdıkları tüm bu avantajlı özellikleri ile aşağıdaki tabloda da görüldüğü üzere ticari olarak bakuloviral kaynaklı ürünlerin üretimi söz konusu olmuştur.

Çizelge 2.2. Bakuloviral ürünler (48, 49)

Ürünün adı / Hastalık	Üretici firma	Bakulovirüs kullanılarak elde edilen proteinler	Kullanıldığı alan	FDA onay durumu
Cervarix	GlaxoSmithKlines, Rixensart, Belçika	İnsan Papillomavirus tip 16 L1 protein, İnsan Papillomavirus tip 18 L1 protein	Servikal Kanser	Onaylandı
Chimigen	Virexx Medical Corp., Calgary, Kanada	HBV S1 ve S2 yüzey antijeni parçaları, çekirdek ve fare FC parçalarının füzyon proteinleri	Hepatit B ve C	Klinik Araştırmada
FluBlok	Protein Biosciences Corp., CT, USA	rekombinant hemaglutinin (HA) proteinleri	İnfluenza virüsü	Klinik Araştırmada
Diamyd	Diamyd Medical AB, Stockholm, İsveç	GAD (glutamik asit dekarboksilaz)	Tip I Diyabet mellitus	Klinik Araştırmada (Faz III)
	GSK	ORF 2	Hepatit E	Faz II
	Protein Sciences	NA HA	Influenza Influenza H5	Faz II Faz I
	Novavax	HA/NA/M1	Influenza	Faz II
	Meridian Life Sciences	Parvovirus VLP	ParvovirusB-19	Faz II
	Ligocyte	Norwalk capsid VLP	Norwalk	Faz I

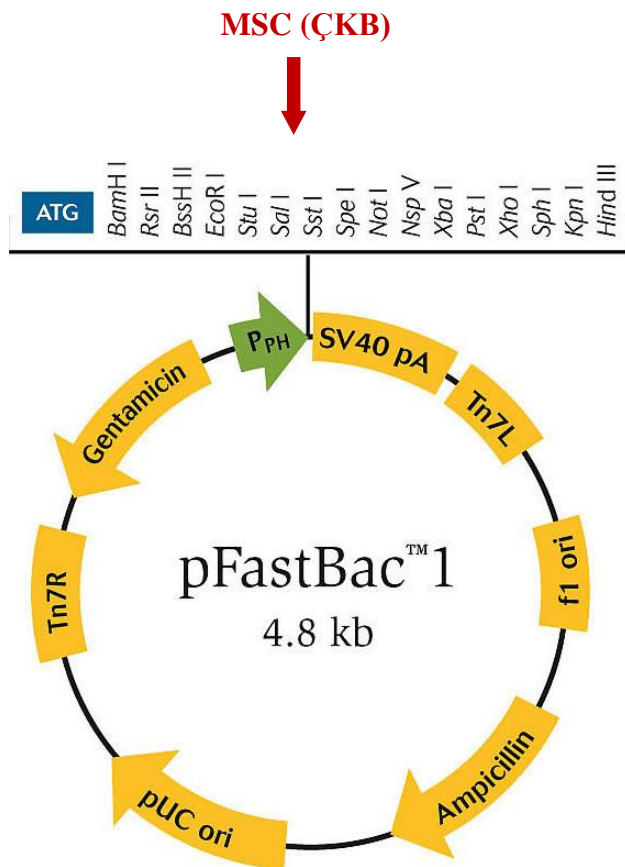
Çizelge 2.3. Kanser gen tedavisinde kullanılan taşıyıcılar (16)

Nanotaşıyıcılar		Avantajlar	Dezavantajlar
	Lipozom	1-Hem hidrofilik hem de hidrofobik ajanları taşıyabilirler 2-Doğal materyalden oluşmuştur ve temelde toksik değildir.	1-Retiküloendotelial savunma mekanizmasınınca kan dolaşımından hızlı bir şekilde temizlenmesi 2-Taşıyıcının stabil olmayışı ve ani ilaç/gen ürünü salınımı 3-Mononükleer fagositik sistem (MPS) tarafından spesifik olmayan alım
	Polimerik nanopartiküller	1-Dozajı azaltabilir ve yan etkileri asgariye indirebilir 2- Taşıdığı ilaçları degradasyona karşı koruyabilir ve ilaç stabilitesini arttırabilir. 3-Tümör hedefleme için potansiyeldir ve kanser tedavisini iyileştirebilir.	1-Polimerlerin doğal yapısal heterojenitesi 2-Düşük ilaç yükleme kapasitesi 3-Topaklanmaya eğilimli ve kapillerlerin tıkanmasına yol açabilir
	Mikroküreler	1-Biyoaktif ajanların bölgeye spesifik taşınımında kullanılmaları dozajı azaltabilir	1-Ani ilaç salınımı
	Nano-emülsiyonlar	1-Vücuda girikten sonra göreceli olarak güvenlidir. 2-Yavaş salınlı özelliklere sahiptir.	1-Fizikokimyasal kararlılık problemleri
	İnorganik nanopartiküller	1-Tepkimesizdir ve toksik değildir 2-Sentez kolaylığı 3-Kullanıma hazır işlevselleştirme 4-Uzaktan ilaç salınımını tetikleyebilen fotofiziksel özellikler	1-Biyoyözünür yada kolaylıkla temizlenecek kadar ufak değildir 2-Vücutta potansiyel birikim gösterebilir ve uzun vadede toksisiteye neden olabilir
Yüzey modifiye taşıyıcı sistemleri	Antikor bağlı taşıyıcı sistem	1-Tümör bölgesine yüksek seçicilik ve özgüllük	1-Reseptör normal hücreler üzerinde ifade edilebilir ve yan etkilere neden olabilir. 2-Düşük ligand bağlanım etkinliği 3-Farklı tümör hücrelerinde antijen/reseptörlerin farklı ifade seviyeleri bölge spesifik hedeflemeyi azaltabilir.
	Ligand bağlı taşıyıcı sistem		
Diğer taşıyıcılar	Manyetik olarak hedeflenmiş taşıyıcı sistem	1-Manyetik alanlar hedef bölge üzerine odaklanır ve partiküllerin hedef bölgelerde yakalanmasına imkan verir.	1-Sadece vücut yüzeyine yakın tümör bölgelerinde etkilidir ve vücuttaki derin bölgelerin hedeflenmesi zordur.
Hücre temelli taşıyıcılar	İmmün hücreler (Makrofajlar, T hücreleri, Doğal Öldürücü Hücreler (NK) hücreler)	1-Tümör bölgesi hedef etkinliğini arttırabilir ve terapötik etkiyi iyileştirebilir 2-Tümörisidal aktiviteye sahiptir	1-Anlamlı sayıda elde etmek zordur 2-Bu hücreleri plazmidler ile transdükte etmek kolay değildir.
	Mezenkimal Kök Hücreler	1-Kolaylıkla elde edilebilir ve basit çoğaltım prosedürleriyle çoğaltılabilmeleri 2) Tümör bölgelerine yüksek göç potansiyeli 3) Düşük immunojenite ve intrinsik mutasyon oranı 4) Nörotoksisiteye ya da tümörjenisiteye sahip olmamaları	1-Kullanılan vektör ve sitokinler sınırlıdır. 2-MSCLerin in vivo kaderiyle ilgili az bilgi vardır.

2.4. Bakulovirüs Ekspresyon Vektör Sistemi (BEVS)

Bakulovirüslerin ekspresyon sistemi olarak kullanılmaları ile ilgili ilk çalışmalar 1980li yıllara dayanır. Bu alandaki çalışmalar Smith ve arkadaşları ile Pennock ve arkadaşları tarafından *Autographa californica* nükleer polihedrozis virüs kullanılarak gerçekleştirilmiştir (47, 50).

Bakulovirüsün ekspresyon vektör sistemi olarak kullanılmasının önemli üstünlükleri bulunmaktadır. Örneğin, polihedrol inklüzyon matriks proteini (polihedrin) ve p10 proteinlerini kodlayan genler enfekte hücrelerde virüs replikasyonunun geç fazında üretilen proteinlerdir. Bu proteinlerden polihedrin virüs partiküllerinin paketlenmesinde kullanılır veya virüsün yayılım ve sağkalımında rol oynar. Dolayısıyla virüs için hayati öneme sahip olmayan bu genler çıkarılarak bakuloviral ekspresyon vektörleri geliştirilmiştir (51). Aşağıda çalışmalarımızda kullandığımız bakuloviral vektör görülmektedir.



Şekil 2.8. pfastBAC ekspresyon vektörü (52)

MSC (ÇKB): Çoklu klonlama bölgesi

P_{PH}: Polihedrin promoter

SV40 pA: SV40 poliadenilasyon sinyali

Tn7L: Tn7 transpozon -sol

f1 ori: f1 replikasyon orjini

Ampisilin: Ampisilin direnç geni

pUC ori: pUC replikasyon orjini

Tn7R: Tn7 transpozon -sağ

Gentamisin: Gentamisin direnç geni

2.4.1. MSC (ÇKB): Çoklu Klonlama Bölgesi

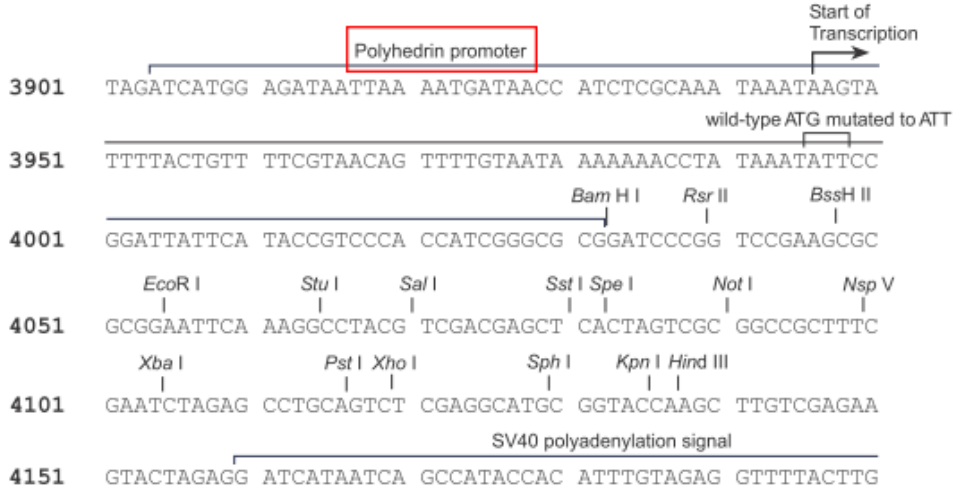
Çoklu klonlama bölgesi, tasarlanan plazmidlerde bulunan standart kısa bir DNA segmentidir. Bu segmentin içinde bulunan restriksiyon bölgeleri (genellikle 20 restriksiyon bölgesine kadar) özeldir, diğer bir ifade ile bu restriksiyon bölgeleri mevcut plazmidin herhangi başka bir bölümünde bulunmaz ve rekombinant plazmid oluşturulması için eklenecek gen bölgesi içinde olması da istenmez. Plazmidin bu bölgesi istenen DNA parçasını eklemek için kullanılan önemli bir bölümdür.

2.4.2. P_{PH}: Polihedrin Promoter

Promoter belirli bir genin transkripsiyonunu başlatan DNA bölgesidir. Daha detaylı olarak ise bir genin yukarı bölgesinde yaklaşık 250 bazlık bir alanı kaplayan (çok daha distal promoter bölgeleri de olabilir), bünyesinde “cis acting” elementler bulunan ve o genin ekspresyonunu yani bu genden mRNA sentezlenmesini aşağı ya da yukarı doğru regüle eden, transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı bölgeler olarak tanımlanabilirler (53).

Polihedrin proteini, ekspresyon çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir bakulovirüs olan *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) partiküllerini koruyucu bir matriks gibi onu kuşatıp bu virüsün çevresel ortamda sağkalımını ve yeni konakçılara etkili yayılımını sağlar. Oldukça güçlü olan pPolh promoterının kontrolü altında enfeksiyon siklusunun geç dönemlerinde (enfeksiyon sonrası 15-96 saat) bile fazla seviyelerde (tüm hücrel proteinin %50sine kadar) ifade edilmektedir. Yapılan araştırmalar hücre kültürü ortamında polihedrin tabakanın virus yayılımı için gerekli

olmadığını, dolayısıyla heterojen proteinlerin pPolh promoter kontrolü altında eksprese edilebileceğini göstermiştir. Böylece bu güçlü promoter kullanılarak ilgilenilen genlerin yüksek miktarda ekspresyonu gerçekleştirilebilmektedir (54-56).



Şekil 2.9. pfastBAC vektörü promoter ve enzim kesim yerleri gösterimi (57)

2.4.3. SV40 pA: SV40 Poliadenilasyon Sinyali

Poliadenilasyon primer transkript RNA'ya poli (A) kuyruğunun eklenmesidir. Poli (A) kuyruğu çoklu adenosin monofosfatlardan oluşmaktadır. Ökaryotik bir organizmada hemen hemen tüm mRNA'lara poli (A) kuyruğu eklenmiş durumdadır. Olgun mRNA oluşumu için bu poli (A) kuyruklarının ne zaman ve nereye takılacağı ise poliadenilasyon sinyali adı verilen spesifik dizi sinyalleri sayesinde başarılmaktadır. Bu sinyaller mRNA kesim bölgesinin 10-30 baz yukarısında bulunmaktadır (58).

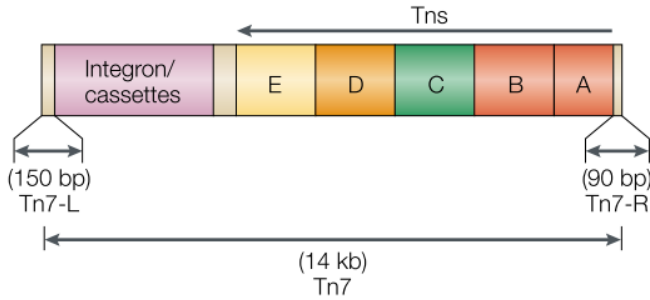
Poliadenilasyon sinyali ilk kez 1981 yılında simian virüs 40 (SV40)'ta tanımlanmıştır ve pek çok hayvan virüsünde bulunduğu gösterilmiştir (58).

2.4.4. Tn7 Transpozon

Transpozonlar, konakçı genomu boyunca yayılabilen ve replike olabilen DNA dizileridir. İnsan genom dizilenmesi genomun %35-50 kadarının transpozonlardan yada kalıntılarından oluştuğunu göstermiştir. Tn7 pek çok bakteri ve fajda bulunan transpozon ailesinin bir modelidir. Bakteriyel Tn7 transpozonu *E.coli* kromozomunda bulunan *aatTn7* dizisine TnsD hedef seçici proteine dizi spesifik DNA bağlanımı yapar. Tn7 transpozisyon için gerekli olan hedef DNA dizisi bakterilerden insanlara kadar yüksek derecede korunmuş, esansiyel glukozamin sentetaz (*glmS*) geninin C-terminalinde bulunur. Tn7

entegrasyonu *tnsABCD* transpozaz ile gerçekleştirilir. *TnsCD* proteinleri *Tn7*'nin *glmS* transkripsiyonel sonlanmaya entegrasyonunu teşvik eder (59, 60).

Transpozisyon düzeneğinin bulunduğu *Tn7*'deki diziler, *Tn7*'nin uçlarında bulunur. Soldaki gerekli segment (*Tn7-L*) yaklaşık 150 bazken sağdaki gerekli segment (*Tn7-R*) yaklaşık 90 baz uzunluğundadır. Bu uç segmentler tarafından iki yandan desteklenen herhangi bir DNA parçası *Tn7* transpozisyon proteinlerinin varlığında transpoze olabilir. Aşağıda *Tn7*'nin yapısı gösterilmektedir (60).



Şekil 2.10. *Tn7* transpozon (60)

2.4.5. Replikasyon orjini

Replikasyon orjini genomda replikasyonun başladığı belirli bir dizidir. Replikasyon orjini türden türe farklılıklar göstermekle birlikte bazı ortak özelliklere sahiptir. Örneğin adenin ve timin bazları bakımından zengindir.

Genetik mühendisliğinde plazmid vektörlerde en sık kullanılan replikasyon orjini pUC orjini. Bu orjin pBR322'den köken almıştır ve iki mutasyon barındırmaktadır. Bu mutasyonlar doğada bulunmayıp daha fazla miktarda DNA eldesi için oluşturmuş olan mutasyonlardır. Bu mutasyonlar sayesinde pBR322 ile hücre başına 15-20 plazmid üretilebilirken pUC ile 500'den fazla plazmid üretilebilmektedir (61).

f1 replikasyon orjini ise bir plazmid olan fajmidlerde bulunmaktadır. Fajmid bir plazmid gibi replike olabileceği gibi aynı zamanda viral partiküllerde tek zincirli bir DNA olarak da paketlenmektedir (62).

2.4.6. Antibiyotik Direnç Genleri

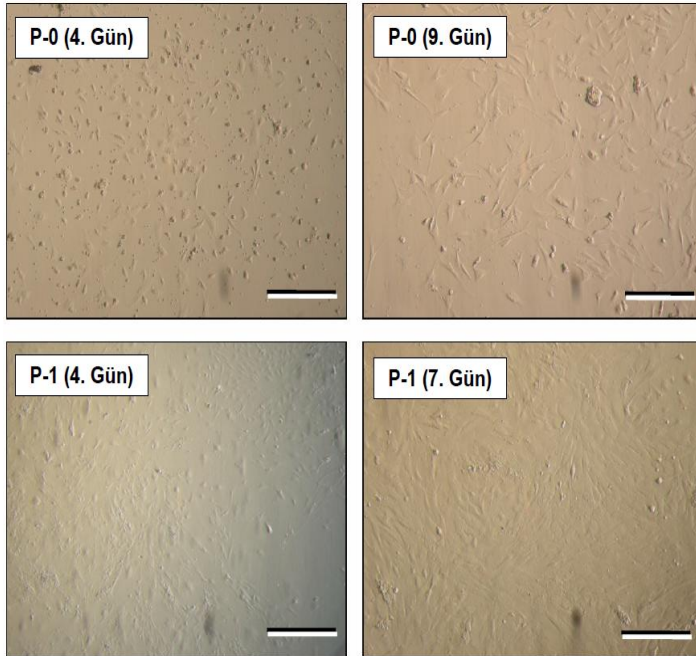
Transformasyonu başarı ile yapılan hücrelerin seçimi vektörde seçici bazı belirteçler ile

sağlanır. En sık kullanılan belirteç ise antibiyotik direnç belirteçidir. Çalışmamızda kullanılan pfastBAC vektöründe ampisilin ve gentamisin olmak üzere iki antibiyotik direnç belirteci bulunmaktadır (Şekil 2.8).

2.5. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

Mezenkimal kök hücreler kan kökenli olmayan, mezoderm tipi birçok hücreye dönüşebilen kök hücrelerdir. Mezenşim mezoderm kaynaklı embriyonik bağ dokusu çeşididir ve hematopoietik ve bağ dokusu olmak üzere iki dokuya farklılaşmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerse non-hematopoietik hücreler olarak ifade edilmektedir. Elde edildiği kaynaklar açısından baktığımızda kemik iliği mezenkimal kök hücre açısından zengindir. Bunun dışında, umbilikal kord dokusu, yağ dokusu, yetişkin kas dokusu, korneal stroma ve bebeklerin süt dişlerinin pulpası, mandibular 3.moların gelişen diş kökü, amniyotik sıvının da mezenkimal kök hücre kaynağı olduğu ifade edilmektedir (63).

Morfolojileri açısından bakıldığında mezenkimal kök hücreler faz kontrast mikroskop altında fibroblast benzeri morfoloji sergilerler (Şekil 2.11).

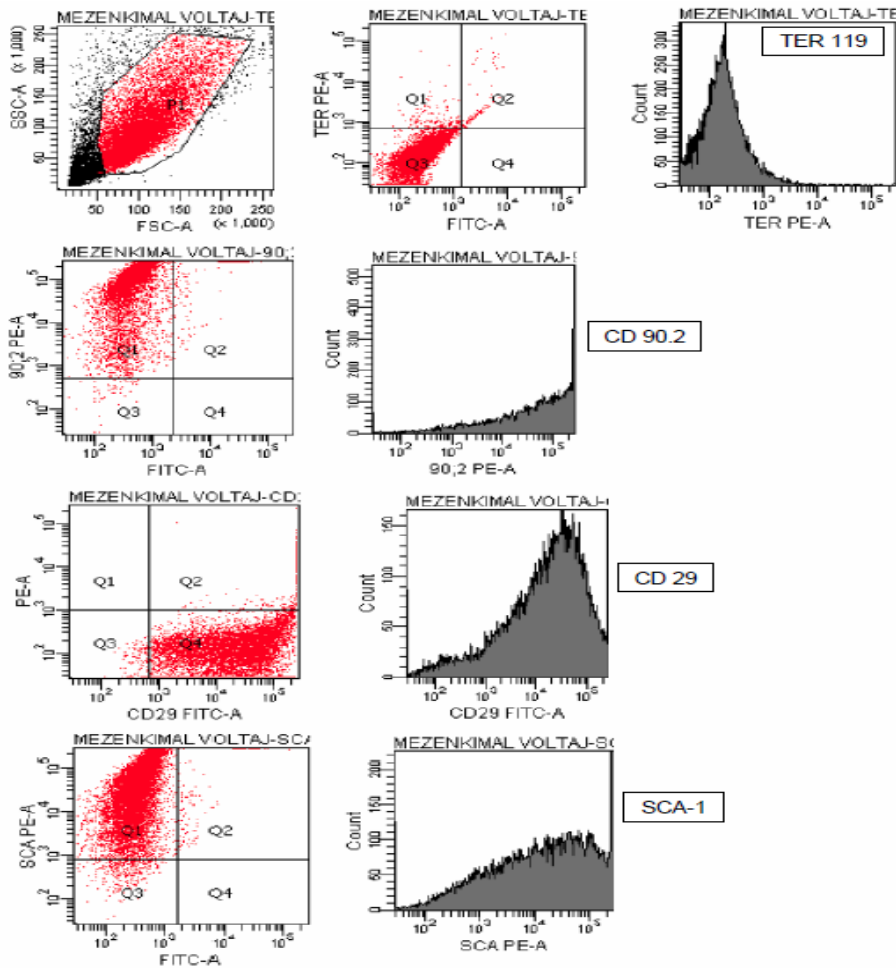


Şekil 2.11. MKH hücre kültüründe farklı zamanlardaki görüntüleri (Prof.Dr. Murat Elçin Laboratuvarı, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi)

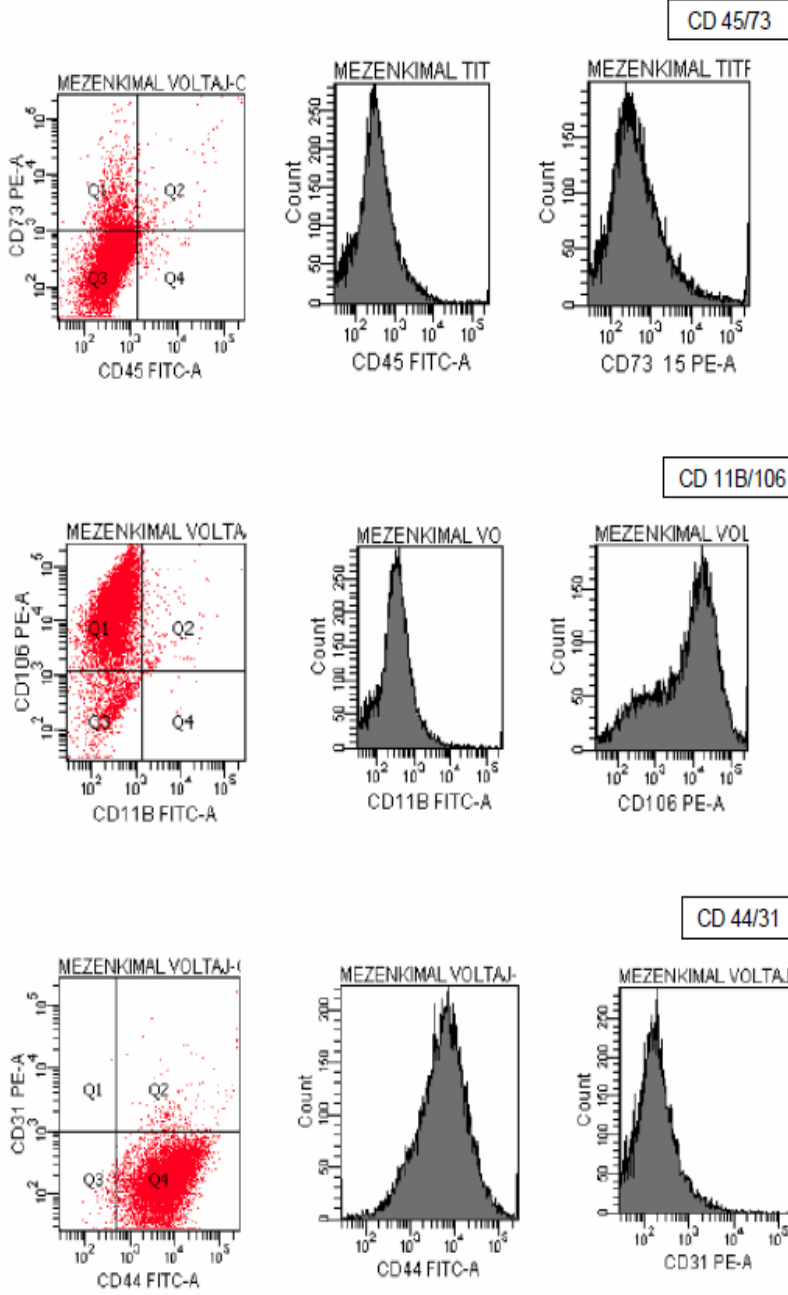
İzolasyonu takiben 0. Pasajın (P-0) 4. ve 9. günleri ile, 1. Pasajın (P-1) 4. ve 7. günlerinde fare mezenkimal hücrelerin faz kontrast mikroskobu görüntüleri (Hoffman modülasyonu). Mezenkimal stromal hücrelere özgü fibroblastoid morfoloji ortaya çıkmaktadır. Boyut çubukları: 200 μ m.

Mezenkimal Kök Hücreler ilk kez A.J. Friedenstein tarafından 40 yıl kadar önce tanımlanmıştır. Bunu kemik iliğinden ilk kez fibroblast benzeri, adherent, in-vitro yüksek replikatif kapasiteye sahip klonijenik hücreler izole ederek göstermiştir (64). A.J. Friedenstein çalışmasında kemik iliğinin mezenkimal doku kök hücreleri için bir kaynak teşkil ettiğini gözlemlemiştir.

Bu hücrelerin elde edilmeleri hücre kültürü kaplarına adhere olmaları, fibroblast benzeri yapı göstermeleri ve koloni oluşturma özellikleri sayesinde olmaktadır. Ex-vivo olarak osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmaya gidebilirler. Kültüre MKH ler yüzeylerinde eksprese ettikleri yüzey belirteçlerine göre de ayırma tabi tutulurlar. MKHlerin CD73, CD90 ve CD105 eksprese ettikleri, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a ve HLA-DR eksprese etmedikleri bilinmektedir (65) (Şekil 2.13).

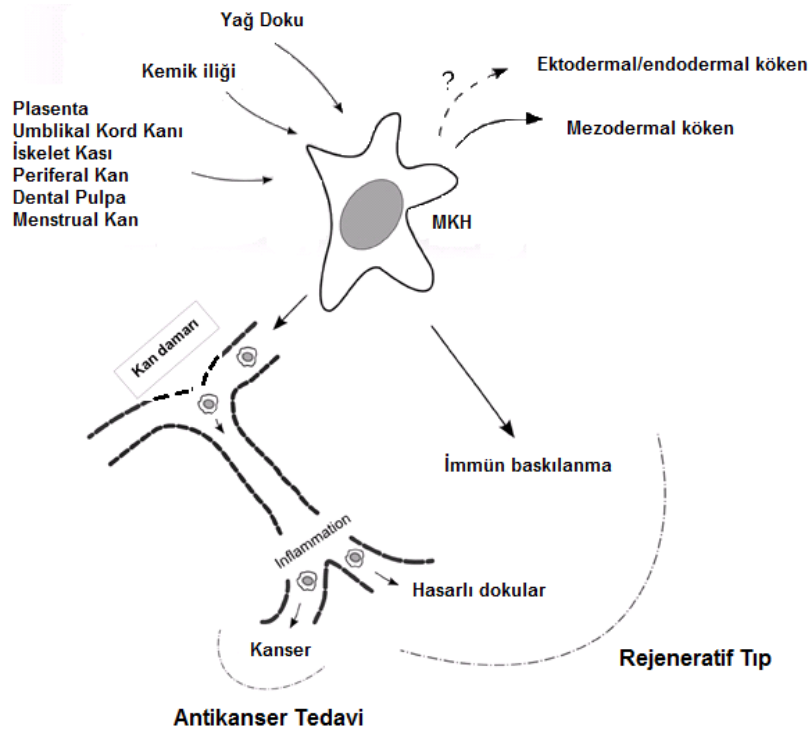


Şekil 2.12. Fare mezenkimal kök hücre (MKH) akım sitometri görüntüleri-1 (Prof.Dr. Murat Elçin laboratuvarı, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi)



Şekil 2.13. Fare mezenkimal kök hücre (MKH) akım sitometri görüntüleri-2 (Prof.Dr. Murat Elçin laboratuvarı, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi)

Kanser MKH'in gen tedavisinde kullanılması açısından önemli bir potansiyel barındırmaktadır. Gerek hücresel tedavi/rejeneratif tıpta kullanılmaları gerekse gen taşıma araçları olarak kullanılmalarını sağlayan eşsiz özellikleri barındırırlar. Bunlar; vücutta geniş bir dağılımları bulunması, kültürde potansiyellerini kaybetmeksizin çoğaltılabilmeleri ve kolay izole edilebilmeleri, in vitro ve in vivo olarak geniş çeşitlilikte fonksiyonel hücreye dönüşebile yetenekleri, başka bir yere nakledildiklerinde anti-inflamatuar ve immunomodülatuar özellikler sergilemeleri ve in vivo uygulamalarında hasarlı dokulara, solid tümörlere ve metastaz alanlarına yerleşmeleridir (66).



