

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

MEME KANSERİ GEN TEDAVİSİNDE
NANOPARTİKÜLER NÜKLEİK ASİT TAŞIYICI
SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Feride ÖNER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2018-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

MEME KANSERİ GEN TEDAVİSİNDE
NANOPARTİKÜLER NÜKLEİK ASİT TAŞIYICI
SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Feride ÖNER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Devrim DEMİR DORA

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2018 - ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Tıbbi Farmakoloji Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 03/01/2018

İmza

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Devrim DEMİR DORA
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Coşkun USTA
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehmet Kürşat DERİCİ
Hitit Üniversitesi



Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun...../...../..... tarih ve/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

EnstitüMüdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Feride ÖNER

İmza

Yrd. Doç. Dr. Devrim DEMİR DORA

İmza

ÖZET

Amaç: Bu tez çalışmasında, doğal ve sentetik polimerler ile, üçlü negatif meme kanserinin tedavisinde kullanılabilecek yeni bir viral olmayan nanopartiküler nükleik asit taşıyıcı sistemin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Üçlü negatif 4T1 fare meme kanseri hücresinde STAT-3 geninin ekspresyonunu baskılayabilecek shRNA kodlayan plazmit DNA (pDNA)'nın etkin bir şekilde aktarılabilmesi için doğal ve sentetik polimerler ile nükleik asit taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı doğal kitosan polimerleri ile kitosan nanopartikülleri hazırlanmıştır. Düşük molekül ağırlıklı (doğrusal) ve yüksek molekül ağırlıklı (dallanmış) sentetik polietilenimin polimerleri ile polipleks taşıyıcı sistemleri hazırlanmıştır. Hazırlanan nükleik asit taşıyıcı sistemlerin partikül boyutu ve yüzey yükü ölçülerek fizikokimyasal karakterizasyonları yapılmıştır. Nükleik asit taşıyıcı sistemlerin serum stabilitesi, sitotoksitesi, transfeksiyon etkinliği ve meme kanseri hücrelerinin migrasyonu üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

Bulgular: Farklı oranlarda polietilenimin kullanılarak hazırlanan doğrusal ve dallanmış polipleksler ile 4T1 metastatik meme kanseri hücresine transfeksiyon sağlanmıştır. Dallanmış PEI ile 2:1 (a:a) polimer:DNA oranında hazırlanmış, 237 nm partikül boyutu ve +21.9 mv zeta potansiyel değerlerine sahip B2S kodlu polipleks, en etkin nükleik asit taşıyıcı sistem olarak bulunmuştur. B2S kodlu polipleks formülasyonunun heterojen hücre yapısına (yuvarlak ve iğsi) sahip üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde fibroblast hücrelerinin hareketini önlediği, yuvarlak hücrelerin ise kohezyonunu artırarak agregasyonu sağladığı gözlemlenmiştir.

Sonuç: Dallanmış ve doğrusal polietilenimin polipleksleri nükleik asitlerin stabil ve etkin bir şekilde 4T1 meme kanseri hücrelerine aktarılması için uygun taşıyıcı sistemlerdir. Üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde STAT-3 geninin ekspresyonunun baskılanması kanser hücrelerinin migrasyon hızını yavaşlatmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Üçlü negatif meme kanseri, STAT-3, 4T1 hücresi, polietilenimin, polipleks, kitosan nanopartikül, shRNA, pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA

ABSTRACT

Objective: In this thesis, it is aimed to develop a novel non-viral gene therapy agent which can be used in the treatment of triple negative breast cancer with natural and synthetic polymers.

Method: Nucleic acid delivery systems have been developed with natural and synthetic polymers for efficient transfection of plasmid DNA which encodes shRNA for silencing of STAT-3 gene expression in 4T1 triple negative mouse breast cancer cells. Chitosan nanoparticles with low, medium and high molecular weight natural chitosan polymers and polyplex delivery systems with low (linear) and high (branched) molecular weight synthetic polyethylenimine polymers were prepared. Physicochemical characterization was done by measuring of particle size and zeta potential of the developed nucleic acid delivery systems. The effect of nucleic acid delivery systems on serum stability, cell proliferation, transfection efficiency and cell migration of breast cancer was evaluated.

Results: Transfection to 4T1 metastatic breast cancer cells was achieved with linear and branched polyplexes prepared at different polyethylenimine ratios. It was found that the B2S coded polyplex, which has 237 nm particle size and +21.9 mv zeta potential value and was prepared with the branched PEI at a ratio of 2:1 (w:w) polymer: DNA, was the most effective nucleic acid delivery system. It was observed that the B2S coded polyplex formulation prevented the movement of fibroblast cells in triple negative breast cancer cells which have heterogeneous cell structure (round and spindle), while it provided aggregation by increasing cohesion in the rounded cancer cells.

Conclusion: The branched and linear polyethylenimine polyplexes can be used for transfection of nucleic acids. In triple negative breast cancer, suppression of the expression of the STAT-3 gene decelerates the migration rate of cells.

Key words: Triple negative breast cancer, STAT-3, 4T1 cell, polyethylenimine polyplex, chitosan nanoparticle, shRNA, pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kanser	2
2.1.1. STAT Gen Ailesi ve Kanserdeki Rolü	3
2.1.2. Meme Kanseri	6
2.1.3. Meme Kanserinde STAT3' ün Rolü	8
2.2. Gen Tedavisi	11
2.3. Gen Tedavisi Stratejileri	13
2.3.1. Antisens Teknolojisi	13
2.4. Gen Tedavisinde Kullanılan Taşıyıcı Sistemler	16
2.4.1. Viral vektörler	17
2.4.2. Viral Olmayan Vektörler	19

2.5. Polimer Yapısındaki Nükleik Asit Taşıyıcı Sistemler	22
2.5.1. Kitosan Nanopartiküller	24
2.5.2. Polietilenimin Polipleksler	26
3.GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar	28
3.1.1. Kullanılan Biyolojik Materyaller	28
3.1.2 Kullanılan Cihazlar	30
3.2. Genetik Materyalin Elde Edilmesi	31
3.2.1. Bakteri Hücrelerinin Katı Besi Yerine Ekimi ve Tek Koloni Seçimi	31
3.2.2. LV-RFP pDNA İzolasyonu	32
3.2.3. pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA İzolasyonu	33
3.3. Genetik Materyallerin Karakterizasyonu	34
3.3.1. Plazmit DNA'nın Saflığının ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi	35
3.3.2. Elektroforetik Hareketin Değerlendirilmesi	35
3.3.3. Restriksiyon Enzim Analizi ile pDNA'nın Doğrulanması	35
3.4. Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması	36
3.4.1. Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması	37
3.4.2. Kitosan Nanopartikül -pDNA Komplekslerinin Hazırlanması	38
3.4.3. Polietilenimin ile Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması	38
3.4.4. Polietilenimin-pDNA Poliplekslerinin Hazırlanması	39

3.5. Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu	39
3.5.1. Taşıyıcı Sistemlerin Yüklerinin ve Boyutlarının Ölçülmesi	39
3.5.2. Taşıyıcı Sistemlerin Serum İçerisindeki Stabilitelerinin Değerlendirilmesi	40
3.5.3. Taşıyıcı Sistemlerin Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi	40
3.6. Transfeksiyon Çalışmaları	41
3.6.1. Hücrelerin Pasajlanması	42
3.6.2. Hücrelerin Dondurulması	42
3.6.3. Hücrelerin Sayımı	42
3.6.4. pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA'sının Transfeksiyonu İçin Optimum Puromisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	43
3.7. Hücrenin Migrasyon Hızının Değerlendirilmesi	44
4. BULGULAR	46
4.1. Genetik Materyalin Eldesi ve Karakterizasyonu	46
4.1.1. Plazmit DNA'nın Saflığının ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi	46
4.1.2. Elektroforetik Hareketin Değerlendirilmesi ve Restriksiyon Enzim Analizi	46
4.2. Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması	47
4.2.1. Kitosan Nanopartikül-pDNA Kompleks Oluşumunun Değerlendirilmesi	47
4.2.2. Polietilenimin-pDNA Polileks Oluşumunun Değerlendirilmesi	50
4.3. Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu	52
4.3.1. Taşıyıcı Sistemlerin Partikül Boyutlarının ve Yüklerinin Ölçülmesi	52

4.3.2. Taşıyıcı Sistemlerin Sitotoksitelerinin Değerlendirilmesi	54
4.3.3. Taşıyıcı Sistemlerin Serum Stabilitelerinin Değerlendirilmesi	55
4.4. Taşıyıcı Sistemlerin Transfeksiyon Etkinliklerinin Değerlendirilmesi	57
4.4.1. pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA ile Hazırlanan Poliplekslerin Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	61
4.5. Hücrenin Migrasyonunun (Yara İyileşmesinin) Değerlendirilmesi	64
5. TARTIŞMA	70
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	91

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Analizlerde kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları	30
Tablo 3.2. Alkali Lizis yönteminde kullanılan çözeltiler	32
Tablo 3.3. Kitosan nanopartiküllerinin hazırlandığı oranlar	38
Tablo 3.4. Polietilenimin ve pDNA polipekslerinin hazırlandığı oranlar (a:a)	39
Tablo 3.5. Hazırlanan polietilenimin:pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA kompleksleri	45
Tablo 3.6. Kullanılan dallanmış ve doğrusal polietilenimin miktarları	45
Tablo 4.1. Düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı kitosan nanopartikülleri ve kitosan-pDNA komplekslerinin boyut ve yük değerleri	53
Tablo 4.2. Dallanmış ve doğrusal polietilenimin ve polietilenimin-pDNA komplekslerinin boyut ve yük değerleri	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Tümör invazyon ve metastazında STAT3 yolağı	5
Şekil 2.2. a) 4T1 fare meme kanseri hücre dizisi; b) MCF-7 insan meme kanseri hücre dizisi (https://www.moleculardevices.com/cell-counter-mcf-7-cells); c) MDA-MB 231 insan meme kanseri hücre dizisi morfolojik görüntüleri	9
Şekil 2.3. STAT3'ün sağlıklı ve kanserli meme hücrelerinde aktivasyon yolağı	10
Şekil 2.4. Gen taşıyıcı sistemlerin hücre içine alım mekanizması	15
Şekil 2.5. shRNA'nın gen susturma mekanizması	16
Şekil 2.6. Dendrimer yapısı	23
Şekil 2.7. Polimerik nanopartikül yapısı	24
Şekil 2.8. Kitosanın yapısal formülü	24
Şekil 2.9. İyonik jelasyon yöntemi ile kitosan partiküllerinin oluşumunun şematik olarak gösterimi	26
Şekil 2.10. Polietilenimin/pDNA polipleksinin şematik gösterimi	26
Şekil 2.11. Doğrusal (a) ve dallanmış (b) polietilenimin yapısal formülü	27
Şekil 3.1. LV-RFP plazmit DNA vektör haritası	29
Şekil 3.2. pSIH1-puro-STAT3 shRNA plazmit DNA vektör haritası	29
Şekil 4.1. Restriksiyon enzim kesimi yapılan pSIH1- puro-STAT3 shRNA pDNA'nın agaroz jel elektroforez fotoğrafı	47
Şekil 4.2. Restriksiyon enzim kesimi yapılan LV-RFP pDNA'nın agaroz jel elektroforez fotoğrafı	47

Şekil 4.3. D33:pDNA kompleks oluşumunun agaroz jel elektroforez fotoğrafı	48
Şekil 4.4. O33:pDNA kompleks oluşumunun agaroz jel elektroforezi fotoğrafı	49
Şekil 4.5. Y33:pDNA kompleks oluşumunun agaroz jel elektroforezi fotoğrafı	49
Şekil 4.6. Doğrusal polietilenimin:pDNA poliplekslerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı	50
Şekil 4.7. Dallanmış polietilenimin:pDNA poliplekslerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı	51
Şekil 4.8. Dallanmış ve doğrusal polietilenimin:STAT3 shRNA pDNA poliplekslerinin agaroz jel elektroforezi fotoğrafı	52
Şekil 4.9. Poliplekslerin hücre proliferasyonuna etkisi (n=3)	55
Şekil 4.10. Poliplekslerin 30 dk boyunca serum içerisindeki stabilitelerini gösteren agaroz jel elektroforezi fotoğrafı	56
Şekil 4.11. Poliplekslerin 4 saat boyunca serum içerisindeki stabilitelerini gösteren agaroz jel elektroforezi fotoğrafı	57
Şekil 4.12. Çıplak LV-RFP pDNA ile transfekte edilen 4T1 hücresine ait floresan mikroskop fotoğrafları	58
Şekil 4.13. Dallanmış polietilenimin ve LV-RFP pDNA'sı ile hazırlanmış polipleksler ile transfekte edilen 4T1 hücresine ait floresan mikroskop fotoğrafları	59
Şekil 4.14. Doğrusal polietilenimin ve LV-RFP pDNA'sı ile hazırlanmış polipleksler ile transfekte edilen 4T1 hücresine ait floresan mikroskop fotoğrafları	60
Şekil 4.15. 4T1 meme kanseri hücrelerinde puromisin konsantrasyonuna bağlı hücre canlılığı	61

- Şekil 4.16.** Dallanmış polietilenimin ve pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA'sı ile hazırlanmış polipleksler ile transfekte edilen 4T1 hücrelerine ait ışık mikroskobu fotoğrafları (K: Kontrol) 62
- Şekil 4.17.** Doğrusal polietilenimin ve pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA'sı ile hazırlanmış polipleksler ile transfekte edilen 4T1 hücrelerine ait ışık mikroskobu fotoğrafları (K: Kontrol) 63
- Şekil 4.18.** 4T1 hücrelerinin migrasyonun değerlendirilmesinde kontrol gruplarına ait ışık mikroskobu fotoğrafları (K: Kontrol hücresi, KpDNA: Çıplak pDNA'nın aktarıldığı kontrol hücresi) 65
- Şekil 4.19.** Dallanmış polietilenimin ve pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA'sı ile hazırlanmış polipleksler ile transfekte edilen 4T1 hücrelerinin migrasyonuna ait ışık mikroskobu fotoğrafları 66
- Şekil 4.20.** Doğrusal polietilenimin ve pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA'sı ile hazırlanmış polipleksler ile transfekte edilen 4T1 hücrelerinin migrasyonuna ait ışık mikroskobu fotoğrafları 67
- Şekil 4.21.** Dallanmış polietileniminin 4T1 hücresi migrasyonuna ait ışık mikroskobu fotoğrafları 68
- Şekil 4.22.** Doğrusal polietileniminin 4T1 hücrelerinin migrasyonuna ait ışık mikroskobu fotoğrafları 69

SİMGELER VE KISALTMALAR

ASO	: Antisens Oligonükleotit
APRF	: Akut Faz Yanıt Faktör
BPEI	: Dallanmış Polietilenimin
DMA	: Düşük molekül Ağırlık
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dsRNA	: Çift İplik RNA
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
ER	: Östrojen Reseptör
ERBB1	: Epidermal Büyüme Faktör Reseptör
FBS	: Fetal Sığır Serum
FDA	: Amerika Gıda ve İlaç Kurumu
HER-2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptör- 2
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
HPMA	: N-(2- hidroksipropil)- metakrilamid Kopolimer
IFN	: İnterferon
IFN-γ	: İnterferon gama
IL-6	: İnterlökin-6

IL-12	: İnterlökin -12
Jak	: Janus kinaz
LB	: Luria broth
LIF	: Lösemi İnhibitör Faktör
LPEI	: Doğrusal Polietilenimin
mRNA	: Mesajcı RNA
miRNA	: MikroRNA
MTT	: Metil tiazol-difenil-tetrazolium bromid
NA	: Nükleik Asitler
Na- TPP	: Sodyum tripolifosfat
NF-kb	: Nüklear Faktör- kabba b
OMA	: Orta Molekül Ağırlık
OSM	: Onkostatin M
OSM-R	: OSM-Reseptörü
PAA	: Poliaspartat
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltilisi
PCL	: Polikaprolakton
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	: Polietilen Glikol

PEI	: Polietilenimin
PGA	: Poliglikolik Asit
PLA	: Polilaktik Asit
PLGA	: Poli (D,L- laktit-ko-glikolik) Asit
PR	: Progesteron Reseptör
RES	: Retiküloendotelyal Sistem
RISC	: RNA-İndüklü Susturucu Kompleks
RNA	: Ribonükleik Asit
RNAi	: RNA interferans
shRNA	: Kısa hairpin RNA
siRNA	: Küçük interferans RNA
STAT	: Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü
STAT3	: Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü 3
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
YMA	: Yüksek Molekül Ağırlık

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
A	: Ağırlık
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
bç	: Baz Çifti
dk	: Dakika
g	: Gram
H	: Hacim
L	: Litre
M	: Molarite
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mm³	: Milimetre Küp
mV	: Milivolt
Mw	: Molekül Ağırlık
N	: Normalite
nm	: Nanometre
RCF	: Bağlı Santrifüj Kuvveti
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
V	: Volt

GİRİŞ

Meme kanseri, kanserden kaynaklanan ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alan ve kadınlar arasında en sık görülen kanser tiplerinden birisidir. Yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde bu tümörün moleküler düzeyde özelliklerinin iyi anlaşılması önemli rol oynamaktadır.