Şekil 2.14. MKH kaynakları ve etkileri (67)

2.6. İntihar Gen Tedavisi

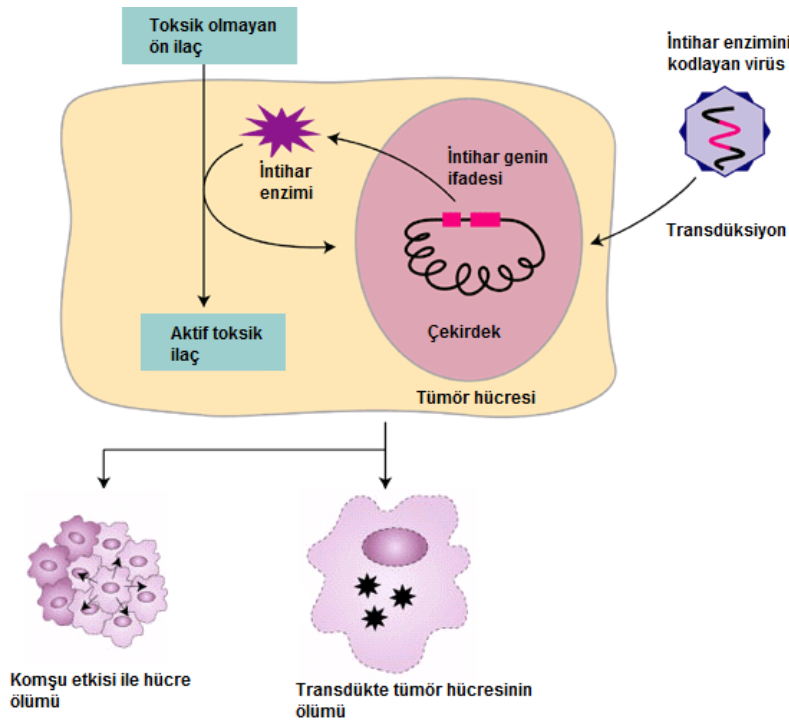
Kanser tedavisinde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi en sık kullanılan geleneksel yöntemler olup cerrahi olarak tümörün tamamının alınabildiği durumlar halen en etkili yöntemdir. Ancak onkoloji kliniklerine başvuran çoğu hasta genelde ileri evre tanı aldığı için cerrahi şansı azalmaktadır. Kemoterapide kullanılan ilaçlara direnç gelişebileceği ve kanser kök hücresi adı verilen kök hücre özelliği gösteren hücrelerin varlığı da tedaviyi daha da zorlaştırmaktadır. Bu nedenle daha etkili kanser tedavisi stratejilerinin gerekliliği açıktır.

Son yıllarda pek çok hastalığın tedavisinde olduğu gibi kanser tedavisinde de gen tedavi ajanlarının hayata geçirilmesi tedavide bir umut doğurmuştur. Çizelge 2.1’de belirtildiği üzere kanser tedavisinde pek çok tedavi ajanı halen klinik araştırma aşamasındadır.

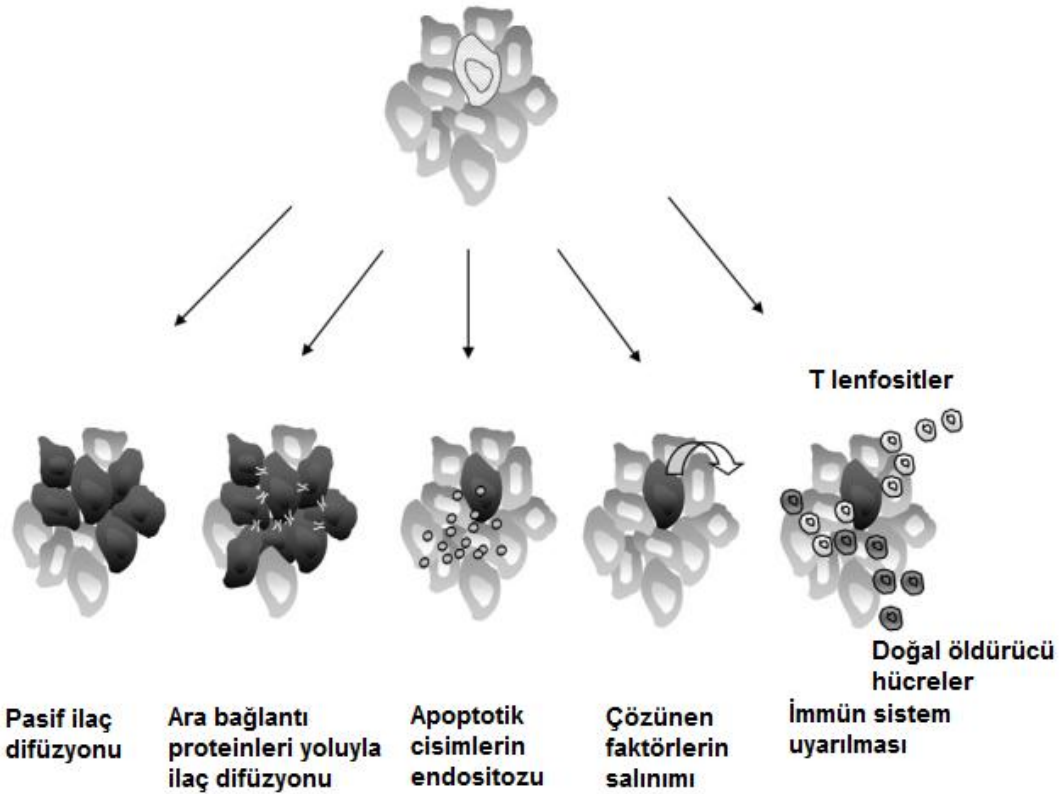
İntihar gen tedavisi, kanser gen tedavisi yöntemlerinden biridir. Bu tedavi yöntemi memeli hücrelerinde bulunmayan viral ya da bakteriyel bir enzim geninin tümör hücrelerine verilmesiyle toksik olmayan ön ilacın aktif toksik ilaca dönüşme prensibine dayanır (68). Bu sayede kemoterapinin sistemik toksik etkisi gözlenmez ve hedefe yönelik bir strateji izlenmiş olunur.

Geçmişten günümüze pek çok intihar gen tedavisi sistemi denenmiş olup bunların arasında en çok çalışılanları Herpes simpleks virüs timidin kinaz/gansiklovir ve Sitozin deaminaz/5F-C'dir (69).

Bu tez çalışmasında sitozin deaminaz/5F-C intihar gen tedavisini kullandık. Sitozin deaminaz (CD) bakteri ve mantarlarda bulunan ancak memelilerde bulunmayan bir enzimdir. Gen ile ilgili detaylı bilgi bir sonraki bölümde verilmiştir. Bu enzim bir ön ilaç olarak verilen ve vücuda bir zararı olmayan 5-FC'yi kemoterapide kullanılan ve toksik etkileri olan 5-FU'ya dönüştürür. Dolayısıyla sistemik toksik bir etki yaratmaksızın sadece enzimin ifade edildiği tümör hücrelerinde toksik bir etki yaratılmış olur. Şekil 2.15 bu mekanizmayı özetlemektedir.



Şekil 2.15. İntihar gen tedavisi (70, 71)



Şekil 2.16. Transfekte olmayan ancak regresyon gösteren tümör hücrelerinin durumuna ait hipotezler (69)

5-FU kolaylaştırılmış difüzyon olmadan hücrelerin içine ve dışına rahatlıkla difüze olabilen, hücre-hücre kontağına ihtiyaç duymayan bir ilaçtır. Dolayısıyla CD/5-FC intihar gen tedavisinde bu ilacın kullanımı güçlü bir lokal komşu etkisi yaratmaktadır.

2.6.1. İntihar Gen Tedavisinde Sıklıkla Kullanılan Genler ve Üretilen İlaçlar

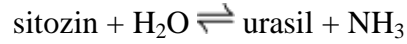
2.6.1.1. Timidin Kinaz/ Gansiklovir Sistemi

Çeşitli intihar gen tedavileri bulunsa da sitozin deaminaz ve HSV1-TK bunlar içinde en çok çalışılanlarıdır. Bunlardan HSV1-TK intihar gen tedavisi sisteminde tirozin kinaz (TK) bir ön ilaç olan gansikloviri toksik metabolitine dönüştürmektedir. Bu toksik metabolitte kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan bir tedavi ajanıdır. Sistemde virüs olarak herpes simplex (HSV) kullanılmaktadır. Her ne kadar HSV1-TK intihar gen tedavisi diğer adıyla ön ilaç aktivasyon tedavisi pek çok kanser tiplerini tedavi etmek için kullanılsa da HSV nörotropik bir virüs olduğundan beyin tümörleri tedavisi için kullanımı daha avantajlı olmuştur. Mekanizma özetle şu şekildedir: TK, GSV'yi monofosforile forma metabolize eder. Bu form daha sonra diğer selüler kinazlarca toksik trifosfat formuna dönüştürülür.

Toksik GCV metaboliti replike olan hücre DNAsı ile birleşince prematür zincir sonlanması gerçekleşir ve sonuçta replikasyon bozularak hücre ölümü gerçekleşir (74).

2.6.1.2. Sitozin Deaminaz (CD)/ 5-FC Sistemi

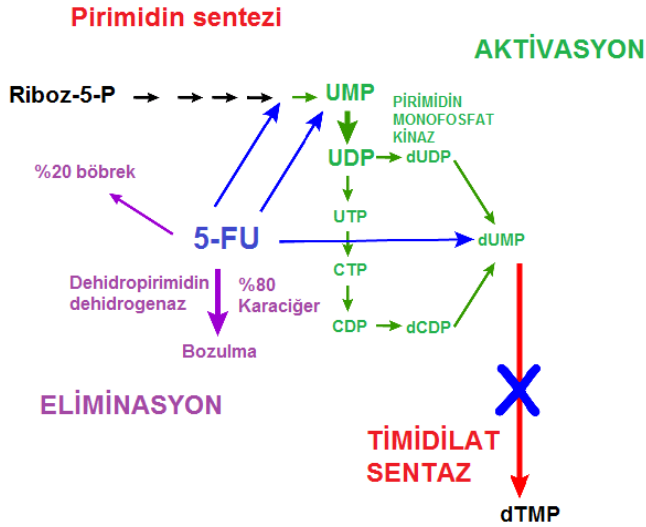
Sitozin deaminaz aşağıda ifade edilen kimyasal reaksiyonu katalizleyen, hidrolaz ailesinden bir enzimdir. Yalnızca bakteri ve mantarlarda bulunmaktadır (75).



Toksik olmayan ön ilacı (5-FC) toksik ilaca (5-FU) dönüştürmekte, ilaç daha sonra hücrel enzimlerce potent pirimidin antimetabolitlerine transforme olmaktadır. Enzim hem antimikrobiyal ilaç tasarımı hemde tümörlere karşı gen tedavisi uygulamalarında oldukça ilgi çekici olmuştur. 5-FC normal hücreler için zararsız olan bir mantar ilacıdır. Florinlenmiş bir pirimidin analogudur (75, 76). Sitozin deaminaz varlığında hücreler için zararlı olan 5-FU'ya dönüşmektedir. Kanser tedavisinde bir kemoterapi ajanı olarak kullanılan 5-Fluorourasil'in sistemik etki yaratmaksızın tümör hücrelerinde oluşumu ilgili vektörlere klonlanan bu enzim sayesinde gerçekleştirilmektedir.

Fluorourasil (5-FU) yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçlarından birisidir. Meme, kolon ve cilt kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Timidilat sentetaz adı verilen enzime bağlanarak hücreler üzerindeki etkisini gösterir ve genellikle standart dozlarda iyi tolere edilir (76).

Timidilat sentaz enzimi deoksiürinmonofosfatın (dUMP) deoksitimidin monofosfata (dTMP) dönüşümünü katalizler. dTMP timini oluşturan üç nükleotidden (dTMP, dTTP, and dTDP) biridir. Dolayısıyla 5-FU tarafından timidilat sentaz enziminin blokasyonu DNA yapısında bulunan timin nükleik asidinde azalmaya, dUTP seviyelerinin artmasına neden olur. Bu dengesizliğin her ikisi de DNA da hasara neden olmaktadır (Şekil 2.18).



Şekil 2.17. 5-FU fonksiyonları (77)

2.7. Kanser Gen Tedavisinde Kullanılan Diğer Genler

2.7.1. Sitokin Genleri

Sitokinler normal ve patolojik koşullarda önemli görevler üstlenen hormon benzeri polipeptitlerdir. Pek çok hücre ve dokunun fonksiyonel aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynarlar. Çok geniş bir aktivite spektrumları olduğundan enfeksiyöz hastalıklardan neoplazilere kadar pek çok alanda kullanımları söz konusu olmuştur. G-CSF, GM-CSF ve EPO gibi sitokinlerin kemoterapi tedavisi sonucu ortaya çıkabilen sitopenileri önlemek için sistemik olarak kullanımları söz konusu iken IL-2 gibi sitokinlerin sistemik kullanımları yarattıkları önemli toksisitelerden dolayı kısıtlıdır. Dolayısıyla kanser açısından bakacak olursak bu sitokinlerin hedef bölgeye aktarımı oldukça önem taşımaktadır. Bugüne kadar pek çok sitokin (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , G-CSF, GM-CSF, IL-5, IL-10 ve M-CSF) araştırmalarda kullanılmıştır. Çoğu tümörde anlamlı regresyon gözlemlenememiştir ancak bazı hayvan modellerinde IL-2, IL-4, IL-6, IFN- α ve GM-CSF gibi belirli sitokinleri üreten tümörlerde hatta uzak metastazlarda etkili oldukları bulunmuştur (78).

Çizelge 2.4. Sitokin grupları ve örnekleri (79)

Sitokin çeşidi Lenfokinler	Özgün sitokinler MAF (Makrofaj aktive edici faktör), MMIF (Makrofaj göçünü inhibe edici faktör), MCF (Makrofaj kemotaktik faktör), LMIF (Lökosit göçünü inhibe edici faktör), HRFler (Histamin salgılayan faktörler), TF (Transfer faktörleri)
İnterlökinler	IL-1,IL-2,.....IL-15
Tümör nekrozis faktör	TNF- α (kaşeksin), TNF- β (lenfotoksin)
İnterferonlar	IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- ω , IFN- τ
Koloni uyarıcı faktörler	G-CSF (Granülosit koloni uyarıcı faktör), GM-CSF (Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör), M-CSF (Makrofaj koloni uyarıcı faktör), MultiCSF (IL-3)
Polipeptid büyüme faktörleri	aFGF (asidik fibroblast büyüme faktörü), bFGF (bazik fibroblast büyüme faktörü), EGF (epidermal büyüme faktörü), NGF (sinir büyüme faktörü), PDGF (platelet kaynaklı büyüme faktörü), VEGF (damar endotelial büyüme faktörü)
Transforme edici büyüme faktörü	TGF- α , TGF- β
α-Kemokinler	IL-8, NAP-2 (Nötrofil aktive edici protein-2), PF-4 (platelet faktör-4), β -TG (β -Tromboglobulin)
β-Kemokinler	MCP-1 (Monosit kemoatraktan protein 1), MCP-3 MIP-1- α (Makrofaj inflamatuvar protein 1- α) MIP-1- β (Makrofaj inflamatuvar protein 1- β) RANTES
Stres proteinleri	HPSler (Isı şok proteinleri), GRPler (glukozla ilgili proteinler), ubiquitin, süperoksit dismutaz

2.7.1.1. Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör (GM-CSF)

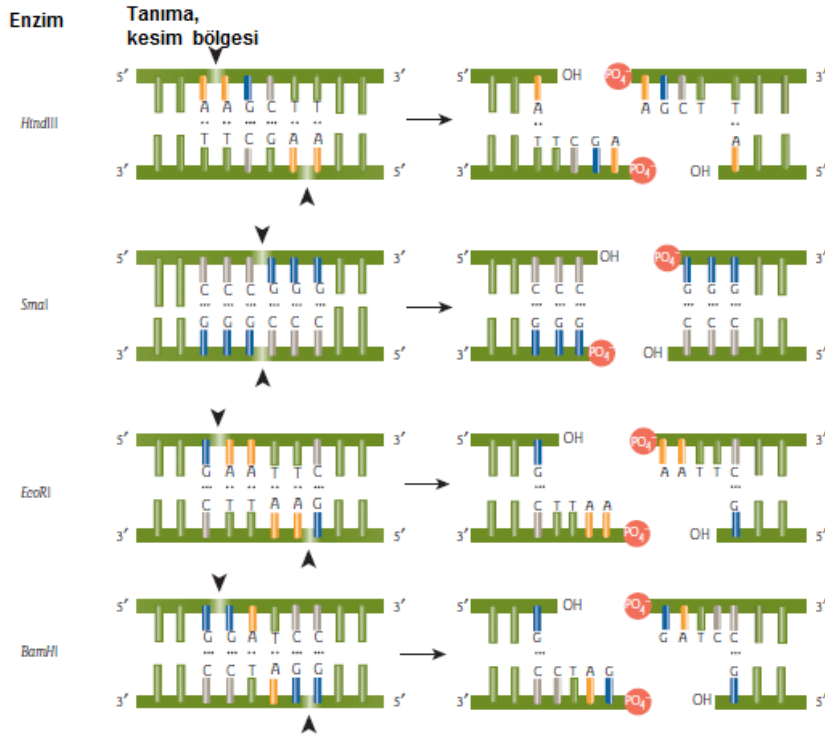
GM-CSF proteininin aktif formu hücre dışında homodimer olarak bulunmaktadır. Aynı zamanda serum ve çoğu dokuda, ekstraselüler matriks ile ve integral membran proteinler ile bağlantılı olarak bulunmaktadır. 4 eksondan oluşan 2.5 kb mRNA tarafından kodlanır. Monomerik yapıda, 23 kDa ağırlığında, glikozillenmiş küçük bir protein olarak salgılanır (80).

GM-CSF ilk kez farelere lipopolisakkarit enjeksiyonunun ardından fare akciğer dokusu-uyumlu ortamda in vitro fare kemik iliği hücrelerinin çoğalmasını uyarma yeteneği ve hem granülosit hemde makrofaj kolonileri oluşturma yeteneğiyle tespit edilmiştir. Multipotent progenitör hücreleri doz bağımlı olarak uyarır. Örneğin makrofaj öncülü hücreleri en düşük dozlarda uyardığı bilinmektedir (80).

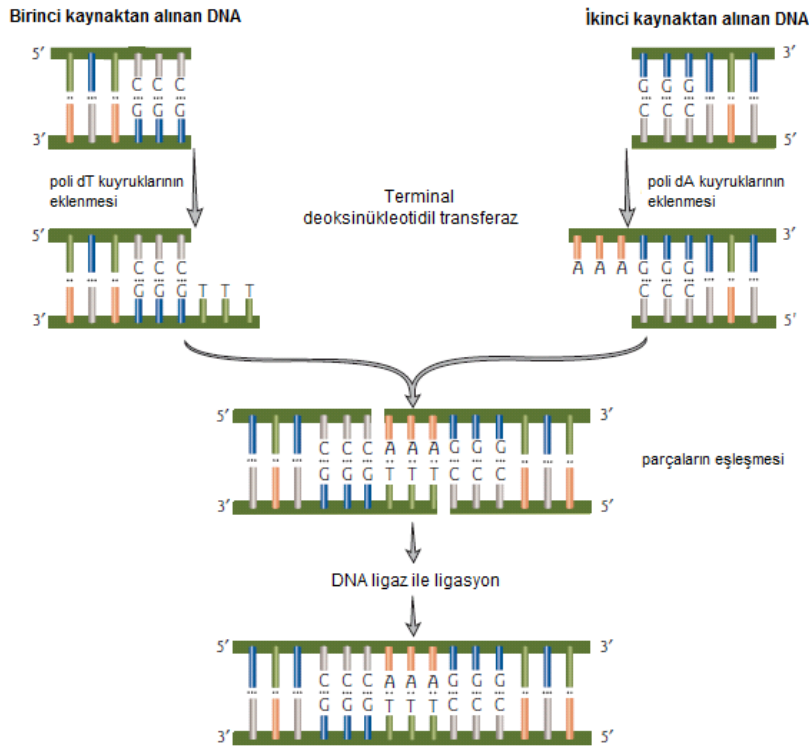
2.8. Bakuloviral Gen Tedavi Vektörü Yapım Aşamaları

2.8.1. Rekombinant Plazmid Vektör İnşası

DNA'yı izole etmek ve rekombinant DNA oluşturmak için iki önemli enzim ailesi kullanılır. Bunlar: Restriksiyon endonükleazlar ve DNA ligazlardır. Restriksiyon endonükleazlar çift zincirli DNA'yı spesifik nükleotid dizilerinden keserler. DNA ligazlar ise fosfodiester bağları oluşturarak iki DNA parçasını birbirine bağlarlar (81). Aşağıda sıklıkla kullanılan bazı restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kesim bölgelerine örnekler verilmiştir.

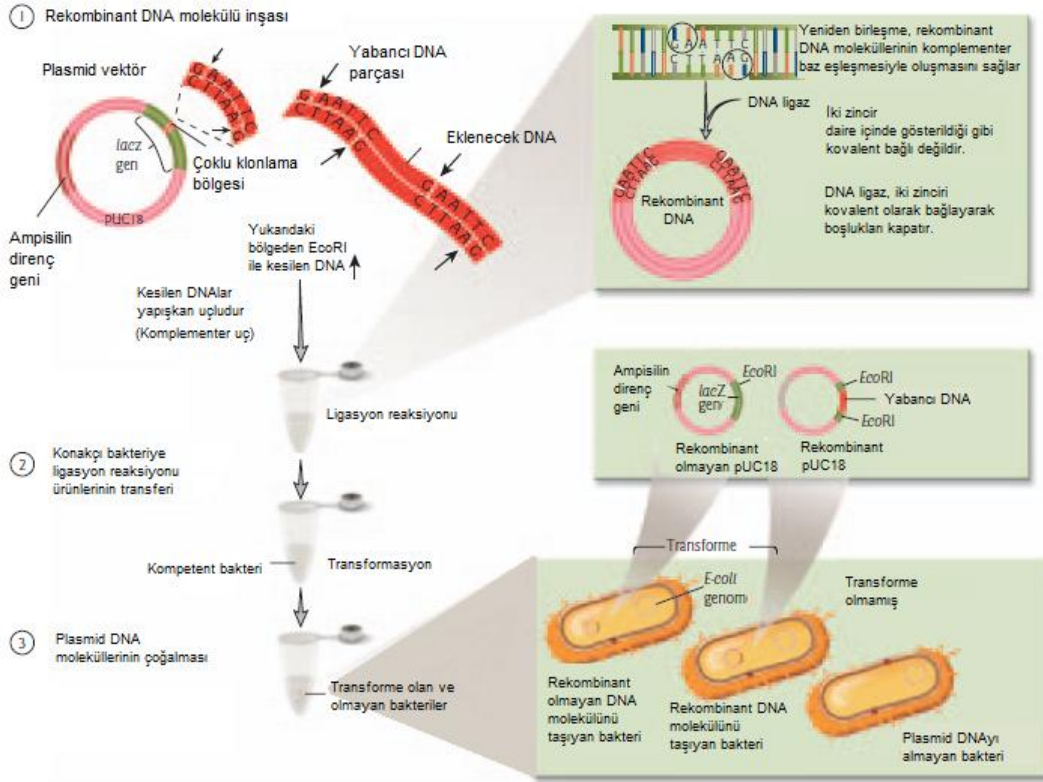


Şekil 2.18. Bazı restriksiyon endonükleazların kesim paterni örnekleri (82)



Şekil 2.19. Küt uç ligasyonu (82)

Bu şekilde açıklanan küt uç ligasyon yöntemi, “4.1. Materyal” bölümünün bir alt başlığı olan” 4.1.3. Kitler” bölümünde belirtildiği üzere Zero Blunt PZR klonlama kiti (Invitrogen Carlsbad, USA) ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.20. Plazmid vektör kullanarak moleküler klonlama (82)

2.8.2. Rekombinant Bacmid Vektör İnşası

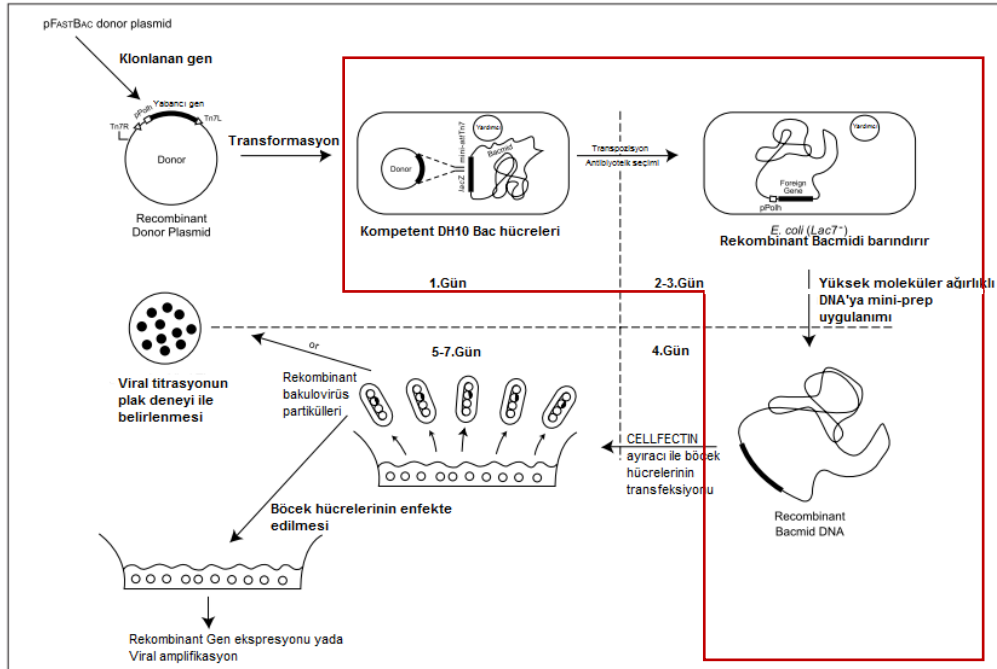
Bu virion çeşitleri farklı dokuları enfekte etme etkinliklerine göre değişiklik gösterirler. ODV'nin böcek orta bağırsak hücrelerini BV'den 10.000 kat daha etkin bir şekilde enfekte edebilirken BV'nin kültüre hücrelerini ODV'den 1000 kat daha fazla enfekte ettiği bilinmektedir (45).

Doğal olarak meydana gelen in-vivo enfeksiyon ve rekombinant in vitro enfeksiyon arasındaki temel fark yabancı tip bakulovirüs genomundaki polihedrin geninin rekombinant bir gen yada cDNA ile değiştirilmiş olmasından kaynaklanmaktadır. Bu genler ortaklaşa olarak polihedrin ve p10 promoterlarının kontrolü altındadır. Enfeksiyonun geç fazında, virionlar birleştirilir ve tomurcuklanan rekombinant virionlar salınır. Ancak, çok geç dönem boyunca, eklenen heterojen genler, güçlü AcMNPV polihedrin promoterının transkripsiyonel kontrolü altına alınır (46). Böylece, polihedrin proteini yerine rekombinant ürün ifade edilir. Genellikle, rekombinant proteinler işlenir, modifiye edilir ve uygun hücresel yerlere hedeflenir.

İntihar gen tedavisinde önemli bir diğer nokta komşu etkisidir. İntihar gen tedavisinde komşu etkisi transfekte hücrelerin komşu tümör hücrelerine ölüm sinyalleri göstermesidir. İki çeşit komşu etkisi görülür. Biri lokal diğeri ise uzak komşu etkisidir. Lokal komşu etkisinde tümör hücrelerinin sadece küçük bir bölümü intihar geni ifade etse de, lokal komşu etkisinin tümör regresyonunu uyardığı bilinmektedir (72, 73).

Uzak komşu etkisinde ise intihar geni ifade eden tümör hücrelerinden uzakta bile yabancı tümör hücrelerinin regresyonu görülmektedir. Bu transfekte olmayan ancak regresyon gözlemlenen tümör hücrelerindeki durum çeşitli hipotezler ile açıklanmaya çalışılmıştır (69) (Şekil 2.16).

GM-CSF, beyaz kan hücresi büyüme faktörü olarak fonksiyon gören bir sitokindir. Makrofajlar, mast hücreleri, T hücreleri, doğal öldürücü hücreler, endotelial hücreler ve fibroblastlar tarafından salgılanır. Kök hücreleri nötrofil, euzinofil ve bazofil gibi granüositleri ve monositleri yapmak için uyarır. Ayrıca immun/inflamatuar kaskadın en önemli hücrelerinden olan makrofajlar ve dendritik hücreleri uyarmaktadır. Özetle GM-CSF immun/inflamatuar hücreler için oldukça önemli bir sitokindir.



Bu çalışmadaki hayvan deneyleri için “Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu” tarafından onam alınmıştır. (Tarih:27.08.2010, Karar no:2010-96-347).

Şekil 2.21.Rekombinant Bacmid Vektör İnşası (83)

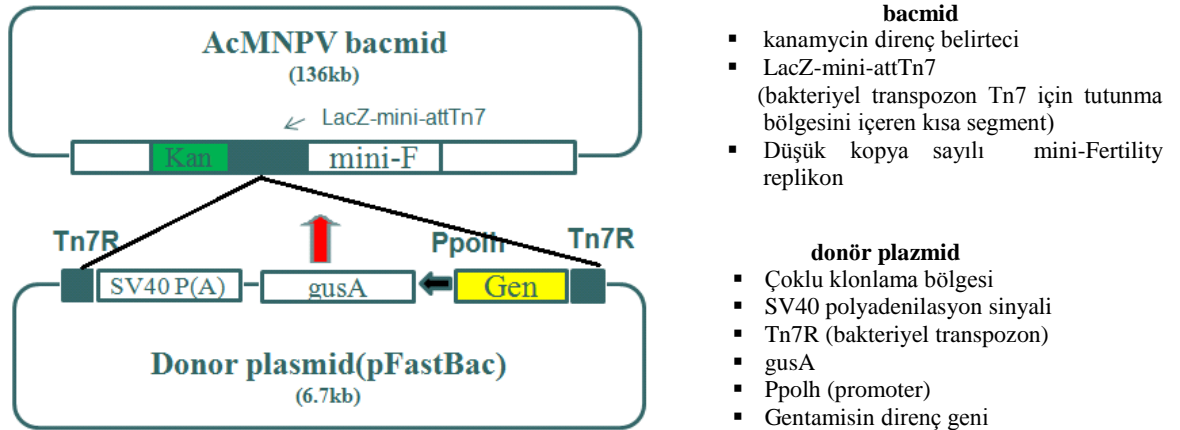
Yukarıda gösterilen şekil rekombinant plazmidten rekombinant bakulovirüs eldesine kadar olan tüm aşamaları ifade etmektedir. Kırmızı ile çerçevelenen kısım rekombinant bakulovirüsün elde edilmesi aşamalarıdır ve teknik & pratik bilgiler kısaca şu şekilde özetlenebilir:

Bir önceki aşamada elde edilen, ilgili genlerimizi barındıran rekombinant donör plazmid Kompetent DH10 Bac hücrelerine (Invitrogen Carlsbad, USA) transforme edilir. Kompetent DH10 Bac hücreleri 3 önemli vektörü barındırır. Bunlar;

1. **Verici (Donör) plazmid vektör:** Klonlanan genleri barındıran vektördür.

2. **Bakulovirüs shuttle (mekik) vektör = bacmid:** mini-attTn7 hedef bölge, lacZ, kanamisin direnç geni içerir.

3. **Yardımcı (helper) plazmid vektör:** transpozaz, tetrasiklin direnç geni içerir.



Şekil 2.22. Rekombinant Bacmid Vektör inşasında transpozisyon (84)

Bu vektörlerden mekik ve yardımcı vektörde bulunan transpozonlar sayesinde donör plazmid vektördeki ilgili genlerimiz mekik vektöre aktarılır. Bu aktarımda yardımcı vektördeki transpozaz geni işlev görür. Bu üç vektörde bulunan direnç genlerinin (kanamisin, gentamisin, tetrasiklin) olduğu ortamda da rekombinant bacmid vektör seçimi gerçekleştirilir. Ayrıca mekik vektörde bulunan lacZ geni (beta galaktozidaz) transpozisyon olduğu takdirde kırılacağından işlesiz kalarak bize farklı bir seçici ortam

daha hazırlamış olur. Gen işlevsiz kaldığı için beta galaktozidaz çalışmaz ve laktozu yıkamaz. Böylece beyaz renkli koloniler elde edilir.

2.8.3. Rekombinant Vektörlerde Kullanılan İşaretleyici Genler

Bazı vektörler ligasyonu yapılan genin tanımlanması için işaretleyici genler taşırlar. Bunlara örnek olarak, GFP, lacZ- α ve lusiferaz verilebilir.

2.8.3.1. Yeşil Floresan Protein (GFP)

İlk kez 1962 yılında bir denizanası türü olan *Aequorea victoria*'da gözlemlenmiştir. Daha sonra modern biyolojik bilimlerde kullanılan en önemli araç haline gelmiştir. Moleküler biyolojide ekspresyonun habercisi olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca, araştırmacılar bu protein aracılığıyla sinir hücrelerinin gelişimi ya da kanser hücrelerinin nasıl yayıldığı gibi daha önce görülemeyen prosesleri izleme imkanı bulabilmişlerdir (85).

26.9 kDa (238 amino asit rezidüsü) büyüklüğünde olan bu proteinin keşfi ve gelişimi Osamu Shimomura, Martin Chalfie ve Roger Y. Tsien'a 2008 yılında Nobel Ödülünü kazandırmıştır (86).

2.8.3.2. LacZ- α

LacZ- α , β -galaktosidazın N-terminal parçasını kodlar. β -galaktosidaz, galaktozu parçalayan bir enzimdir. Plasmid vektörlerde laktoz geni (beta galaktosidaz) restriksiyon endonükleaz ile kesilerek buraya yabancı gen yerleştirilmişse, bu genin aktivitesi ortadan kalkar. Eğer, böyle bir konjugat (kimerik plasmid) taşıyan *E. coli*, ampicilin ve Xgal (5-bromo -4chloro -3-indolyl -beta- D- galactopyronoside) içeren ortama aktarılsa, *E.coli* ler ürer ancak, enzim sentezlenemediği için Xgal'ı ayrıştıramaz ve kolonilerin etrafı renksiz olarak görülür. Bu tür koloniler (lac, ampr) seçilir ve saf olarak üretilir. Eğer beta galaktosidaz geni sağlamısa, inaktive olmamışsa, sentezlenen enzim, Xgal'ı ayrıştırarak koloni etrafında mavi renk meydana getirir. Böylece rekombinant plasmidin seçimi gerçekleştirilir.

2.8.3.3. Lusiferaz

Ateş böceği *Photinus pyralis* geninden elde edilen lusiferaz ATP, oksijen ve Mg (++) varlığında D-lusiferini okside eder. Oksidasyon sonucu floresan bir ürün açığa çıkar. Açığa çıkan ışık ölçülerek değerlendirme yapılabilir (87).

2.9. Amaç ve Mantıksal Temeller

Moleküler biyoloji ve tıptaki olağanüstü gelişmelere karşın kanser tedavisinde hala ciddi bir iyileşme elde edilememiştir. Tüm kanser türleri göz önüne alındığında genel olarak son 20 yılda şifa oranlarında yaklaşık olarak % 5 lik bir iyileşmeden söz edilebilir (88). Doksanlı yılların başlarında kanser hedefli gen tedavisi büyük umutlar doğurmasına ve bu konu ile ilgili sayısız araştırma ve klinik çalışmaya rağmen günümüzde somut bir başarıdan söz etmek mümkün değildir. Gen tedavisi çalışmaları başlıca onkogen ekspresyonunu baskılamaya, eksik olan tümör baskılayıcı gen aktivitesini yerine koymaya, immün sistemi uarmaya, tümör damar endotelini ortadan kaldırmaya ve dışarıdan verilen ilaçlara karşı tümör hücre duyarlılığını arttırmaya (intihtar genleri) yönelik olarak yapılmaktadır.

İntihtar genleri olarak adlandırdığımız ve memeli hücrelerinde bulunmayan ancak bu hücrelere yerleştirildiğinde normal hücreler için toksik olmayan ilaçları metabolize ederek bunları sitotoksik ajanlara dönüştüren gen tedavileri doğrudan sitotoksik bir etkiyi amaçladığı için gen tedavisi yöntemleri arasında en çok umut vaad eden yöntem gibi görünmektedir. Bazı bakteri ve mantarlarda bulunan sitozin deaminaz (CD) geni tümör hücrelerine yerleştirildiğinde 5-florositozini hücre içinde 5-florourasile dönüştürmekte ve böylece diğer normal hücreler zarar görmeden sadece tümör hücreleri spesifik olarak öldürülebilmektedir (89). Yine herpes simpleks timidin kinaz (HSVtk) geni hücreler için pek toksik olmayan gansikloviri hücre içinde gansiklovir trifosfata dönüştürerek sitotoksik bir etki sağlayabilmektedir (90). Ancak hayvan çalışmalarında tümör kitlelerinin gen tedavisi yöntemleriyle tamamen ortadan kaldırılması çoğu zaman mümkün olamamaktadır.

Mevcut gen tedavisi yöntemlerinin çok başarılı olamamasında tümör hücrelerinin heterojenitesi ve her hücre için uygun olabilecek bir hedef geninin bulunamaması gibi

tümörlerin biyolojik davranışlarından kaynaklanan engellerin yanısıra bir diğer önemli engel de gen tedavisi vektörlerinin tüm tümör hücrelerine etkin bir şekilde ulaştırılmamasıdır. İntihar gen tedavisi çalışmalarında bu sorun “komşu etkisi” (bystander effect) kısmen giderilebilmektedir. Gen tedavisi vektörü tümör kitlesindeki hücrelerin bir kısmına ulaştırılmış olsa dahi bu transfekte hücrelerde vektörün hücreye yerleştirdiği enzim transkripsiyon birimi aracılığıyla dönüştürülmüş olan aktif ilaç komşu hücreleri de kolaylıkla etkileyebilmektedir (91).

Kanserin metastatik özelliği nedeniyle tedavi ajanlarının tüm vücutta dağılması ve tüm tümör hücrelerine spesifik olarak ulaştırılması gerekmektedir. Teorik olarak gen tedavisi vektörlerinin vücuttaki tüm tümör hücrelerine ulaştırılması durumunda kanserin eradike edilebilmesi beklenmektedir. Fakat tedavi vektörlerinin in vivo olarak tüm tümör hücrelerine ulaştırılması ciddi bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde gen tedavisi vektörlerinin transfeksiyon verimini arttırmak için çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Mevcut gen tedavisi yöntemleri ile in vivo olarak yüksek oranda yanıt oranları elde edilse bile tümörlerin, özellikle metastatik olanların, eradike edilmesi pek olası görünmemektedir.

Kök hücreler, hasta dokuların replasmanını sağlaması veya hastalıklı bölgenin mikroçevresini değiştirmesi gibi özellikleri nedeniyle kişisel tedaviler için yeni bir yaklaşımı temsil etmektedir. Bu hücreler arasında, özellikle immün-modülatuar karakter taşıyan (HLA uyumsuzluğu durumunda verici hücrelerin alıcı tarafından reddedilmemesi) mezenkimal kök hücrelerin (MKH), kıkırdak, kemik, adipoz, kalp kası gibi uzmanlaşmış hücrelere farklılaşma yetenekleri nedeniyle rejeneratif tıp alanında ümit vaat ettikleri bilinmektedir (92-94). MKH'lerin dolaşıma verildiğinde tümör dokularına göç ettikleri uzun bir süredir bilinmektedir. Bu hücrelerin tümör seçici özelliklerinin önemli ölçüde tümör hücrelerinin oluşturduğu kronik inflamasyon, salgılanan bazı sitokinler ve büyüme faktörlerine bağlı olduğu düşünülmektedir (95). Anjiogenez artışı olan bölgelere ve/veya stroma oluşum bölgelerine göç etme özellikleri nedeniyle kök hücreler kanser tedavisinde potansiyel bir araç olarak dikkat çekmektedirler. MKH, özellikle kanser tedavisinde etkili olabilecek IL-2, IL-12 TRAIL ligand, vb. terapötik proteinleri salgılayacak şekilde yüklendikleri zaman deneysel kanser modellerinde tümörleri başarı ile gerilettikleri gösterilmiştir (96-98). Bunların yanısıra MKH'lerin prodrug aktive edici genlerle (intihar genleri) veya diğer gen tedavisi vektörleri ile yükleyerek bu hücrelerin tümörlere

yerleşebilme özelliklerinden yararlanarak tedavi modelleri geliştirilmektedir.

MKH'lerin *in vitro* ortamda kolayca manipüle edilebilmeleri nedeniyle gen tedavisi vektör taşıyıcısı olarak kullanılmaları çok önemli bir avantaj olarak görünmektedir. Son yıllarda lentiviruslar, retro viruslar ve plazmidlerle transdükte edilen MKH'lerin kanser tedavisinde başarılı olabileceğini gösteren çalışmalar yayınlanmıştır (99-101). Kemik iliği kökenli MKH'lerin yanısıra adipoz dokudan elde edilen MKH'ler ile yapılan çalışmalarda da bu hücrelerin iv yolla verildiklerinde tümör dokularına yerleştikleri gösterilmiştir. Sitozin deaminaz (CD) intihar geni taşıyan retroviral vektörle transdükte edilmiş adipoz doku kökenli MKH'lerin HT29 kolon kanseri modelinde tümörleri belirgin olarak geriletmediği gösterilmiştir (100). Lentiviruslar ve retro viral vektörler çok uzun süreli gen ifade etmeleri ve genoma entegrasyon yaparak mutasyon riski taşımaları nedeniyle kanser tedavisinde çok fazla tercih edilmemektedir.

Son yıllarda bir böcek virusundan (*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*) elde edilen bakuloviral vektörlerin (BVV) gen aktarımında başarı ile kullanılabilmesi gösterilmiştir. Bir DNA virusu olan BVV memeli hücrelerine kolayca girebilmekte ve hücre içinde çoğalmadan ve herhangi bir toksisiteye yol açmadan kalabilmektedir (102). Yaklaşık 130 kB'lık genomu nedeniyle çok büyük genlerin transferine imkan verebilmektedir. BVV'in MKH'leri transdükte edebildikleri gösterilmiştir (103, 104). Transdükte edilen MKH'lerin allojeneik transplantasyonu sonrasında bu hücrelerin alıcıda yerleştiği ve reddedilmediği gösterilmiştir. Bakuloviral vektörlerle transdükte edilen MKH in hayvan modellerinde güvenle kullanılabilirliği bildirilmiştir. Çok yakın zamanda intihar geni (HSVtk) taşıyan BVV ile transdükte edilmiş kemik iliği kökenli MKH in insan glioma hücrelerinin kullanıldığı tümör modelinde tümör büyümesini anlamlı ölçüde baskıladığı ve sağkalımı belirgin olarak uzattığı gösterilmiştir (103). Bakuloviral vektörlere karşı memelilerde doğal bağışıklığın olmaması ve bu vektörlerle *in vitro* olarak transdükte edilen hücrelerin transfüzyonu ile çalışılan immünkompetan hayvan modellerinde bu hücrelere karşı bir immünitenin gelişmemiş olması söz konusu vektörlerin insan kanserlerinin tedavisi için çekici hale getirmektedir.

Kanser tedavisinde diğer önemli bir yaklaşım da immünoterapidir. Ancak immünoterapinin klinik tedaviye girmesinden bu yana yaklaşık 30 yıl geçmesine karşın metastatik hastalıkta pek fazla başarı elde edilememiştir. IL-2, interferonlar gibi immunomodülatör

moleküllerin kullanılması ve LAK hücreleri ve TIL (Tümör infiltrasyon yapan lenfositler) gibi hücrelerin adoptif transferi özellikle metastatik kanserlerde kullanıldığında kalıcı yanıtlar elde edilememiştir (105, 106). Kanserli hastalarda tümörün büyüyerek klinik hale gelmesinde tümör hücrelerinin immün efektör mekanizmaları yenerek devre dışı bırakması önemli rol oynar. Dolayısıyla immün sistemin hastalarda tümör yükünün minimal olduğu dönemde daha efektif olması beklenmektedir. Nitekim interferonlar, vb. sitokinler veya tümör dokularından hazırlanan aşılarda primer tümör kitlesinin cerrahi olarak çıkarıldığı hastalarda adjuvan olarak kullanıldığında malin melanoma ve kolon kanserli hastalarda başarılı sonuçlar elde edilebilmiştir (107, 108). Son yıllarda gelişen teknoloji immünoterapiyi minimal rezidüel hastalığın tedavisinde bir alternatif haline getirmiştir. IL-2, GM-CSF ve IL-12 gibi immünmodülatör moleküller ile B7 ligand ailesi, vb. ko-stimülör moleküllerin kullanılması ile anti-tümör immünitenin artırılabilirdiği gösterilmiştir (109). B7-1 ko-stimülör molekülü T hücreleri ve dendritik hücreler üzerindeki CD28 reseptörlerine bağlanır. B7-1 genlerinin tümör hücrelerine aktarılması ile tümör regresyonu sağlandığı ve sistemik immünitenin artırıldığı gösterilmiştir (110).

Bazı adjuvanlar yabancı antijenlere karşı immünite oluşmasında önemli rol oynar. Tümör immünitesinde ise tümör hücrelerinin kendisi adjuvan olarak iş görür. Ölen tümör hücrelerinin immün sistemi harekete geçiren sinyaller sağladığı öne sürülmüştür (tehlike hipotezi) (111). Ölmekte olan tümör hücreleri dendritik hücrelerin olgunlaşmasını ve tümör immünitesinin oluşmasını uyaran tümör antijenlerinin kaynağını oluşturur (112). Tümör hücrelerinin sitoplazmasında bulunan adjuvan aktivite ölmekte olan hücrelerde canlı hücrelere göre artmaktadır (113). Her ne kadar nekroz olayının endojen adjuvan aktiviteyi en fazla arttırdığı gösterilmiş olsa da apoptozisin de benzer etki gösterdiği, bazı tümör hücrelerinde ise daha fazla etki gösterdikleri bulunmuştur (114-116). Ölmekte olan hücrelerin adjuvan aktivite mekanizması tam olarak aydınlatılamamış ise de ısı şok (heat shock) proteinler ve bazı stresle uyarılan MICA (NK ve T hücreleri üzerindeki NKG2D-DAP10 reseptör kompleksini bağlar) vb. ligandlar önemli rol oynayabilmektedir (117, 118). Bununla birlikte tümör hücreleri ile hücre teması, dendritik hücreler ve NK hücrelerinin aktivasyonunda ayrıca önem taşır (119, 120).

HSVtk/GCV sistemi ile doğrudan öldürülen tümör hücrelerinin immün sistemi uyardığı gösterilmiştir (121). Bir fare fibrosarkoma modelinde HSV-TK geni ile modifiye edilmiş tümör hücreleri verilen farelerde gansiklovir tedavisinin ICAM, B7-1 ve B-7 ko-stimülör

moleküllerinin kuvvetli ekspresyonuna yol açtığı gösterilmiştir (122). Tümör hücrelerinin pek çoğunda yüzeylelerinde kostimülatör molekül olmadığı zaman immün sistem hücrelerinden kolaylıkla kurtulabilmektedir. Ancak bu hücrelere ko-stimülatör molekülün verilmesi immün sistem için uyarıcı bir etki gösterir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada üveal melanoma hücrelerine (SOM 157d) adenoviral bir vektör aracılığı ile B7-1 verildiğinde sitotoksik T hücre cevabında belirgin artışa yol açtığı gösterilmiştir (123). Yine aynı çalışmada, B7-1 eksprese eden apoptotik tümör hücrelerinin canlı B7-1 pozitif tümör hücrelerinden çok daha fazla etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, daha önceden CD geni taşıyan vektör ile transfekte edilen tümör hücrelerinin oluşturduğu implantlar taşıyan ve 5-FC ile tedavi edilmiş olan farelerin transfekte olmayan tümör hücrelerine karşı dirençli hale gelmesi de enzim/ön ilaç sistemlerinin muhtemel uzak komşu etkisinin olabileceğini düşündürmektedir (124). GM-CSF'nin CD/5-FC ile birlikte kullanılması tek başına CD/5-FC veya GM-CSF'den daha yüksek cevap oranlarına yol açmıştır (125).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Kanser tedavisi tıp alanındaki tüm gelişmelere rağmen halen beklenen düzeyde bir iyileşme sağlayabilmiş değildir. Uluslararası Kanser Ajansı 2012 yılı için yayınlanan, dünya üzerinde kanser kayıtlılığın yapan toplam 184 ülke ve 28 kanser tipi için en yeni kanser tahminlerine göre dünya’da yeni tanı alan kanserli hasta sayısı ve kanserden kaynaklanan ölümler bir önceki tahminlere göre artmıştır. GLOBOCAN 2012 verilerine göre 2012 yılında Dünya’da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm olmuştur. Dünya’da en çok tanı konulan kanserler akciğer (%13,0), meme (%11,9) ve kolon (%9,7) iken kanserden ölümlerin ise en çok akciğer (%19,4), karaciğer (%9,1) ve mideden (%8,8) kaynaklandığı ifade edilmiştir. Bu şekilde kanser artış hızının devam etmesi durumunda, Dünya nüfusunun artışına ve nüfustaki yaşlanmaya bağlı olarak 2025 yılında toplam 19,3 milyon yeni kanser vakası olacağı belirtilmiştir (126).

Kanser tedavisinde sıklıkla cerrahi, radyoterapi ve kemoterapiden yararlanılmaktadır. Bu tedavilerin yanısıra hormon tedavileri, biyolojik tedavi yöntemleri ve hedefe yönelik tedaviler kullanılmaktadır. Sitokinler antitumor yanıt oluşturmada kullanılan önemli bileşiklerdir. Özellikle IL-2, IL-12 ve IFN- β gibi sitokinler T hücrelerini aktive ettiği için sıklıkla kullanılmaktadır ancak yarı ömürlerinin çok az olması ve tümör bölgesine ulaşmadaki problemler dışarıdan uygulanan bu sitokinlerinin veriminin düşük olmasına neden olmuştur. Ayrıca bu sitokinlerin kandan hızlı temizlenmeleri ve hedef bölgede tutulma zamanlarının kısa olması bu ajanların sık ve yüksek miktarda verilmesine, bu da aşırı toksisiteye neden olabilmektedir.

Mevcut gen tedavisi yöntemlerinde istenilen başarıyı yakalayamamanın önemli etkenlerinden biri de gen tedavi vektörlerinin hedef bölgeye ulaştırılmasında yaşanan sorunlardır. Bu aşama kanser tedavisindeki en kritik basamaklardan biridir.

Son yıllarda yapılan araştırmalar mezenkimal kök hücrelerin kanser araştırmalarında başarılı bir şekilde taşıyıcı olarak kullanılmalrı üzerinde durmaktadır (100, 127, 128).

Mezenkimal kök hücreleri taşıyıcı olarak bu kadar çekici kılan bazı özellikleri mevcuttur. Bunlar: Kendini yenileyebilme, in vitro olarak kolay izolasyon ve çoğaltım, tümör bölgelerine göç etme ve yerleşme kabiliyetidir (129).

Gen tedavisinde bir diğer önemli nokta ise istenilen genin ifadesinin verimi ve kullanılan vektörün toksik etkilerinin olmaması ya da mümkün olduğunca az olmasıdır. Bu amaçla şimdiye kadar pek çok vektör taşıyıcı olarak denenmiştir. Viral olmayan taşıyıcıların gen ifade etkinliği istenilen verimi yakalayamadığı için araştırmacılar viral vektörlere yönelmiştir. Retrovirüsler, lentivirüsler, adenovirüsler, adeno bağlantılı virüsler (AAV) en sık kullanılan viral taşıyıcılar olmuştur. Retrovirüsler ve lentivirüsler stabil gen ifadesi sağlayıp ifade verimleri yüksek olsa da toksik etkilerinin yüksek oluşu kullanımları hakkında önemli soru işaretleri doğurmuştur. Adenovirüsler ve AAVler ise insanların çok sık karşılaştığı virus ailelerinden olduğu için tekrarlayan dozlarda kullanım etkinlikleri ile ilgili soru işaretleri vardır. Bakulovirüsler ise gerek ekspresyon verimliliği açısından gerekse biyogüvenlik açısından sağladığı avantajlar ile ilgi çekici hale gelmektedir. Literatür taraması yapıldığında ise ekspresyon vektörü olarak bakulovirüslerin, taşıyıcı olarak mezenkimal kök hücrelerin kullanıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu tez ekspresyon vektörü olarak bakulovirüslerin intihar gen tedavisinde ve taşıyıcı olarak da mezenkimal kök hücrelerin kullanıldığı öncü bir çalışmadır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Ana Bilim Dalı, Gen Tedavisi Araştırma Ünitesi Laboratuvarında yapılmıştır. Bu çalışma 111S241 nolu TÜBİTAK 1001 projesiyle desteklenmiştir.

4.1. Materyal

4.1.1. Deney Hayvanları

Fareler eşsoylu, 6-8 haftalık BALB/c, 20 tane dişi, ayrıca 5 tanesi ise frozen deneyi ve tümör oluşumunu deneme amaçlı olarak kullanılmış olan toplamda 25 fare Türkiye Halk Sağlığı Kurumundan alındı. Deney protokolü “Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hayvan Deneyleri Etik Kurulu” tarafından onaylandı ve hayvan deneyleri “Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası Hayvan Deneyleri Laboratuvarı”nda gerçekleştirildi.

4.1.2. Plazmidler, cDNA Dizileri

Bakuloviral plazmid, pfastBAC, Invitrogen firmasından (Invitrogen Carlsbad, USA, cat no: 15529-019) ticari olarak satın alındı. CD ve GMCSF cDNA dizileri kendi laboratuvarımızda daha önce yapılan deneysel çalışmalarımızdaki vektörlerden elde edildi (Dr. Hakan Akbulut). GFP cDNA dizileri pacAd5CMVGFP vektöründen (Cell biolabs, cat no:325004) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile elde edildi. CMV cDNA dizileri pshuttle CMV vektöründen (Stratagene, cat no: 240007-51) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile elde edildi.

4.1.3. Kitler

Zero Blunt PZR klonlama kiti (Invitrogen Carlsbad,USA,cat no: REF 44-0302) ve pcDNA3.1/V5-His-TOPO vektörü (Invitrogen, Carlsbad,USA, Part No: 45-0005) invitrogen firmasından ticari olarak satın alındı., Plazmid izolasyonları “QIAprep spin mini prep kit” (Qiagen, Hilden, Germany,cat no: 27106), QIAGEN plasmid midi kit (Qiagen, Hilden, Germany,cat no: 12143 ve “Invitrogen PureLink Hi-Pure Plazmid mini and midi kits” (Invitrogen, Carlsbad,USA, REF K210003, REF K210005) kullanılarak

yapıldı. Jelden ekstraksiyonlar “Qiaquick Gel Extraction Kit” (Qiagen, Hilden, Germany, cat no: 28706) ile yapıldı.

Sitotoksosite testi XTT cell proliferation assay kiti, Cell Biolabs, Inc.,cat no: 20-300-1000 kullanılarak yapıldı.

4.1.4. PZR Primer ve Probları

Tüm primerler dizayn edilerek (Pearl primer) Genoviz (İzmir, Türkiye) sentezletirildi.

Taq polimeraz (QIAGEN Taq DNA polymerase, cat no: 201203), pfu DNA polimeraz (Bioron cat no: 108105)

4.1.5. Kompetent *E.coli* Suşları

Tüm plazmidler competent *E.coli* one shot suşlarına (Invitrogen, Carlsbad, USA) transforme edildi.

4.1.6. Hücre Hatları

CRL2638 hücre hatları ATCC firmasından ticari olarak satın alındı. Sf-9 böcek hücresi hatları Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, USA) firmasından ticari olarak satın alındı. Mezenkimal kök hücreler Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Prof. Dr. Murat Elçin, laboratuvarından temin edildi.

4.1.7. Besiyerleri

Sf-9 böcek hücresi vasatı olarak %10 HI FBS (Invitrogen, Carlsbad, USA, REF 10082-139) içeren Grace’s katkılı besiyeri (Invitrogen, Carlsbad, USA, REF 11595-030) yada Sf 900 II sfm (Invitrogen, Carlsbad, USA, REF 10902-096) kullanıldı. Transfeksiyonlar Grace’s katkısız besiyerinde (Invitrogen, Carlsbad, USA) gerçekleştirildi.

Mezenkimal kök hücre hatları için %10 fetal sığır serumu (*Fetal Bovine Serum*; FBS), %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin karışımı içeren α -MEM besiyeri kullanıldı.

CRL2638 hücre hatları için %10 FBS (GIBCO, 10500) içeren glutaminli RPMI 1640 besiyeri (Biological Industries, REF 01-100-1A) kullanıldı.

Zero Blunt vektöre yapılan transformasyonların kontrolü için; E. coli FastMediaTM Kan Agar, E. coli FastMediaTM Kan TB (InvivoGen) kullanıldı.

pfastBAC1 vektörüne yapılan transformasyonların kontrolü için; E. coli FastMediaTM Amp Agar (InvivoGen, amp-zn-s), E. coli FastMediaTM Amp TB kullanıldı.

4.1.8. Diğer

Klonlama için gerekli restriksiyon endonükleaz enzimleri (Spe I, Sph I, Kpn I) ve tamponları için *NEB* (New English Biolabs, sırasıyla R0133S, R0182, R0142S), DNA ligaz enzimi (T4 DNA Ligaz) için Thermo Scientific (EL0016), IPTG kimyasalı Invitrogen (cat no: 15529-019), Cellfectin II reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA, cat no: REF 10362-100), 1 kb DNA belirteç (Axygen cat no: M-DNA-1kb), 100 bp belirteç (invitrogen cat no: 15628-019), Pierce western blotting substrate Prod #32106, PAGEr EX Gels cat no: 59702.