Meme kanserinde son yıllarda yapılan çalışmalarla hücrel mekanizmaların aydınlatılması sağlanmaya çalışılmaktadır. Nanoteknoloji alanında meydana gelen ilerlemeler ile nano boyutta akıllı ilaçların ve gen taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi sağlanmıştır. Gen aktarım sisteminde kullanılan sistemler viral ve viral olmayan vektörler olarak iki ayrı grupta değerlendirilmekte olup, viral vektörler ile yapılan çalışmalar sonucu her ne kadar önemli gelişmeler kaydedilse de kısa süreli transgen ekspresyonu ve toksisite gibi önemli problemler nedeniyle bu sistemlere alternatif taşıyıcılar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Viral vektörlerde gözlenen olumsuzluklar nedeniyle, araştırmalar, kolay sentez edilebilme, hücre/dokuya hedeflendirilebilme, düşük immün cevap ve sınırsız büyüklükte plazmid DNA taşıyabilme gibi özelliklere sahip viral olmayan vektörler üzerine yoğunlaşmıştır. Üzerinde en çok araştırma yapılan viral olmayan vektörlerden birisi katyonik özellikte polimerik taşıyıcı sistemler olup, genetik materyali hücre içine taşıyabilmektedir. Katyonik polimerler, sentetik ve doğal polimerler olarak iki grupta incelenir. Doğal polimerlerden kitosan ve sentetik polimerlerden polietilenimin polimerik taşıyıcı sistem olarak hücre içerisine etkin bir şekilde gen aktarımı amacıyla oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, polimerik yapıdaki taşıyıcı sistemler hazırlanarak STAT3 mRNA'sını tanıma ve ona bağlanarak gen ekspresyonunu susturma özelliği olan, STAT3'e özgü kısa hairpin RNA (shRNA) kodlayan pDNA'nın, meme kanseri hücreleri üzerindeki transfeksiyon ve gen susturma etkinliği değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, ileride meme kanseri gen tedavisi için yapılacak olan in vivo deneysel çalışmalara katkı sağlayacaktır

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Günümüzde kanser tüm dünyada ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri haline gelmiştir (Ferlay, Soerjomataram ve ark., 2015). Kanser vakalarının son 20 yılda %70 oranında artacağı Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından rapor edilmiştir (Vago ve ark., 2016). 2015 yılında kanserden ölenlerin sayısı 8.8 milyon kişiye ulaşmıştır. Yaygın olarak erkeklerde akciğer, prostat, kolorektal ve karaciğer kanseri görülürken, kadınlarda ise meme, kolorektal, akciğer, serviks ve mide kanseri görülmektedir. (www.who.int/cancer/en/ Erişim tarihi/ 1 Mayıs 2017).

Kanser, normal hücrelerin fonksiyonlarını değiştiren bir dizi moleküler olaydan kaynaklanır. Kansere hücrelerinde hücrenin aşırı büyümesini kontrol eden ve diğer organlara metastaz yapmasını önleyen sistem hasarlıdır. Bu hücreler büyüdükçe hücre yapısındaki değişiklikler, azalmış hücre adezyonu ve yeni enzim üretimi gibi yeni karakteristik özellikler geliştirirler. Bu tür yeni kazanılan özellikler kanser hücrelerinin yayılmasına ve diğer dokuları istila etmesine neden olur.

İnsan genomundaki yaklaşık 35.000 genin yalnızca küçük bir kısmı kanserle ilişkilendirilmiştir. Aynı gendeki değişiklikler genellikle farklı kanser türleriyle ilişkilidir. Bu hasarlı genler üç gruba ayrılabilir. İlk grup proto-onkogenler; normalde hücre bölünmesini arttıran veya normal hücre ölümünü inhibe eden protein üretirler. Bu genlerin mutasyona uğramış formlarına onkogen denilmektedir. İkinci grup tümör baskılayıcılar; normalde hücre bölünmesini önler veya hücre ölümüne neden olur. Üçüncü grup DNA onarım genleri içerir; kansere yol açan mutasyonları önlemeye yardımcı olur (Gibbs 2003). Kansere gelişiminde onkogenler ve tümör baskılayıcı genler önemli rol oynamaktadır. Bu iki gen grubu birbiriyle denge halindedir. Kanserin meydana gelmesindeki bir diğer faktör çevresel etkenlerdir. Bu kanserojen ajanlardan bazıları X ışınları, UV ışınları, tütün ürünleri ve birçok kimyasal maddelerdir. Apoptozdan kaçış, sürekli anjiogenez, sınırsız çoğalma potansiyeli, doku metastazı ve invazyon yeteneği gibi normal hücrelerde meydana gelen fonksiyonel değişiklikler kanser oluşumu ve yayılımına neden olur (Hanahan ve Weinberg 2000). Kansere

oluşumu; çeşitli yollarda meydana gelen mutasyonlar, gen ekspresyonlarının yanlış, az ya da çok olması gibi fonksiyon değişiklikleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu yollar genellikle sitokinler, büyüme faktörleri ve hücre içi sinyal yolları olabilmektedir. Kanser hücrelerinin immünojenik etki göstermesi nedeniyle (Oettgen 1991); kanserli hücrelere karşı immün yanıtın artırılması; kanser gen tedavisinde yaygın olarak kullanılan IL-12 (interleukin -12) genleri gibi sitokinleri kodlayan genler yoluyla kazandırılabilir (Barajas, Mazzolini ve ark., 2001, Shi, Rakhmievich ve ark., 2002).

2.1.1. STAT Gen Ailesi ve Kanserdeki Rolü

Kanser hücreleri genellikle proliferasyonun gelişmesi, apoptozun azalması ve anormal metabolik aktivite gibi farklı özellikler ile karakterize edilmiştir (Hanahan ve Weinberg 2000, Garay ve Gray 2012). Kanser hücrelerinde meydana gelen bu özelliklerin keşfi sayesinde moleküler mekanizmalar giderek daha açık hale gelmiştir. Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü (Signal Transducer and Activator of Transcription; STAT) proteinleri hücre yaşamının sürdürülmesi, hücre proliferasyonunu uyarma, anjiogenezi uyarma ve hücreleri immün sistemden koruma gibi önemli görevleri bulunan çeşitli proteinlerin ekspresyonunun düzenlenmesinden sorumlu hücre proteinleridir.

STAT ailesi STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olarak adlandırılan yedi üyeden oluşmaktadır. Bu proteinler sitokin, büyüme faktörü veya peptid reseptörlerinden aldıkları sinyaller ile aktive olan ve bu sinyalleri hücre çekirdeğine ileten sitoplazmik transkripsiyon faktörleri olarak fonksiyon görmektedirler (Yu ve Jove 2004, Chai, Shanmugam ve ark., 2016). Aktive olduklarında önce fosforillenmekte sonra da dimerleşerek çekirdeğe yönelmektedirler. Burada hedef genin promotör bölgesine bağlanarak gen ekspresyon değişikliklerine neden olmaktadır.

STAT ailesinin üyeleri fonksiyonlarına göre iki gruba ayrılmaktadır. İlk grup STAT2, STAT4 ve STAT6'dan oluşmaktadır; bunlar az sayıda sitokinler aracılığıyla aktive olurlar ve interferon - γ (IFN- γ) sinyali ve T- hücre gelişimiyle ilgilidir. İkinci grup STAT1, STAT3 ve STAT5 içerir; çeşitli ligandlar aracılığıyla farklı dokularda aktive edilir ve IFN- γ sinyali, meme bezlerinin gelişimi ve embriyogenez ile ilgilidir.

STAT'ların ikinci grubu apoptozu ve hücre siklus progresyonunu kontrol ettiği için onkogeneizde anahtar rol oynamaktadır.

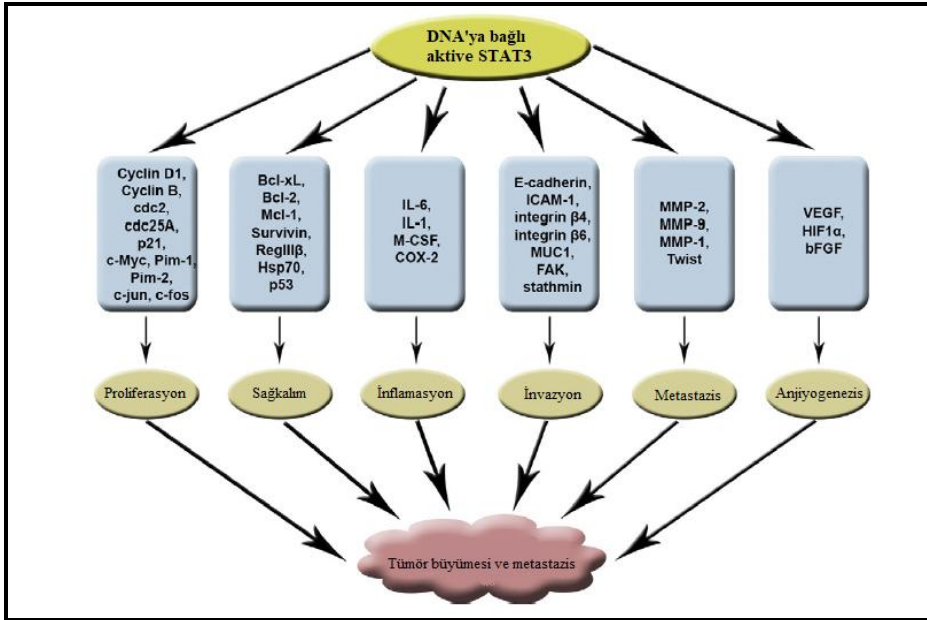
STAT3'ün tümörlerde ve kansere sebep olan hücrelerde yaygın olarak aktive edilmiş olması bu faktörün tümör oluşumu ve ilerlemesinde önemli olduğunu akla getirmektedir. STAT3'ün özellikle kontrolsüz olarak çoğalan, apoptoza dirençli, bağışıklık sisteminden kaçan ve çoğalmayla birlikte anjiyogenezi (damar oluşumunu) uyaran tümör hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği ve hücre sel dönüşüme neden olduğu bilinmektedir (Niu, Bowman ve ark., 2002). Transkripsiyon faktörü STAT3 ayrıca gelişme, farklılaşma, immunité, metabolizma gibi çeşitli fizyolojik prosesleri kontrol eder ve kanser gibi patolojik koşullarda beklenmedik şekilde eksprese edilir. STAT3'ün devamlı olarak aktive olduğu meme, pankreas, prostat, over ve hepatik kanserler gibi birçok solid tümörlerde ve lenfoma ile lösemiler dahil olmak üzere hematopoetik tümörlerin çoğunda gösterilmiştir (Yu ve Jove 2004). Çeşitli tümör tiplerinde hücrelerde yüksek oranda STAT3 hiperaktivitesinin olması, bunun birçok malignitede rol alması, tümör hücrelerinin canlı kalımı için, normal hücrelere oranla STAT3'e daha fazla bağımlı olması bu moleküllü kanser terapisi için uygun bir hedef haline getirmektedir. STAT3'ün kanser hücrelerinin direnç kazanması ve yaşamlarını sürdürmesi üzerindeki rolü, Bcl-2 ve Bcl-xL gibi anti-apoptotik proteinler, vasküler endotelyal büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) gibi birçok onkojen protein ile ilişkisi değişik çalışmalarda incelenmiş, inhibe edilmesi ile birlikte hem kanser hücrelerinin apoptoza uğradığı, hem de kemoterapi direncinin kırıldığı bildirilmiştir (Eroles, Bosch ve ark., 2012).

Kronik inflamasyon ve kanser arasındaki kritik bağlantı major pro-inflamatuvar faktörler olan nüklear faktör kappa B (NF-kb) ve sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3) olarak gösterilmiştir. Bu iki onkogenik transkripsiyon faktörleri tümör oluşumunda anahtar rol oynamaktadır. Ayrıca kanseri tedavi etmek ya da önlemek için potansiyel hedef olarak düşünülebilir (Lin ve Karin 2007).

IL-6 ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi birçok sitokinler ve hepatosit büyüme faktörünün (HGF) fosforilasyonu STAT3'ün aktivasyonuna aracılık etmektedir. Temel

olarak aktive olmuş STAT3 eksprese eden kanser hücreleri apoptoz ve kemoterapiye karşı daha fazla direnç sağlar. Artmış STAT3 aktivasyonu veya aşırı ekspresyon ve uyarım sonucunda tirozin kinazlar kontrolsüz olarak aktive olmakta ve STAT3'ün fosforillenmesine neden olmaktadır. STAT3'ün aktivasyonu sonucunda pro-apoptotik genlerin baskılanması (p53, Bax, Bid), anti-apoptotik genlerin (Bcl-2, Bcl-xL, c-Myc) ise aktivasyonu gerçekleşmektedir. Bu şekilde hücrelerin ölüm yolağına girmesi engellenmektedir. Ayrıca immün yanıt uyaranlarına verilen cevapta da azalma olmakta ve bu da canlılığın sürdürülmesine katkıda bulunmaktadır. Diğer yandan damar endotel büyüme faktörü ekspresyonunda artışla birlikte tümörlü dokuda yeni damar oluşumu uyarılmakta ve tümörün kolayca beslenmesini sağlayan dolaşım koşulları sağlanmaktadır (Siveen, Sikka ve ark., 2014).

Başta viral vektörlerle olmak üzere çeşitli yollarla STAT3 geninin susturulması ile birçok kanser türünden köken alan hücre kültürleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* denemeler yapılmıştır. Bu denemelerin sonucunda STAT3 geninin susturulmasıyla kanser hücrelerinin kemoterapiye duyarlılığının arttığı ve hatta apoptoza uğradığı gösterilmiştir (Spitzner, Roesler ve ark., 2014).



(Siveen, Sikka ve ark., 2014)

Şekil 2.1. Tümör invazyon ve metastazında STAT3 yolağı

2.1.2. Meme Kanseri

Meme kanseri dünyada kadınlarda en sık teşhis edilen ve kadınlar arasında akciğer kanserinden sonra gelen (Siegel, Naishadham ve ark., 2013) kanser ölümlerinin en yaygın nedenlerinden birisidir (Jemal, Bray ve ark., 2011). Meme kanseri morfolojileri, moleküler profilleri, klinik davranışları ve tedaviye yanıtları farklı olan heterojen bir hastalıktır. Meme kanseri; östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör (PR) ve onkogen ERBB2 (HER2) reseptörlerin statüsüne göre ER+, HER2+ (ER-, PR- ve HER2+) ve üçlü negatif meme kanseri (ER-/PR-/HER2-) olarak üç alt grupta sınıflandırılmaktadır (Perou, Sørlie ve ark., 2000). Bu farklı moleküler alt türler hastalığın ilerlemesinde, metastatik yayılım modellerinde ve tedaviye yanıtta farklılık gösterir. Bu nedenle hastaların sınıflandırılması meme kanseri tedavi planlaması için önemlidir (Weigelt, Peterse ve ark., 2005).

Üçlü negatif meme kanseri meme kanseri vakalarının % 15 'ni oluşturur ve insan epidermal büyüme faktör reseptör 2 (HER-2), progesteron reseptör (PR) ve östrojen reseptör (ER) ekspresyonunun eksikliği immünohistokimyasal olarak tanımlanmaktadır (Tan, Marchió ve ark., 2008). Üçlü negatif meme kanseri çoğunlukla bazal benzeri meme kanseri ile eşleştirilir ve üç alt tip arasında en agresif meme tümörlerini temsil eder. Günümüzde mevcut hedeflendirilmiş bir tedavi yöntemi yoktur ve hastalar çoğunlukla sitotoksik olan kemoterapi ile tedavi edilmektedir (Curtis, Shah ve ark., 2012). Üçlü negatif meme kanseri ilk bir iki yıl içerisinde artan insidans hızı ile kötü prognoz sergiler ve hemen hemen tüm metastazlar ilk beş yıl içerisinde gerçekleşir (Dent, Hanna ve ark., 2009, Kennecke, Yerushalmi ve ark., 2010). Beyin ve akciğer dahil tüm iç organlar üçlü negatif meme kanseri tümörlerinde daha sık etkilenir. Üçlü negatif meme kanseri; HER-2 pozitif reseptör ve hormonal reseptör pozitif meme kanserleri ile karşılaştırıldığında terapötik bir hedefin olmaması, prognozun kötü olması ve agresif olması ile karakterizedir (Reis-Filho ve Tutt 2008).

ER+ tümörler luminal alt tip olarak da tanımlanır, meme kanseri vakalarının ~% 70 ni oluşturur. Bu tümörler tipik olarak yüksek düzeyde ER ve PR eksprese eder ve ER'ye bağlı büyüme fenotipi gösterir ve östrojen yoksunluğuna duyarlıdır; tedavi olarak hormonal tedavi kullanılır (Sledge, Mamounas ve ark., 2014). ER+ tümörleri ilk beş

yılda düşük insidans hızı ile en iyi prognaza sahiptir. Fakat bu oran beş yılın sonunda kademeli olarak artar (%40).

HER2+ alt tipi tüm meme kanseri vakalarının %10-15' ni oluşturmaktadır ve reseptör tirozin kinaz (RTK) onkogen ERBB2 ile çalışmaktadır. Bu tümörler klinikte anti-HER2 tedavisine duyarlılık ve ERBB2 gen amplifikasyon/aşırı ekspresyonu ile tedavi edilmektedir HER2+ tümörler de agresif özellik sergiler. Anti-HER2 tedavisinin keşfi hastanın prognozu ve yaşam süresine önemli ölçüde katkı sağlamıştır (Kennecke, Yerushalmi ve ark., 2010).

Meme kanserleri ölümlerinde metastaz birincil nedendir (Weigelt, Peterse ve ark., 2005). Metastaz; kanser hücresinin ilk bulunduğu yerden vücudun farklı organ ve dokularına yayılmasıdır. Meme kanserinin alt türüne bağlı olarak nüksettiği uzak bölgeler; karaciğer, plevra zarı, akciğer, lenf nodları ve beyindir (Kennecke, Yerushalmi ve ark., 2010). Kanser metastazı çok aşamalı bir süreçtir ve bu süreç bir çok hücrel sinyal yolları tarafından etkilenmiştir (Said ve Williams 2011). Meme kanseri metastazında sitokinlerden interleukin-6 (IL-6)'nın ve onkostatın M (OSM)'in önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Queen, Ryan ve ark., 2005, Jorcyk, Holzer ve ark., 2006, Knüpfer ve Preiß 2007). OSM ve IL-6 gp130 ailesinin iki üyesi olup (Kishimoto, Taga ve ark., 1994, Heinrich, Behrmann ve ark., 1998) hücrel olayları akış yönünde etkilemek için Janus Kinaz- Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü (JAK-STAT) sinyal yolağını kullanır (Levy ve Darnell 2002). STAT ailesinin transkripsiyon faktörleri temel biyolojik yanıtları indüklemek ve hücre iletişimine aracılık etmek için büyüme faktörleri ve sitokinleri ters yönde etkiler. Hücre yüzey reseptörüne bağlanan sitokin Janus (Jak) kinaz ailesinin aktivitesiyle sonuçlanır, ki bu da belirli Jak- reseptör kombinasyonuna bağlı olarak sitoplazmada spesifik gizli STAT' ları fosforile eder ve düzenler (Darnell Jr, Kerr ve ark., 1994). Bu yolak hücre farklılaşması, hücre çoğalması, hücre göçü, immün sistemin gelişimi, süt oluşumu ve apoptoz gibi birçok hücrel süreçte rol oynamaktadır.