4.1.9. Kullanılan Cihazlar

PZR cihazı (Biorad C1000 Thermal Cycler)

Jel görüntüleme (Biorad Gel DOC XR+)

ELISA okuyucu (Medispec ESR200)

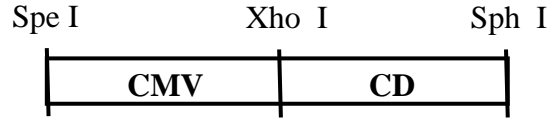
Spektrofotometre (Beckman Coulter DU 730)

Western semi dry transfer cihazı (Hoefer 80-6211-86)

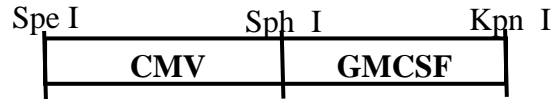
4.2. Yöntem

4.2.1. Plazmid İnşaası

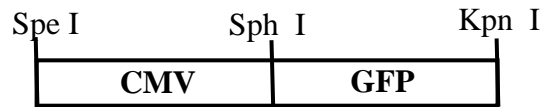
Çalışmada üç vektörün inşaası planlanmıştır.



Şekil 4.1: pfastBAC-CMV-CD vektörü enzimleri ve bölgeleri



Şekil 4.2: pfastBAC-CMV-GMCSF vektörü enzimleri ve bölgeleri



Şekil 4.3: pfastBAC-CMV-GFP vektörü enzimleri ve bölgeleri

Özetle şu aşamalar gerçekleştirilmiştir.

pcDNA-CMV vektörü inşaası	pCRBlunt-CD vektörü inşaası
pcDNA-CMV vektöründen CMV kesimi	pCRBlunt-GMCSF vektörü inşaası
pfastBAC-CMV vektörü inşaası	pCRBlunt-GFP vektörü inşaası

↓

pfastBAC-CMV-CD vektörü inşaası	← pCRBlunt vektöründen CD kesimi
pfastBAC-CMV-GMCSF vektörü inşaası	← pCRBlunt vektöründen GMCSF kesimi
pfastBAC-CMV-GFP vektörü inşaası	← pCRBlunt vektöründen GFP kesimi

Şekil 4.4: İnşa edilen vektörler ve inşa aşamaları

4.2.2. Primer Dizaynı

Tüm primerler dizayn edilerek (“PerlPrimer“ primer programı <http://perlprimer.sourceforge.net/>), danışman görüşü alındı ve Genoviz’e (İzmir, Turkey) sentezlettiirildi.

Kullanılan primerler:

CMV ileri 5' ACC ACT AGT AAC CGA GTA AGA TTT GGC

CMV geri (*) 5' TTT ATG TTT CAG GTT CAG GGG GAG

CMV ileri 5' ACC ACT AGT AAC CGA GTA AGA TTT GGC

CMV geri 5' ATT GCA TGC CTG ATT ATG ATC AGTT

CD ileri 5' CCG CTC GAG AGA CCA TGA GCA ATA ACG CTT TACA

CD geri 5' TCG GCA TGC ACG TTT GTA ATC GAT GGC TTCT

GMCSF ileri 5' TGC ATG CGT CGA CAT GTG GCT GCA GAA TTT ACT TTTC

GMCSF geri 5' CGG AGG TAC CTC ATT TTT GGC CTG GTT TTT TG

GFP ileri 5' ACG CGC ATG CGT AGA CAC ACC ATG GTG AGC AAG G

GFP geri 5' CGG AGG TAC CTC GGT CAT GGT GGC CTT GTA CAG

4.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

CD ve GMCSF cDNA dizileri önceki çalışmalarımızda inşa ettiğimiz vektörden PZR ile elde edildi. *E.coli* sitozin deaminaz (CD) geni ve fare GM-CSF geni cDNA dizileri olarak kullanıldı.

CD için kullanılan PZR reaksiyonu ve şartları:

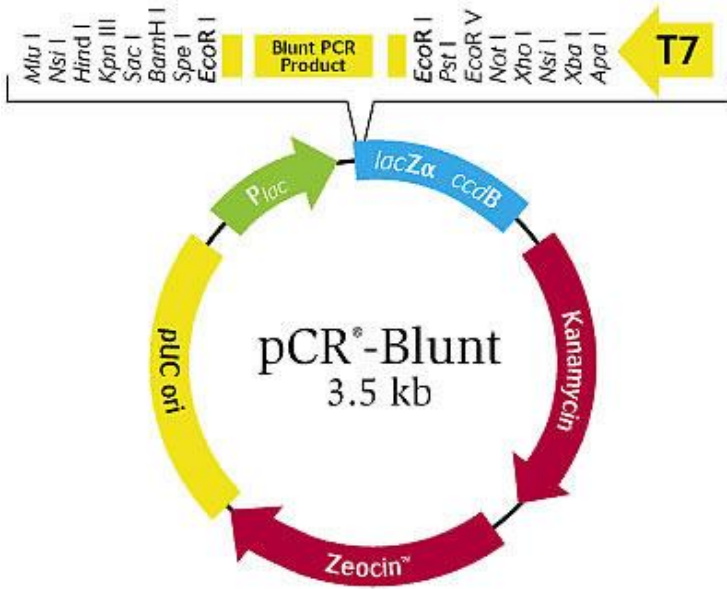
Taq polimeraz:	0,25 µl	95 °C 3 dk	} X30
10X Buffer:	5 µl	95 °C 45 sn	
dH ₂ O:	42,25 µl	57 °C 45 sn	
dNTP:	1	72 °C 1 dk 15 sn	
ileri (forward) primer:	0,5 µl	72 °C 5 dk	
geri (reverse) primer:	0,5 µl	4 °C ∞	
Kalıp DNA:	0,5 µl		

GFP ve GMCSF için kullanılan PZR reaksiyonu ve şartları:

Taq polimeraz:	0,25 µl	95 °C 3 dk	} X30
10X Buffer:	5 µl	95 °C 30 sn	
dH ₂ O:	42,25 µl	55 °C 30 sn	
dNTP:	1	72 °C 1 dk	
ileri (forward) primer:	0,5 µl	72 °C 5 dk	
geri (reverse) primer:	0,5 µl	4 °C ∞	
Kalıp DNA:	0,5 µl		

4.2.4. Genlerin pCR-Blunt Vektöre Klonlanması

Öncelikle, genler (CD, GMCSF, GFP, CMV) PCRBlunt vektörüne klonlandı. Daha sonra, bu vektörden kesilerek pfastBAC vektörüne klonlandı.



Şekil 4.5. pCR-Blunt vektörü

1. PZR ürünlerinin (4.2.3'deki) küt uçlu hale getirilmesi

PZR ürünü	: 7 µgr (10 µl)
T4 DNA polimeraz	: 6U (2 µl)
dNTP	: 1 µl
Buffer2 (NEB)	: 3 µl
dH ₂ O	: 14 µl

12 °C 15 dk inkübasyona bırakıldı.

Reaksiyon durdurulmak için son hacimdeki konsantrasyon 10 mM olacak şekilde EDTA eklendi.

72 °C 20 dk bloklandı.

1. pCR-Blunt vektöre ligasyon

Vektöre ne kadar ligasyon yapılması gerektiği kullanma kılavuzunda verilen formüle göre hesaplandı:

$$X \text{ ng insert: } \frac{10 \times (y \text{ bp PCR ürünü}) \times (25 \text{ ng linear PCR Blunt})}{3500 \text{ bp PCR Blunt}}$$

$$\text{CD geni için: } \frac{10 \times 1300 \times 25}{3500}$$

:92,85 ng CD

Ligasyon reaksiyonu ve şartları (CD geni için örnek verilmiştir)

pCR Blunt vektörü	: 1 µl
Küt uçlu PCR ürünü	: 7 µl (0,5 µg)
10X Ligasyon tampon (ATPlı)	: 1 µl
T4 DNA ligaz (3U/ µl)	: 1 µl

Reaksiyon koşulları:

16 °C 2 saat, 4 °C ∞

Kompetent E.coli hücrelerine ligasyon ürününden 2 µl transformasyon* yapıldı.

Kanamisinli plaklara ekildi.

* Transformasyon

- Ligasyon ürününden 2 µl, kompetan bakterinin üzerine eklendi.
- Buzda 30 dakika bekletildikten sonra 42°C su banyosunda 45 saniye bekletildi ve sonrasında 2 dk buz içine konuldu.
- Bu işlem sonrası üzerine 250 µl SOC medium eklenerek 225 rpm çalkalama hızında 37°C 1,5 saat inkübe edildi.

16-18 saatlik inkübasyondan sonra üreyen kolonilerden seçim yapılarak, her biri 5 ml kanamisinli TB'ye ekilerek çoğaltıldı. Çoğalan plazmidler "QIAGEN-Plazmid Purification mini kit" ile saflaştırıldı.

Mini Prep Kitle Plazmid Saflaştırma (Qiagen)

- 15 ml lik falkon tüplerde üretilen ve pCRBlunt-CD, PCRBlunt-GMCSF ve PCRBlunt-GFP plazmidlerini içeren bakteriler 5000 rpm de 10 dak. santrifüj edildi.
- Pelet üzerine 250 µl RNase içeren Buffer P1 eklenerek pipetaj yapıldı.
- 250µl P2 tamponu (Lizis tamponu) eklenerek ve tüp 6 defa alt üst edildi.
- 350µl N3 tamponu (Nötralize edici tampon) eklenip tüp 6 defa alt üst edildi.
- 13000 rpm'de 10 dak. santrifüj edilen supernatant filtreli ependorflara aktarıldı.
- 13000 rpm'de 1 dak. santrifüj edildikten sonra su yada TE tampon ile filtrede kalan DNA saflaştırıldı.

Agaroz jel

Saflaştırılan DNAlar restriksiyon enzimleriyle kesilerek %1 lik agaroz jelde doğrulandı.

Agaroz III (Amresco, X174)

Tris-Borik asit-EDTA tamponu (5X TBE): 54 gr Trizma base (Sigma, T-6066)

27,5 gr Borik asit

20 ml 0,5 M EDTA (Amresco, 0105)

5X TBE 1X'e seyreltilerek kullanılır.

Yükleme tamponu: 10X loading dye invitrogen

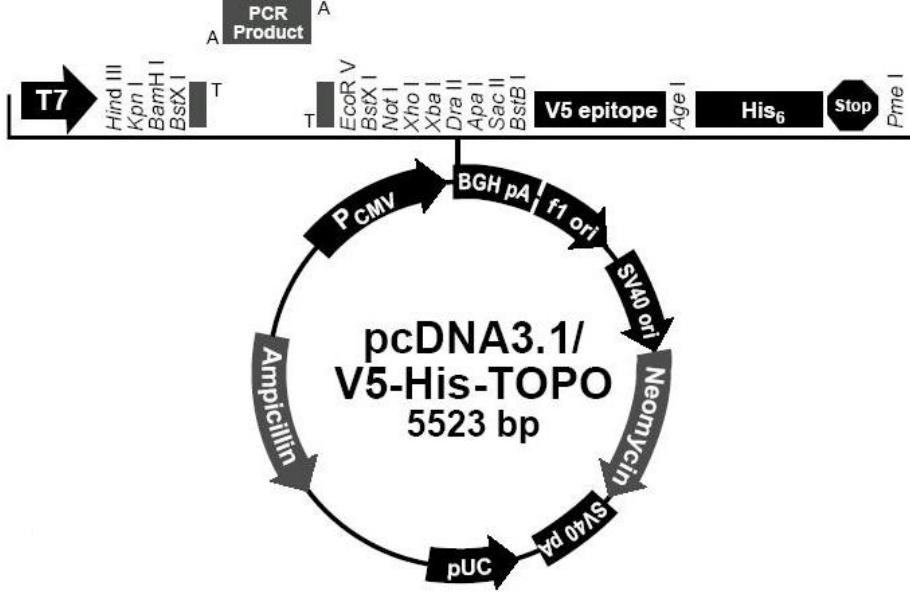
Distile su

Etidyum bromür (Serva, 21238), 10mg/ml distile su

4.2.5. CMV Promotorunun pcDNA Vektörüne Klonlanması

Laboratuvarımızda daha önce satın aldığımız pcDNA vektörü kullanılarak CMV promotorunun bu vektöre klonlanması yapılmıştır.

Önemli Not: pCR-Blunt vektörüne CMV genini klonlamada yaşadığımız sıkıntı nedeni ile herhangi başka bir vektörde de aynı sıkıntının yaşanıp yaşanmayacağını görmek ve klonlama aşamasını geçebilmek için Spe I-Sph I restriksiyon uçlarını barındıran CMV genimiz laboratuvarımızda mevcut olan pcDNA 3.1.V5-His-TOPO vektörüne klonlanmıştır. pcDNA vektörü zaten CMV promotörü taşımaktadır. Bu vektördeki mevcut gen kesilip alınmamış, Spe I-Sph I restriksiyon uçlarını barındıran CMV genimiz buraya takılıp çoğaltılarak bu vektörden alınmıştır.



Şekil 4.6. pcDNA3.1/V5-His-TOPO vektörü

4.2.6. CMV Promotorunun PZR ile Çoğaltılması

CMV için kullanılan PZR reaksiyonu ve şartları:

Taq polimeraz:	0,3 µl	94 °C 3 dk	} X30
10X Buffer:	5 µl	94 °C 45 sn	
dH ₂ O:	42,45 µl	55 °C 40 sn	
dNTP:	1	72 °C 1 dk	
ileri (forward) primer:	0,5 µl	72 °C 20 dk	
geri (reverse) primer:	0,5 µl	4 °C ∞	
Kalıp DNA:	0,5 µl		

4.2.7. PZR ile Çoğaltılan CMV Promotorunun Agaroz Jele Yüklenerek Sonrasında Jelden Saflaştırılması

Jelden DNA saflaştırılması (Qiagen protokolü)

- Jelden kesilen bandın ağırlığı ölçüldü.
- 100 mg jele 300 µl olacak şekilde QG (çözme tamponu) tamponu eklendi.

- 50°C’de yaklaşık 10 dk (jel tamamen çözünene kadar) inkübe edildi. Her 2-3 dk ‘da bir vortekslendi.
- Jel tamamen çözününce sıvı kolona aktarıldı.
- 10000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
- 500 µl QG tamponu eklendi.
- 10000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
- 750 µl PE tamponu (yıkama tamponu) eklendi.
- 2-5 dak. oda ısısında inkübe edildikten sonra 10000 rpm’de 1 dak santrifüj edildi.
- 13000 rpm’de 1 dak boş santrifüj edildi.
- Kolon temiz bir ependorfa aktarılarak 25 µl steril distile su eklenir. 1 dk. oda ısısında bekledikten sonra 13000 rpm’de 1 dak santrifüj edilerek elüsyon tamamlandı.

4.2.8. CMV Promotoru ile pcDNA Vektörünün Ligasyonu

Ligasyon reaksiyonu ve şartları

pcDNA vektörü	: 1 µl
CMV PCR ürünü	: 4 µl (260 ng)
Tuz solüsyonu	: 1 µl

Reaksiyon koşulları:

22 °C’de 6 dk

Ligasyon ürünü “*One Shot Kompetent E.coli*” hücrelerine transforme* edildi ve ampisilinli plaklara ekildi. Ertesi gün plaklarda üreyen koloniler ampisilinli sıvı besiyerine alındı. Safılaştırma protokolü uygulanarak ligasyonun kontrolü amacı ile restriksiyon endonükleazlar ile kesime tabi tutuldu.

4.2.9. CMV Promotorunun pfastBAC Vektörü ile Ligasyonu

Bu amaçla CMV promotoru pcDNA vektöründen kesildi. pfastBAC vektörü de yine aynı restriksiyon enzimleriyle kesilerek ligasyon işlemi yapıldı.

Kesim reaksiyonu ve şartları

pcDNA-CMV	: 31,2 µl
Buffer 3 (NEB)	: 3,8 µl
BSA	: 0,38 µl
Bam HI	: 1,2 µl
Not I	: 1,2 µl

37 °C'de 2,5 saat inkübasyon

Kesim reaksiyonu jelde yürütülerek sonrasında jelden saflaştırma yapıldı (bakınız 4.2.7 bölümü protokol).

Kesim ürünü ikinci kesimlere tabi tutuldu.

<u>Kesim reaksiyonu ve şartları</u>	<u>Kesim reaksiyonu ve şartları</u>
CMV Bam HI/ Not I kesimi: 34 µl	CMV Bam HI/ Not I kesimi : 32 µl
Buffer 2 : 4,2 µl	Buffer 2 : 3,9 µl
BSA : 0,42 µl	BSA : 0,39 µl
Spe I : 1,6 µl	Spe I : 1,35 µl
Xho I : 1,6 µl	Sph I : 1,35 µl

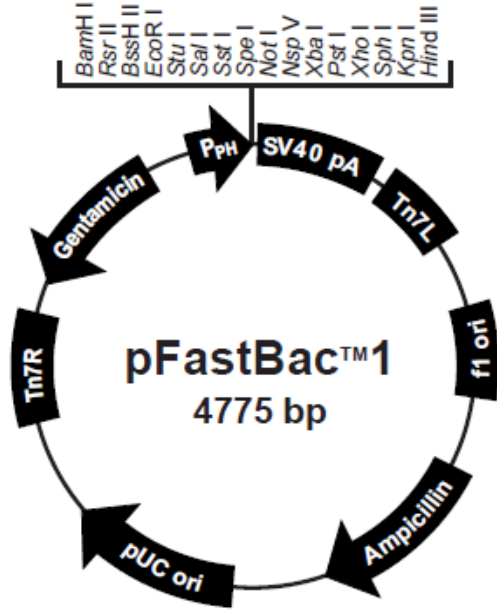
4.2.10. Genlerin pfastBAC-CMV Vektöre Klonlanması

İlgili genler (CD, GFP, GMCSF) pCRBlunt vektörden kesilerek pfastBAC vektörüne ligasyon yapıldı. Bu amaçla;

İlk aşamada genler pCRBlunt vektörden uygun restriksiyon endonükleazlar ile kesildi,

pfastBAC vektörü ilgili genin kesildiği restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildi,

Gen ve vektörün (backbone) ligasyonu sağlandı.



Şekil 4.7: pFastBac1 vektörü

4.2.11. pCRBlunt Vektörden Uygun Restriksiyon Endonükleazlar ile Genlerin Kesilmesi

Kesim reaksiyonu ve şartları (CD geni için örnek verilmiştir)

pCRBlunt-CD vektörü (backbone): 1 µl

Buffer 2 (NEB) : 1,5 µl

BSA : 0,15 µl

dH₂O : 11,35 µl

Xho I : 0,4 µl

Sph I : 0,6 µl

37 °C etüvde 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası %1'lik agaroz jelde yürütülerek CD bandı jelden kesildi.

4.2.12. pfastBAC-CMV Vektörünün İlgili Genin Kesildiği Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile Kesilmesi

Kesim reaksiyonu ve şartları

pfastBAC-CMV (backbone)	: 2 µl (midi prep; 1800 ng)
Buffer 2 (NEB)	: 3 µl
BSA	: 0,3 µl
dH ₂ O	: 23,2 µl
Xho I	: 0,5 µl
Sph I	: 0,8 µl

Kesim reaksiyonu 37 °C etüvde overnight bırakıldı.

4.2.13. pfastBAC-CMV Vektörüne İlgili Genlerin Ligasyonu

Ligasyon reaksiyonu ve şartları: (GM-CSF için örnek verilmiştir)

pfastBAC-CMV vektörü	: 2 µl (64 ng)
pCRBlunt vektöründen kesilen GM-CSF	: 1,5 µl (22 ng)
T4 DNA ligaz	: 1 µl
Tampon	: 1 µl
dH ₂ O	: 4,5 µl

Reaksiyon koşulları:

Oda ısısı, 13 dk

Ligasyon ürünü “*One Shot Kompetent E.coli*” hücrelerine transforme* edildi (3 µl) ve ampisilinli plaklara ekildi.

Ertesi gün plaklarda üreyen koloniler ampisilinli sıvı besiyerine alındı. Saflaştırma protokolü uygulanarak ligasyonun kontrolü amacı ile restriksiyon endonükleazlar ile kesime tabi tutuldu (bakınız 5.3).

4.2.14. Dizi Analizi ve Genom Veritabanından (BLAST) Dizinin Karşılaştırılması

Bir diğ er ve kesin do ğ r u l a m a v e k t ö r ü n d i z i l e m e y e g ö n d e r i l e r e k g e n l e r i n B L A S T v e r i t a b a n ı n d a n d i z i l e r i n i n k a r ş ı l a ş t ı r ı l m a s ı i l e y a p ı l d ı .

4.2.15. Rekombinant Bacmid DNA Eldesi

Rekombinant plazmidler, pfastBAC-CMV-CD, pfastBAC-CMV-GFP ve pfastBAC-CMV-GMCSF daha sonra mekik vektör barındıran MAX Efficiency DH10BAC hücrelere transforme edildi ve Bac-to-Bac Baculovirus Expression Sistem Protokolü (Invitrogen, Carlsbad, USA) do ğ r u l t u s u n d a e k i m l e r i y a p ı l d ı . E l d e e d i l e n k o l o n i l e r d e n s a f l a ş t ı r ı l a n R e k o m b i n a n t b a c m i d D N A a ş a ğ ı d a k i p r i m e r l e r k u l l a n ı l a r a k P Z R i l e k o n t r o l e d i l d i v e d o ğ r u l u ğ u t e y i d e d i l e n R e k o m b i n a n t b a c m i d D N A ç o ğ a l t ı l d ı . R e k o m b i n a n t b a c m i d D N A d o ğ r u l u ğ u i ç i n k u l l a n ı l a n p r i m e r l e r a ş a ğ ı d a v e r i l m i ş t i r .

Rekombinant bacmid ileri primer: 5' CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3',
Rekombinant bacmid geri primer: 5' AGCGGATAACAATTTACACAGG 3'

Rekombinant bacmid için kullanılan PZR reaksiyonu ve şartları:

Taq Polimeraz		95 °C 5 dk	
(Qiagen Hot Star High Fidelity):	2 µl		
5X Buffer:	10 µl	94 °C 15 sn	} 2X45
Q solüsyonu:	10 µl	55 °C 1 dk	
ileri (forward) primer:	1,25 µl	68 °C 7,5 dk	
geri (reverse) primer:	1,25 µl	72 °C 10 dk	
Kalıp DNA:	40 ng	4 °C ∞	

4.2.16. Western Blotlama

CD ve GM-CSF proteinlerinin varlığı sf-9 hücrelerinden hücre içi ve hücre dışı kompartmanlardan Abcam western blotlama protokolüne uygun olarak bakıldı. Protokol ve kullanılan antikorlar a ş a ğ ı d a v e r i l m i ş t i r :

4.2.16.1. Hücre Kültüründen Lizat Hazırlama

Hücre kültürü kabı buzda tutularak hücreler soğuk PBS ile yıkandı. Bu PBS çekilip uzaklaştırıldı ve 5×10^6 hücreye 0,5 ml PBS olacak şekilde ikinci PBS koyulup böcek hücrelerine tripsin ile ayırım etki etmediğinden hücreler steril drigalski spatula ile kazındı. Kültür kabından ayrılan hücreler steril ependorflara alınarak 30 dakika 4°C 'de çalkalandı. Ardından 4°C , 12000 rpm, 20 dakika santrifüj edildi. İncelenmek üzere supernatant ayrı bir ependorfa alındı. Böylece elimizde hem süpernatandan analiz için hem de pelletten için örnek elde edilmiş oldu.

Elde edilen örneklerdeki protein konsantrasyonlarını belirlemek için Bradford analizi yapıldı.

4.2.16.2. Bradford Analizi

Bradford analizi protein konsantrasyonunu tayin etmede hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Bu analiz için Sığır Serum Albumin (BSA), su ve Bradford ayırıcı kullanıldı. Standartlar hazırlanarak örneğimizdeki protein konsantrasyonunun hesaplanması yapıldı. Standart ve örnekler üçlü (triplicate) çalışılarak OD590 nm'de okuma yapıldı.

4.2.16.3. Örneklerin Jele Yüklenmek Üzere Hazırlanması

4.2.16.3.1. Denatüre, İndirgenmiş Örnekler

İleri analizler için örnekler denature edildi. Bu amaçla 2X Laemmli tamponunda örnekler 1:1 oranında karıştırıldı ve 95°C 'de 5 dk bekletildi.

4.2.16.3.2. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Jelin Yürütülmesi

Bu amaçla yürütme tamponu hazırlanarak örnekler jele (PAGEr EX gels cat no: 59702) yüklenmiştir.

Yürütme tamponu (1lt)

25 mM Tris Base (Ambresco Lot 0574B95)

190 mM glisin (Ambresco Lot 0994B61)

% 0.1 SDS (Merck S3868334 323)

pH 8.3

4.2.16.4. Proteinlerin Membrane Transferi, Membran Bloklama ve Antikorlar ile Muamele

Proteinlerin membrane transferi yarı-kuru koşullar altında, yarı-kuru transfer cihazının üretici firmasının önerdiği şekilde (Hoever 80-6211-86) yapıldı.

Yarı-kuru transfer tamponu (1 lt):

5,8 gr Tris

2,9 gr Glisin

200 ml metanol

Transfer sonrası membran bloklama süt tozu ile gerçekleştirildi (TBST içinde %5 süt tozu, 2 saat oda ısısında, 80.rpm çalkalama sonrası 4°C overnight bırakıldı. Ertesi gün primer ve sekonder antikorlar ile muamele edildi.

CD primer antikor (Thermo Scientific Pierce Cytosine Deaminase PA1-85365)

CD sekonder antikor (Thermo Scientific Prod#31480 Pierce Antibody)

GMCSF primer antikor (eBioscience MP1- Cyto22E9)

GMCSF sekonder antikor (Cell signaling Anti-rat IgG)

4.2.17. Rekombinant Bakulovirüsün Hazırlanması ve Çoğaltılması

Sf-9 hücreleri ($1,6 \times 10^6$ hücre/4 ml) 25 cm² hücre kültürü flaskına Grace's katkısız besiyeri kullanılarak ekildi ve tutunmaları için 30 dakika biyogüvenlik kabininde, oda ısısında bekletildi. Tutunmanın mikroskop ile doğrulanmasını takiben transfeksiyon prosedürü üreticinin (Invitrogen,USA, BAC to BAC Baculovirus expression system,transfection procedure) talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. pfCMV-CD, pfCMV-GMCSF ve pfCMV-GFP bacmidlerin transfeksiyonları aynı gün ve aynı koşullarda gerçekleştirildi. Hücreler 5 saat inkübe edilerek bu sürenin sonunda mevcut vasat %10 HI FBS içeren 4 ml Grace's katkılı böcek vasatı ile değiştirildi. Hücreler üretici protokolünde de belirtilen viral enfeksiyon belirtilerini gösterene kadar inkübe edildi. Viral enfeksiyon belirtileri görüldüğünde besiyeri 15 ml toplama tübüne alınarak 500g 'de 5

dakika santrifüj edildi. Bakulovirüsün P1 stoğu olan bu süpernatant 2 ml dondurma tüplerine alınarak fraksiyonlara ayrıldı ve 4 °C’de ışıktan korunarak saklandı.

4.2.18. Bakuloviral Stoğun Üretimi

P1 bakuloviral stok kullanılarak yüksek miktarda rekombinant bakulovirüs elde edildi. Bunun için Sf-9 hücreleri (4x10⁶ hücre/4 ml) katkılı Grace’s besiyeri kullanılarak 25 cm² hücre kültürü flaskine ekildi. Biyogüvenlik kabininde, oda ısısında, yarım saat tutunmaları için beklendi. Tutunmanın mikroskop ile doğrulanması sonrası P1 viral stoktan ne kadar alınarak transfeksiyon yapılması gerektiği üreticinin aşağıda verilen formül ile hesaplanarak hücrelere eklendi. Hücreler viral enfeksiyon gözlemlenene kadar inkübe edildi. Viral enfeksiyon gözlemlendiği zaman 15 ml toplama tübüne alınarak 500g ‘de 5 dakika santrifüj edildi. Bakulovirüsün P2 stoğu olan bu süpernatant 2 ml dondurma tüplerine alınarak fraksiyonlara ayrıldı ve 4 °C’de ışıktan korunarak saklandı. Gerekli olan viral titrasyona ulaşana kadar P3,P4 vb. Stoklar aynı prosedür doğrultusunda hazırlandı.

$$\text{Transfeksiyon için gereken miktar (ml)} = \frac{\text{MOI (pfu/hücre)} \times \text{hücre sayısı}}{\text{Viral stok titrasyonu (pfu/ml)}}$$

MOI = Enfeksiyon için kullanılan virüs pfu / hücre sayısı

4.2.19. Bakulovirüs Titrasyonunun Belirlenmesi

4.2.19.1. Viral Plak Deneyi

Viral plak deneyi virüs titrasyonunun altın standardı olarak kabul edildiği için viral plak deneyi yapıldı. Protokol için Abcam ® (Abcam, Cambridge,USA) protokolü önceki deneyimlerimizle bazı modifikasyon yapılarak kullanıldı. Protokol aşağıda verildiği şekildedir:

Sf-9 hücreleri %10 FBSli Grace’s katkılı böcek besiyeri kullanılarak 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Hücre doluluğu %90-100 olana kadar 24 saat boyunca 27 °C’de inkübasyona bırakıldı. Doluluk doğrulandığında serumlu vasat çekildi ve hücreler PBS ile iki kez yıkandı. Viral dilüsyonlar (10⁻²,10⁻⁴,10⁻⁶,10⁻⁸, 10⁻¹⁰) ikili çalışılacak şekilde her kuyuya 500 µl koyuldu ve 27 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. %10 FBSli Grace’s

katkılı böcek besiyeri içeren %3 düşük erime ısıly agaroz karışımı hazırlanarak ılık, donmamış karışımından 2 ml alınarak her kuyuya eklendi. Plaklar 4 gün boyunca 27 °C'de inkübe edildi. Bu süreç sonrası hazırlanan %3,65 lik formaldehitten 2 ml alınarak kuyulara koyulur ve 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Formaldehit ile eriyen agar uzaklaştırıldı ve son olarak %0,5 lik Kristal viyole plaklara eklenerek 5 dk oda ısısında inkübe edilerek koloni sayımı gerçekleştirildi. Viral titrasyon aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$\text{pfu/ml} = \text{plak sayısı} \times 10 \times \text{sulandırma faktörü}$$

4.2.20. Sitotoksisite Deneyi

Sitozin deaminaz/5-FC sisteminin invitro etkinliğini değerlendirmek için sitotoksisite deneyi yapıldı. Sitotoksisitenin ölçülmesi amacıyla en sık kullanılan yöntemlerden biri olan XTT testi kullanıldı. XTT çalışma prensibi MTT ile aynı şekildedir. XTT, MTT gibi hücre canlılığını değerlendirmek için kullanılan kolorimetrik bir deneydir. İndirgenme reaksiyonu sonucunda renksiz yada açık sarı olan XTT turuncu renge dönüşmektedir.

XTT deneyi için Biological industries markası kullanıldı ve deney firmanın kullanım talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi.

Viral plak deneyi ile bulunan viral titrasyona göre (3×10^6 pfu/ml) viral dilüsyonlar gerçekleştirildi.

*Deneyimizde 100 MOİ virus vererek dilüsyonları buna göre hesaplandı ve 100, 50, 20, 10 ve 1 MOI dozlarında kuyucuklara virus eklendi.

Ertesi gün virus verilen hücrelere 5-FC verildi (500 µM/kuyu).

72 saat inkübasyonu takiben 5-FC verilen hücrelere XTT ajanı eklendi. 2,5 saat sonra okuma yapıldı.

4.2.21. Bakulovirüsün Mezenkimal Kök Hücreye Yüklenmesi

MKH'ler 75 cm² yüzey alanları hücre kültürü flasklarına 5×10^6 hücre olacak şekilde ekildi. 500 µl virus (0,3 MOİ) ile transfekte edildi.

1 saat karıştırıcıda hafifçe sallandı.

37 °C'ye overnight inkübasyona bırakıldı.

4.2.22. MKH'in Transfeksiyon Veriminin Akım Sitometri ile Belirlenmesi

MKH deki bakuloviral virus transfeksiyon verimini değerlendirmek amacıyla GFP geni taşıyan vektör kullanıldı. GFP içeren virus ile transfeksiyonu izleyen 72. saatte hücreler % 0,25 tripsin ile yüzeyden kaldırılarak 500xg'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelleti PBS'te yeniden süspansiyon haline getirildi. Floresan mikroskopta değerlendirme için preparat hazırlandı ve ayrıca transfeksiyon oranı akım sitometri ile hesaplandı.

4.2.23. Frozen Tekniği ile Transfeksiyonun Belirlenmesi

Dondurulmuş dokudan mikrotomla kesilen örneğin hemen mikroskopta incelenmesine dayanan bir yöntemdir. Farelerin kuyruk veninden GFP eksprese eden bakuloviral vektörler verilmiştir. Ayrıca direkt tümör dokularına verilmişler ve floresan mikroskopta bu kesitler incelenmiştir.

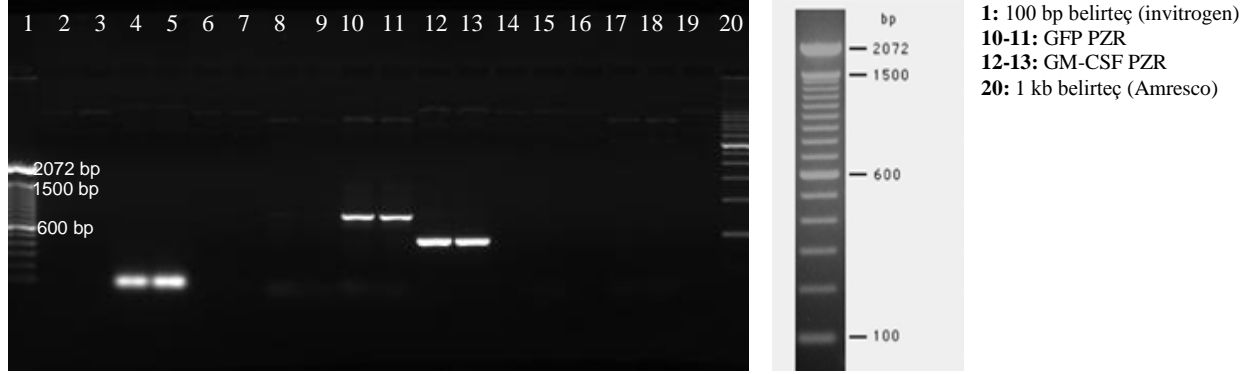
4.2.23. Farelerde Tümör Oluşturma

6-8 haftalık BALB/c farelere (her grupta 5 adet, 4 grup fare) 5×10^5 CRL2638 hücresi subkutan olarak enjekte edildi. Fareler tümörleri 1500 mm³ hacime ulaştınca sakrifiye edildi. Bacmid pFCMV-GFP ile yüklü MKH'lerin organlara olan göçünün izlenmesi için akciğer, karaciğer ve dalak alınarak frozen preparatlar yapıldı ve floresan mikroskopta incelendi.

Tümör takibi ise şu şekilde yapıldı: Tümör boyutları her gün tümörmetre ile ölçüldü ve tümör hacimleri modifiye elipsoid formülü ile $\frac{1}{2}$ (uzunluk x genişlik²) hesaplandı. Tümör hacmi yaklaşık 50 mm³ e ulaştığında MKH yüklü bakuloviral vektörler subkutan olarak tümöre komşu bölgeye enjekte edildi. Takip eden üç gün CD vektörünü içeren gruba 5-FC (5-fluorositozin) verildi ve tümörler 1500 mm³ oluncaya kadar takip edildi.

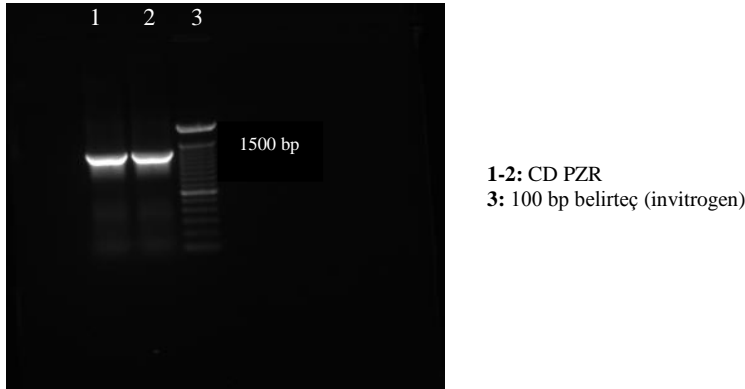
5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. Genlerin PZR ile Çoğaltılarak Agaroz Jelde Görüntülenmesi



Şekil 5.1.1. GFP ve GM-CSF PZR

GFP geni pacAd5CMVGFP ve GM-CSF geni ise daha önce laboratuvarımızda inşa edilmiş olan pAdCMVGM-CSF vektöründen bölüm 4.2.2'de belirtilen primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. GFP (10 ve 11. sıra) yaklaşık 600bp ve GM-CSF (12 ve 13. sıra) ise 450bp büyüklüğünde bantlar izlendi (Şekil 5.1.1).



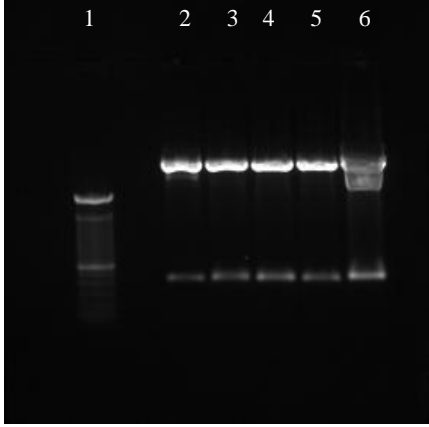
Şekil 5.1.2. CD PZR

Sitozin deaminaz geni de yine laboratuvarımızda daha önce inşa edilmiş olan pShuttleCMVCD plazmidinden bölüm 4.2.2'de belirtilen primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Yaklaşık 1200 bp büyüklüğünde bir bant izlendi (Şekil 5.1.2, 1. ve 2. sıra)

5.2. PCR Blunt Vektörüne Klonlamanın Doğrulaması

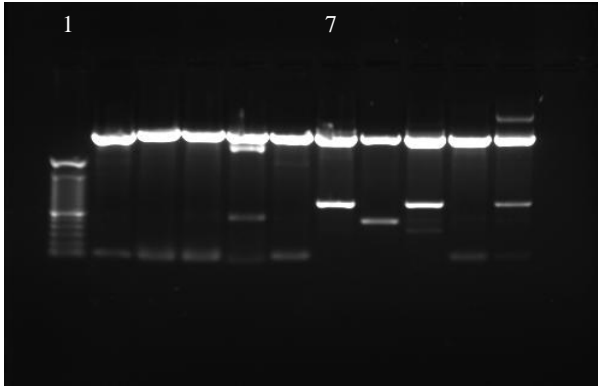
Bir önceki bölümde çoğaltılan CD, GFP ve GM-CSF genleri pCRBlunt plazmidlerine klonlandı. Daha sonra her üç plazmid (pCR-GMCSF, pCR-GFP ve pCR-CD) EcoRI enzimi ile kesilerek doğrulama işlemi yapıldı. Kesim sonucunda pCR-GMCSF için yaklaşık 450 bp (Şekil 5.2.1, 2-6. sıra), pCR-GFP için yaklaşık 600 bp (Şekil 5.2.2, 7. ve 9.

sıra) ve pCR-CD için ise yaklaşık 1200 bp (Şekil 5.2.3, 2. sıra) büyüklüğünde bant elde edilen koloniler doğru ligasyon olarak belirlendi ve sonraki aşamalar için bu koloniler çoğaltılarak plazmid saflaştırılması yapıldı.



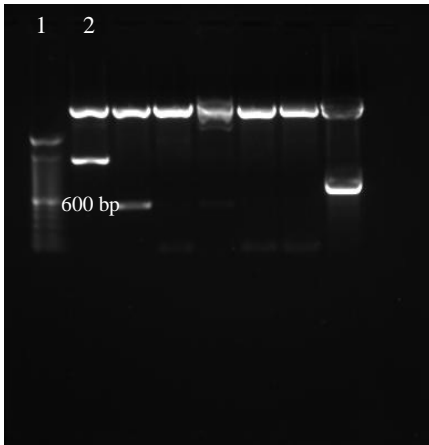
1: 100 bp belirteç (invitrogen)
2-6: pCRBlunt-GMCSF ligasyonunun EcoR I enzimi ile kesilerek doğrulanması

Şekil 5.2.1. pCRBlunt-GMCSF ligasyonunun EcoR I enzimi ile kesilerek doğrulanması



1: 100 bp belirteç (invitrogen)
7: pCRBlunt-GFP ligasyonunun EcoR I enzimi ile kesilerek doğrulanması

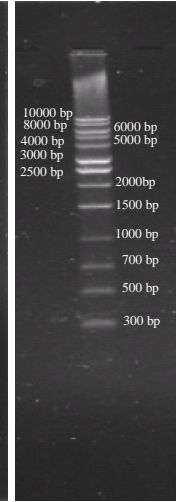
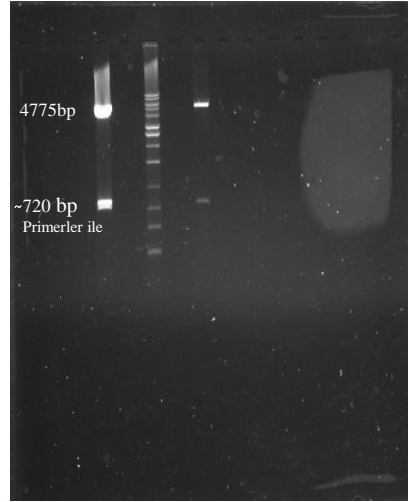
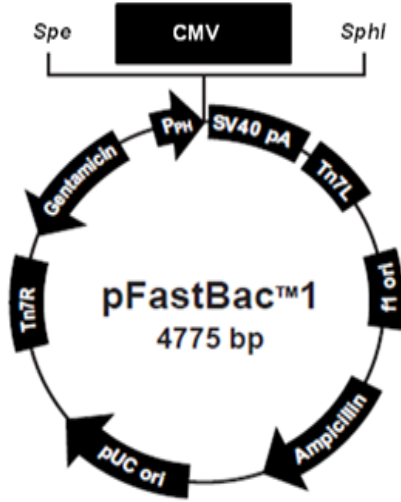
Şekil 5.2.2. pCRBlunt-GFP ligasyonunun EcoR I enzimi ile kesilerek doğrulanması



1: 100 bp belirteç (NEB)
2: pCRBlunt-CD ligasyonunun EcoR I enzimi ile kesilerek doğrulanması

Şekil 5.2.3. pCRBlunt-CD ligasyonunun EcoR I enzimi ile kesilerek doğrulanması

5.3. pFastBAC1 Vektörüne Klonlamanın Doğrulanması

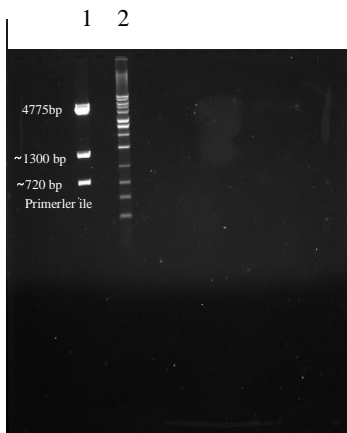
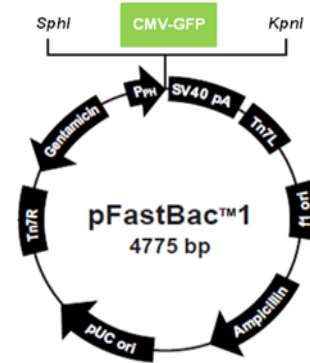
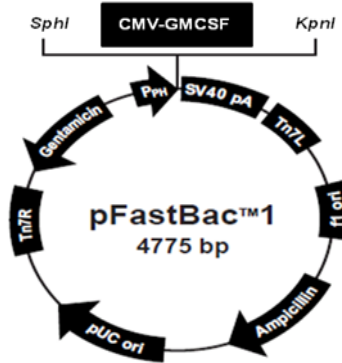
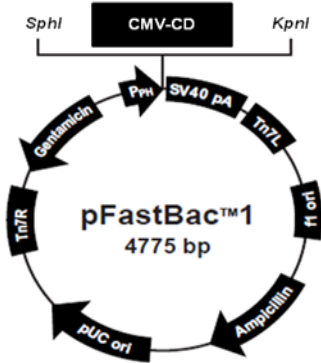


Şekil 5.3.1. pfastBAC-CD ligasyonunun EcoR I enzimi ile kesilerek doğrulanması

Şekil 5.3.2. Axygen 1 kb

Jel görüntüsü

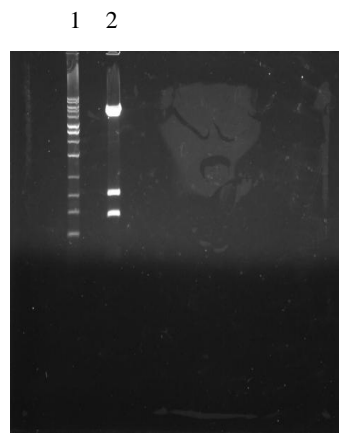
- 1- 4775 bp ana vektör, ~720 bp CMV geni (10 µl yükleme, mikro kuyucuk)
- 2- Marker (1 kb Axygen)
- 3- 4775 bp ana vektör, ~720 bp CMV geni (5 µl yükleme, mikro kuyucuk)



Şekil 5.3.3. CD ve CMV geni ligasyon doğrulama, %1 lik agaroz jel

Jel görüntüsü

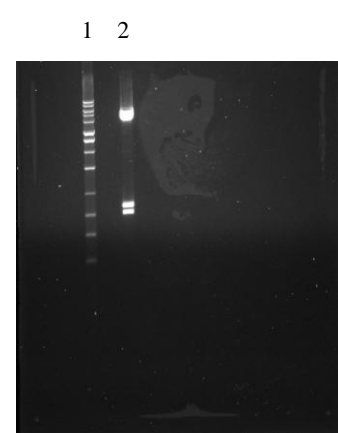
1. 4775 bp ana vektör, ~1300 bp CD geni, ~720 bp CMV geni (5 µl yükleme, mikro kuyucuk)
2. Marker (1 kb Axygen)



Şekil 5.3.4. GM-CSF geni ligasyon doğrulama, %1 lik agaroz jel

Jel görüntüsü

1. Marker (1 kb Axygen)
2. 4775 bp ana vektör, ~423 bp GM-CSF geni, ~720 bp CMV geni (5 µl yükleme, mikro kuyucuk)



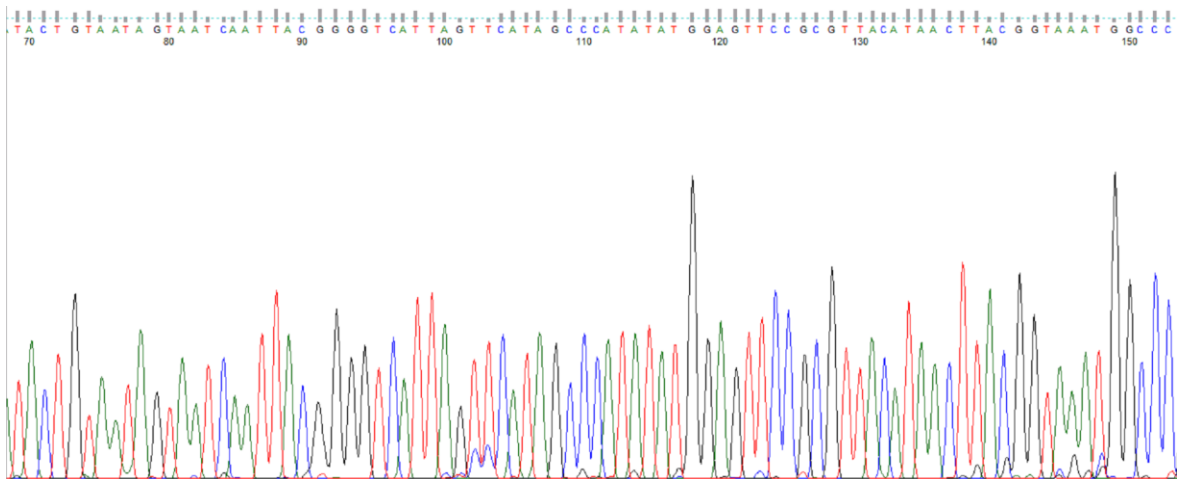
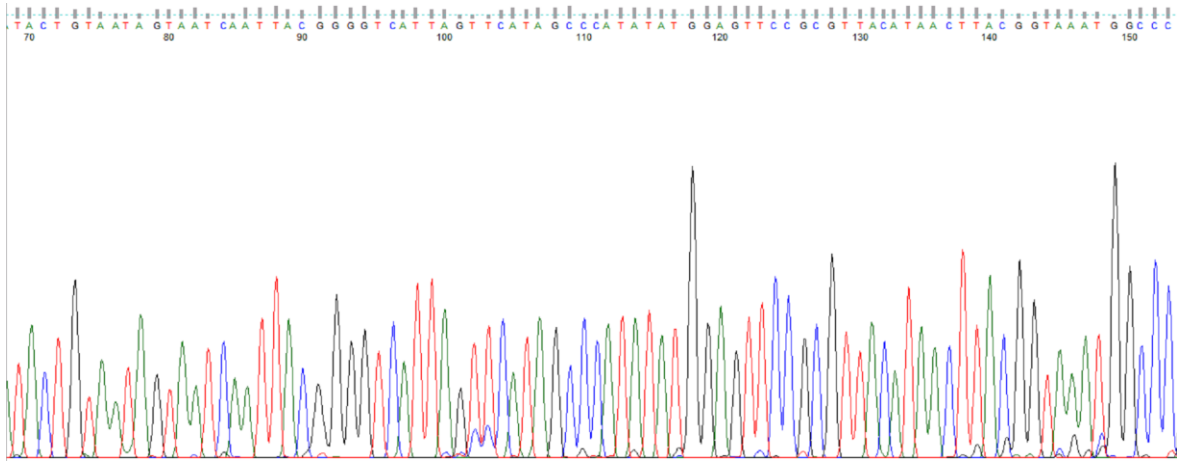
Şekil 5.3.5. GFP geni ligasyon doğrulama, %1 lik agaroz jel

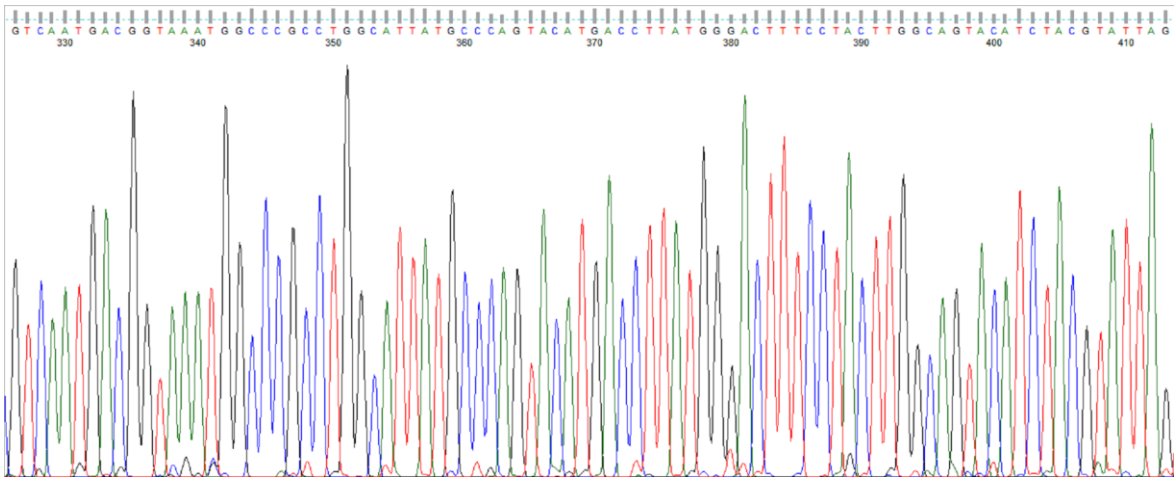
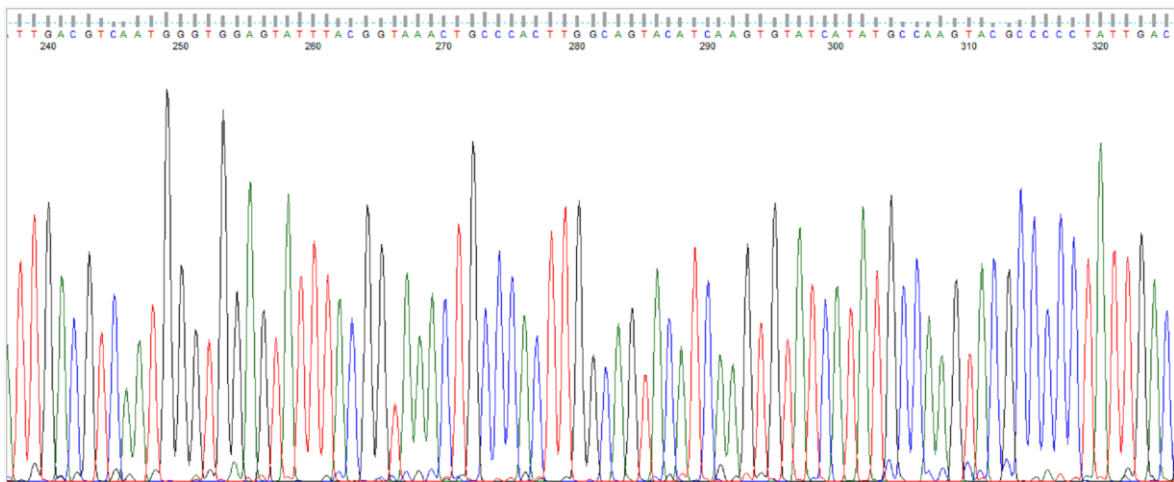
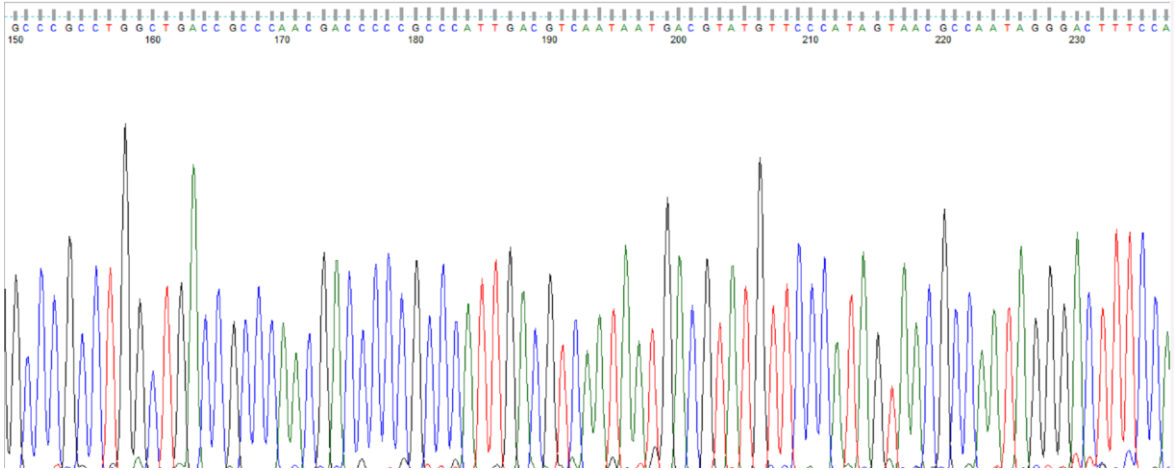
Jel görüntüsü

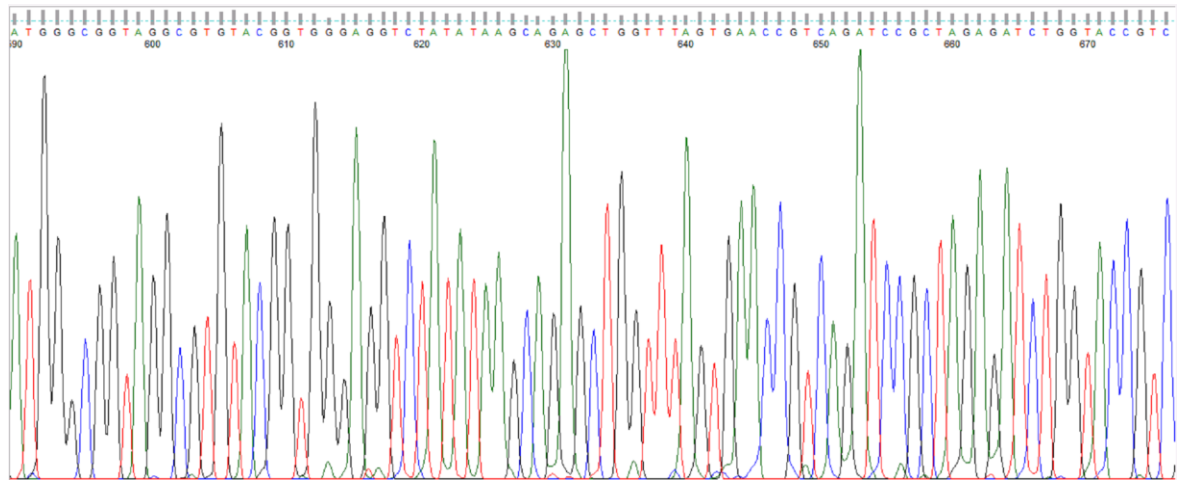
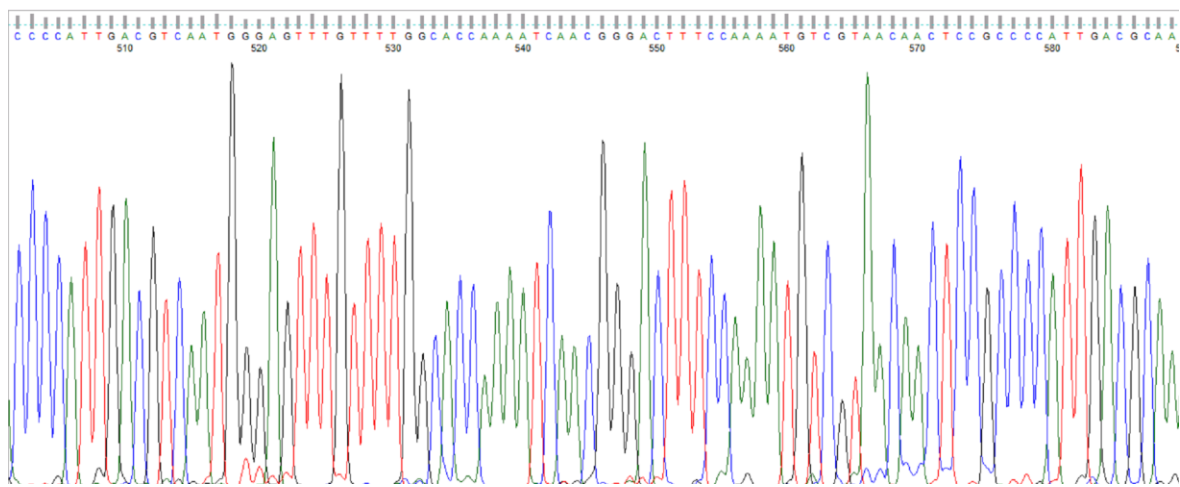
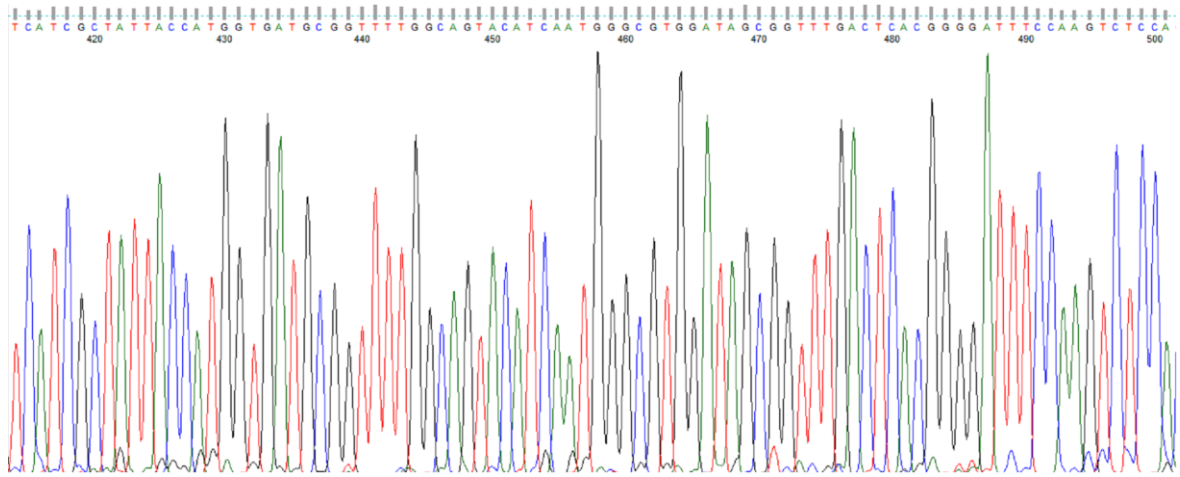
1. Marker (1 kb Axygen)
2. 4775 bp ana vektör, ~900 bp GFP geni, ~720 bp CMV geni (5 µl yükleme, mikro kuyucuk)