Yapılan deneysel çalışmalarda çoğunlukla üçlü negatif meme kanseri hücre dizisi olarak; 4T1 fare meme kanseri hücresi ile MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre

dizisi ve HER2(-) meme kanseri hücre dizisi olarak; MCF-7 insan meme kanseri hücre dizisi kullanılmaktadır.

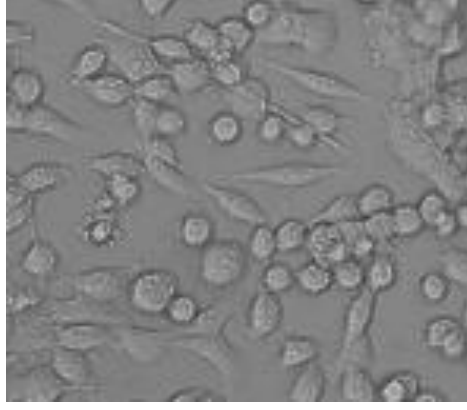
4T1 meme kanseri hücre dizisi başlangıçta BALB/c cins farelerden rastgele bir meme karsinomasından üretilmiştir (Aslakson ve Miller 1992). 4T1 hücrelerinin insan meme karsinomasını taklit ettiği ve bu hücrelerin uzak organlara mikrometastatik özellikte olduğu raporlarda bildirilmiştir (Pulaski, Terman ve ark., 2000). 4T1 hücresi kemiğin yanı sıra akciğer, karaciğer ve beyin dahil olmak üzere metastaz yapmaktadır (Yoneda, Michigami ve ark., 2000). 4T1 hücresi; üçlü negatif meme kanseri özelliklerini taklit etmektedir. 4T1 meme kanseri hücre dizisi Şekil 2.2 (a)' da görüldüğü gibidir.

MCF-7 hücre dizisi insan meme adenokarsinoma hücre dizisidir. İlk olarak 1970 yılında 69 yaşındaki Asya ırkından olan bir kadın meme dokusundan elde edilmiştir. MCF-7 hücre dizisi PR(+) ve ER(+) HER2(-) özelliktedir (<http://www.mcf7.com> Erişim tarihi 5 Eylül 2017). MCF-7 meme kanseri hücre dizisi Şekil 2.2 (b)' de görüldüğü gibidir.

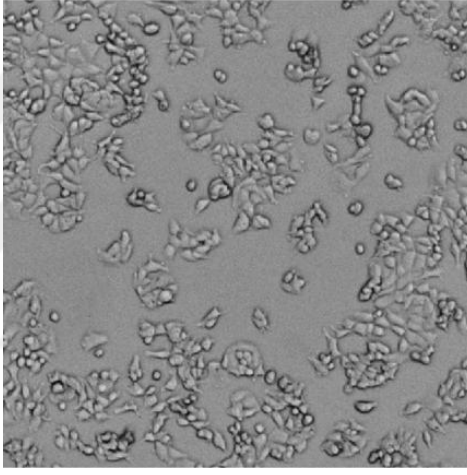
MDA-MB-231 hücresi; epitelyal insan meme kanseri hücre dizisidir; metastatik meme adenokarsinomalı 59 yaşındaki Asyalı bir kadının meme dokusundan elde edilmiştir (Cailleau, Olive ve ark., 1978). MDA-MB 231 hücresi PR, ER ve HER2 reseptörü bulundurmadığından oldukça agresif ve invaziv üçlü negatif meme kanseri hücre dizisidir (Liu, Zang ve ark., 2003, Chavez, Garimella ve ark., 2010). MDA-MB-231 meme kanseri hücre dizisi Şekil 2.2 (c)' de görüldüğü gibidir.

2.1.3. Meme Kanseri STAT3' ün Rolü

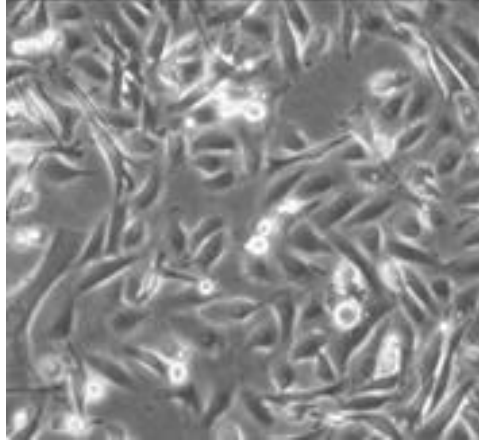
STAT3 laktasyon kesildikten sonra meme bezinin kıvrılmasını (involüsyon) önlerken (Groner ve Hennighausen 2000, Humphrey, Helfand ve ark., 2002) kanserde STAT3 aktivasyonu onkogeniktir. Temel olarak fosforillenmiş STAT3 primer meme kanserlerinin % 30-60' ında bulunur ve artmış proliferasyon, apoptoz direnci, hücre hareketi invazyon ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir (Hsieh, Cheng ve ark., 2005, Avalle, Pensa ve ark., 2012). STAT3 meme tümörlerinin yaklaşık %70' inde aktive olmuştur (Chai, Shanmugam ve ark., 2016).



(a)



(b)

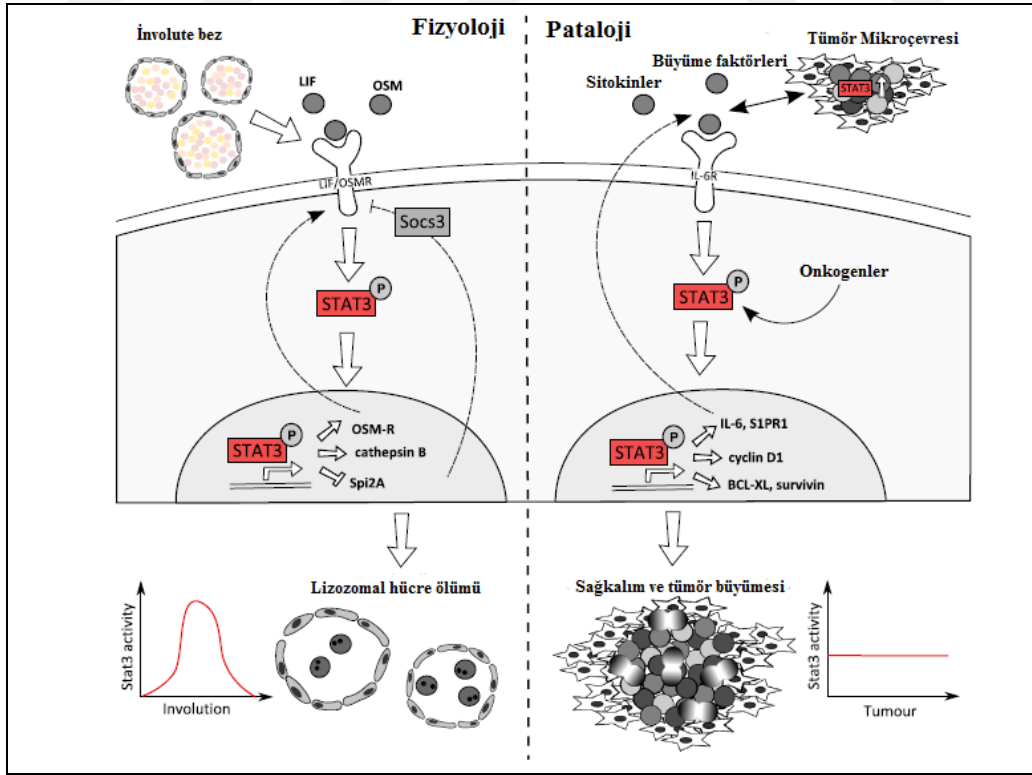


(c)

Şekil 2.2. a) 4T1 fare meme kanseri hücre dizisi; b) MCF-7 insan meme kanseri hücre dizisi (<https://www.moleculardevices.com/cell-counter-mcf-7-cells>); c) MDA-MB 231 insan meme kanseri hücre dizisi morfolojik görüntüleri

Normal meme hücrelerinde STAT3 involusyonu kolaylaştırmak için lösemi inhibitör faktör (LIF) tarafından aktive edilir, ancak meme kanserinde STAT3 çoğunlukla interlökin-6 (IL-6) tarafından aktive edilir (Kritikou, Sharkey ve ark., 2003). Aslında birçok meme kanseri hücre dizisinde IL-6 üretilir, bu üretilen IL-6 Jak kinaz ve IL-6 reseptör yoluyla sinyal göndererek STAT3'ü aktive eder (Marotta, Almendro ve ark., 2011). STAT3 aktivasyonu meme kanserlerinin üç alt tipinde de bulunur, fakat çoğu kez üçlü negatif meme tümörü ile ilişkilidir (Walker, Nelson ve ark., 2009, Marotta, Almendro ve ark., 2011).

Sitokinlerin IL-6 ailesi STAT3'ün güçlü uyarıcıları olarak raporlarda gösterilmiştir ve birçok meme kanserinde STAT3 hiperaktivasyonunun başlıca tetikleyicisi olarak görülmektedir. Meme kanseri olan bir çok hastada artmış IL-6 üretimi ve serum seviyesi, genellikle geç evre tümörlerde, artmış metastatik bölge (organ ve dokular) ve kötü prognoz ile korelasyon gösterir (Kozłowski, Zakrzewska ve ark., 2003, Chavey, Bibeau ve ark., 2007).



(Yoshimura 2005)

Şekil 2.3. STAT3'ün sağlıklı ve kanserli meme hücrelerinde aktivasyon yolağı

Stat3 involute meme bezlerinde (fizyoloji) ve meme kanseri (patoloji) de farklı rollere sahiptir. Stat3 sitokin sinyalizasyonunun downstream yönünde Jak kinazlar tarafından fosforile edilir. Meme bezi involasyonu boyunca, Stat3 aktivitesi lösemi inhibitör faktör (LIF) ve onkostatin M (OSM)- sinyali tarafından up regüle edilir, transkripsiyonel aktivitede bir artışa yol açar. Stat aynı zamanda, sinyalizasyonunun negatif bir düzenleyicisi olan Socs3 'ün yanısıra, pozitif bir geri bildirim halkası olarak OSM-reseptörünün (OSM-R) ekspresyonunu up regüle eder. Meme kanseri hücresi ve normal meme hücresindeki farklılık Şekil 2.3' de gösterilmiştir. Bu düzenleyici ağ, meme bezinde Stat3 transkripsiyonel aktivitesinin güçlü fakat kısa süreli patlamasına izin verir. Meme ve diğer kanserlerde, STAT3' ün sıklıkla yapısal olarak aktive olduğu ve onkogen bağımlılığı (STAT3'e) görülmüştür (Baltayiannis, Baltayiannis ve ark., 2008, Resemann, Watson ve ark., 2014). Tüm STAT ailesi üyeleri arasında en sık olarak STAT3 tümör oluşumu ile ilişkilidir ve onkogen olarak düşünülmektedir (Bromberg, Wrzeszczynska ve ark., 1999).

Günümüzde meme kanserinde kullanılan mevcut tedaviler cerrahi işlem, radyoterapi, kemoterapi ve hormon terapidir. Son yıllarda ise biyolojik ilaçlar ile tedavi gibi gelişmiş tedavi yaklaşımları ortaya çıkmıştır. Bu gelişmiş tedavi yaklaşımlarında tümör hedef bölgesindeki etkinliği arttırmak için pasif ve aktif hedeflendirme yapılarak hedeflendirilmiş kanser hücresi dışındaki toksisite en aza indirilerek; daha toksik olan mevcut kemoterapiye alternatif tedavi seçeneği oluşturmaktadır.

2.2. Gen Tedavisi

Genetik materyal deoksiribonükleik asit (DNA); doğada bulunan tüm organizmaların ve bazı virüslerin biyolojik olaylar için genetik bilgi aktarımı sağlayan nükleik asitlerdir. Gen; DNA molekülünde canlının kalıtsal özelliklerinden herhangi birini taşıyan, anlamlı bir işlevi olan (protein kodlayan) bir birim, bir parçadır.

Gen tedavisi; eksik veya fazla ya da hatalı protein üretimine sebep olan, bozuk gen taşıyan hücreye gen aktarımı yapılarak genetik hasarın düzeltilmesi olarak tanımlanabilir.

Gen tedavisi hedef alınan dokunun niteliği bakımından germinal (eşey hücresi) ve somatik (vücut hücresi) gen tedavisi olarak iki grupta sınıflandırılabilir. Somatik gen tedavisinde genetik materyal bazı hedef hücelere aktarılır, ama bu değişim gelecek nesillere aktarılmaz. Germinal gen tedavisinde ise terapötik ya da modifiye edilmiş genler yumurta ya da sperm hücresine aktarılır, bu sebeple genlerde yapılan değişiklikler bir sonraki nesile aktarılır. Günümüzde yapılan gen tedavisi çalışmalarının çoğu somatik hücre gen tedavisidir.

Gen tedavisi *ex vivo* ve *in vivo* gen tedavisi şeklinde uygulanmaktadır. *Ex vivo* gen tedavisinde, hücreler vücuttan alınır; *in vitro* koşullarda vücut dışında istenen genin aktarımı yapıldıktan sonra hücreler vücuda transplantasyon veya transfüzyon yoluyla geri verilir. *In vivo* gen tedavisi ise, istenen DNA parçasının hedef organdaki hücelere direk transferidir, hastadan hasta genler hücre dışına çıkarılmaz.

Avrupa İlaç Ajansı (European Medicine Agency, EMA) gen tedavisi tıbbi ürününü aşağıdaki iki özelliği yerine getiren bir biyolojik tıbbi ürün olarak tanımlamaktadır: a) Genetik bir diziyi silmek, eklemek, değiştirmek ya da tamir ettiğini görmek amacıyla insanlarda kullanılan veya uygulanan rekombinant nükleik asitler içeren veya oluşan aktif bir madde içerir b) terapötik, profilaktik ya da diagnostik etki bu dizinin direkt olarak genetik ekspresyonun üretimine ya da rekombinant nükleik asite bağlıdır. Gen tedavi tıbbi ürünü enfeksiyon hastalıklarına karşı aşılardan içermemelidir.

Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (US Food and Drug Administration, FDA) gen tedavisini şöyle tanımlamaktadır; "Aktarılmış genetik materyalin translasyonu ve/veya transkripsiyonu ya da konakçı genoma integrasyonu ile aracılık eder ve bunlar nükleik asit, virüs ya da genetik olarak modifiye mikroorganizma olarak uygulanır".

Gen tedavisi çalışmaları, insan genom başarısı ile gen tedavisi kistik fibroz (Mitomo, Griesenbach ve ark., 2010) ve hemofili (Walsh 2003) hastalıkları, malign tümörler gibi birçok somatik hastalıklar (Mcneish, Bell ve ark., 2004), nörodejeneratif hastalıklar (Tuszynski, 2002), enfeksiyon hastalıkları (Bunnell ve Morgan 1998), AIDS gibi ciddi viral enfeksiyon hastalıklarında umut verici sonuçlar göstermiştir. 2012 yılında yapılan araştırmalara göre; % 66.4 kanser hastalıkları, % 8.7 monojenik hastalıklar, % 8.4

kardiyovasküler hastalıklar, % 8 enfeksiyon hastalıkları, % 2 nörolojik hastalıklar, % 1.5 oküler hastalıklar, % 0.7 inflamatuvar hastalıklar şeklinde veriler gösterilmiştir (Ginn, Alexander ve ark., 2013).

Gen tedavisi terapötik DNA' nın hedef hücrenin çekirdeğine başarılı bir şekilde taşınmasına dayanır. Hayvan hücresine dışardan DNA'nın aktarımı ilk kez 1979'da Mulligan ve ark. tarafından kalsiyum fosfat transfeksiyon teknolojisi kullanılarak yapılmış ve rekombinant plazmid DNA ile hücrelerin başarılı bir şekilde transfeksiyon edildiği rapor edilmiştir (Mulligan, Howard ve ark., 1979). 1980 yılında in vitro koşulda lipozom aracılı gen taşıyıcı sistem yolu ile DNA'nın başarılı bir şekilde aktarıldığı raporlarda gösterilmiştir (Fraley, Subramani ve ark., 1980). Bunu 1980 yılının sonunda polilizin ile transfeksiyon (Wu ve Wu 1987) ve 1990 yılında polietilenimin (PEI) ile transfeksiyon (Boussif, Lezoualc'h ve ark., 1995) takip etmiştir. Taşıyıcı sistemin amacı uygulamaya göre değişir, örneğin; birçok kanser gen tedavi stratejisinde kısa süreli gen ekspresyonu yeterliyken, hiperkolestorelomi gibi tek gen işlev bozukluğu ile ilgili hastalıkların tedavisi için uzun ve sürekli gen ekspresyonuna ihtiyaç vardır. Kanser hücrelerinin gelişimi bu hücrelerin genetik seviyede çoklu değişiklikleri ile ilgilidir (Bertram 2000).

2.3. Gen Tedavisi Stratejileri

Başlıca gen tedavi stratejileri; eksik genlerin veya ürününün yerine konması, yanlış veya fazla çalışan genlerin ekspresyonlarının susturulması, genetik hasarı düzelterek normal gen ekspresyonunu sağlamaktır. Tüm gen tedavi stratejilerinde hedef, gen ya da gen ürünlerinin hedef doku veya organa aktarılmasıdır. Genetik materyallerin hedef doku veya hücreye aktarılması için taşıyıcı vektörlere ihtiyaç vardır.