5.4. Dizi Analizi Sonuçları

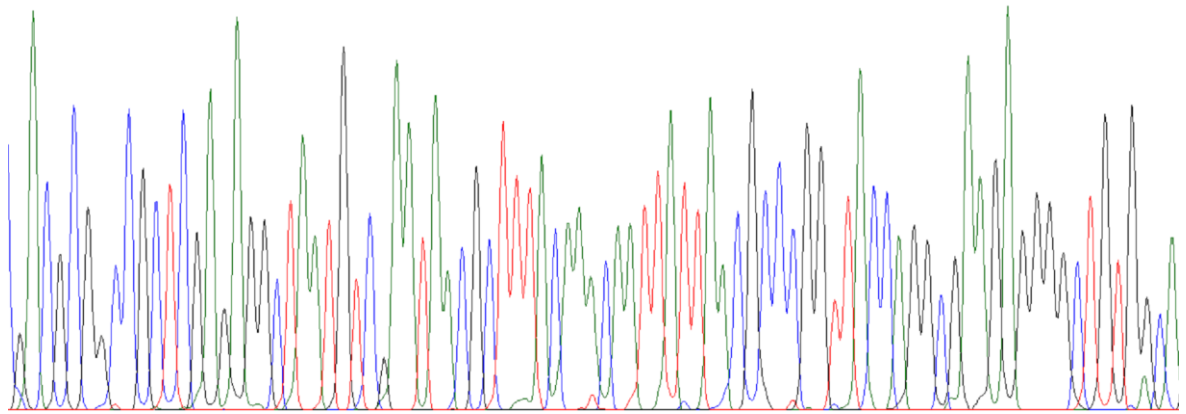
Elde edilen pFastBac-CD, pFastBac-GMCSF, pFastBac-GFP plazmid vektörlerinde yer alan transgenler olası mutasyonlar açısından dizi analizi (laboratuvarımız dışında özel bir merkezde (RefGen, Ankara) yaptırılmıştır) yapıldı. Elde edilen diziler daha sonra hem orijinal ticari plazmiddeki ilgili gen nükleotid dizisi ile hem de web den NIH nucleotid veri tabanında kontrol edildi. Aşağıda CD (sitozin deaminaz) geninin ileri (forward) primerin sekans sonuçları örnek olarak verilmiştir. İleri analizler (klonlanan genlerin dizilerinin primerlerin karşılaştırılarak bulunması ve genom veri tabanından taranması vb.) primerlerin dizi analizleri ile gerçekleştirildi.



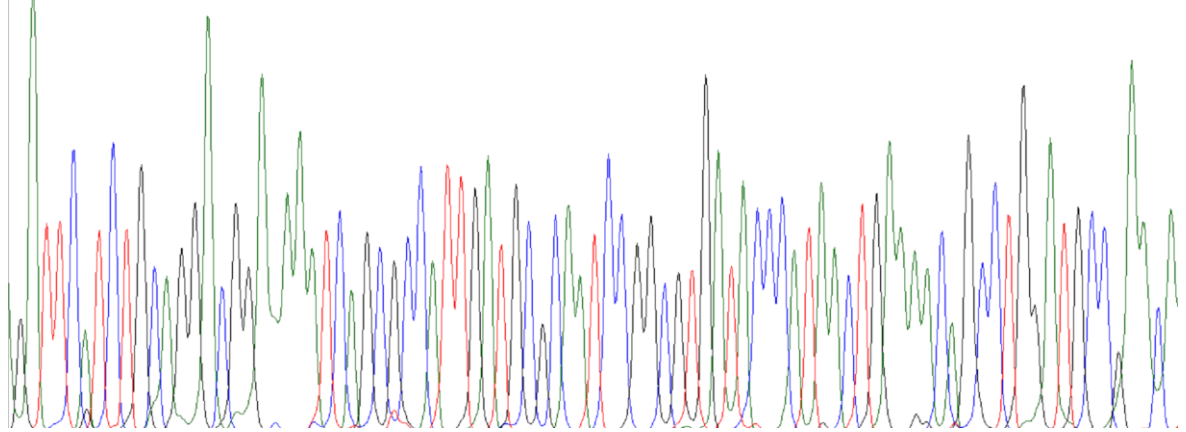




G A C G C G G C C G C T C G A G A G G C T A A T G T C G A A T A A C G C T T T A C A A A C A A T T A T T A A C G C C C G G T T A C C A G G C G A A G A G G G C T G T G G C A
680 690 700 710 720 730 740 750 760



G A T T C A T C T G C A G G A C G G A A A A T C A G C G C C A T T G A T G C G C A A T C C G G C G T G A T A C C C A T A A C T G A A A A C A G C C T G G A T G C C G A A C A
770 780 790 800 810 820 830 840 850



5.5. Genom Veri Tabanından Karşılaştırma Sonuçları

Örnek yine CD (sitozin deaminaz) geni için verilmiştir.

Sequence ID: lcl|43789|Length: 1306|Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 28 to 969

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1716 bits (929)	0.0	938/942 (99%)	1/942 (0%)	Plus/Plus
Query 11	ATTATTACCGCCCGGTTACCAGGCGAAGAGGGGCTGTGGCAGATTCATCTGCCGGACGGA	70		
Sbjct 28	ATTATTAACGCCCGGTTACCAGGCGAAGAGGGGCTGTGGCAGATTCATCTGCAGGACGGA	87		
Query 71	AAAATCAGCGCCATTGATGCGCAATCCGGCGTGATACCCATAACTGAAAACAGCCTGGAT	130		
Sbjct 88	AAAATCAGCGCCATTGATGCGCAATCCGGCGTGATGCCATAACTGAAAACAGCCTGGAT	147		
Query 131	GCCGAACAAGGTTTAGTTATACCGCCGTTTGTGGAGCCACATATTCACCTGGACACCACG	190		
Sbjct 148	GCCGAACAAGGTTTAGTTATACCGCCGTTTGTGGAGCCACATATTCACCTGGACACCACG	207		
Query 191	CAAACCGCCGGACAACCGAACTGGAATCAGTCCGGCACGCTGTTTGAAGGCATTGAACGC	250		
Sbjct 208	CAAACCGCCGGACAACCGAACTGGAATCAGTCCGGCACGCTGTTTGAAGGCATTGAACGC	267		
Query 251	TGGGCCGAGCGCAAAGCGTTATTAACCCATGACGATGTGAAACAACGCGCATGGCAAACG	310		
Sbjct 268	TGGGCCGAGCGCAAAGCGTTATTAACCCATGACGATGTGAAACAACGCGCATGGCAAACG	327		
Query 311	CTGAAATGGCAGATTGCCAACGGCATTGAGCATGTGCGTACCCATGTCGATGTTTCGGAT	370		
Sbjct 328	CTGAAATGGCAGATTGCCAACGGCATTGAGCATGTGCGTACCCATGTCGATGTTTCGGAT	387		
Query 371	GCAACGCTAACTGCGCTGAAAGCAATGCTGGAAGTGAAGCAGGAAGTCGCGCCGTGGATT	430		
Sbjct 388	GCAACGCTAACTGCGCTGAAAGCAATGCTGGAAGTGAAGCAGGAAGTCGCGCCGTGGATT	447		
Query 431	GATCTGCAAATCGTCGCCTTCCCTCAGGAAGGGATTTTGTTCGTATCCCAACGGTGAAGCG	490		
Sbjct 448	GATCTGCAAATCGTCGCCTTCCCTCAGGAAGGGATTTTGTTCGTATCCCAACGGTGAAGCG	507		
Query 491	TTGCTGGAAGAGGCGTTACGCTTAGGGGCAGATGTAGTGGGGGCGATTCCGCATTTTGAA	550		
Sbjct 508	TTGCTGGAAGAGGCGTTACGCTTAGGGGCAGATGTAGTGGGGGCGATTCCGCATTTTGAA	567		
Query 551	TTTACCCGTGAATACGGCGTGGAGTCGCTGCATAAAACCTTCGCCCTGGCGCAAAAATAC	610		
Sbjct 568	TTTACCCGTGAATACGGCGTGGAGTCGCTGCATAAAACCTTCGCCCTGGCGCAAAAATAC	627		
Query 611	GACCGTCTCATCGACGTTCACTGTGATGAGATCGATGACGAGCAGTCGCGCTTTGTCGAA	670		
Sbjct 628	GACCGTCTCATCGACGTTCACTGTGATGAGATCGATGACGAGCAGTCGCGCTTTGTCGAA	687		
Query 671	ACCGTTGCTGCCCTGGCGCACCATGAAGGCATGGGCGCGGAGTCACCGCCAGCCACACC	730		
Sbjct 688	ACCGTTGCTGCCCTGGCGCACCATGAAGGCATGGGCGCGGAGTCACCGCCAGCCACACC	747		
Query 731	ACGGCAATGCACTCCTATAACGGGGCGTATACCTCACGCCTGTTCCGCTTGCTGAAAATG	790		
Sbjct 748	ACGGCAATGCACTCCTATAACGGGGCGTATACCTCACGCCTGTTCCGCTTGCTGAAAATG	807		
Query 791	TCCGGTATTAACCTTTGTCGCCAACCCGCTGGTCAATATTCATCTGCAAGGACGTTTCGAT	850		
Sbjct 808	TCCGGTATTAACCTTTGTCGCCAACCCGCTGGTCAATATTCATCTGCAAGGACGTTTCGAT	867		
Query 851	ACGTATCCAAAACGTCGCGGCATCACGCGGTTAA-GAGATGCTGGAGTCCGGCATTAAAC	909		
Sbjct 868	ACGTATCCAAAACGTCGCGGCATCACGCGGTTAAAGAGATGCTGGAGTCCGGCATTAAAC	927		
Query 910	GTCTGCTTTGGTACGATGATGTCTTCGATCCGTGGTATCCG	951		
Sbjct 928	GTCTGCTTTGGTACGATGATGTCTTCGATCCGTGGTATCCG	969		

Her iki karşılaştırma sonucunda da pFastBac taşıyıcı vektörlere klonladığımız GMCSF, GFP ve CD genlerinde mutasyon izlenmedi.

5.6. Rekombinant Bacmid DNA Eldesi

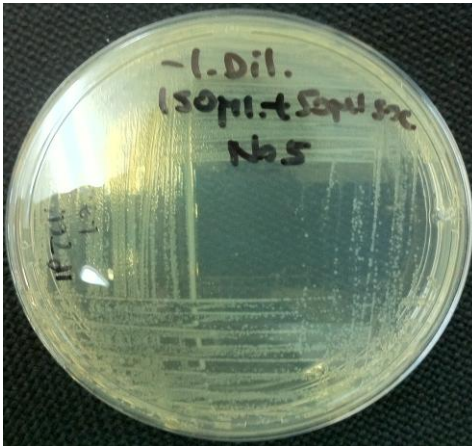
pFastBAC-CMV-CD, pFastBAC-CMV-GFP ve pFastBAC-CMV-GMCSF plazmidleri içerisinde mekik vektör barındıran MAX Efficiency DH10BAC hücrelere transforme edildi. Plazmidlerde yer alan CMV-transgen bölgeleri mekik vektördeki β -galaktozidaz bölgesine yerleşerek rekombinant bakulovirus meydana getirmesi beklenmektedir. Ekim sonrası rekombinasyonun gerçekleştiği vektörlerin bulunduğu kolonilerdeki bakteriler X-Gal i parçalayamadığı için beyaz olarak görünmesi beklenmektedir (Şekil 5.6.1). Daha sonra üreyen beyaz kolonilerin yeniden dilüsyonel ekimi ile elde edilen beyaz koloniler (Şekil 5.6.2, Şekil 5.6.3) alınıp sıvı besiyerinde çoğaltılarak saflaştırıldı.



Şekil 5.6.1. Dilüsyon yapılmadan ekilen örnek



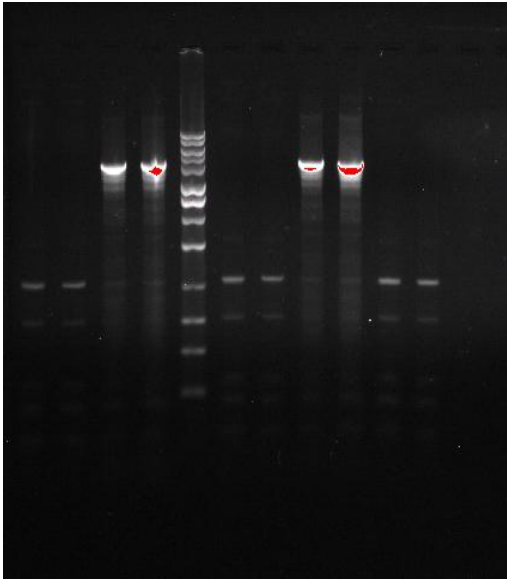
Şekil 5.6.2. Dilüsyon yapılarak ekilen örnek



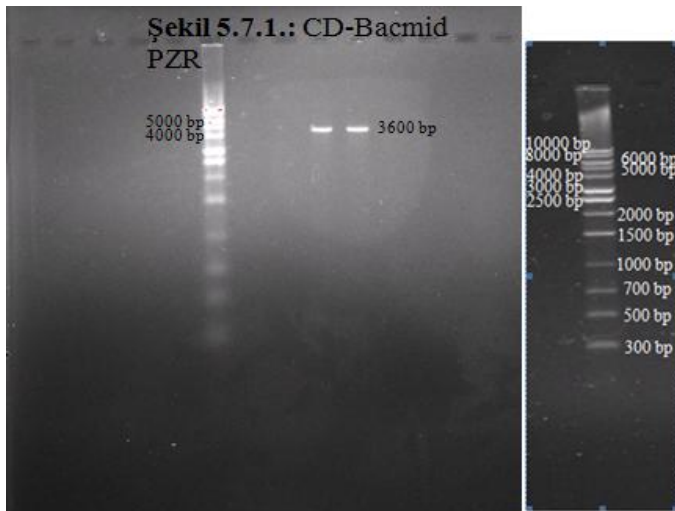
Şekil 5.6.3. Dilüsyon yapılarak ekilen örnekten tek koloni ekimi

5.7. Rekombinant Bacmid DNA'nın PZR ile çoğaltılıp Doğrulanması

Bir önceki basamakta çoğaltılan beyaz koloniler saflaştırıldı ve transgenin (CMV ile birlikte CD, GFP veya GMCSF) yerleştiği bölge PZR ile çoğaltılarak jelde yürütüldü. Yaklaşık olarak 2300 bp + transgen (bp olarak) bant elde edilmesi durumunda vektördeki ligasyon doğru olarak kabul edildi (Bac to Bac Expression systems, Invitrogen), Carlsbad, USA). Şekil 5.7.1 ve Şekil 5.7.2 de CMV ve CD genlerini taşıyan rekombinant bakuloviral vektörün PZR sonuçları sunulmuştur.



Şekil 5.7.1. CD-Bacmid PZR



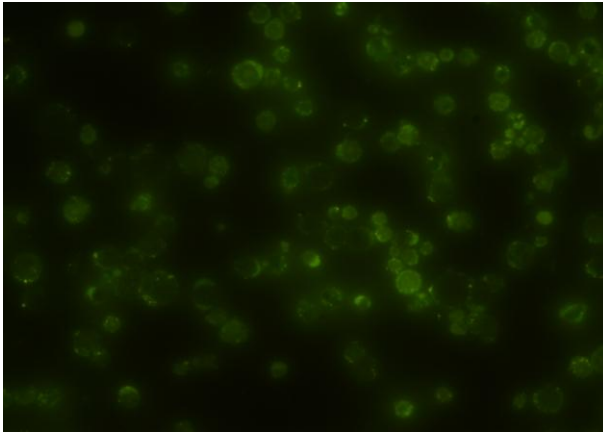
Şekil 5.7.2. CD-Bacmid PZR (3 ng DNA ile tekrarı)

5.8. In vivo Bakulovirüs Transfeksiyonunun Doğrulanması

Elde ettiğimiz rekombinant bakuloviral vektörün böcek hücrelerinde ve memeli hücrelerine girip gen ifadesine yol açtığını göstermek amacıyla Sf-9 hücreleri ile in-vitro ve BalBc farfelerde CRL26538 kolon kanseri hücreleri ile oluşturulan tümör dokusunda ve yine BalBc farelerin karaciğer dokusuna vektör enjeksiyonu ile bu dokulardaki gen ifadesini değerlendirmek amacıyla GFP taşıyan bakuloviral vektörler enjekte edildi.

5.8.1. Floresan Mikroskop ile Doğrulama

Sf-9 hücreler CMVpromoter ve GFP geni taşıyan rekombinan bakuloviral ile transfekte edildikten sonraki 48. saatten itibaren enfekte hücrelerde yeşil floresan protein ifadesi izlenmeye başladı (Şekil 5.8.1).

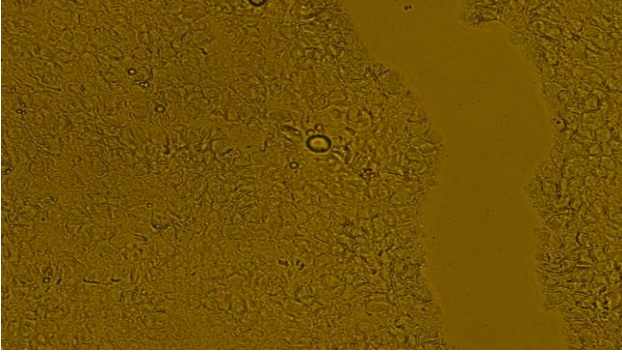


Şekil 5.8.1. Sf-9 hücrelerinde GFP ekspresyonu (400 x)

5.8.2. Frozen ile Doğrulama

Memeli hücrelerinde in-vivo olarak bakulovirüs transfeksiyonun değerlendirmek amacıyla GFP taşıyan bakuloviral vektör tümör dokusuna ve karaciğere enjekte edildi (yaklaşık olarak 10^8 viral partikül). Kontrol olarak da GFP içermeyen diğer vektörler kullanıldı. Yaklaşık 96 saatlik süre sonunda tümör ve karaciğer dokuları alınarak frozen kesitler hazırlandı ve floresan mikroskopda incelendi. Kontrol grubunda tümör hücrelerinde GFP ifadesi izlenmez iken GFP vektörü enjekte edilen tümör dokularında GFP ışınması izlendi (Şekiller 5.8.2-5). Karaciğere yapılan enjeksiyon sonrasında ise 96. saatte karaciğerde tümör dokusuna oranla daha belirgin bir GFP ifadesi izlendi (Şekiller 5.8.6-7). Ancak

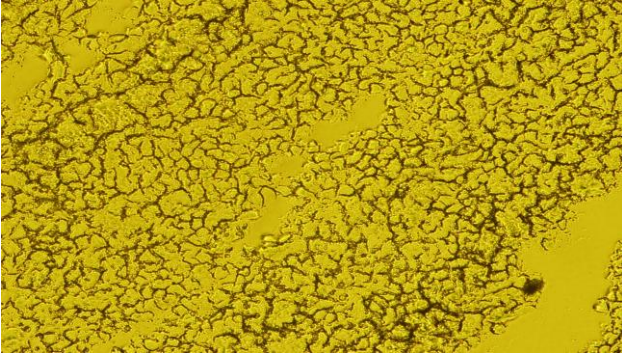
şekil 5.8.7 deki görüntüde tüm hücrelerin transfekte olmuş gibi görünüyor olması kesitin katlanmış olabileceğini düşündürmektedir.



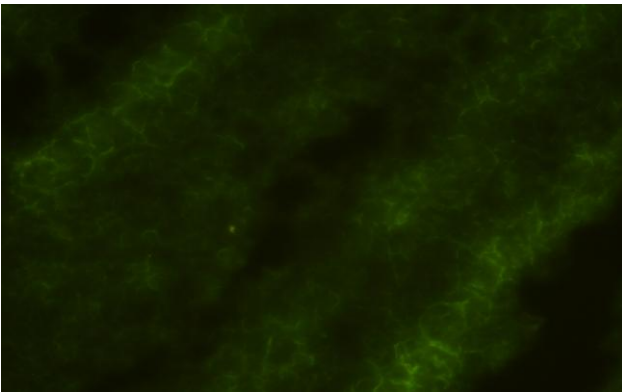
Şekil 5.8.2. Kontrol grubunun ışık mikroskopundaki görünümü



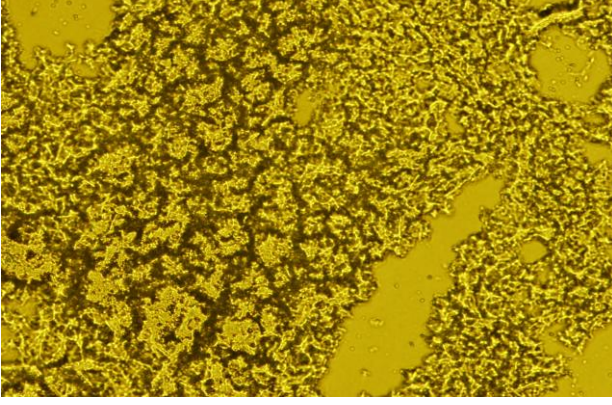
Şekil 5.8.3. Kontrol grubunun floresan mikroskopundaki görünümü



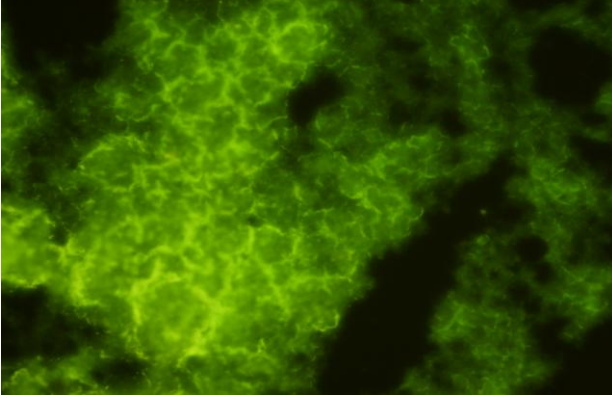
Şekil 5.8.4. GFP geni içeren grubun ışık mikroskopundaki görünümü-1



Şekil 5.8.5. GFP geni içeren grubun floresan mikroskopundaki görünümü-1



Şekil 5.8.6. GFP geni içeren grubun ışık mikroskopundaki görünümü-2

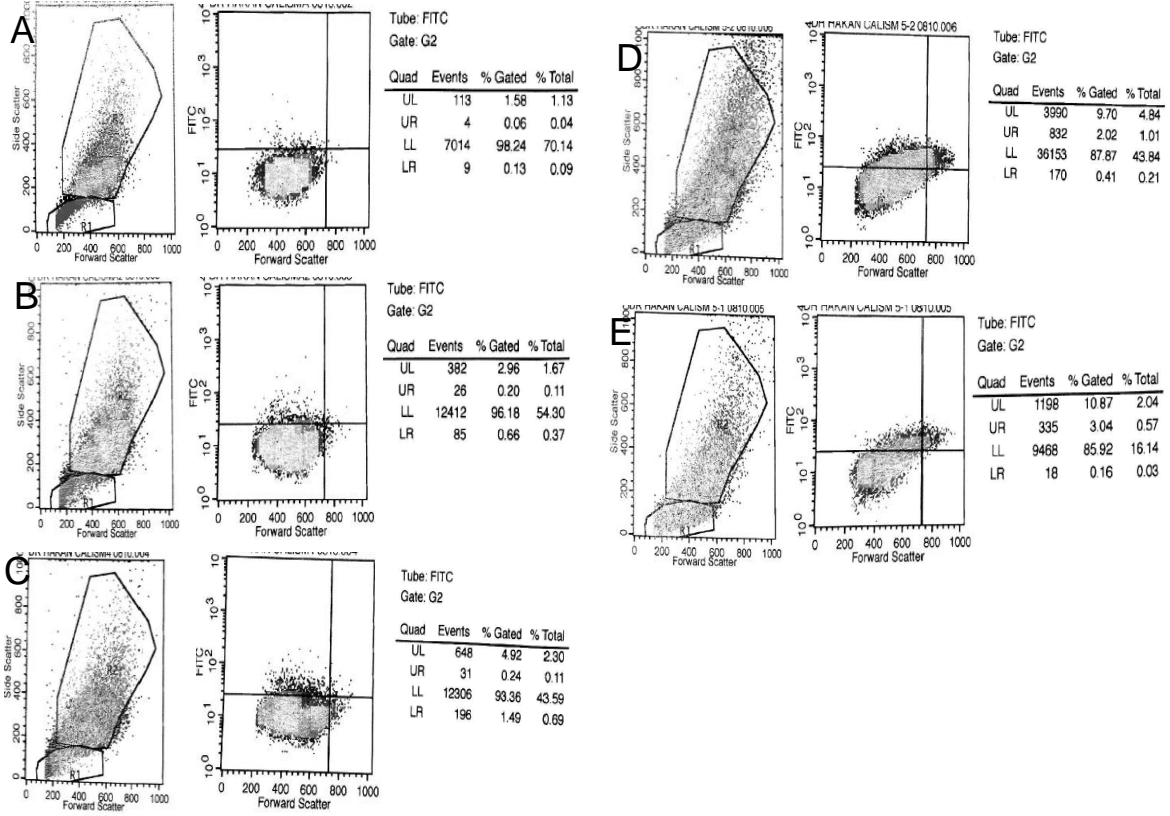


Şekil 5.8.7. GFP geni içeren grubun floresan mikroskoptaki görünümü-2

GFP geni taşıyan vektör enjeksiyonunu takibeden 96 saat sonraki Fare frozen karaciğer dokusunda GFP ifadesi (Floresan mikroskop 400x)

5.8.2. Mezenkimal Kök Hücrelerde Bakulovirus Transfeksiyonunun Akım Sitometri ile Doğrulanması

Elde ettiğimiz bakuloviral vektörlerin mezenkimal kök hücreleri transfekte edip etmediğini test etmek amacıyla P1 stoktan (viral titrasyonu $<10^5$) MKH lere transfeksiyon yapıldı. 72 saatlik inkübasyon sonrasında hücreler tripsinize edilerek süspansiyon haline getirildi ve akım sitometrisi ile GFP pozitif hücrelerin oranları tayin edildi. Şekil 5.8.8'de görüldüğü gibi transfeksiyon için kullanılan virus dozu arttıkça GFP pozitif hücre oranlarında da artış izlendi.

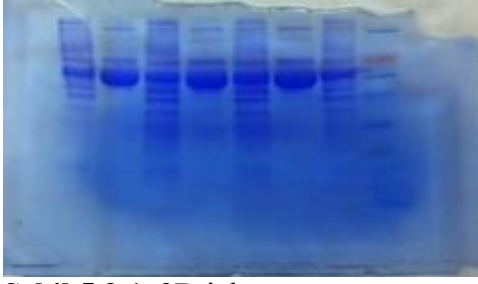


Şekil 5.8.8. GFP geni içeren virüsün MKHlere transfeksiyonunun akım sitometri ile doğrulanması

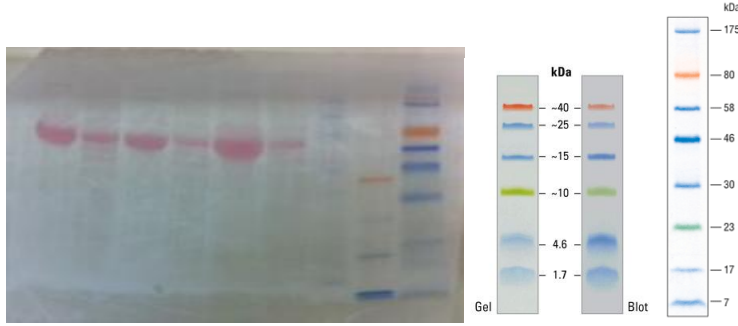
A-MKH lerin 1 moi GFP Bacmid ile transfeksiyonu, B- MKH lerin 10 moi GFP Bacmid ile transfeksiyonu, C- MKH lerin 20 moi GFP Bacmid ile transfeksiyonu, D- MKH lerin 50 moi GFP Bacmid ile transfeksiyonu, E- MKH lerin 100 moi GFP Bacmid ile transfeksiyonu

5.9. Western Blot ile Rekombinant Vektör ile Memeli Hücrelerinde İfade Edilen Proteinlerin Gösterilmesi

Yaklaşık 100 MOI vektör (CMV-CD veya CMV-GMCSF genleri taşıyan) ile enfekte edilen CRL26-38 hücreleri yaklaşık 72 saatlik inkübasyon sonrasında toplanarak hücre lizatı hazırlandı ve bu hücre lizatında CD veya GM-CSF protein ifadesi Western blot (denature) yöntemi ile gösterildi. CRL-2638 hücrelerinde CMV-GMCSF vektörü ile transfekte edildiğinde yaklaşık 23 kDa ağırlığında bir proteini ifade ettikleri bulundu (Şekil 5.9.3).



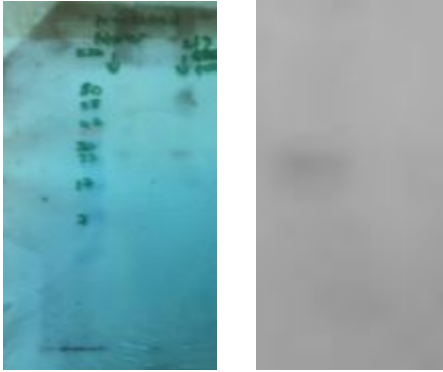
Şekil 5.9.1. 2D jel görüntüsü



Thermo scientificNEB

Şekil 5.9.2. Transfer sonrası membranın ponce boyası ile boyanması (GM-CSF)

(Thermo scientific spectra multicolor low range protein ladder,26628
NEBColorplus prestained protein marker,broad range (7-175 kDa)

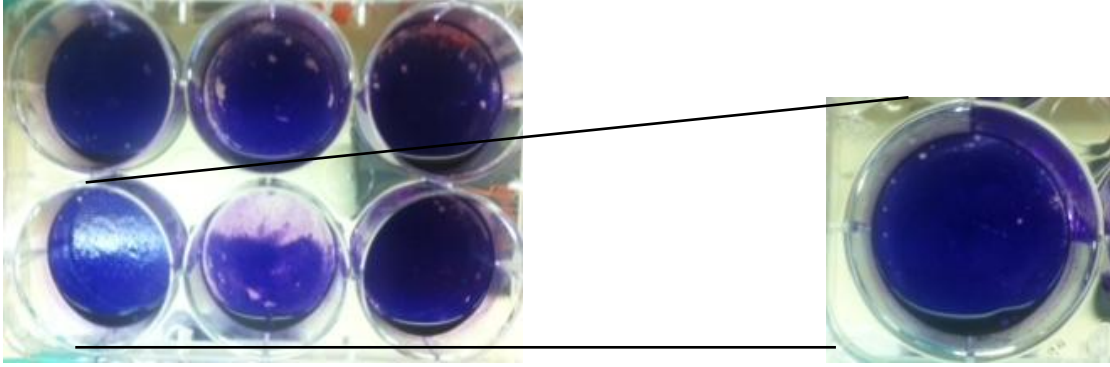


Şekil 5.9.3. Filmde GM-CSF antikoruna muamele sonrası GM-CSF'nin gösterilmesi

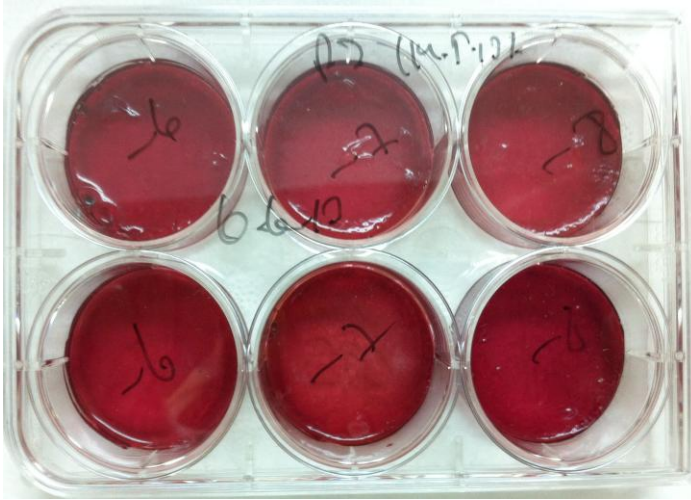
5.10. Bakulovirüs Titrasyonunun Belirlenmesi

5.10.1. Viral Plak Deneyi ile Belirleme

Elde edilen bakuloviral stoklar, invitro ve in-vivo deneylerde kullanılmadan önce doz belirlemek amacıyla viral plak yöntemi ile virüs titrasyonu yapıldı. P2 stoklardan yapılan deneylerde virus titrasyonu 1×10^6 pfu/ml civarında iken (Şekil 5.10.1 ve 2) P5 stoktan yapılan değerlendirmelerde virüs titrasyonu 10^8 - 10^{10} pfu/ml arasında değişmekteydi.



Şekil 5.10.1. Kristal viyole ile boyama



Şekil 5.10.2. Nötral kırmızı ile boyama

viral titrasyon: 3×10^6 pfu/ml olarak hesaplandı.

5.11. Hayvan Deneyleri

5.11.1. Deney Hayvanlarında Tümör Oluşturma

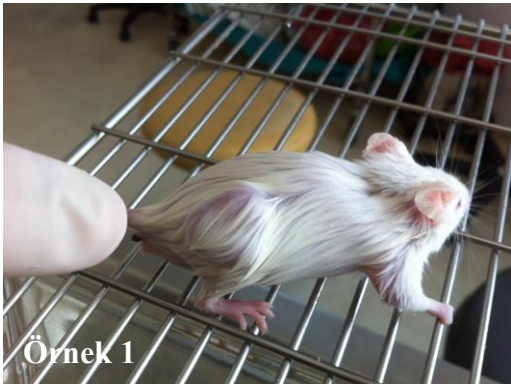
In-vivo deneyler için fare kolon kanseri modeli oluşturuldu. Bu amaçla 6-8 haftalık BalBc farelere subkütan olarak 5×10^5 CRL-2638 fare kolon kanseri hücresi enjekte edildi (Şekil 5.11.1). Tümör enjeksiyonunu takiben 4. günden itibaren subkütan tümör nodülleri izlenmeye başlandı. Rekombinant vektörlerin anti-tümoral etkinliğini değerlendirmek için tümör enjeksiyonunun 6. günde 5'er fareden oluşan rastgele gruplar oluşturuldu:

1. Grup: Kontrol
2. Grup: CD geni taşıyan vektör (10^8 viral paritkül)
3. Grup: CD vektörü (5×10^7 viral paritkül) ve GM-CSF vektörü (5×10^7 viral partikül)
4. Grup: GFP vektörü verilen (10^8 viral partikül)

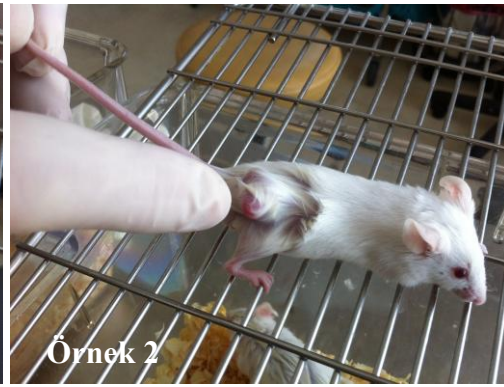


Şekil 5.11.1. 5×10^5 CRL2638 hücrelerinin subkutan olarak enjeksiyonu

Tümör enjeksiyonu 1.gün



Örnek 1



Örnek 2



Örnek 3

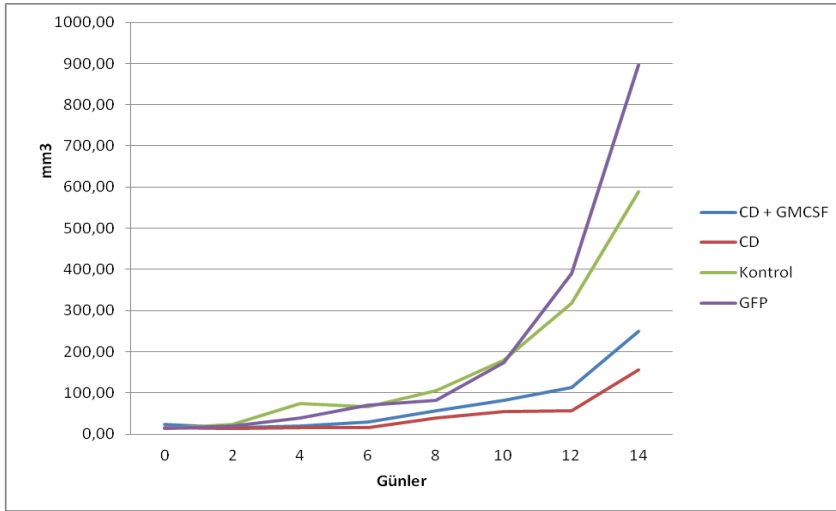


Örnek 4

Şekil 5.11.2. Gelişen tümörler (10. Gün)

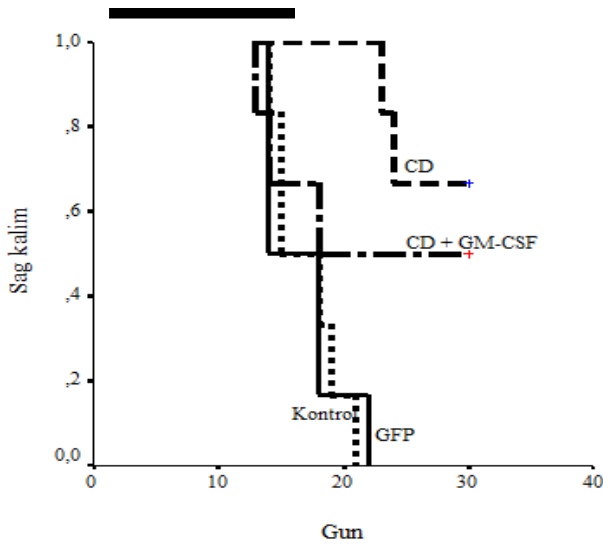
5.11.2. Tümör Büyüme ve Sağkalım Eğrileri

İnşa ettiğimiz vektörlerin tümör büyümesi açısından etkinliğine bakıldığında CD vektörünü tek başına veya CD vektörü ile birlikte GM-CSF vektörü verilenlerde tümörlerin belirgin olarak daha yavaş geliştiği izlendi (Şekil 5.12.2). Yine benzer olarak aynı gruplardaki fareler diğer gruplara göre belirgin olarak daha uzun yaşadılar. Medyan sağkalım süreleri kontrol ve GFP gruplarında 18 gün iken CD grubunda 30 gün ve CD ve GMCSF grubunda ise 25 gün olarak bulundu.



Şekil 5.11.3. Tümör büyüme eğrileri⁺

⁺Gruplar arası tümör boyut farklılıkları “Mann Whitney U” testi ile değerlendirildi.



Şekil 5.11.4. Sağkalım eğrileri⁺⁺

p değeri= 0.0049

⁺⁺Sağkalım eğrileri analizinde Kaplan-Meier kullanılmıştır.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser günümüzün önemli sağlık problemlerinden biridir. Ancak şifa oranlarına bakıldığında genel olarak son 20 yılda yaklaşık olarak sadece % 5 lik bir iyileşmeden söz edilebilir (69).

Kanser tedavisinde mortaliteyi azaltmak ve sağkalımı artırmak için birçok tedavi modaliteleri kullanılsa da hala ciddi bir iyileşme elde edilememiştir. Son yıllarda gen tedavisindeki gelişmeler ve FDA tarafından onaylanan ürünler ümit vaad edici olmuş, gen tedavisinin katkısını ortaya koymuştur.

Bu çalışmada intihar geni olarak sitozin deaminaz genini taşıyan bakuloviral vektörlerin mezenkimal kök hücrelere yüklenerek bu hücrelerin tümör tropizminden yararlanmayı böylece, ön ilaç verildiğinde yalnızca tümör dokusunda etkisini gösterebilmesi amaçlanmıştır. Sonuçlar hayvan deneylerinden elde edilen veriler ile değerlendirilmiştir.

MKH'ler son yıllarda bazı özellikleri nedeni ile gen tedavisinde önemli taşıyıcılar olarak gösterilmektedir. Örneğin dolaşıma verildiklerinde tümör dokularına göç ettikleri bilinmektedir. Bu hücrelerin tümör seçici özelliklerinin ise önemli ölçüde tümör hücrelerinin oluşturduğu kronik inflamasyon, salgılanan bazı sitokinler ve büyüme faktörlerine bağlı olduğu düşünölmektedir (76). Anjiogenez artışı olan bölgelere ve/veya stroma oluşum bölgelerine göç etme özellikleri nedeniyle de kanser tedavisinde potansiyel bir araç olarak dikkat çekmektedirler.

MKH'lerin bir diğer avantajı; in vitro ortamda kolayca manipöle edilebilmeleridir. Bu sayede gen tedavisi vektör taşıyıcısı olarak kullanılabilirler. Son yıllarda lentiviruslar, retro viruslar ve plazmidlerle transdükte edilen MKH'lerin kanser tedavisinde başarılı olabileceğini gösteren çalışmalar yayınlanmıştır (80-82). Ayrıca, böcek virusundan (*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*) elde edilen bakuloviral vektörlerin (BVV) gen aktarımında başarı ile kullanılabileceği gösterilmiştir. Bir DNA virusu olan BVV memeli hücrelerine kolayca girebilmekte ve hücre içinde çoğalmadan ve herhangi bir toksisiteye yol açmadan kalabilmektedir (83). Yaklaşık 130 kB'lık genomu nedeniyle çok büyük genlerin transferine imkan verebilmektedir. BVV'in MKH'leri transdükte edebildikleri gösterilmiştir (84,85). Transdükte edilen MKH'lerin allojenik

transplantasyonu sonrasında bu hücrelerin alıcıda yerleşebildiği ve reddedilmediği gösterilmiştir. Bakuloviral vektörlerle transdükte edilen MKH in hayvan modellerinde güvenle kullanılabilirlikleri bildirilmiştir. Bakuloviral vektörlere karşı memelilerde doğal bağışıklığın olmaması ve bu vektörlerle in vitro olarak transdükte edilen hücrelerin transfüzyonu ile çalışılan immünkompetan hayvan modellerinde bu hücrelere karşı bir immünitinin gelişmemiş olması söz konusu vektörlerin insan kanserlerinin tedavisi için çekici hale getirmektedir.

Bakuloviral vektörler gen tedaviden ziyade sıklıkla rekombinant protein eldesi için kullanılmıştır (çizelge 2.2). Ancak bu firmalar taşıyıcı olarak yine adenovirüs, adeno bağlantılı virüs, herpes simplex virüs gibi virüsleri kullanmaktadırlar, gen ekspresyon vektörü olarak bakuloviral plazmidler kullanılmaktadır. Bunların dışında intihar geni taşıyan BVV ile transdükte edilmiş kemik iliği kökenli MKH'in insan glioma hücrelerinin kullanıldığı tümör modelinde tümör büyümesini anlamlı ölçüde baskıladığı ve sağkalımı belirgin olarak uzattığı bir çalışma vardır (84). Bu anlamda, mevcut tez çalışması kanserde mezenkimal kök hücrelerin taşıyıcı olarak, bakulovirüslerin ekspresyon vektörü olarak kullanıldığı sayılı çalışmalardan olma özelliği taşımaktadır.

Bakuloviral vektörler genelde terapötik proteinlerin üretiminde kullanılmış olmakla birlikte memeli hücrelerine de girdiğinde uygun promoter takılması halinde gen ifadesi söz konusu olabilmektedir. Tez çalışması kapsamında CMV promoter taşıyan rekombinant bakuloviral vektörlerin (ör. GFP) memeli hücrelerinde gen ifadesi yaptığını gösterdik (Şekil 5.8.5, Şekil 5.8.7). Elde ettiğimiz bakuloviral vektörler memeli hücrelerini (fare ve insan) yaklaşık 12 saatlik inkübasyon sonrası enfekte edebilmektedir. Memeli hücrelerini enfekte edebilme potansiyeli adenovirüslere nazaran daha düşüktür. Ancak 12 saatlik enfeksiyon sonrası yaklaşık 100 moi dozunda fare mezenkimal kök hücrelerinde yaklaşık %30 luk bir vektör ifade oranı elde edilmiştir (Şekil 5.8.8). Bu oran da gen tedavisi açısından etkili olabilecek bir orandır.

Bakulovirüsler barındırdığı pek çok özellik dolayısıyla gen tedavisi için önemli bir vektör olmakla birlikte diğer vektörler ile (örneğin adenoviral vektörler) kıyaslandığında daha düşük titrede elde edilebilmektedirler. Yaptığımız çalışmada her ne kadar hayvan deneyleri için adenoviral vektörlerle yapılan çalışmalardakine yakın titrede virus elde edilebilmiş olsak

da daha yüksek titrasyonların elde edilmesi için mevcut tekniklerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Hayvan deneyleri verilerine baktığımızda yaptığımız araştırmada kontrol grubu, MKH taşıyıcılı CD ve GM-CSF içeren vektörlerin birlikte verildiği grup ile karşılaştırıldığında yaklaşık 2.5 kat daha fazla tümör yüküne sahiptir. Kontrol grubu, MKH taşıyıcılı CD vektörü ile kıyaslandığında ise 4 kat daha fazla tümör yüküne sahip olduğu görülmektedir. GM-CSF immünmodülatör bir sitokindir. Dolayısıyla her ne kadar bu sitokini eksprese eden vektörün uygulandığı farelerin tümörlerinde GM-CSF'nin anti tümör immunitiyi artırması dolayısıyla daha fazla bir regresyon beklense de yalnızca CD genini eksprese eden MKH taşıyıcılı CD vektöründeki tümör hacmi daha azdır. Sağkalım eğrilerine bakıldığında yine bununla korele sonuçlar görülmektedir. Kontrol grubundaki fareler 21.günde ölmüş, MKH taşıyıcılı CD ve GM-CSF vektörleri uygulanan farelerin %50si 30.günde halen yaşarken, sadece MKH taşıyıcılı CD vektörü uygulanan farelerin ise %65i 30.günde yaşamaktadır. GM-CSF'nin etkilerinin daha az görülmesi ya da görülmemesi iki vektörün aynı anda farelere uygulanması olabilir. Bazı hücelere yalnızca CD eksprese eden vektör girebilir, bazılarında yalnızca GM-CSF eksprese eden vektör girebilir ya da her iki vektör aynı hücreye girebilir ancak tüm bu durumların gen ekspresyonlarını düşürmesi olasıdır. Ayrıca, MKH taşıyıcılı CD vektörü uygulanan farelerin 30.günde %35 kadarı ölmüştür ancak uygulanan tedavi 500 mg/kg/gün olacak şekilde bir hafta boyunca uygulanmıştır. Bakuloviral sistemlerde üretilen gen ürünlerinin, rekombinant proteinlerin, yarılanma ömürlerinin kısa olduğu Grossmann M. ve arkadaşları tarafından ifade edilmiştir. Bu bilgiler ışığında ve buna ilave olarak insanların bakuloviral vektörlere bağışıklığının olmaması göz önüne alınırsa kullandığımız vektörlerin tekrarlayan dozlarının kullanımı ile sağkalım daha da arttırılabilir. Bu projeden elde ettiğimiz vektörlerin tekrarlayan uygulamaları ve daha yüksek dozlardaki etkinliği daha sonra yapacağımız araştırmalarda test edilecektir.

Bu tez çalışması ile bir memeli promotörü olan CMV promotörü kullanılarak inşa edilen bakuloviral vektörlerin etkili bir şekilde memeli hücrelerini transfekte edebildiği (şekil 5.8.5, şekil 5.8.7), yüksek miktarda titrasyon ile elde edilebildikleri (şekil 5.10.1), MKH'lere etkili bir şekilde yüklendiği (şekil 5.8.8) ve sonuçta MKH'lerin taşıyıcı olarak kullanıldığı, CD ve/veya GM-CSF genlerini eksprese eden bakuloviral vektörlerin kontrol grubuna oranla kolon kanseri oluşturulan farelerde tümörü geriletmediği gösterilmiştir.

Taşıyıcı olarak kullanılan mezenkimal kök hücrelerin ön ilaç verilip barındırdığı bakuloviral vektördeki CD geni aktivitesi sonucu oluşan 5-florourasil ile ölmeleri beklenmektedir. Ancak oluşan 5-FU etkisi ile MKH'in ölmeleri bekleniyor olsa da, hipotezimizin dokudaki MKH belirteçleri ile daha ayrıntılı araştırılması gerekmektedir. Ayrıca, MKH in tümör mikorçevresinde meydana getirebileceği olası immünsüpresif etkilerin de ayrıntılı olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. Tez çalışmamızın devam eden aşamalarında bahsedilen noktaların aydınlatılması için ayrıntılı çalışmalara devam ediyoruz.

KAYNAKLAR

- 1 Kanser İstatistikleri. [cited; Available from: <http://www.turkcancer.org>]
- 2 Torrero M, Li S. Growth factor receptors: targets for gene therapy and immunotherapy for cancer treatment. *Gene Ther Mol Biol.* 2004 Jun;**8**:175-80.
- 3 Gene therapy defined, gene therapy for genetic disorders. [cited; Available from: <http://www.asgct.org>]
- 4 Friedman T, Roblin R. Gene Therapy for Human Genetic Disease. *Science.* 1972 Mar;**175** (4025):949-&.
- 5 ADA: The First Gene Therapy Trial. [cited; Available from: <http://history.nih.gov/exhibits/genetics/sect4.htm>]
- 6 Indications Addressed by Gene Therapy Clinical Trials. [cited; Available from: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical>]
- 7 Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T-Lymphocyte-Directed Gene-Therapy for Ada (-) Scid - Initial Trial Results after 4 Years. *Science.* 1995 Oct 20;**270** (5235):475-80.
- 8 Gore ME. Adverse effects of gene therapy: Gene therapy can cause leukaemia: no shock, mild horror but a probe. *Gene Ther.* 2003;**10**:4-.
- 9 Burnett JR, Hooper AJ. Alipogene tiparvovec, an adeno-associated virus encoding the Ser (447)X variant of the human lipoprotein lipase gene for the treatment of patients with lipoprotein lipase deficiency. *Curr Opin Mol Ther.* 2009 Dec;**11** (6):681-91.
- 10 Amgen press release. Amgen announces top-line results of phase 3 talimogene laherparepvec trial in melanoma. [cited; Available from: http://www.amgen.com/media/media_pr_detail.jsp?releaseID=1798143]
- 11 Liu BL, Robinson M, Han ZQ, et al. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther.* 2003 Feb;**10** (4):292-303.
- 12 Penn medicine team reports findings from research study of first 59 adult and pediatric leukemia patients who received investigational, personalized cellular therapy CTL019. [cited 2013 7 December]; Available from: http://www.uphs.upenn.edu/news/News_Releases/2013/12/ctl019/
- 13 When will gene therapy come to the U.S.?. [cited; Available from: <http://www.technologyreview.com/news/519071/when-will-gene-therapy-come-to-the-us>]
- 14 Giacca M. *Gene Therapy Italy*: Springer-Verlag; 2010.
- 15 Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet.* 2014 Aug;**15** (8):541-55.

- 16 Hu YL, Fu YH, Tabata Y, Gao JQ. Mesenchymal stem cells: A promising targeted-delivery vehicle in cancer gene therapy. *J Control Release*. 2010 Oct 15;**147** (2):154-62.
- 17 Li S, Huang L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther*. 2000 Jan;**7** (1):31-4.
- 18 Gad SC. *Handbook of Pharmaceutical Biotechnology*. North Carolina: Gad Consulting Services, Cary 2007.
- 19 Hoekstra D, Rejman J, Wasungu L, Shi F, Zuhorn I. Gene delivery by cationic lipids: in and out of an endosome. *Biochem Soc T*. 2007 Feb;**35**:68-71.
- 20 Misra A. *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics*: Elsevier Inc 2011.
- 21 Anwer K, Kao G, Proctor B, Rolland A, Sullivan S. Optimization of cationic lipid/DNA complexes for systemic gene transfer to tumor lesions. *J Drug Target*. 2000;**8** (2):125-35.
- 22 Bruckheimer E, Harvie P, Orthel J, et al. In vivo efficacy of folate-targeted lipid-protamine-DNA (LPD-PEG-Folate) complexes in an immunocompetent syngeneic model for breast adenocarcinoma. *Cancer Gene Ther*. 2004 Feb;**11** (2):128-34.
- 23 Batrakova EV, Bronich TK, Vetro JA, Kabanov AV. *Nanoparticulates as Drug Carriers*. Northeastern University, USA: Imperial College Pres; 2006.
- 24 Akhtar S. Beyond delivery. *Gene Ther*. 2006 May;**13** (9):739-40.
- 25 Walther W, Stein U. Viral vectors for gene transfer - A review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs*. 2000 Aug;**60** (2):249-71.
- 26 Todo T, Rabkin SD. *Cancer Gene Therapy*. In: Curiel DT, Douglas JT, editors. ISBN: 978-1-58829-213-1 (Print) 978-1-59259-785-7 (Online); 2005. p. 199.
- 27 Howe JA, Ralston R, Ramachandra M. *Cancer Gene Therapy Book*. In: Curiel DT, Douglas JT, editors. ISBN: 978-1-58829-213-1 (Print) 978-1-59259-785-7 (Online); 2005. p. 211.
- 28 Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Therapeut*. 1998 Oct;**80** (1):35-47.
- 29 Kurth R, Bannert N. *Retroviruses: Molecular Biology, Genomics and Pathogenesis*. Robert Koch-Institut, 13353 Berlin, Germany: Horizon Scientific Press; 2010.
- 30 Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, Basile CD, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*. 2000 Apr 28;**288** (5466):669-72.
- 31 Kaiser J. Gene therapy - Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial. *Science*. 2003 Jan 24;**299** (5606):495-.
- 32 Kang HJ, Bartholomae CC, Paruzynski A, et al. Retroviral Gene Therapy for X-linked Chronic Granulomatous Disease: Results From Phase I/II Trial. *Mol Ther*. 2011 Nov;**19** (11):2092-101.