2.3.1. Antisens Teknolojisi

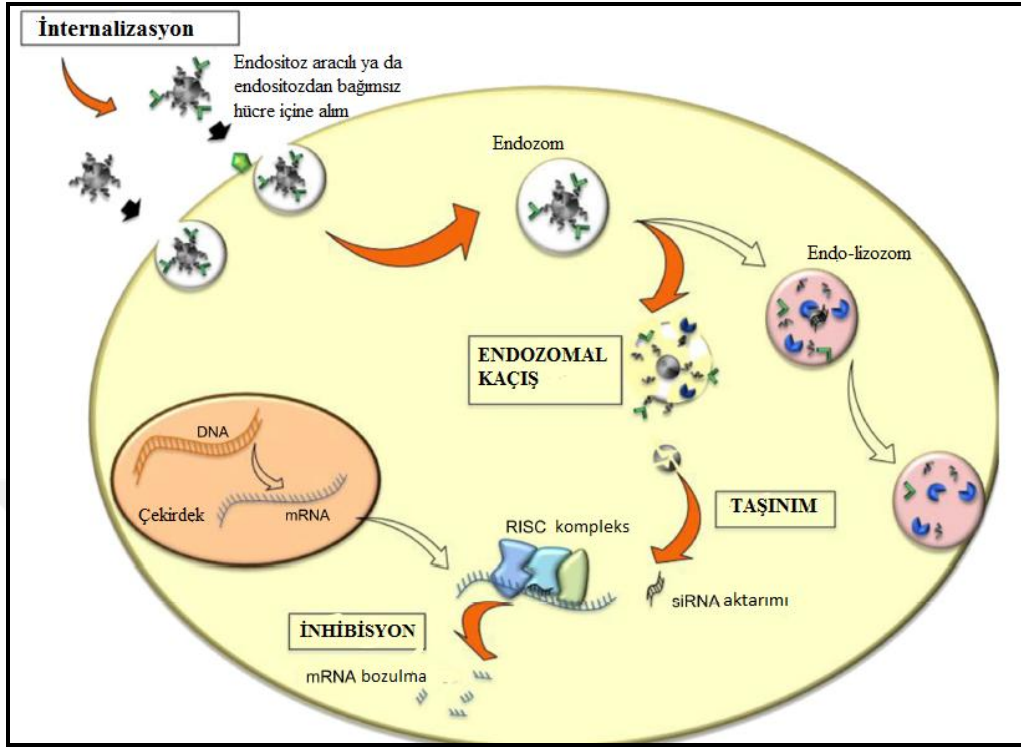
Bilinen gen terapi yöntemlerinin birçoğu hücre fenotipinin değiştirilmesi amacıyla fonksiyon kazandırılmasına odaklı olmakla birlikte son yıllarda hücredeki nükleik asit fonksiyonunun inhibe edilmesine dayalı tedavi yöntemlerine olan ilgi artmıştır. Gen ekspresyonunun inhibisyonu genellikle translasyonda kesinti yapmayı sağlayan antisens moleküllerinin kullanılması veya mRNA'nın parçalanması sonucu genomik diziyi bozan çeşitli kompleks genetik manipülasyonlar ile sağlanmaktadır. Antisens teknolojisi,

antisens moleküller kullanılarak hedef gen ekspresyonunun engellenmesini ifade etmektedir. Antisens oligonükleotidler ile yapılan çalışmalar, gen susturma mekanizması için etkili bir yöntem olan *RNA interferansın (RNAi)* keşfedilmesini sağlamıştır.

RNA İnterferans (RNAi)

RNA interferans mekanizması ilk olarak bitkilerde keşfedilmiş olup daha sonra bir mikroenjeksiyon teknik kullanılarak çift iplik RNA'nın (dsRNA) taşınması ile solucan *Caenorhabditis elegans* da gösterilmiştir (Fire, Xu ve ark., 1998). Ekzojen olarak sunulan çift iplik RNA'nın (dsRNA) gen ekspresyonunu geçici olarak baskılamasına sebep olduğu gösterilmiştir (Sen ve Blau 2006, Dogini, Pascoal ve ark., 2014). Doğal olarak RNAi, virüsler gibi ökaryotik hücrelerin eksojen genleri parçalayabileceği önemli bir savunma mekanizmasıdır. RNAi spesifik genlerin transkripsiyonunu engelleyerek ya da gen ekspresyonunu translasyon aşamasında inhibe eder. mRNA dizisinin kırılmasına yol açan transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasının bir parçasıdır. Bu RNAi ürünleri 19-29 nt dizili siRNA (small interfering RNA), 19-21 nt dizili shRNA (short hairpin RNA) ve 19-22 nt dizili miRNA' lardır ve ilaç olarak kullanım için uygundur; çünkü genoma entegrasyon gerektirmez ve kolay sentezlenebilir (Singh ve Peer 2016). Çift zincir RNA (dsRNA) hücreye girdiğinde ilk olarak DICER enzimi tarafından ~20 nükleotidli siRNA parçalarına bölünür. Sonra her bir çift iplik siRNA taşıyıcı iplik (passenger strand) ve kılavuz iplik (guide strand) olarak ayrılır. Bundan sonra kılavuz iplik passenger iplik bozulmuşken, RNA-indüklü susturucu kompleks (RNA-induce silencing complex RISC) içine birleşir. RISC'de siRNA'nın kılavuz ipliği bir tamamlayıcı sekans ile çiftleşir ve Argonaute tarafından bölünerek indüklenir; bu da transkripsiyon sonrası gen susturulmasına sebep olur.

Taşıyıcı sistemlerin hücre içine alınımı klatrin, kaveol yolak ya da lipit raft gibi birkaç mekanizma tarafından gerçekleştirilebilir. Bu olayda iki yöntem gözlenir; reseptör aracılı endositoz ve reseptör aracılı olmayan endositoz. Bütün bu durumlarda, taşıyıcı sistemler endozomal veziküllerin içine hapsolür, bu veziküller lizozom ile birleşir ve siRNA'nın parçalanmasına yol açar (Resnier, Montier ve ark., 2013). (Şekil 2.4)



(Resnier, Montier ve ark., 2013)

Şekil 2.4. Gen taşıyıcı sistemlerin hücre içine alım mekanizması

Son yıllarda kanser gen tedavisi yaklaşımlarının birçok türü shRNA (tek iplik RNA hairpin loop yapısında), shRNA kodlayan plazmid DNA ve küçük engelleyici RNA (siRNA; çift iplik RNA) içeren endojen gen ekspresyonunu düzenleyen sistemleri kullanmak üzerine oluşturulmuştur.

siRNA (Small İnterfering RNA- küçük interferans RNA)

siRNA, mRNA dizisinin kırılmasına yol açan transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasının parçasıdır. siRNA 19-29 nt dizili RNAi ürünleridir. Taşıyıcı sistemler aracılığıyla endositoz, fagositoz ve ligandlar aracılığıyla hücre içerisine alınırlar (Mehrabadi, Fischer ve ark., 2012).

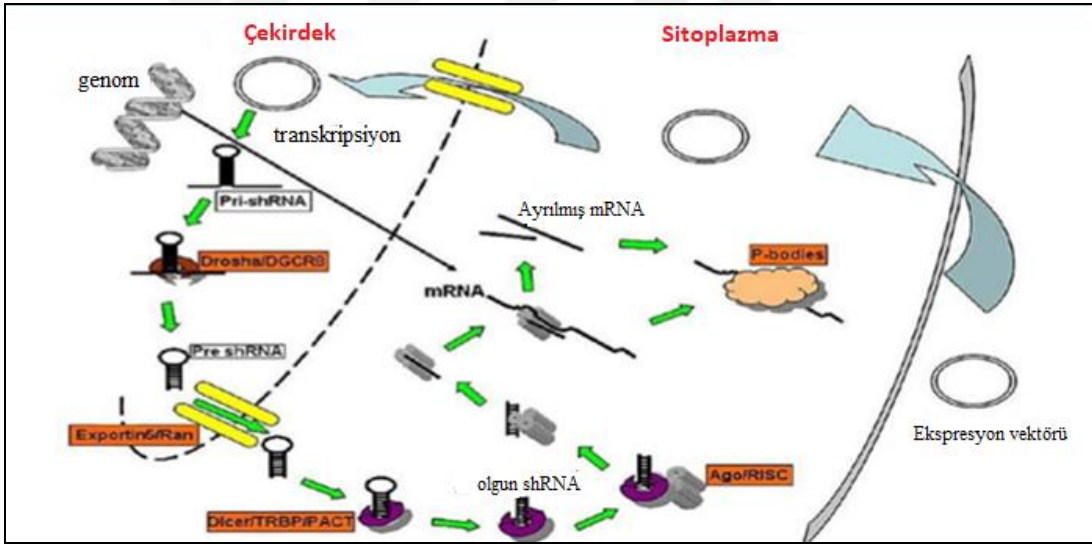
shRNA (Short hairpin RNA- kısa toka RNA)

shRNA 19-21 nt dizili RNAi ürünüdür. mRNA dizisinin kırılmasına yol açan transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasıdır. Hücre içine vektör aracılığıyla aktarılan shRNA sitoplazmadan çekirdeğe taşınır ve olgunlaşmamış haldeki shRNA (Pre-shRNA) Exportin G ile çekirdekten sitoplazmaya geçer ve burada Dicer enzimi ile

olgun shRNA oluşur. Daha sonra bu olgun shRNA' lar Ago/RISC kompleksi oluşturur; RISC'de shRNA'nın klavuz ipliği bir tamamlayıcı sekans ile çiftleşir ve Argonaute tarafından bölünerek indüklenir; bu da transkripsiyon sonrası gen susturulmasına sebep olur. Taşıyıcı sistemler aracılığıyla endositoz, fagositoz ve ligandlar aracılığıyla hücre içerisine alınırlar (Mehrabadi, Fischer ve ark., 2012). shRNA' nı gen susturma mekanizması Şekil 2.5' de gösterilmiştir.

miRNA (mikro RNA)

miRNA 19-29 nt dizili RNAi ürünüdür. mRNA dizisinin kırılmasına yol açan transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasının parçasıdır. Taşıyıcı sistemler aracılığıyla endositoz, fagositoz ve ligandlar aracılığıyla hücre içerisine alınırlar (Mehrabadi, Fischer ve ark., 2012).



(Mansoori, Shotorbani ve ark., 2014)

Şekil 2.5. shRNA'nın gen susturma mekanizması

2.4. Gen Tedavisinde Kullanılan Taşıyıcı Sistemler

Gen tedavisi potansiyel yeni nesil bir terapötik yöntem olarak ilgi çekmesine rağmen, nükleik asitlerin istenmeyen özelliklerinden dolayı klinik uygulamaları sınırlıdır (Putnam, Gentry ve ark., 2001, Pack, Hoffman ve ark., 2005). Nükleik asit taşınmasındaki engeller; dolaşımda nükleaz içeren çeşitli biyomoleküller tarafından parçalanır olmaları, serum bileşenleri ile spesifik olmayan etkileşimler, kararsızlık

göstermeleri, immün ve inflamatuvar yanıt oluşturmaları, hücre zarına yetersiz bağlanmaları ve agregasyon ve tromboz riski oluşturmaları çıplak nükleik asitlerin hedef hücreye aktarılmasını sınırlandırmaktadır (Scholz ve Wagner 2012). Küçük kimyasal ilaçların ve bir çok biyolojik ilacın aksine, etkin bir gen tedavisi için nükleik asitler (NA) sitoplazmaya ya da çekirdeğe aktarılmalıdır. Bu taşıyıcı sistemler nükleik asitlerin etkili bir şekilde ve yukarıda belirtilen dezavantajları en aza indirerek hedef dokuya ya da organa aktarılmasını sağlar.

Gen taşıyıcı sistemler viral vektörler ve viral olmayan vektörler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Wirth, Parker ve ark., 2013). Gen taşıyıcı sistem olarak; viral taşıyıcılar yüksek oranda transfeksiyon etkinliğine sahip olmalarına karşın potansiyel mutasyon, rekombinasyon ve onkogenik etkiler gibi ciddi problemler taşımaktadırlar. Viral vektörlerin toksisite, saf olmama, laboratuarda uygulama zorluğu, büyük ölçekte istenen miktarda üretilmemesi gibi dezavantajları nedeniyle viral olmayan yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır

2.4.1. Viral vektörler

Viral vektör; günümüzde mevcut kullanılan başarılı bir gen aktarımı sağlayan biyolojik vektörlerdir ve etkili hücrel infeksiyonu korumak için genetik olarak işlenmiş ve patojenik olmayan virüslerdir. Viral vektör olarak retroviral vektörler, adenoviral vektörler, adeno benzeri virüs, herpes-simpleks virüs, pox virüs ve lentiviral vektörler kullanılmaktadır (Nayerossadat, Maedeh ve ark., 2012). Bütün viral vektör genomları modifiye edilerek çoğalmaları bozulmuştur ve bu işlem onları daha güvenilir hale getirdi; fakat immünojenite göstermeleri ve toksin üretimi genel karşılaşılan sorunlardandır (Katara ve Aeri 2010).

Adenoviral vektörler

Enfekte ettikleri hücrelerin kromozomlarına entegre olmayan, patojenitesi düşük olan çift sarmal DNA virüsleridir (Thomas, Ehrhardt ve ark., 2003). Konakçı genomuna entegre olmamaları, gen transdüksiyon veriminin yüksek olması gibi avantajlara sahiptirler. Geçici transgen ekspresyonu, dokuya spesifik olmaması, hepato(toksik) olması, vektör immünojenitesinin yüksek olması dezavantajlarıdır.

Retroviral Vektörler

RNA virüsleridir ve retrovirüs nükleik asidi konakçı kromozomal DNA'ya entegre olur. Hedef hücre genotipi sürekli değişerek, hücrelerdeki gen ekspresyonunun devam etmesini ve nesilden nesile aktarılmasını sağlar (Thomas, Ehrhardt ve ark., 2003). Retroviral vektörlerin avantajları; kalıtsal ve kronik hastalıkların tedavisinde kullanılabilir, konakçı genomuna entegrasyonla uzun süreli gen ekspresyonu sağlamakta, gen transdüksiyon veriminin yüksek olması, dokuya spesifik olabilme ve düşük immünojenite göstermesi kullanım açısından avantaj sağlamaktadır. Retroviral genlerin konakçı genomuna rastgele yerleşmesi ve insan bileşenleri ile çok çabuk inaktive olmaları ve mutajenik etki gösterebilmeleri dezavantaj olarak gösterilmektedir.

Adenobenzeri Virüs (AAV) Vektörler

Replikasyon için yardımcı virüsün ko- enfeksiyonuna ihtiyaç duyan, patojenik olmayan küçük DNA virüsleridir. Replikasyon yapabilen ve yapamayan hücrelerde kullanılabilir olması avantaj sağlar (Thomas, Ehrhardt ve ark., 2003).

Herpes-Simpleks Virüs Vektörler

Nörodegeneratif hastalıkların tedavisinde terapötik gen aktarımı için geliştirilmiş büyük DNA virüsleridir (Thomas, Ehrhardt ve ark., 2003). Konakçı genomuna entegre olmamaları ve virüs genomunun büyük olması avantaj sağlamaktadır. Transgen ekspresyonunun kalıcı olmaması, düşük titrede elde edilebilir olması ve sitotoksik etki göstermeleri dezavantaj olarak gösterilmektedir.

Lentiviral Vektörler

Bölünmeyen hücreleri de enfekte edebilen özelleşmiş retrovirüslerdir. İmmün sistemi tetiklememeleri ve yüksek düzeyde gen ekspresyonu sağlamaları avantaj sağlamaktadır. Çoğu lentiviral vektörlerin kaynağı insan HIV (human immunodeficiency virüs) virüsüdür. Diğer retrovirüsler gibi genoma rastgele entegre olmasından dolayı dezavantaj göstermektedir (Nayerossadat, Maedeh ve ark., 2012). Viral vektörlere alternatif bir diğer gen aktarım taşıyıcı sistem viral olmayan vektörlerdir.

2.4.2. Viral Olmayan Vektörler

Viral vektörler ile yapılan çalışmalar sonucu her ne kadar önemli gelişmeler kaydedilse de kısa süreli transgen ekspresyonu ve konakçı hücrede yetersizlik ve toksisite gibi önemli problemler meydana gelmiştir. Ayrıca inflamatuvar sitokin profil analizi ile bu vektörlerin intravasküler koagülasyona, akut solunum hastalıklarına ve çoklu organ iflaslarına neden olduğu gösterilmiştir. Viral vektörler için yukarıda sıralanan olumsuzluklar nedeniyle viral olmayan vektörler geliştirilmiştir.

Viral olmayan vektörler kolay sentez edilebilme, hücre/dokuya hedeflendirilebilme, düşük immün cevap ve sınırsız büyüklükte plazmit taşıyabilme gibi özellik göstermelerinden dolayı son yıllarda tercih edilmektedir. Üzerinde en çok araştırma yapılan viral olmayan vektörler, katyonik özellikte polimerik, lipidik ve peptid-protein yapıda taşıyıcı sistemler olup, genetik materyali hücre içine taşıyabilmektedirler.

Katyonik özellikte viral olmayan sistemler, negatif yüklü genetik materyal ile elektrostatik olarak etkileşmesi nedeniyle avantajlara sahiptirler. Etkileşimden sonra oluşan pozitif net yüklü partikül, negatif yüklü hücre membranı ile etkileşim sağlar ve bu durum da endositoz yolu ile (Ogris, Brunner ve ark., 1999) DNA'nın hücre zarından geçişini kolaylaştırır ve kompleks oluşturulmuş DNA'yı nükleaz yıkımına karşı korur (Davis 2002)

Viral olmayan vektörler de kendi içersinde fiziksel yöntemler, kimyasal yöntem ve ilaç taşıyıcı sistemler olarak sınıflandırılmaktadır.

Fiziksel Yöntemler

Gen tabancası

DNA mikro büyüklükteki tungsten veya altın parçacıkları ile kaplanıp, gen tabancası kullanılarak, helyum basıncı ile yüksek hızla hücrelere gönderilmektedir (Gao ve ark., 2007).

Elektroporasyon

Hücrelere veya dokulara kısa zamanlı çok kuvvetli elektrik akımı uygulayarak, hücre zarında nanometre boyutunda geçici porlar oluşturulması işlemidir (Gao ve ark., 2007).

Sonikasyon

Yüksek frekanslı ses dalgaları kullanılarak yapılan gen transferidir. Membran porları oluşturur ve DNA'nın membran porları arasından pasif difüzyon yoluyla gen transferini kolaylaştırır (Özlem 2005).

Kimyasal Yöntemler

DEAE-DEKSTRAN (Dietilaminoetil Dekstran)

Memeli hücre kültürüne nükleik asitlerin transferi için kullanılan ilk ajandır. Katyonik polimerdir ve negatif yüklü nükleik asitlerle birleşir (Macka ve ark., 1998).

Kalsiyum Fosfat

Kalsiyum fosfat ile çöktürme ilk önce sistemik çalışmalarda kullanılmış sonra transfeksiyon yöntemi haline gelmiştir. Kullanılan maddeler kolay ulaşılabilir olduğu için kalsiyum fosfatla çöktürme yöntemi geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Nükleik Asit Taşıyıcı Sistemler

- Polimerik yapıdaki taşıyıcılar
 - Polimer konjugatları
 - Polimer-protein konjugatları
 - Polimer-ilaç konjugatları
 - Dendrimerler
 - Polimerik nanopartiküller
 - Polimerik miseller
- Lipit yapıdaki taşıyıcılar
 - Lipozomlar
 - Katı lipit nanopartiküller
- İnorganik yapıdaki taşıyıcılar
 - Karbon nanotüpler
 - Altın nanopartiküller
 - Manyetik nanopartiküller

Sistemik gen taşınması için uygun vektörler aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır (Nimesh, Gupta ve ark., 2011):

- Kan dolaşımından ve sitozoldeki yıkılımdan nükleik asitleri korumalı
- Serum proteinleri ile agregasyon oluşumunu önlemeli
- Retiküloendotelyal sistem(RES)'den korumalı
- Hedef hücreye spesifik bağlanması ve internalizasyonu

- Endozomal kaçış sağlamalı
- Nükleik asiti çekirdeğe etkili bir şekilde taşınmalı

2.5. Polimer Yapısındaki Nükleik Asit Taşıyıcı Sistemler

Nanoteknoloji Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından "Nanometre ölçekteki materyallerin şeklini ve boyutunu kontrol ederek sistemler, araçlar ve yapıların uygulanması" olarak tanımlanmıştır (<http://www.ema.europa.eu> Erişim Tarihi 5 Aralık 2017). Nanopartiküller; sentetik veya doğal kaynaklı bir makromolekülden meydana gelen ve çözünmüş, hapsedilmiş veya adsorbe olmuş etkin maddeyi kontrollü olarak salan katı kolloidal partiküllerdir. Nanopartiküllerin; ilacı kontrollü olarak salması, istenen bölgede toplanarak etki etmesi, stabilite sorunlarının olmaması, parçalanma ürünlerinin toksik olmaması ve sterilize edilebilmeleri istenen özellikleridir. Nanopartiküller görüntüleme, tanı ve tedavi amacıyla sağlık alanında kullanılmaktadır. Nanopartiküller tedavi amacıyla kullanıldıklarında aktif ve pasif hedeflendirme stratejileri uygulanmaktadır. Hedeflendirme stratejileri ile; özellikle kanser tedavilerinde tümör dokusuna hedeflendirme yapılarak terapötik etkiyi arttırmak, düşük ya da yüksek dozlarda etkin ve güvenli tedavi sağlamak, ilaçların farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini değiştirmek ve diğer dokularda meydana gelebilecek toksisiteyi en aza indirmek amaçlanır (Brigger, Dubernet ve ark., 2002).

İlaç ve genetik materyalin taşınmasında kullanılan en yaygın taşıyıcı sistemler lipidik ve polimerik taşıyıcı sistemlerdir. Lipozomlar; amfifilik fosfolipitlerden oluşan kendi kendine katlanabilen iki katmanlı lipit membranlı kolloidal veziküllerdir. Bu tez çalışmasında polimerik taşıyıcı sistemler kullanılmıştır. Aşağıda kısaca polimerik yapıdaki taşıyıcılar hakkında bilgi verilmiştir.

Polimer Yapısındaki Taşıyıcılar

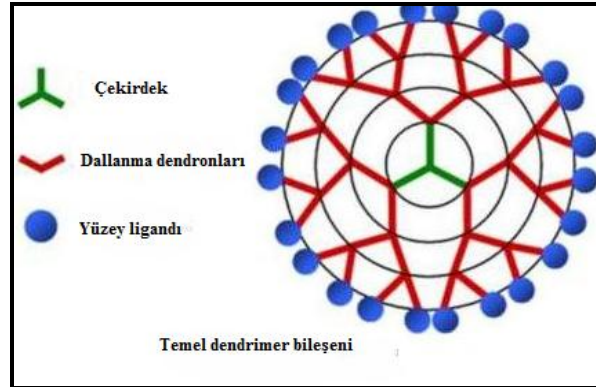
Polimer konjugatları

- Polimer-protein konjugatları
- Polimer-ilaç konjugatları

Antitümör proteinlerin ya da küçük molekül antikanser ilaçların konjuge edildiği polimerik yapılar olarak tanımlanabilir. Antikanser ajanlar hedeflendirilmiş bölgeye polimerik taşıyıcı sistem içerisinde stabil olarak taşınırlar (Duncan 2006). Antikanser proteinler ile polimer arasındaki kovalent bağlanma immunojeniteyi azaltır. Stabilitate ve kandaki dolaşım süresini artırır (Duncan 2003).

Dendrimerler

Biyolojik özellikte nanomateryal türüdür. Küçük boyutta (1-15nm), yüksek su çözünürlüğüne sahip, düzenli ve oldukça dallanmış üç boyutlu yapı, yüksek ilaç yükleme kapasitesi, biyobozunur, biyogeçimli, yüzeyine birden fazla fonksiyonel grup ve molekülün konjugasyonunun yapılması özelliklerine sahiptir (Nanjwade, Bechra ve ark., 2009)Nanjwade ve ark., 2009; (Khan, Nigavekar ve ark., 2005). Dendrimerlerin tekdüze yapıda olmaları kanser hücrelerin zarını geçmelerini kolaylaştırır ve makrofajlar tarafından taşınımlarını azaltır. Anti kanser ilaçlar dendrimerin çekirdeğinde non-kovalent olarak ya da yüzeyinde kovalent olarak bağlanabilir ve ilaç salınım profili isteğe göre değiştirilebilir (Lee, Mackay ve ark., 2005, Tong ve Cheng 2007, Wolinsky ve Grinstaff 2008, Svenson 2009).



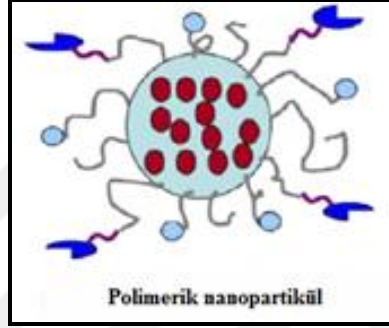
(<http://bme240.eng.uci.edu> Erişim tarihi 1 Mayıs 2017)

Şekil 2.6. Dendrimer yapısı

Polimerik Nanopartiküller

Polimerler çok sayıda aynı veya farklı atomların kimyasal bağlarla, az veya çok düzenli bir biçimde bağlanarak oluşturduğu uzun zincirli yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Nanopartiküllerin hazırlanmasında biyoparçalanır ve biyoyumlu doğal ya da sentetik

polimerler kullanılır. Sentetik polimerlere örnek; poliglutamik asit ve poliglikolik asit (PGA), polietilen glikol (PEG), polikaprolakton (PCL), polilaktik asit (PLA), poli aspartat (PAA), poli(D,L- lactide-co-glycolic) acid (PLGA), N-(2- hidroksipropil)-metakrilamid kopolimer(HPMA) kullanılmaktadır. Doğal polimerler olarak kitozan, aljinat, dekstran, heparin, albumin sık kullanılan jelatin ya da kollojen daha az kullanılan polimerlerdir.



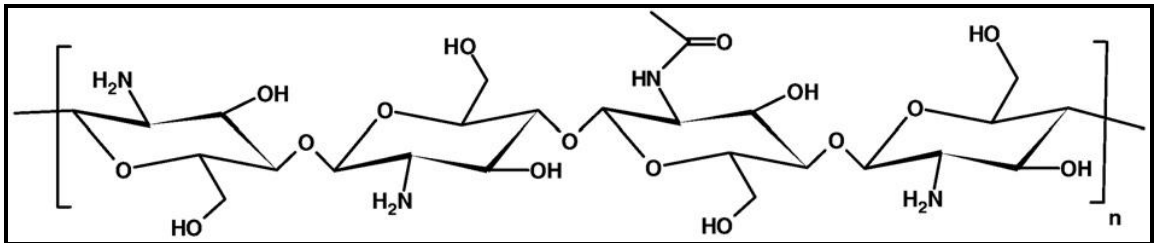
● İlaç A ● İlaç B  Hedefleyici kısım

(Gao, Xie ve ark., 2014)

Şekil 2.7. Polimerik nanopartikül yapısı

2.5.1. Kitosan Nanopartiküller

Kitosan; deniz kabuklularının iskeletinde bulunan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen kationik polisakkarittir. Kitin; bazı mantar türlerinde bulunmakla birlikte doğada selülozdan sonra en çok bulunan polisakkarittir. Kitosan; D-glikozamin ve N-asetil-D-glukozamin birimlerinin tekrarlarından oluşan, 1-4 glikozidik bağ ile bağlı, biyobozunur bir polimerdir (Onishi ve Machida 1999).



Şekil 2.8. Kitosanın yapısal formülü

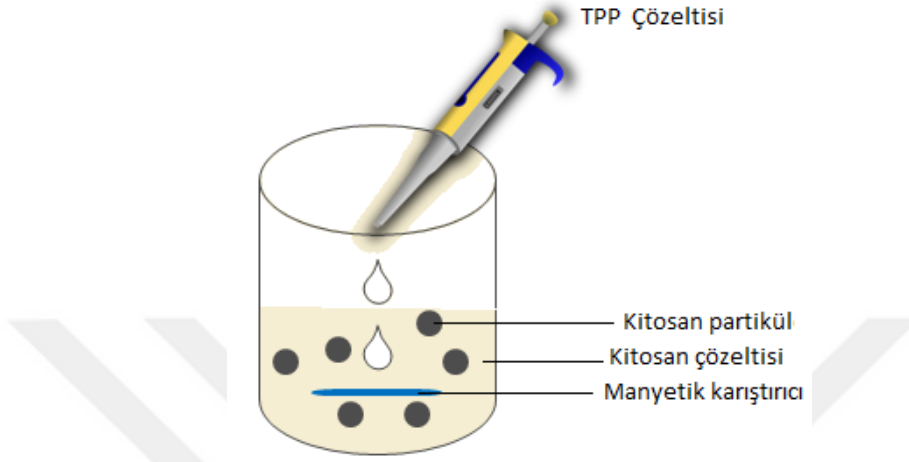
Kitosan birkaç fizikokimyasal özellikleri ile sınıflandırılabilir; bunlar moleküler ağırlığı, deasetilasyon derecesi, vizkozite ve kristallenme derecesidir. Kitosanın çözünürlüğü deasetilasyon derecesine ve moleküler ağırlığına bağlı olarak değişiklik gösterir. Kitosan asetik asit, sitrik asit, hidroklorik asit, glutamik asit, aspartik asit ve laktik asit gibi asidik pH' lı ortamda çözünür ve nötr pH da çözünmez.

Kitin ve kitosan mikroorganizmada bulunan lizozomal enzimler tarafından enzimatik yıkıma maruz kalmaktadır ve bu enzimatik yıkım sonucunda glikozamin açığa çıkar. Kitosanın enzimler tarafından parçalanabilir olması ve açığa çıkan ürünün doğal bir monosakkarit olması, bu polimerin farmasötik alanda kullanımını açısından önemlidir (Shigemasa ve Minami 1996).

Doğal kitosan polimeri tarım, gıda ve sağlık gibi birçok alanda kullanılmaktadır. İlaç endüstrisinde kitosan sıklıkla ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve nano ve mikropartiküler sistemlerin hazırlanması için kullanılır. Kitosan sadece ilaç taşımak için değil aynı zamanda nükleik asit taşınmasında (pDNA, siRNA, shRNA ve miRNA vb.) en çok kullanılan doğal polimerlerden bir tanesidir (Katas ve Alpar 2006).

Literatürde kitosan nanopartikül hazırlamak için çözücü buharlaştırma tekniği, çoklu emülsiyon yöntemi, çöktürme yöntemi gibi birçok yöntem kullanılmaktadır. En çok kullanılan yöntemlerden bir tanesi iyonik jelyasyon yöntemidir (Banerjee, Mitra ve ark., 2002). Kitosan nanopartikül, zıt yüklü bir bağlayıcının kitosan ile çapraz bağlanması sonucu oluşur; en sık kullanılan çapraz bağlayıcı sodyum tripolifosfat (Na-TPP)' dir. Nanopartikül oluşumu; kitosan yapısındaki pozitif (+) yüklü amin grubu ile TPP yapısındaki negatif (-) yüklü tripolifosfat grupları arasındaki iyonik etkileşime dayanır (Shu ve Zhu 2002). Kitosan partiküllerinin oluşumu şematik olarak Şekil 2.9'da gösterilmiştir. İlk kitosan/TPP nanopartikülleri 1997 yılında Calvo ve ark., tarafından yapılmıştır ve bir çok çalışmada bu yöntemin kullanıldığı rapor edilmiştir (Calvo, Remunan-Lopez ve ark., 1997). Protonlanmış kitosanın amin grubu ile negatif yüklü DNA/siRNA elektrostatik etkileşim yoluyla kompleks oluşturur (Malmo, Sørgård ve ark., 2012). Mumper ve ark., 1995 yılında ilk kez *in vitro* çalışmada pDNA taşınması için kitosanı potansiyel taşıyıcı olarak kullanmışlardır.

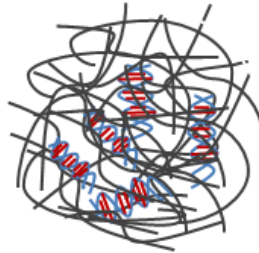
Bu çalışmada da 4T1 hücrelerine kitosan/TPP nanopartikül/pSIH-H1-STAT3 shRNA pDNA'sı taşıyıcı sistem kullanılarak transfeksiyon gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.



Şekil 2.9. İyonik jelyasyon yöntemi ile kitosan partiküllerinin oluşumunun şematik olarak gösterimi

2.5.2. Polietilenimin Polipleksler

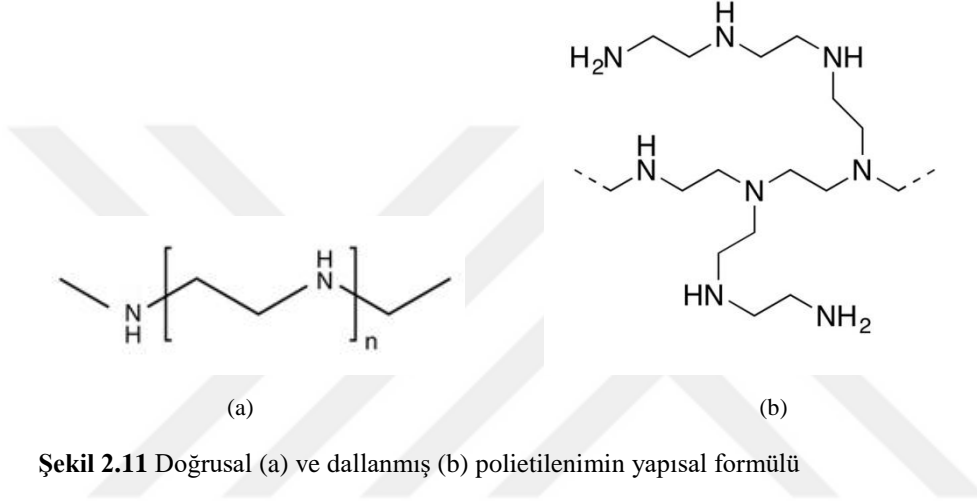
Polietilenimin (PEI) alifatik ve toksik olmayan bazik yapıda sentetik bir polimerdir. Ayrıca primer, sekonder ve üçüncül amino grubundan dolayı polikasyonik özelliktedir. (Beyth, Yudovin-Farber ve ark., 2010). PEI yüksek yük yoğunluğuna ve DNA bağlama kapasitesine sahiptir (Wong, Sun ve ark., 2006). PEI en etkili polikasyonik transfeksiyon ajanıdır ve gen aktarımında altın standart olarak bilinmektedir (Pathak, Patnaik ve ark., 2009). PEI ile pDNA'nın oluşturduğu poliplekslerin yapısı şematik olarak Şekil... gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Polietilenimin/pDNA polipleksinin şematik gösterimi

Tekrarlanan etilenimin birimlerinin bağ oluşturmaya bağlı olarak dallanmış ve doğrusal olmak üzere iki çeşit polietilenimin bulunmaktadır. Dallanmış ve doğrusal polietilenimin vektörlerinin etkinliği ve bunların sitotoksik özellikleri, önemli ölçüde,

polipleksin partikül boyutu ve zeta potansiyel gibi özellikleri, polipleks konsantrasyonu, transfeksiyon süresince serum varlığı ya da yokluğu, inkübasyon süresi, gibi deneysel koşullara bağlıdır (Von Harpe, Petersen ve ark., 2000). 25 kDa dallanmış polietilenimin ve 22 kDa'lık doğrusal polietilenimin en verimli pDNA transfeksiyon ajanı olarak kabul edilmektedir. (Grayson, Doody ve ark., 2006).



3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

3.1.1. Kullanılan Biyolojik Materyaller

pDNA vektörleri

Çalışmalarımızda iki farklı pDNA vektörü Addgene firmasından bakteri kültürü içerisinde temin edildi. LV-RFP (Addgene #plazmit 26001) ve pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA (Addgene #plazmit 26596) kullanıldı.

Ön çalışmalarımızda üzerinde kırmızı floresan marker geni taşıyan LV-RFP plazmit DNA'sı kullanıldı. LV-RFP pDNA'sı 7539 bç uzunluğunda olup, ampisilin antibiyotiğine karşı direnç geni taşıyan bir plazmittir. LV-RFP plazmit DNA vektör haritası Şekil 3.1'de gösterildiği gibidir.