- 33 Retroviral virion structure. [cited; Available from: http://figshare.com/articles/Retroviral_virion_structure/807677
- 34 Cattoglio C, Facchini G, Sartori D, et al. Hot spots of retroviral integration in human CD34 (+) hematopoietic cells. *Blood*. 2007 Sep 15;**110** (6):1770-8.
- 35 Doerfler W. Medical Microbiology. In: Baron S, editor. University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
- 36 Russell WC. Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol*. 2009 Jan;**90**:1-20.
- 37 Sarantis H, Johnson G, Brown M, Petric M, Tellier R. Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol*. 2004 Sep;**42** (9):3963-9.
- 38 Fields' Virology: Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
- 39 Daya S, Berns KI. Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Oct;**21** (4):583-93.
- 40 Vasileva A, Jessberger R. Precise hit: Adeno-associated virus in gene targeting. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Nov;**3** (11):837-47.
- 41 Viruses, vectors and the nucleus. [cited; Available from: <http://hvd.ens-lyon.fr/teams/nucleovir>
- 42 Clem RJ, Passarelli AL. Baculoviruses: Sophisticated Pathogens of Insects. *Plos Pathog*. 2013 Nov;**9** (11).
- 43 Rohrmann GF. Baculovirus Molecular Biology. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2013. p. 4.
- 44 Baculoviruses. [cited; Available from: <http://www.microbiologybytes.com/virology/kalmakoff/baculo/baculo.html>
- 45 Rohrmann GF. Baculovirus Molecular Biology. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2013. p. 2-3.
- 46 Airene KJ, Hu YC, Kost TA, et al. Baculovirus: an Insect-derived Vector for Diverse Gene Transfer Applications. *Mol Ther*. 2013 Apr;**21** (4):739-49.
- 47 Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector. *Mol Cell Biol*. 1983;**3** (12):2156-65.
- 48 Lapointe R, D T, Lucarotti CJ Recent Advances in Our Knowledge of Baculovirus Molecular Biology and Its Relevance for the Registration of Baculovirus-Based Products for Insect Pest Population Control; 2012.
- 49 M.J.Cox M. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. [cited; Available from: http://www.who.int/immunization/research/meetings_workshops/Manon_Cox.pdf

- 50 Pennock GD, Shoemaker C, Miller LK. Strong and Regulated Expression of Escherichia-Coli Beta-Galactosidase in Insect Cells with a Baculovirus Vector. *Mol Cell Biol.* 1984;**4** (3):399-406.
- 51 Demirbag Z, Belduz AO, Demir I. Baculovirus'ün Ekspresyon Vektörü Olarak Biyoteknolojide Kullanılması. *Tr J of Biology* 1998;**22**:249-62.
- 52 Bac to Bac vector kit [cited; Available from: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/10360014>
- 53 Klug WS, Cummings MR. *Genetik Kavramlar*: Palme yayıncılık; 2012.
- 54 Possee RD, Howard SC. Analysis of the Polyhedrin Gene Promoter of the Autographa-Californica Nuclear Polyhedrosis-Virus. *Nucleic Acids Res.* 1987 Dec 23;**15** (24):10233-48.
- 55 Rohrmann GF. Polyhedrin Structure. *J Gen Virol.* 1986 Aug;**67**:1499-513.
- 56 Sridhar P, Awasthi AK, Azim CA, et al. Baculovirus Vector-Mediated Expression of Heterologous Genes in Insect Cells. *J Bioscience.* 1994 Dec;**19** (5):603-14.
- 57 Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, Multiple cloning site of pFastBac™. [cited; Available from: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf
- 58 Carter J, Saunders V. *Virology: Principles and Applications*. England: Wiley J.& Sons; 2007.
- 59 Crepin S, Harel J, Dozois CM. Chromosomal Complementation Using Tn7 Transposon Vectors in Enterobacteriaceae. *Appl Environ Microb.* 2012 Sep;**78** (17):6001-8.
- 60 Peters JE, Craig NL. Tn7: Smarter than we thought. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 2001 Nov;**2** (11):806-14.
- 61 Howe C. *Gene Cloning and Manipulation*. 2 ed: Cambridge University Press; 2007.
- 62 Reece RJ, Wiley JS. *Analysis of Genes and Genomes*; 2004.
- 63 What stem cells do-mesenchymal stem cells. [cited; Available from: <http://nationalstemcellfoundation.org>
- 64 Afanasyev BV, Elstner EE, Zander AR. A. J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. *Cellular Therapy and Transplantation* 2009;**1** (3).
- 65 Baer PC. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World J Stem Cells* 2014;**6** (3):256-65.
- 66 Porada CD, Porada GA. Mesenchymal Stem Cells as Gene Delivery Vehicles. [cited; Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/53240>
- 67 Baglio SR, Pegtel DM, Baldini N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. *Front Physiol.* 2012;**3**.

- 68 Duarte S, Carle G, Faneca H, de Lima MCP, Pierrefite-Carle V. Suicide gene therapy in cancer: Where do we stand now? *Cancer Lett.* 2012 Nov 28;**324** (2):160-70.
- 69 Huber BE, Austin EA, Richards CA, Davis ST, Good SS. Metabolism of 5-Fluorocytosine to 5-Fluorouracil in Human Colorectal Tumor-Cells Transduced with the Cytosine Deaminase Gene - Significant Antitumor Effects When Only a Small Percentage of Tumor-Cells Express Cytosine Deaminase. *P Natl Acad Sci USA.* 1994 Aug 16;**91** (17):8302-6.
- 70 Invivogen, Technologies, Suicide genes. [cited; Available from: http://www.invivogen.com/technologies/suicide_genes.html]
- 71 T. S, Fairbairn L.J. Principle of gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT). [cited; Available from: http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM6_18/S146239940400818Xsup008.htm]
- 72 Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, et al. The Bystander Effect - Tumor-Regression When a Fraction of the Tumor Mass Is Genetically-Modified. *Cancer Res.* 1993 Nov 1;**53** (21):5274-83.
- 73 Ireton GC, Black ME, Stoddard BL. The 1.14 angstrom crystal structure of yeast cytosine deaminase: Evolution of nucleotide salvage enzymes and implications for genetic chemotherapy. *Structure.* 2003 Aug;**11** (8):961-72.
- 74 Beltinger C, Fulda S, Kammertoens T, Meyer E, Uckert W, Debatin KM. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases. *P Natl Acad Sci USA.* 1999 Jul 20;**96** (15):8699-704.
- 75 Porter DJT, Austin EA. Cytosine Deaminase - the Roles of Divalent Metal-Ions in Catalysis. *J Biol Chem.* 1993 Nov 15;**268** (32):24005-11.
- 76 Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003 May;**3** (5):330-8.
- 77 Pyrimidine analogues: 5-fluorouracil, capecitabine. [cited; Available from: <http://www.d.umn.edu/~jfitzake/Lectures/DMED/Antineoplastics/DNASynthesisInhibitors/5FU/5FUPK.html>]
- 78 Cao L, Kulmburg P, Veelken H, et al. Cytokine Gene Transfer in Cancer Therapy. *STEM CELLS* 1998;**16** (suppl 1):251-60.
- 79 Main types of cytokines. [cited; Available from: <http://staryweb.fmed.uniba.sk>]
- 80 Shi YF, Liu CH, Roberts AI, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res.* 2006 Feb;**16** (2):126-33.
- 81 Mullis KB. Recombinant DNA technology and molecular cloning. *Scientific American* 1990. p. 262:36.
- 82 L.A A. *Fundamental Molecular Biology.* Wiley; 2009.

83 Generation of recombinant baculoviruses and gene expression with the Bac to Bac expression system, Guide to Baculovirus Expression Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques Instruction Manual.

84 Fotouhi D. [cited; Available from: <http://scripts.biosummerschool.com/archive/2011/Baculoviruses & Insect cells.pptx>

85 Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* 1998;**67**:509-44.

86 Nobel prize in chemistry 2008. [cited; Available from: <http://www.nobelprize.org>

87 Oba Y, Ojika M, Inouye S. Firefly luciferase is a bifunctional enzyme: ATP-dependent monooxygenase and a long chain fatty acyl-CoA synthetase. *Febs Lett.* 2003 Apr 10;**540** (1-3):251-4.

88 DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology. 9 ed: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, WOLTERS KLUWER; 2011.

89 Lal S, Lauer UM, Niethammer D, Beck JF, Schlegel PG. Suicide genes: past, present and future perspectives. *Immunol Today.* 2000 Jan;**21** (1):48-54.

90 Wildner O, Morris JC, Vahanian NN, Ford H, Ramsey WJ, Blaese RM. Adenoviral vectors capable of replication improve the efficacy of HSVtk/GCV suicide gene therapy of cancer. *Gene Ther.* 1999 Jan;**6** (1):57-62.

91 Akbulut H, Zhang LX, Tang YC, Deisseroth A. Cytotoxic effect of replication-competent adenoviral vectors carrying L-plastin promoter regulated E1A and cytosine deaminase genes in cancers of the breast, ovary and colon. *Cancer Gene Ther.* 2003 May;**10** (5):388-95.

92 Celebi B, Elcin AE, Elcin YM. Proteome Analysis of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *J Proteome Res.* 2010 Oct;**9** (10):5217-27.

93 Celebi B, Elcin YM. Proteome Analysis of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Subcultures. *J Proteome Res.* 2009 May;**8** (5):2164-72.

94 Elçin YM. Tissue Engineering, Stem Cells and Gene Therapies, Advances in Experimental Medicine and Biology Series NY and London, Kluwer Academic-Plenum Press; 2003.

95 Sasportas LS, Kasmieh R, Wakimoto H, et al. Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. *P Natl Acad Sci USA.* 2009 Mar 24;**106** (12):4822-7.

96 Gao P, Ding Q, Wu Z, Jiang HW, Fang ZJ. Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse xenograft model of renal cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2010 Apr 28;**290** (2):157-66.

97 Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D, Janes SM. Mesenchymal Stem Cell Delivery of TRAIL Can Eliminate Metastatic Cancer. *Cancer Res.* 2009 May 15;**69** (10):4134-42.

- 98 Stagg J, Lejeune L, Paquin A, Galipeau J. Marrow stromal cells for interleukin-2 delivery in cancer immunotherapy. *Hum Gene Ther.* 2004 Jun;**15** (6):597-608.
- 99 Huang Q, Liu XZ, Kang CS, Wang GX, Zhong Y, Pu PY. The anti-glioma effect of suicide gene therapy using BMSC expressing HSV/TK combined with overexpression of Cx43 in glioma cells. *Cancer Gene Ther.* 2010 Mar;**17** (3):192-202.
- 100 Kucerova L, Altanerova V, Matuskova M, Tyciakova S, Altaner C. Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer Res.* 2007 Jul 1;**67** (13):6304-13.
- 101 Matuskova M, Hlubinova K, Pastorakova A, et al. HSV-tk expressing mesenchymal stem cells exert bystander effect on human glioblastoma cells. *Cancer Lett.* 2010 Apr 1;**290** (1):58-67.
- 102 Chuang CK, Sung LY, Hwang SM, Lo WH, Chen HC, Hu YC. Baculovirus as a new gene delivery vector for stem cell engineering and bone tissue engineering. *Gene Ther.* 2007 Oct;**14** (19):1417-24.
- 103 Bak XY, Yang J, Wang S. Baculovirus-transduced bone marrow mesenchymal stem cells for systemic cancer therapy. *Cancer Gene Ther.* 2010 Oct;**17** (10):721-9.
- 104 Chuang CK, Wong TH, Hwang SM, et al. Baculovirus Transduction of Mesenchymal Stem Cells: In Vitro Responses and In Vivo Immune Responses After Cell Transplantation. *Mol Ther.* 2009 May;**17** (5):889-96.
- 105 Figlin R, Gitlitz B, Franklin J, et al. Interleukin-2-based immunotherapy for the treatment of metastatic renal cell carcinoma: An analysis of 203 consecutively treated patients. *Cancer J Sci Am.* 1997 Dec;**3**:S92-S7.
- 106 Kadison AS, Morton DL. Immunotherapy of malignant melanoma. *Surg Clin N Am.* 2003 Apr;**83** (2):343-+.
- 107 Hanna MG, Hoover HC, Vermorken JB, Harris JE, Pinedo HM. Adjuvant active specific immunotherapy of stage II and stage III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: first randomized phase III trials show promise. *Vaccine.* 2001 Mar 21;**19** (17-19):2576-82.
- 108 Schmitz M, Bornhauser M, Ockert D, Rieber EP. Cancer immunotherapy: novel strategies and clinical experiences. *Trends Immunol* 2002;**23**:428-9.
- 109 Zitvogel L, Robbins PD, Storkus WJ, et al. Interleukin-12 and B7.1 co-stimulation cooperate in the induction of effective antitumor immunity and therapy of established tumors. *Eur J Immunol.* 1996 Jun;**26** (6):1335-41.
- 110 Wu TC, Huang AYC, Jaffee EM, Levitsky HI, Pardoll DM. A Reassessment of the Role of B7-1 Expression in Tumor Rejection. *J Exp Med.* 1995 Nov 1;**182** (5):1415-21.
- 111 Matzinger P. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annu Rev Immunol.* 1994;**12**:991-1045.

- 112 Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;**18**:767-+.
- 113 Shi Y, Zheng WY, Rock KL. Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses. *P Natl Acad Sci USA.* 2000 Dec 19;**97** (26):14590-5.
- 114 Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol.* 2000 Nov;**12** (11):1539-46.
- 115 Kotera Y, Shimizu K, Mule JJ. Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen (s) in dendritic cell-based immunization. *Cancer Res.* 2001 Nov 15;**61** (22):8105-9.
- 116 Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: Exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med.* 2000 Feb 7;**191** (3):423-33.
- 117 Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 1999 Jul 30;**285** (5428):727-9.
- 118 Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature.* 2001 Sep 13;**413** (6852):165-71.
- 119 Feng HP, Zeng Y, Graner MW, Katsanis E. Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells. *Blood.* 2002 Dec 1;**100** (12):4108-15.
- 120 Schnurr M, Scholz C, Rothenfusser S, et al. Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gamma delta T cells. *Cancer Res.* 2002 Apr 15;**62** (8):2347-52.
- 121 Barba D, Hardin J, Sadelain M, Gage FH. Development of Antitumor Immunity Following Thymidine Kinase-Mediated Killing of Experimental Brain-Tumors. *P Natl Acad Sci USA.* 1994 May 10;**91** (10):4348-52.
- 122 Ramesh R, Munshi A, Abboud CN, Marrogi AJ, Freeman SM. Expression of costimulatory molecules: B7 and ICAM up-regulation after treatment with a suicide gene. *Cancer Gene Ther.* 1996 Nov-Dec;**3** (6):373-84.
- 123 Carlbring J, Shaif-Muthana M, Sisley K, Rennie IG, Murray AK. Apoptotic cell death in conjunction with CD80 costimulation confers uveal melanoma cells with ability to induce immune responses. *Immunology.* 2003;**109**:41-8.
- 124 Pierrefite-Carle V, Baque P, Gavelli A, et al. Cytosine deaminase/5-fluorocytosine-based vaccination against liver tumors: Evidence of distant bystander effect. *J Natl Cancer I.* 1999 Dec 1;**91** (23):2014-9.
- 125 Cao X, Ju DW, Tao Q, et al. Adenovirus-mediated GM-CSF gene and cytosine deaminase gene transfer followed by 5-fluorocytosine administration elicit more potent antitumor response in tumor-bearing mice. *Gene Ther.* 1998 Aug;**5** (8):1130-6.

126 Yeni dünya kanser istatistikleri yayınlandı. [cited; Available from: <http://kanser.gov.tr/haberler/856-yeni-dunya-kanser-istatistikleri->

127 Harrington K, Alvarez-Vallina L, Crittenden M, et al. Cells as vehicles for cancer gene therapy: The missing link between targeted vectors and systemic delivery? *Hum Gene Ther.* 2002 Jul;**13** (11):1263-80.

128 Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, et al. Mesenchymal stem cells: Potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer I.* 2004 Nov 3;**96** (21):1593-603.

129 Dennis JE, Cohen N, Goldberg VM, Caplan AI. Targeted delivery of progenitor cells for cartilage repair. *J Orthopaed Res.* 2004 Jul;**22** (4):735-41.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Sedef Hande AKTAŞ

Doğum Yeri: Eskişehir

Doğum Tarihi: 13.10.1982

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Gazi Lisesi / Eskişehir

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Y.lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

İş Tecrübesi

Kurumu: Özel Sektör- Kronik Yara Organizasyonu

Görevi: Ürün Müdürü

Yılları: Mayıs 2006-Kasım 2007

Kurumu: TÜBİTAK- Hacettepe Üniversitesi

Görevi: Bursiyer (1001 Projesi kapsamında)

Yılları: Ocak 2009-Ekim 2009

Kurumu: TÜBİTAK- Ankara Üniversitesi

Görevi: Bursiyer (1001 Projesi kapsamında)

Yılları: Kasım 2011-Ocak 2014

Kurumu: Ankara Üniversitesi

Görevi: Biyolog

Yılları: Ağustos 2014-...

Yayınlar

SCI'da Yer Alan Makaleler:

Aktas SH, Akbulut H, Akgun N, İcli F. Low dose chemotherapeutic drugs without overt cytotoxic effects decrease the secretion of VEGF by cultured human tumor cells: A tentative relationship between drug type and tumor cell type response. *Cancer Biomarkers* 2013

Akbulut KG, Guney S, Cetin F, Akgun N, **Aktas SH**, Akbulut H. Melatonin delays brain aging by decreasing nitric oxide. *Neurophysiology* 2012

Kazime Gonca Akbulut, **Sedef Hande Aktaş**, Hakan Akbulut. The role of melatonin, sirtuin 2 and FoxO1 transcription factor in the aging process of colon in male rats. *Biogerontology*. 2014 (Kabul edildi).

Hakemli Dergilerde Yer Alan Makaleler:

Sedef Hande Aktaş, Hakan Akbulut. Kolorektal kanserde anjiyogenez ve anti-anjiyogenik tedaviler. *Türk Onkoloji Dergisi*. 2014, Cilt 29, Sayı 2, Sayfa (lar) 067-079

Kitap bölümü

Aktaş SH, Baydın P, Akbulut H. Kanserde Gen tedavisi. *Medikal Onkoloji Ders Kitabı*. Ed. Altınbaş M. DNT Ortadoğu Yayıncılık, Ankara, 2013.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Aktas SH, Akbulut H, Akgun N. The Chemotherapeutic Drugs at the Metronomic Doses Decrease Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Secretion of Solid Tumors. *Drug Metabolism Reviews* 2010;42:162-163. 9th International Meeting of the International-Society-for-the-Study-of-Xenobiotics (ISSX), İstanbul. SEP 04-08, 2010

Aktas SH, Akbulut H, Elçin M, Coleri A, Akgun N, İcli F. Kolon Kanseri Gen Tedavisinde Baculoviral Vektörler. I.Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Kongresi, 30 Ekim – 3 Kasım 2013, Çeşme

Proje/ kurs /sempozyum

Proje:

İnsan Bütiril kolin esterazında yapı ligand bağlama ilişkilerinin bölge yönelimli mutagenез yaklaşımı ile incelenmesi (TÜBİTAK Projesi; SBAG) (Yürütücü: Doç. Dr. Özden Tacal, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya ABD) (Görev:Bursiyer). (1.11.2008 – 1.2.2009)

Mezenkimal kök hücrelerle intihar gen tedavisi (TÜBİTAK Projesi; SBAG 111S241) (Yürütücü: Prof. Dr. Hakan Akbulut, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı) (Görev: Bursiyer). (1.11.2011 – 31.10.2013)

Rutin tedavi olarak Bevasizumab kullanılan metastatik kolorektal kanserli hastalarda VEGF ve VEGF düzeylerinin klinik önemi (Yürütücü: Prof. Dr. Hakan AKBULUT, Görev:Araştırmacı) 24.05.2013-...

Kurs/sertifika:

Ankara Üniversitesi – Alman Akademik Programı (DAAD) İşbirliği Almanca Kursu Bursları, 25.09.2008 - 31.12.2008

İç Hastalıkları Mezuniyet Sonrası Eğitim Derneği (Temel Onkoloji kursu), Ankara, 13.06.09

Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi, 21-29 Aralık 2009

I.Ulusal Mezenkimal Kök Hücre Sempozyumu, Mezenkimal Kök Hücre Kültürü Kursu, 5-6 Şubat 2010 Eskişehir

II. Hücre Ölümü Araştırma Teknikleri Teorik Kursu- Hücre Ölümü Derneği. 1-2 Kasım 2012 Eskişehir

II.Hücre Ölümü Araştırma Teknikleri Teorik Kursu, 1-2 Kasım 2012

Sempozyum/sertifika:

Symbiose- Uluslararası Katılımlı Biyoloji Öğrencileri Sempozyumu- 02.08.06- 14.08.06, Ancona, İTALYA

Ankara Üniversitesi, 6.Ankara Biyoteknoloji Günleri, 15-17 Kasım 2007, Ankara

Temel Onkolojide Güncel Gelişmeler, Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü 23.05.09

IV. Kök Hücre Sempozyumu, 26.06.09, Ankara

I.Ulusal Mezenkimal Kök Hücre Sempozyumu, 5-6 Şubat 2010, Eskişehir

Uluslararası Katılımlı 1.Hücre lm Araştırma Kongresi, 30 Ekim-3 Kasım 2013

ÖDÜLLER:

TÜBİTAK niversite GiriŐimcilik ve Yenilikçilik Yarışması 2.lık dl- 26 Haziran 2014

DiğER-

DS: Alınan puan 86,250

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR

Aktas SH, Akbulut H, Elçin M, Coleri A, Akgun N, İcli F. Kolon Kanseri Gen Tedavisinde Bakuloviral Vektörler. I.Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Kongresi, 30 Ekim – 3 Kasım 2013, Çeşme

KOLON KANSERİ GEN TEDAVİSİNDE BAKULOVİRAL VEKTÖRLER

¹Sedef Hande Aktaş ¹Hakan Akbulut, ¹Fikri İçli, ²Murat Elçin, ³Arzu Çöleri

Ankara Üniversitesi ¹Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı; Fen Fakültesi ²Biyokimya ve ³Biyoloji Bölümleri, Ankara

GİRİŞ ve AMAÇ

Gen tedavisi kanserde ümit vadeden tedavi yöntemlerinden biridir. Bu amaçla başta adenovirüsler olmak üzere değişik viral vektörler terapötik genleri tümör hücrelerine taşımak için kullanılmaktadır. Memeli hücrelerine toksik etkilerinin bulunmaması nedeniyle bakulovirüsler kanser gen tedavisinde potansiyel vektörler olarak önem kazanmaktadır.

YÖNTEM

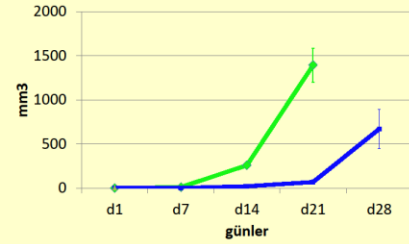
Bu çalışmada inşa ettiğimiz rekombinant bakuloviral vektörleri kanser gen tedavisi çalışmalarında kullanılmak üzere memeli tümörlerinde test etmeyi amaçladık. Polihedrin ve CMV promotorları ile düzenlenen terapötik (sitozin deaminaz) ve reporter genler (GFP) taşıyan bakuloviral vektörler inşa edildi.

BULGULAR

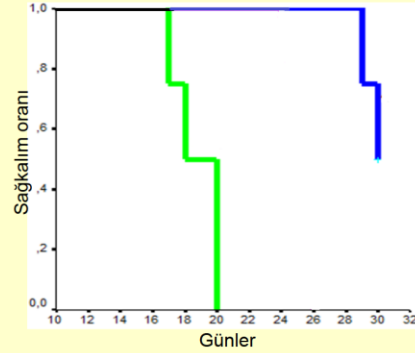
Bv-Ph-GFP vektörü ile enfekte olan böcek hücrelerinde (Sf-9) belirgin GFP-ekspresyonu izlenirken memeli hücrelerinde (HEK293, CRL2638 kolon kanseri hücre hattı) izlenmedi. Buna karşılık CMV promotoru taşıyan vektör ile enfekte edildiğinde hem böcek ve hem de memeli hücrelerinde GFP ekspresyonu izlendi. Sitozin deaminaz (CD) intihar geni taşıyan bakuloviral vektör kolon kanseri hücrelerinde 5-florositozin varlığında belirgin bir sitotoksiteye neden olurken 5-FC verilmeyen hücrelerde herhangi bir sitotoksik etki gözlenmemiştir. BalBc farelerde oluşturulan kolon kanseri modelinde CMV promotoru taşıyan rekombinant bakuloviral vektörler hem tümör gelişimini anlamlı olarak yavaşlatmış ($p<0.001$) ve hem de belirgin sağkalım avantajı sağlamıştır ($p<0.012$).

SONUÇ

Bu sonuçlar inşa ettiğimiz CMV promotoru ve sitozin deaminaz geni taşıyan bakuloviral vektörlerin kanser tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir.



Şekil 1. Tümör büyüme eğrileri



Şekil 2. Sağkalım eğrileri

Low dose chemotherapeutic drugs without overt cytotoxic effects decrease the secretion of VEGF by cultured human tumor cells: A tentative relationship between drug type and tumor cell type response

Sedef Hande Aktas, Hakan Akbulut*, Nalan Akgun and Fikri Icli
Department of Medical Oncology, Ankara University School of Medicine, Ankara, Turkey

Abstract.

BACKGROUND: The metronomic use of chemotherapeutic drugs is presumed to have anti-angiogenic effect. In the current study, we aimed to test the effects of lower doses of cytotoxic agents on VEGF secretion from tumor cell lines.

METHODS: We tested the cytotoxic effects of widely used chemotherapeutic drugs including 5-fluorouracil, irinotecan, oxaliplatin, paclitaxel and docetaxel in tumor cell lines, MCF-7 (human breast cancer cell line) HT-29 (human colon cancer cell line) and a primary gastric cancer cell line and calculated the IC₅₀ values. We've also assayed the effects of the lower doses of chemotherapeutic drugs on the levels of VEGF secreted by tumor cells *in vitro*.

RESULTS: The human primary gastric cancer cells were more resistant to 5-FU and oxaliplatin than the HT29 and MCF-7 cell lines ($p < 0.001$). No significant differences were noticed in terms of the IC₅₀ values of the irinotecan, docetaxel and paclitaxel among the studied tumor cell lines ($p > 0.05$). The test drugs yielded significant decreases in VEGF levels at the doses of $-2 \log$ of IC₅₀ values in MCF-7 and primary gastric cancer cell lines. While 5-fluorouracil did not inhibit the VEGF secretion of HT-29 cell line, irinotecan, oxaliplatin, docetaxel and paclitaxel significantly decreased the levels of secreted VEGF.

CONCLUSIONS: Our results suggest that lower doses of chemotherapeutic drugs decrease VEGF secretion from tumor cells without causing substantial cell killing. The data suggest the occurrence of a kind of selective drug-tumor cell type relationship.

Keywords: 5-fluorouracil, irinotecan, oxaliplatin, paclitaxel, docetaxel, VEGF, IC₅₀, gastric cancer

1. Introduction

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-pathway play a crucial role in the growth of new vessels. For the last 20 years targeting angiogenesis, especially VEGF and VEGF pathway, have been the focus of research on angiogenesis-targeted therapies for cancer. The monoclonal antibodies binding VEGF

or small molecules inhibiting VEGF receptor tyrosine kinases have improved the treatment outcomes in a variety of solid tumors [1].

The chemotherapeutic drugs are conventionally used at or near the maximum tolerated doses which are usually cytotoxic to tumor cells. Previously, it has been shown that chemotherapeutic agents could induce endothelial cell (EC) apoptosis or decrease the number of circulating ECs [2]. The microtubule-interfering agents such as vinblastine, paclitaxel and docetaxel might decrease VEGF expression [3,4]. However, when used at the cytotoxic levels, paclitaxel has been reported to induce VEGF expression through reactive oxygen species

* Corresponding author: Dr. Hakan Akbulut, Department of Medical Oncology, Ankara University School of Medicine, Ankara 06100, Turkey. Tel.: +90 312 395 7712; Fax: +90 312 319 2283; E-mail: akbulut@medicine.ankara.edu.tr.

Melatonin Delays Brain Aging by Decreasing the Nitric Oxide Level

K. G. Akbulut¹, S. Guney¹, F. Cetin¹, H. N. Akgun²,
S. H. Aktas², and H. Akbulut²

Received November 12, 2012.

Aging is believed to be a first-order risk factor for most neurodegenerative disorders. The neuronal cell loss that occurs with aging has been partly attributed to increased production of nitric oxide and high caspase activity. Melatonin (MLT) might have a role in the regulation of nitric oxide in the brain. We investigated the effects of MLT on the nitrite/nitrate levels and caspase-3 enzyme activity in the frontal cortex, temporal cortex, and hippocampus of young and aged rats. There was no significant difference between the nitrite levels in the frontal cortex and hippocampus of young and aged animals. In the temporal cortex of aged rats, the nitrite level, however, was significantly higher ($P < 0.001$). In the aged group, MLT significantly decreased these levels in the brain regions. Caspase-3 enzyme activity in the temporal and frontal cortices was significantly higher in aged rats when compared to the control group ($P < 0.05$). Melatonin did not cause significant changes in caspase-3 activity in any brain region of both young and aged rats. Thus, brain regions demonstrate different caspase-3 enzyme activities and nitrite levels in the aging process. Exogenous MLT administration might delay brain aging (by moderation of death of neurons and glia) via decreasing the nitrite/nitrate level.

Keywords: aging, caspase-3, melatonin, nitric oxide, temporal cortex, frontal cortex, hippocampus.

INTRODUCTION

Aging is one of the risk factors for the neurodegenerative diseases [1]. Recently, it was reported that aging is accompanied by the development of some inflammatory processes at the tissue level in different parts of the body and in the brain in particular [2]. Aging intensifies the glial cell activity in the brain [3], and the number of abnormal astrocytes increases with aging [4]. The increased apoptotic cell death of astrocytes observed in neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, is consistent with these findings [5]. Likewise, increased activity of caspase-3 and

caspase-9 involved in the process of apoptosis has been reported in neurodegenerative disorders, like Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's disease [6, 7].

The existence of nitric oxide synthase (NOS)-containing neurons in the cerebral cortex, cerebellum, hippocampus, and hypothalamus suggests a possible role of nitric oxide (NO) in the oxidative-antioxidative processes, apoptosis, and aging of the brain [8, 9]. Nitric oxide can behave either as a free-radical precursor or an antioxidant and neuroprotective agent [10]. Depending on its local concentration and cell type, NO can be an agent promoting either apoptosis or cell survival. Inhibition/induction of apoptosis by NO is mediated by downstream caspases, including caspase-3 [11].

Reactive oxygen and nitrogen species (ROSs and RNSs), potent inducers of oxidative damage, have been shown to trigger apoptosis [12]. Accordingly, antioxidant treatment was shown to decrease the rate of this process [13]. Superoxide and hydroxyl radicals and NO might also be related to aging and, in particular, aging-related loss of cognitive functions in humans [14].

Melatonin (MLT) demonstrates a wide range of

¹ Gazi University School of Medicine, Department of Physiology, Ankara, Turkey.

² Ankara University School of Medicine, Department of Medical Oncology, Ankara, Turkey.

Correspondence should be addressed to

K. G. Akbulut (e-mail: kgakbulut@yahoo.com),

S. Guney (e-mail: sguney@gazi.edu.tr),

F. Cetin (e-mail: farihan.cetin@izmir.edu.tr),

H. N. Akgun (e-mail: akgun.hmalan@hotmail.com),

S. H. Aktas (e-mail: handsenfox@yahoo.com), or

H. Akbulut (e-mail: akbulut@medicines.ankara.edu.tr).