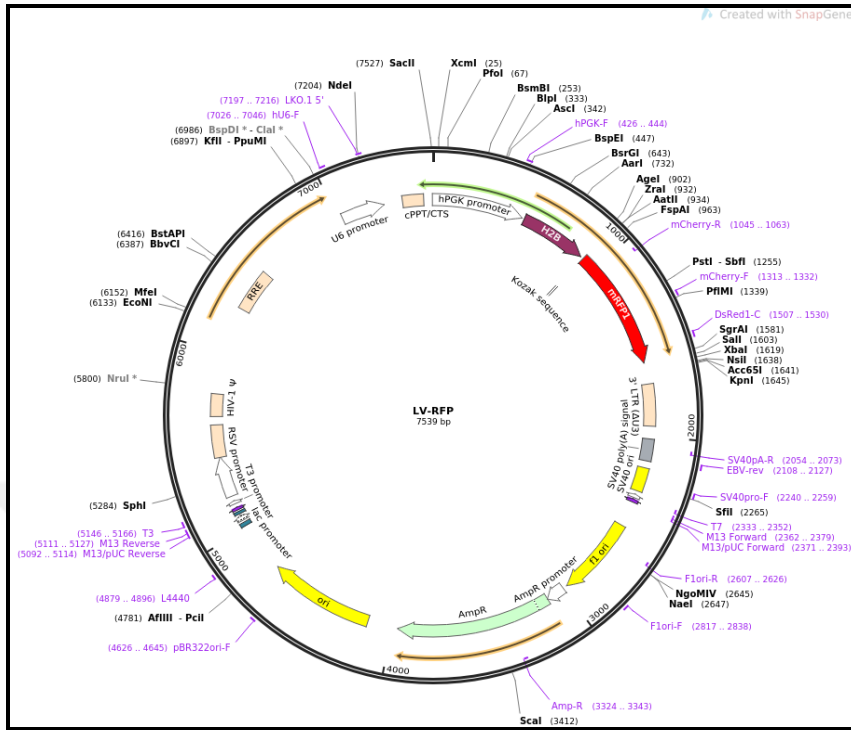
Terapötik olarak STAT3 genini susturması amacıyla 7048 bç büyüklüğünde, ampisilin ve puromisin antibiyotiklerine karşı direnç genleri taşıyan pSIH1-puro-STAT3 shRNA plazmit DNA'sı kullanıldı. pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA vektör haritası Şekil 3.2'de gösterildiği gibidir.

4T1 meme kanseri hücre hattı

4T1 fare meme kanseri hücre dizisi (ATCC® CRL-2539) kullanıldı.

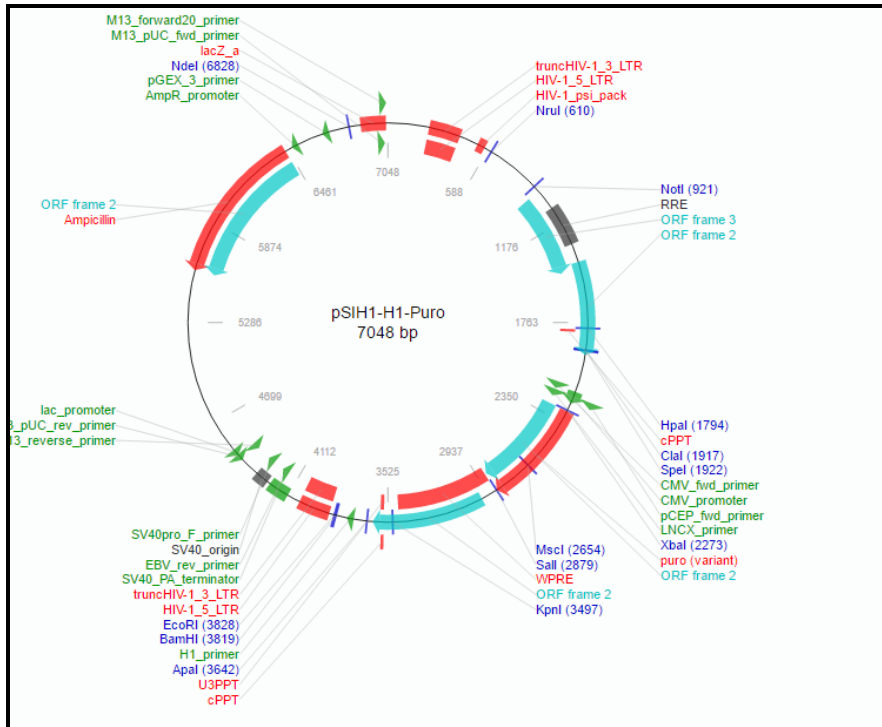
Kullanılan bakteri

pDNA'nın çoğaltılmasında konakçı bakteri hücresi olarak *Escherichia coli* DH5 α (*E. coli*) suşu kullanıldı.



(Addgene plazmit #26001)

Şekil 3.1. LV-RFP plazmit DNA vektör haritası



(Addgene plazmit # 26596)

Şekil 3.2. pSIH1-puro-STAT3 shRNA plazmit DNA vektör haritası

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazların listesi kullanım amaçları ile birlikte Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1. Analizlerde kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Kullanılan cihazlar	Kullanım amaçları
AutoclaveSystemec VE55	Kullanılan çözeltilerin sterilizasyonu
BiofugeStratosHeraeus	pDNA izolasyonu
Bio-RAD PowerPac Basic	Agaroz jel elektroforezi
Çalkalamalı İnkübatör SHEL LAB SI Series	Bakteri kültürü
Floresan Microscope	Hücre görüntüleme
Heidolph İnkübatör 1000	Bakteri kültürü
Heidolph MR3001 Manyetik Karıştırıcı	Çözelti hazırlama
Heidolph Unimax 1010	Bakteri kültürü
KODAK Image Station 2000min	Agaroz jel elektroforezi
Mettler Toledo Hassas Terazî	Çözelti hazırlama
Olympus CKX41 Mikroskop	Hücre görüntüleme
Olympus IX2-UCB	Hücre görüntüleme
Thermo Multiskan Spectrum	pDNA izolasyonu
ThermoScientific Heracell 240 CO ₂ İnkübatör	Hücre kültürü
ThermoScientific Orion Star A111 pH metre	Çözelti hazırlama

3.2. Genetik Materyalin Elde Edilmesi

Deneysel çalışmalarımızda LV-RFP (Addgene #plazmit 26001) ve pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA (Addgene #plazmit 26596) kullanıldı. *Escherichia coli* bakteri hücresi içinde bulunan LV-RFP plazmit DNA'sının izolasyonu alkali lizis yöntemi ile; pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA'sının izolasyonu Qiagen maksit kit ile yapıldı.

Kullanılan Çözeltiler

Luria-Bertani Agar (Sigma Aldrich L2897): 35 g LB agar tartılıp 1 L dH₂O'da çözüldü ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Otoklav işleminden sonra oda sıcaklığında biraz bekleyen LB agar içerisine 100µg/ml olacak şekilde ampisilin eklendi.

Luria-Bertani Broth (Sigma Aldrich L3022): 20 g LB tartılıp 1 L dH₂O'da çözüldü ve 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Otoklav işleminden sonra oda sıcaklığında biraz bekleyen LB broth içerisine 100µg/ml olacak şekilde ampisilin eklendi.

Tris (Vivantis biochemical Mw:121.4 g/mol): 10mM Tris-Cl için 30.285g tartılıp 250 ml dH₂O'da çözüldü ve HCl kullanılarak pH 8'e ayarlandı.

EDTA (Sigma aldrich Mw:372.2 g/mol): 0.5 M EDTA hazırlamak için 9.306 g EDTA tartılıp 50 ml dH₂O'da çözüldü ve NaOH kullanılarak pH 8'e ayarlandı.

3.2.1. Bakteri Hücrelerinin Katı Besi Yerine Ekimi ve Tek Koloni Seçimi

Tek koloni izolasyonu aynı özelliklere sahip olan bakteri topluluğunu seçmeye yarayan bir işlemdir.

1. 100 µg/ml ampisilin içeren LB agar besiyeri hazırlandı.
2. -20°C'de saklanan, pDNA içeren *E. coli* bakteri stoğundan bakteri örneği alındı ve petri yüzeyinin yaklaşık 1/3'ünü kaplayacak şekilde steril öze ucu ile üç aşamalı çizik oluşturularak ekim yapıldı.
3. Ekim yapılan petriler gece boyu 37°C'de inkübatörde bırakılarak bakterilerin çoğalması sağlandı.

4. Agarlı besiyerinde üremiş olan kolonilerden tek koloni seçilerek, daha önce hazırlanan 100 µg/ml ampisilin içeren LB sıvı besiyerine ekim yapılarak mini kültür kuruldu.
5. Bakteri kültürü 37°C'deki inkübatörde 200 rpm'de çalkalanarak yaklaşık 8 saat inkübasyona bırakıldı.
6. Daha sonra yine 100 µg/ml ampisilin içeren sıvı LB ile mini kültürden bakteri alınarak maksî kültür kuruldu.
7. Bakteri kültürü 37°C'de 200 rpm'de çalkalanarak, 12 saat inkübe edildi ve plazmit DNA izolasyonuna geçildi.

3.2.2. LV-RFP pDNA İzolasyonu

Ön çalışmada kullanılmak üzere LV-RFP pDNA izolasyonu için alkali lizis yöntemi kullanıldı (Sambrook, Fritsch ve ark., 1989). Bunun için gerekli çözeltiler Tablo 3.2'de verildiği gibidir.

Tablo 3.2. Alkali Lizis yönteminde kullanılan çözeltiler

Çözelti I
Glukoz 50mM Tris-Cl (pH:8.0) 25mM EDTA (pH:8.0) 10mM
Çözelti II
Sodyum hidroksit 0.2 N SDS %1
Çözelti III
Potasyum asetat (5M) Glasiyel asetik asit Distile su

Alkali lizis yöntemi ile pDNA izolasyonu aşağıda anlatıldığı şekilde yapıldı:

1. Bakteri kültürü 12.000 g'de 3 dakika santrifüj edildi ve çöktürme işlemi gerçekleştirildi.
2. Süpernatant döküldü ve çöken pellet üzerine buz üzerinde soğutulmuş Çözelti I eklenerek, vortekslenip buz üzerinde 30 dakika bekletildi.
3. Daha sonra üzerine taze hazırlanmış olan Çözelti II eklendi ve tüpler 5 kez hassas bir şekilde elle çalkalandı.
4. 3-4 dakika buz üzerinde bekletildi.
5. Buz üzerinde bekletilen Çözelti III eklendi ve vortekslenerek 3-5 dakika buz üzerinde bekletildi.
6. 12.000 g'de 5 dakika santrifüjlendi.
7. DNA'yı çöktürmek için %100 etil alkol eklendi ve 12.000 g'de 5 dakika santrifüjlendi.
8. Çöken pellet üzerine 1 ml %70'lik etil alkol eklenip 12.000 g'de 5 dakika santrifüjlendi.
9. Daha sonra üst faz dökülerek pellet kurumaya bırakıldı ve DNA 1X TE tamponda çözüldü.

3.2.3. pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA İzolasyonu

Terapötik amaçla kullanılması planlanan pSIH1-puro-STAT3 shRNA plazmit DNA izolasyonu QIAGEN plazmit maksit kit (Cat No/12162) ile yapıldı. İzolasyon işlemi QIAGEN plazmit maksit kitin içinde bulunan protokole göre yapıldı. İzole edilen pDNA 1X TE solüsyonunda çözüldü ve küçük parçalara ayrılarak -20°C'de saklandı.

Kit kullanılarak yapılacak pDNA izolasyonu için işlem basamakları aşağıdaki gibidir:

1. Gece boyu inkübasyona bırakılan kültür 4800 g'de 20 dakika santrifüj edildi.

2. Santrifüjledikten sonra süpernatant döküldü ve pellet üzerine 10 ml P1 tampon çözeltisi eklenerek pipetaj yapıldı.
3. Pipetaj işleminden sonra P2 tampon çözeltisi eklendi ve 10 kez hassas bir şekilde elle çalkalandı. 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyondan sonra P3 tampon çözeltisi eklendi ve 6-7 kez çalkalandıktan sonra 20 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakıldı.
5. 20.000 g'de 30 dakika 4°C'de santrifüj edildi.
6. Santrifüjden hemen alınan supernatant QBT tampon çözeltisi ile doyurulan kolondan geçirildi.
7. Kolon tamamen boşaldıktan sonra QC tampon çözeltisi ile yıkandı.
8. DNA'yı toplamak için QF tampon çözeltisi eklendi.
9. Daha sonra hızlı bir şekilde izopropanol eklendi.
10. 15.000 g'de 30 dakika 4°C'de santrifüj edildi.
11. Supernatant döküldükten sonra pellet üzerine %70'lik etil alkol eklendi ve 15.000 g'de 10 dakika 4°C'de santrifüj edildi.
12. Santrifüjden aldıktan sonra süpernatant döküldü ve 5 dakika buz üzerinde kurumaya bırakıldı.
13. Pellet üzerine 1X TE çözeltisi eklendi.
14. pDNA konsantrasyonu spektrofotometre (Thermo Multiskan Spectrum) ile ölçüm yapılarak belirlendi.

3.3. Genetik Materyallerin Karakterizasyonu

İzole edilen pDNA'lar; plazmid DNA'nın saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi, elektroforetik hareketin değerlendirilmesi ve restriksiyon enzim analizi ile plazmit DNA'nın doğrulanması yöntemleri ile karakterize edildi.

3.3.1. Plazmit DNA'nın Saflığının ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İzole edilen pDNA'nın saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi için 260 ve 280 nm dalga boyunda spektrofotometre ile absorbans ölçümü yapıldı. pDNA 1XTE tamponunda çözüldü. Daha sonra pDNA çözeltisinden bir miktar alınarak belirli bir oranda dilüe edildi ve 260-280 nm dalga boyunda spektrofotometre (Thermo Electron Corporation Multiskan Spectrum) ile absorbans ölçümü yapıldı.

Plazmit DNA saflığı $A_{280/260}$ oranına göre değerlendirildi. OD280 çözeltideki protein miktarını; OD260 ise DNA miktarını gösterir. Bu oranın 1.8-2.0 arasında çıkması pDNA'nın saf olduğu bilgisini verir.

pDNA konsantrasyonu ise aşağıda verilmiş olan denkleme göre hesaplandı.

pDNA konsantrasyonu = $A_{260} \times 50 \times \text{Dilüsyon faktörü}$

3.3.2. Elektroforetik Hareketin Değerlendirilmesi

İzole edilen pDNA'ların büyüklükleri %1'lik (a/h) hazırlanan agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Agaroz jelde tampon çözeltisi olarak 1XTBE kullanıldı. TBE çözeltisi aşağıda anlatıldığı gibi hazırlandı.

TBE çözeltisi (Tris- Borik Asit- EDTA): 0.5 M EDTA hazırlamak için 186.1 g disodyum EDTA 1L dH₂O'da çözüldü ve NaOH ile pH 8'e ayarlanarak daha sonra filtreden geçirildi. 1 L TBE çözeltisi hazırlamak için 54 g Tris baz ve 27.5 g borik asit tartılıp üzerine 20 ml 0.5 M EDTA eklenerek 1L'ye tamamlandı ve pH 8.3 ayarlandı.

pSIH-puro-STAT3 shRNA pDNA ve LV-RFP pDNA'sı % 1'lik (a/h) agaroz jel elektroforezinde 90 v sabit elektrik akımında 45 dakika yürütüldü (BIOrad) ve görüntüleme (KODAK Image Station 2000min) yapıldı.

3.3.3. Restriksiyon Enzim Analizi ile pDNA'nın Doğrulanması

Plazmit DNA'ların üzerinde belirli spesifik tanıma bölgeleri vardır. pDNA haritasında restriksiyon enzimlerinin pDNA'yı hangi büyüklükte keseceği bilgisi verilmektedir. Bu bilgiler dahilinde uygun enzimler kullanılarak izolasyon yapılan pDNA'nın doğru olup olmadığı doğrulandı.

pDNA'lar uygun endonükleaz enzimler tarafından kesildikten sonra, agaroz jel elektroforezinde görünen DNA bantlarına bakılarak doğrulukları değerlendirildi. pSIH-puro-STAT3 shRNA pDNA KpnI ve EcoRI enzimleri kullanılarak kesildi. Kesim işlemi 20 µl reaksiyon ortamında gerçekleştirildi. 1 µl pDNA, 1 µl KpnI ve EcoRI enzimi, 2 µl hızlı parçalama tamponu (green buffer, Thermofisher) ve 15 µl enjeksiyonluk su eklenerek 20 µl ye tamamlandı ve 37°C'de 30 dk su banyosunda enzim aktivitesi için bekletildi. Enzim ile kesilen pDNA % 1'lik (a/h) agaroz jel elektroforezinde yürütülerek değerlendirildi.

LV-RFP pDNA'sı NotI, KpnI ve EcoRI enzimleri kullanılarak kesildi. Kesim işlemi 20 µl reaksiyon ortamında gerçekleştirildi. 1 µl pDNA, 1 µl NotI, KpnI ve EcoRI enzimi, 2 µl hızlı parçalama tamponu (green buffer, Thermofisher) ve 14 µl enjeksiyonluk su eklenerek 20 µl ye tamamlandı ve 37°C'de 15 dk su banyosunda enzim aktivitesi için bekletildi. Kesilen pDNA % 1'lik (a/h) agaroz jel elektroforezinde yürütülerek değerlendirildi.

3.4. Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması

İn vitro transfeksiyon çalışmalarında pDNA'yı hücre içine aktarmak için yüksek, orta ve düşük moleküler ağırlıklı kitosan (doğal) ve dallanmış ve doğrusal polietilenimin (sentetik) polimerleri kullanıldı. Taşıyıcı sistemin amacı pDNA'yı serumda bulunan nükleazlara karşı korumak ve pDNA'nın stabil kalmasını sağlamaktır.

Kullanılan maddeler

1. *Yüksek molekül ağırlıklı kitosan (YMA) (Fluka ~600.000 Mw):* Stok çözelti 2mg/ml olacak şekilde %1'lik (h/h) asetik asit kullanılarak hazırlandı ve pH 4.5-5.5 olarak ayarlandı.
2. *Orta molekül ağırlıklı kitosan (OMA) (Fluka ~400.000 Mw):* Stok çözelti 2 mg/ml olacak şekilde %1' lik (h/h) asetik asit kullanılarak hazırlandı ve pH 4.5-5.5 olarak ayarlandı.

3. *Düşük molekül ağırlıklı kitosan (DMA) (Fluka ~150.000 Mw)*: Stok çözelti 2 mg/ml olacak şekilde %1'lik (h/h) asetik asit kullanılarak hazırlandı ve pH 4.5-5.5 olarak ayarlandı.
4. *Sodyum tripolifosfat, 85% (Na- TPP, Sigma aldrich 238503)*: Stok çözeltisi 0.4 mg/ml, 0.55 mg/ml ve 0.84 mg/ml olacak şekilde hazırlandı ve pH 8.0 olarak ayarlandı.
5. *Doğrusal polietilenimin (LPEI) (Polysciences, Inc Cat. No. 23966~25.000mw)*: Stok çözelti 1mg/ml olacak şekilde hazırlandı ve pH 7.0 olarak ayarlandı.
6. *Dallanmış polietilenimin (BPEI) (Sigma Aldrich 408727 average Mw~25.000 by LS)*: Stok çözeltisi 1mg/ml olacak şekilde hazırlandı.

3.4.1. Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Kitosan nanopartikülleri DMA, OMA ve YMA kitosan ve sodyum tripolifosfat (Na-TPP) ile iyonik jelasyon yöntemi kullanılarak hazırlandı. İyonik jelasyon yöntemi, pozitif yüklü kitosan ile negatif yüklü çapraz bağlayıcı Na-TPP'nin oda sıcaklığında iyonik etkileşimine dayanır (Calvo ve ark., 1997).

Kitosan nanopartikülleri, Tablo 3.3'de belirtilen Na-TPP/kitosan ağırlık/ağırlık (a/a) oranlarında hazırlandı. Kitosan çözeltisinin pH'ı 5.5 ve Na-TPP çözeltisinin pH'ı 8 olarak ayarlandı. Hazırlanan kitosan çözeltisi üzerine, manyetik karıştırıcı üzerinde Na-TPP çözeltisi damlatılarak eklendi. Tüm karıştırma işlemleri 500 rpmde 10 dakika gerçekleştirildi.

Tablo 3.3. Kitosan nanopartiküllerinin hazırlandığı oranlar

TPP Konsantrasyonları (mg/ml)	Kitosan Çeşitleri					
	Düşük molekül ağırlıklı kitosan (2 mg/ml)	KOD	Orta molekül ağırlıklı kitosan (2 mg/ml)	KOD	Yüksek molekül ağırlıklı kitosan (2mg/ml)	KOD
0.4	1:4	D14	1:4	O14	1:4	Y14
0.55	1:4	D24	1:4	O24	1:4	Y24
0.84	1:1	D31	1:1	O31	1:1	Y31
	1:3	D33	1:3	O33	1:3	Y33
	1:5	D35	1:5	O35	1:5	Y35
	1:7	D37	1:7	O36	1:7	Y37

3.4.2. Kitosan Nanopartikül -pDNA Komplekslerinin Hazırlanması

Tablo 3.3 de belirtilen oranlarda hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının hepsi 1µg/µl LV-RFP plazmit DNA ile 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ve 6:1 (h/h) oranında karıştırıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılarak kitosan nanopartikül-pDNA kompleksleri hazırlandı. Tüm nanopartikül formülasyonlarının pDNA ile kompleks oluşturabilme özelliği % 1'lik (a/h) agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi.

3.4.3. Polietilenimin ile Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması

İzole edilen pDNA'nın hücre içerisine taşınmasında sentetik yapıda; yüksek molekül ağırlıklı, dallanmış (BPEI) polietilenimin ve düşük molekül ağırlıklı, doğrusal (LPEI) polietilenimin kullanıldı. Her iki polietilenimin polimerinin çözeltisi dH₂O içinde 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanarak pH'ı 7'ye ayarlandı ve kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

3.4.4. Polietilenimin-pDNA Poliplekslerinin Hazırlanması

1 mg/ml stok konsantrasyonda hazırlanan BPEI ve LPEI polimerleri ile 1 µg/µl LV-RFP pDNA'sı Tablo 3.4'de belirtilen pDNA/polietilenimin oranlarında karıştırılarak, 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

Tablo 3.4. Polietilenimin ve pDNA poliplekslerinin hazırlandığı oranlar (a:a)

	Polietilenimin			
	Dallanmış polietilenimin (BPEI) (1 µg/µl)	KOD	Doğrusal polietilenimin (LPEI) (1 µg/µl)	KOD
LV-RFP pDNA 1 µg/µl	1:1	L1	1:1	B1
	1:2	L2	1:2	B2
	1:3	L3	1:3	B3
	1:4	L4	1:4	B4
	1:5	L5	1:5	B5
	1:6	L6	1:6	B6

3.5. Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu

Kitosan ve PEI polimerleri kullanılarak hazırlanan pDNA taşıyıcı sistemler, boyut ve zeta potansiyelleri ölçüldükten sonra, transfeksiyon çalışmalarında kullanıldı; transfeksiyondan sonra sitotoksik özellikleri ve serum stabiliteyi değerlendirildi. Sitotoksikite çalışması 3-(4,5-dimetiltiyazol -2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) testi ile, serum stabilite deneyi %1'lik (a/h) agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi. Boyut ve zeta potansiyel ölçümü için Malvern Zetasizer ZEN3600 kullanıldı.

3.5.1. Taşıyıcı Sistemlerin Yüklerinin ve Boyutlarının Ölçülmesi

Hazırlanan taşıyıcı sistemler 1:1000 kat seyreltilerek yükleri (zeta potansiyel) ve boyutları ölçüldü. Hazırlanan taşıyıcı sistemlerin yük (zeta potansiyel) ve boyutunun ölçülmesi bu taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonu açısından önemli parametrelerdir. Ölçüm yapılan cihazın çalışma prensibi, dinamik ışık saçılımı kullanılarak seyreltik çözelti içerisindeki küçük parçacıklardan saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin

ölçülmesi temeline dayanır. Saçılan ışığın şiddetindeki değişim, parçacığın büyüklüğüne, ortamın vizkozitesine, ortamın sıcaklığına ve parçacığın hareketine bağlıdır. Saçılan ışığın açısı ve şiddeti örneğin parçacık boyut dağılımını belirler. Parçacık içerisinden geçen ışığın saçılma açısı parçacık boyutuna bağlıdır. Parçacık boyutu düşüldükçe saçılma açısı logaritmik olarak artar. Boyutun küçük olması taşınan genetik materyalin hücre içine girmesini kolaylaştırır.

Zeta potansiyel parçacık ile içinde bulunduğu çözelti arasında oluşur. Parçacıklar arasında itme ve çekme kuvveti oluşturur. Bir çözelti içerisindeki aynı yükteki parçacıklar birbirlerini iter, zıt yükteki parçacıklar ise birbirini çeker. Bu çekme ve itme kuvveti parçacığın zeta potansiyel değerine bağlıdır. Zeta potansiyel ölçümü Doppler prensibi kullanılarak elektrik alanı uygulanan parçacıkların hızının ölçümü esasına dayanır. Zeta potansiyel değeri, parçacığın içinde bulunduğu çözeltinin pH değeri ile değişir.

3.5.2. Taşıyıcı Sistemlerin Serum İçerisindeki Stabilitelerinin Değerlendirilmesi

Hazırlanan pDNA taşıyıcı sistemlerinin pDNA'yı serumda bulunan nükleazlara karşı koruyup korumadığını değerlendirmek için hazırlanan formülasyonlar %10 FBS serum içeren DMEM içerisinde 30 dk ve 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda % 1'lik (a/h) sodyumdodesilsülfat (SDS, Sigma L4390) ile deney sonlandırıldı ve serum içerisindeki stabilitesi %1'lik (a/h) agaroz jel elektroforezinde değerlendirildi (Akbaba , 2010).

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma D5648; 4,5 g/l glukoz ve L-glutamin): Bir şişe toz besiyeri ve 3,7 g sodyum bikarbonat 800 ml distile su içinde çözüldü ve pH 7.4 ayarlandıktan sonra 1 litreye tamamlandı. Steril kabinde 0,22 µmlik filtre ile filtreledikten sonra, 10 ml penisilin-streptomisin çözeltisi (Biological Industries) amfoterisin ve sodyum piruvat eklendi. Serumlu DMEM için %10 oranında ısı ile inaktive edilmiş FBS (Fetal Sığır Serum, Biochrom AG) eklendi.

3.5.3. Taşıyıcı Sistemlerin Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi

Taşıyıcı sistemlerin sitotoksitesisi MTT testi ile değerlendirildi. MTT testi, hücre canlılığını ve proliferasyonunu test etmek için kullanılan yöntemlerden biridir.

Yöntemin temeli, canlı hücrelerin metabolik aktivitelerinin ölçümüne dayanır. Canlı hücreler, ortamdaki MTT'yi renkli formazan kristallerine dönüştürür. Ortaya çıkan formazon kristallerinin miktarı, çözümlerini takiben 570-630 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenebilir. Çoğalan hücreler proliferasyon olmayan hücrelerden metabolik olarak daha çok aktivite gösterdiği için, bu yöntem hücre canlılığını ve sitotoksiteyi ölçmenin yanında, hücre proliferasyon oranına da işaret eder. Suda çözünen bir tetrazolyum tuzu olan MTT, tuz çözeltileri ile hazırlandığında sarımtırak bir çözelti halindedir. Tetrazolyum halkasının dehidrogenaz enzimleri tarafından parçalanması sonucu MTT mor renkli, çözünebilir formazana dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığıyla gerçekleşir. Oluşan bu formazan bir çözücü yardımıyla çözülür ve ortaya çıkan kolorimetrik reaksiyon spektrofotometrik olarak okunup miktar tayini yapılır.

MTT (5 mg/ml) Çözeltisi

MTT (AppliChem, A2231) 5 mg tartıldı ve 10 ml 1X PBS içinde çözüldü. Steril kabinde 0,22 µm filtreden geçirilerek +4°C'de karanlıkta muhafaza edildi.

MTT testi için, 96 kuyucuklu kültür kaplarında kültüre edilmiş olan hücrelere, 100 µl besiyeri varlığında 20 µl MTT çözeltisi (5 mg/ml) eklendi ve 4 saat 37°C'de inkübe edildi. Süre sonunda besiyeri uzaklaştırıldı ve 100 µl DMSO (Sigma D8418) eklendi, 5 dakika çalkalandıktan sonra spektrofotometrede 570-640 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

3.6. Transfeksiyon Çalışmaları

Hazırlanan tüm kitosan nanopartikül:pDNA kompleksleri ve dallanmış ve doğrusal PEI pDNA poliplekslerinin gen aktarım etkinlikleri transfeksiyon çalışmasıyla değerlendirildi. Transfeksiyon çalışması aşağıda anlatıldığı şekilde yapıldı.

Kullanılan Çözeltiler

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma D5648; 4,5 g/l glukoz ve L-glutamin): Bölüm 3.5.2'deki gibi hazırlandı.

Fosfat tampon çözeltisi (PBS): 8 g NaCl (Sigma S9888), 0,2 g KCl (Sigma P9541), 1,44 g NaH₂PO₄ (Sigma), ve 0,24 g KH₂PO₄ (Sigma) tartıldı ve 800 ml dH₂O içinde

çözüldü. Çözeltinin pH'sı NaOH ile 7.4'e ayarlandı ve toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan çözelti steril kabinde 0,22 µm vakumlu filtreden geçirildi.

Tripsin-EDTA Çözeltisi: 1X Tripsin-EDTA çözeltisi (Biochrom AG, L2133) kullanıldı.

3.6.1. Hücrelerin Pasajlanması

Petri kabında üretilen hücreler, petri yüzeyinin yaklaşık %80'ini kapladıklarında pasajlandı. Bunun için, besiyeri çekilerek atıldıktan ve 5 ml PBS ile yıkandıktan sonra, 2 ml Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 3-5 dakika inkübatörde bekletildi. Hücreler yüzeyden ayrılmaya başlayınca 8-10 ml serumlu besiyeri ile süspanse edilerek santrifüj tüpüne alındı ve 125g de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet 10 ml serumlu besiyerinde homojenize edilerek petrilere dağıtıldı. 4T1 hücrelerinin yoğunluğuna göre pasaj yapıldı veya besiyeri değiştirildi.

3.6.2. Hücrelerin Dondurulması

Petrilerin yüzeyini yaklaşık %80 oranında kaplayan hücreler, PBS ile yıkayıp Tripsin-EDTA çözeltisinde 3 ila 5 dakika inkübatörde bekletildikten sonra serumlu besiyeri eklendi ve 125 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra çökelti, %5 DMSO ve % 95 FBS karışımıyla süspanse edilerek Cryo.s™ tüplere bölündü (1 petriden yaklaşık 3 adet). Alkol içeren kaplarda 1 gece -80°C'de bekletildikten sonra sıvı azot tankına aktarıldı.

3.6.3. Hücrelerin Sayımı

Thoma lamında hücre sayımına hazırlık olarak hücreler tripsinle kaldırılarak besiyerinde süspanse edildi. Bu süspansiyondan 100 µl alınarak 1 ml ependorf içinde 100 µl Trypan Blue boyası ile karıştırılarak pipetaj yapıldı. Hücre zarının bütünlüğü bozulduğunda Trypan Blue boyası hücre içerisine girerek sitoplazmayı boyamaktadır. Canlı hücreler Trypan Blue boyasını geçirmediğinden işlem sonucunda mikroskopta parlak sarı renkte, ölü hücreler ise mavi renkte görülür.

Hücre sayısının belirlenme formülü = $H_s \times D_o \times S_s$

(Hs/ Hücre sayısı, Do/ Dilüsyon oranı, Ss/ 0,1 mm³'te gerçekleştirilen sayımın 1 ml hacimdeki karşılığının bulunması ve standart sonuç elde edilmesi amacıyla kullanılan sabit sayı/ 10.000).

Thoma lamında 0,1 mm³ hacimde sayım yapılır. 1 küçük kare olarak belirtilen kare prizmanın hacmi = 0,005 mm x 0,05 mm x 0,1 mm = 0,00025 mm³ = 1/4.000 mm³'tür. Bir sayım alanında 16 x 25 = 400 küçük kare olduğundan, toplam sayım hacmi = 0,00025 mm³ x 400 = 0,1 mm³'dür.

Ön transfeksiyon çalışmaları için LV-RFP plazmit DNA'sı ve Tablo 3.3 ve 3.4'de verilmiş formülasyonlar kullanıldı. 4T1 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara 30.000/ kuyucuk olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra 70-80% doluluğa ulaşmış 4T1 hücreleri 1X PBS ile yıkandı. Daha sonra, %10 FBS içeren 100 µl DMEM besi yeri ile karıştırılan formülasyonlar 4T1 hücreleri üzerine eklenerek; 37°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatin sonunda eski besiyeri, taze besi yeri ile değiştirildi. 24., 48. ve 72. saatlerde floresan mikroskopunda (Olympus CKX41 Mikroskop) ışımalara bakılarak transfeksiyon etkinliği değerlendirildi.

Ön transfeksiyon çalışmalarında başarılı bulunan LV-RFP plazmit DNA'yı hücrelere aktarabilen formülasyonların transfeksiyon yetenekleri daha sonra pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA'sı ile değerlendirildi. Üzerinde puromisin direnç geni taşıyan pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA'sının transfeksiyon çalışmalarından önce ilk olarak optimum puromisin konsantrasyonu belirlendi.

3.6.4. pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA'sının Transfeksiyonu İçin Optimum Puromisin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA'sının transfeksiyon etkinliğini değerlendirmek için öncelikle 4T1 hücresi için optimum puromisin konsantrasyonu belirlendi. pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA'sı üzerinde puromisin direnç geni bulunmaktadır. Plazmit DNA'yı aktardığımız hücreler puromisin direnç genine sahip olacağından puromisin içeren ortamda direnç göstererek canlı kalacaktır. Puromisin düşük antibiyotik konsantrasyonlarında, hızlı hücre ölümüne neden olan hızlı bir etkiye sahiptir. Yapışkan (adherent) memeli hücreleri 2-5 ug/ml konsantrasyonlarında duyarlıdır

(www.thermofisher.com Erişim tarihi 12 Aralık 2017). Bu nedenle 4T1 hücreleri için hücreleri tamamen öldürmeyen dozu belirlemek amacıyla puromisin konsantrasyonu belirlendi. Bu konsantrasyonlar insan meme kanseri hücre hatlarında yapılan diğer çalışmalarda kullanılan oranlara göre belirlendi. Puromisin uygulamasından 24 saat önce 96 kuyucuklu plakalara 30.000/kuyucuk hücre ekildi ve puromisinin 0.1, 0.5, 1, 2.5 ve 5 µg/ml konsantrasyonları uygulandı. Sonuçlar 48 saat sonra MTT yapılarak değerlendirildi.

3.7. Hücrenin Migrasyon Hızının Değerlendirilmesi

Hücrenin migrasyon hızı yaygın olarak kullanılan yara iyileşmesi (Wound Healing/Scratch Assay) yöntemi ile değerlendirildi. Bu tez çalışmasında kullanılan 4T1 fare meme kanseri hücre dizisi çok fazla metastaz yapan bir fizyolojiye sahiptir ve meme kanseri hücre hatlarında bu parametrenin değerlendirilmesi önem taşımaktadır. pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA'sını başarılı bir şekilde aktararak STAT3 genini baskılamak ve hücrenin migrasyon yeteneğinin durdurulması amaçlandı.

Kullanılan çözeltiler

DMEM besiyeri: Bölüm 3.5.2'deki gibi hazırlandı.

Fosfat tampon çözeltisi (PBS): Bölüm 3.6'daki gibi hazırlandı.

Hücrenin migrasyon hızını değerlendirmek için LV RFP pDNA'sı ile yapılan transfeksiyon ve sitotoksosite çalışması sonucunda belirlenen formülasyonlar kullanıldı. Transfeksiyon ve sitotoksosite çalışması sonucunda belirlenen formülasyonlar Tablo 3.5'de verildi. 4T1 hücreleri 24 kuyucuklu plaklara 150.000/kuyucuk olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra doluluk oranı %90 olduğunda 10µl steril pipet ucu ile çizik oluşturuldu ve PBS ile yıkandı. Hazırlanan bu formülasyonlar uygulandı ve uygun koşullarda 37°C'de inkübatörde 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saatin sonunda %10 FBS içeren DMEM taze besiyeri ile değiştirildi. 0., 24., 48 ve 72. saatlerde görüntü alındı (Olympus CKX41 floresan mikroskop).

Ayrıca formülasyonda kullandığımız polimerlerin hücreye tek başına etki edip etmeyeceği değerlendirildi. Uygulanan miktarlar Tablo 3.6'da verildi. Hücreye

uygulanan polimerler 4 saat inkübasyona bırakıldı ve sonra eski besiyeri taze besi yeri ile değiştirildi. 0., 24., 48 ve 72. saatlerde görüntü alındı (Olympus CKX41 floresan mikroskop).

Tablo 3.5. Hazırlanan polietilenimin:pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA kompleksleri

Kod	Polipeksler	a:a ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$)	h:h ($\mu\text{l}/\mu\text{l}$)
L1S	LPEI:pSIH1 puro- STAT3 shRNA pDNA	1:1	2:2
L2S	LPEI:pSIH1 puro- STAT3 shRNA pDNA	2:1	4:2
L3S	LPEI:pSIH1 puro- STAT3 shRNA pDNA	3:1	6:2
B1S	BPEI:pSIH1 puro- STAT3 shRNA pDNA	1:1	2:2
B2S	BPEI:pSIH1 puro- STAT3 shRNA pDNA	2:1	4:2
ÇPS	Çıplak pSIH1 puro- STAT3 shRNA pDNA	2	
K	Kontrol hücre		

Tablo 3.6. Kullanılan dallanmış ve doğrusal polietilenimin miktarları

Kod	Polimer	Miktar
LPEI/1	Doğrusal polietilenimin	1 μg
LPEI/2	Doğrusal polietilenimin	2 μg
LPEI/3	Doğrusal polietilenimin	3 μg
BPEI/1	Dallanmış polietilenimin	1 μg
BPEI/2	Dallanmış polietilenimin	2 μg

4. BULGULAR

4.1. Genetik Materyalin Eldesi ve Karakterizasyonu

Deneysel çalışmalarımızda LV-RFP (Addgene #plazmit 26001) ve pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA (Addgene #plazmit 26596) kullanıldı. *Escherichia coli* bakteri hücresi içinde bulunan LV-RFP plazmit DNA'sının izolasyonu Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde; pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA'sının izolasyonu Bölüm 3.2.3'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

İzole edilen pDNA'lar; plazmit DNA'nın saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi, elektroforetik hareketinin değerlendirilmesi ve restriksiyon enzim analizi ile plazmit DNA'nın doğrulanması yöntemleri ile karakterize edildi.

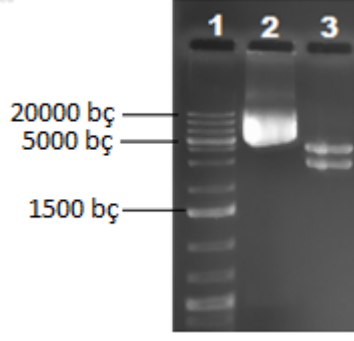
4.1.1. Plazmit DNA'nın Saflığının ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İzole edilen pDNA'ların saflık ve konsantrasyonları Bölüm 3.3.1'de anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır. Konsantrasyonları 1.7-2 µg/µl, saflıkları 1.8-2.0 aralığında hesaplandı.

4.1.2. Elektroforetik Hareketin Değerlendirilmesi ve Restriksiyon Enzim Analizi

İzole edilen pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA ve LV-RFP pDNA'larının elektroforetik hareketi Bölüm 3.3.2'de; doğruluğu Bölüm 3.3.3'de anlatıldığı şekilde belirlenmiştir.

pSIH1- puro-STAT3 shRNA pDNA'sının KpnI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile tanıma bölgelerinden kesildiği Şekil 4.1'de; LV-RFP pDNA'sının NotI, KpnI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile tanıma bölgelerinden kesildiği Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

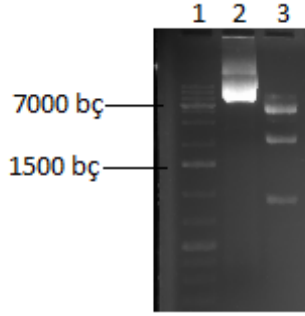


Şekil 4.1. Restriksiyon enzim kesimi yapılan pSIH1- puro-STAT3 shRNA pDNA'nın agaroz jel elektroforez fotoğrafı

Örnek 1: DNA molekül ağırlık standartı (1 kb plus DNA ladder Thermo)

Örnek 2: pSIH1- puro-STAT3 shRNA pDNA (7048 bç)

Örnek 3: KpnI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılan örnek



Şekil 4.2. Restriksiyon enzim kesimi yapılan LV-RFP pDNA'nın agaroz jel elektroforez fotoğrafı

Örnek 1: DNA molekül ağırlık standartı (1 kb plus DNA ladder Thermo)

Örnek 2: LV-RFP pDNA (7539 bç)

Örnek 3: NotI, KpnI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılan örnek

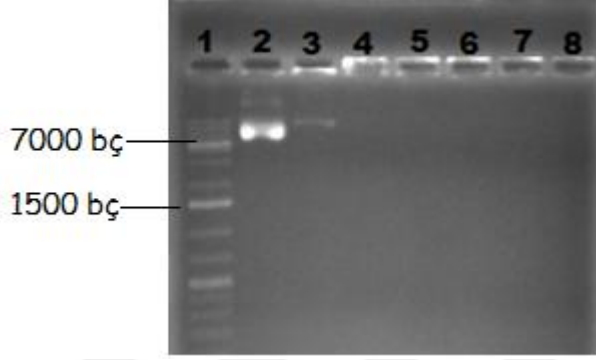
4.2. Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması

pDNA'yı serumda bulunan nükleazlara karşı korumak ve pDNA'nın stabil kalmasını sağlamak amacıyla Bölüm 3.4.1 ve 3.4.3'de anlatıldığı şekilde kitosan nanopartikülleri ve polietilenimin çözeltisi hazırlandı.

4.2.1. Kitosan Nanopartikül-pDNA Kompleks Oluşumunun Değerlendirilmesi

Ön çalışmalarda kullanılmak üzere yüksek, orta ve düşük molekül ağırlıklı kitosan nanopartikülleri Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı şekilde LV-RFP plazmit DNA'sı ile kompleksleştirildi. Tablo 3.3'de verilen oranlarda hazırlanmış kitosan nanopartikülleri ile pDNA'nın kompleks oluşturup oluşturmadığı agaroz jel elektroforezi ile

değerlendirildi. D33, O33 ve Y33 kodlu kitosan nanopartiküllerinin ve pDNA'nın elektrostatik etkileşim ile kompleks oluşturduğu sırasıyla Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Çıplak plazmit DNA ile karşılaştırıldığında komplekslerin kuyucukta kaldığı ve jel üzerinde hareket etmediği görüldü.



Şekil 4.3. D33:pDNA kompleks oluşumunun agaroz jel elektroforez fotoğrafı

Örnek 1: DNA molekül ağırlık standartı (1 kb plus DNA ladder Thermo)

Örnek 2: Çıplak plazmit DNA (LV-RFP pDNA)

Örnek 3: D33:LV-RFP pDNA 1:1 (h:h)

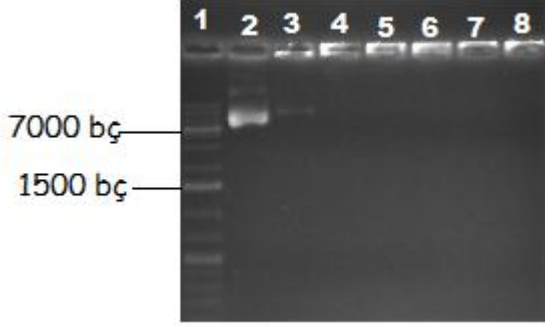
Örnek 4: D33:LV-RFP pDNA 2:1 (h:h)

Örnek 5: D33:LV-RFP pDNA 3:1 (h:h)

Örnek 6: D33:LV-RFP pDNA 4:1 (h:h)

Örnek 7: D33:LV-RFP pDNA 5:1 (h:h)

Örnek 8: D33:LV-RFP pDNA 6:1 (h:h)



Şekil 4.4. O33:pDNA kompleks oluşumunun agaroz jel elektroforezi fotoğrafı

Örnek 1: DNA molekül ağırlık standartı (1 kb plus DNA ladder Thermo)

Örnek 2: Çıplak plazmit DNA (LV-RFP pDNA)

Örnek 3: O33:LV-RFP pDNA 1:1 (h:h)

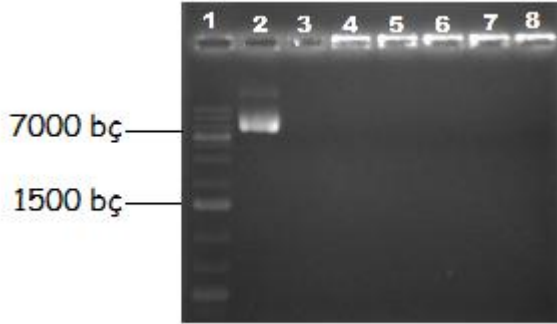
Örnek 4: O33:LV-RFP pDNA 2:1 (h:h)

Örnek 5: O33:LV-RFP pDNA 3:1 (h:h)

Örnek 6: O33:LV-RFP pDNA 4:1 (h:h)

Örnek 7: O33:LV-RFP pDNA 5:1 (h:h)

Örnek 8: O33:LV-RFP pDNA 6:1 (h:h)



Şekil 4.5. Y33:pDNA kompleks oluşumunun agaroz jel elektroforezi fotoğrafı

Örnek 1: DNA molekül ağırlık standartı (1 kb plus DNA ladder Thermo)

Örnek 2: Çıplak plazmit DNA (LV-RFP pDNA)

Örnek 3: Y33:LV-RFP pDNA 1:1 (h:h)

Örnek 4: Y33:LV-RFP pDNA 2:1 (h:h)

Örnek 5: Y33:LV-RFP pDNA 3:1 (h:h)

Örnek 6: Y33:LV-RFP pDNA 4:1 (h:h)

Örnek 7: Y33:LV-RFP pDNA 5:1 (h:h)

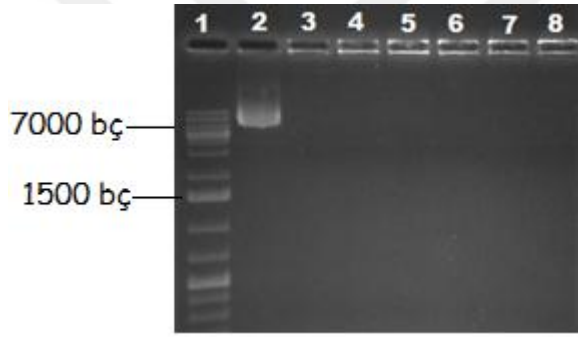
Örnek 8: Y33:LV-RFP pDNA 6:1 (h:h)

4.2.2 Polietilenimin-pDNA Polipeks Oluşumunun Değerlendirilmesi

Polietilenimin - LV-RFP pDNA Polipeksleri

Ön çalışmalarda kullanılmak üzere, dallanmış ve doğrusal polietilenimin ve LV-RFP pDNA Tablo 3.4'deki oranlarda Bölüm 3.4.4'de anlatıldığı şekilde kompleksleştirilmiştir. Hazırlanmış olan polipekslerin agaroz jel elektroforezi fotoğrafları Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de görülmektedir.

Doğrusal polietilenimin ile pDNA'nın polipeks oluşturduğu; çıplak pDNA kuyucuktan hareket ederken polipekslerin hareket etmeyerek kuyucukta kaldığı Şekil 4.6'da görülmektedir.



Şekil 4.6. Doğrusal polietilenimin:pDNA polipekslerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı

Örnek 1: DNA molekül ağırlık standartı (1 kb plus DNA ladder Thermo)

Örnek 2: Çıplak plazmit DNA (LV-RFP pDNA)

Örnek 3: L1 1:1 (a:a)

Örnek 4: L2 2:1 (a:a)

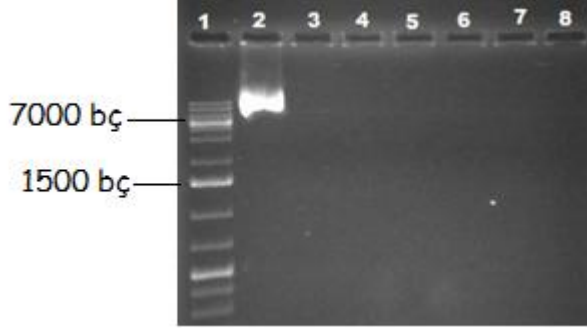
Örnek 5: L3 3:1 (a:a)

Örnek 6: L4 4:1 (a:a)

Örnek 7: L5 5:1 (a:a)

Örnek 8: L6 6:1 (a:a)

Dallanmış polietilenimin ile pDNA'nın polipeks oluşturduğu; çıplak pDNA kuyucuktan hareket ederken polipekslerin hareket etmeyerek kuyucukta kaldığı Şekil 4.7'de görülmektedir.



Şekil 4.7. Dallanmış polietilenimin:pDNA polipekslerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafı

Örnek 1: DNA molekül ağırlık standartı (1 kb plus DNA ladder Thermo)

Örnek 2: Çıplak plazmit DNA (LV-RFP pDNA)

Örnek 3: B1 1:1 (a:a)

Örnek 4: B2 2:1 (a:a)

Örnek 5: B3 3:1 (a:a)

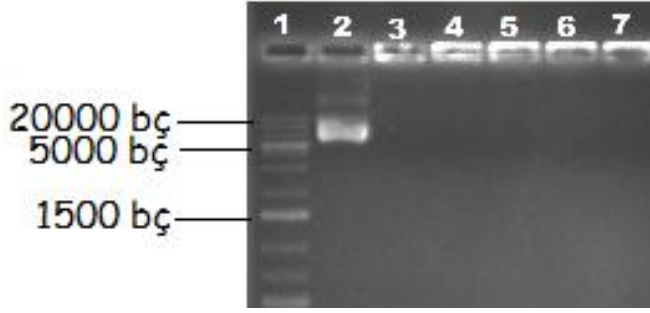
Örnek 6: B4 4:1 (a:a)

Örnek 7: B5 5:1 (a:a)

Örnek 8: B6 6:1 (a:a)

Polietilenimin - pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA Polipeksleri

Ön çalışmada kullandığımız LV-RFP pDNA ile oluşturulan polipekslerin transfeksiyon ve toksisite çalışmaları sonucunda seçilen oranlarda, terapötik amaçla kullanılmak üzere pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA ile polipeksler hazırlandı. Hazırlanan polipekslerin oranları Tablo 3.5'de verilmiştir. Çıplak pDNA kuyucuktan hareket ederken polipekslerin hareket etmediği kuyucukta kaldığı Şekil 4.8'de görülmektedir.



Şekil 4.8. Dallanmış ve doğrusal polietilenimin:STAT3 shRNA pDNA polipekslerinin agaroz jel elektroforezi fotoğrafı

Örnek 1: DNA molekül ağırlık standartı (1 kb plus DNA ladder Thermo)

Örnek 2: Çıplak plazmit DNA (STAT3 shRNA pDNA)

Örnek 3: B1S 1:1 (a:a)

Örnek 4: B2S 2:1 (a:a)

Örnek 5: L1S 1:1 (a:a)

Örnek 6: L2S 2:1 (a:a)

Örnek 7: L3S 3:1 (a:a)

4.3. Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu

Taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonu amacıyla partikül boyutları ve yükleri ölçüldü, transfeksiyon etkinliklerinin değerlendirilmesinden sonra sitotoksik özellikleri ve serum stabiliteyi belirlendi.

4.3.1. Taşıyıcı Sistemlerin Partikül Boyutlarının ve Yüklerinin Ölçülmesi

Kitosan Nanopartikül-pDNA Kompleksinin Boyut ve Yük Ölçümü

Kitosan nanopartikül ve dallanmış ve doğrusal polietilenimin ile oluşturulan komplekslerin partikül boyutları ve yükleri Bölüm 3.5.1'de anlatıldığı şekilde ölçüldü. D33, O33 ve Y33 kodlu kitosan nanopartikül-LV-RFP pDNA komplekslerinin partikül boyutları ve yük değerleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Kitosan nanopartikülleri ile transfeksiyon işlemi gerçekleşmediği için sadece yük ve boyutları ölçüldü, serum stabiliteyi ve sitotoksik özellikleri değerlendirilmedi.

Tablo 4.1. Düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı kitosan nanopartikülleri ve kitosan-pDNA komplekslerinin boyut ve yük değerleri

Örnekler	Zeta Potansiyel (mV)	Boyut (nm)
D33	+39.5	774
O33	+56.6	752
Y33	+38.2	656
D33:pDNA 1:1	+4.27	210
D33:pDNA 2:1	+30.1	265
D33:pDNA 3:1	+27.9	350
D33:pDNA 4:1	+3.85	364
D33:pDNA 5:1	+28.2	479
D33:pDNA 6:1	+29.5	314
O33:pDNA 1:1	+25.3	165
O33:pDNA 2:1	+30.4	183
O33:pDNA 3:1	+28.6	191
O33:pDNA 4:1	+14.8	274
O33:pDNA 5:1	+38.6	411
O33:pDNA 6:1	+18.8	447
Y33:pDNA 1:1	+17.0	270
Y33:pDNA 2:1	+2.51	150
Y33:pDNA 3:1	+26.4	301
Y33:pDNA 4:1	+22.3	574
Y33:pDNA 5:1	+32.7	676
Y33:pDNA 6:1	+26.7	752

D: Düşük molekül ağırlıklı kitosan, O: Orta molekül ağırlıklı kitosan, Y: Yüksek molekül ağırlıklı kitosan

Polietilenimin- pDNA Komplekslerinin Boyut ve Yük Ölçümü

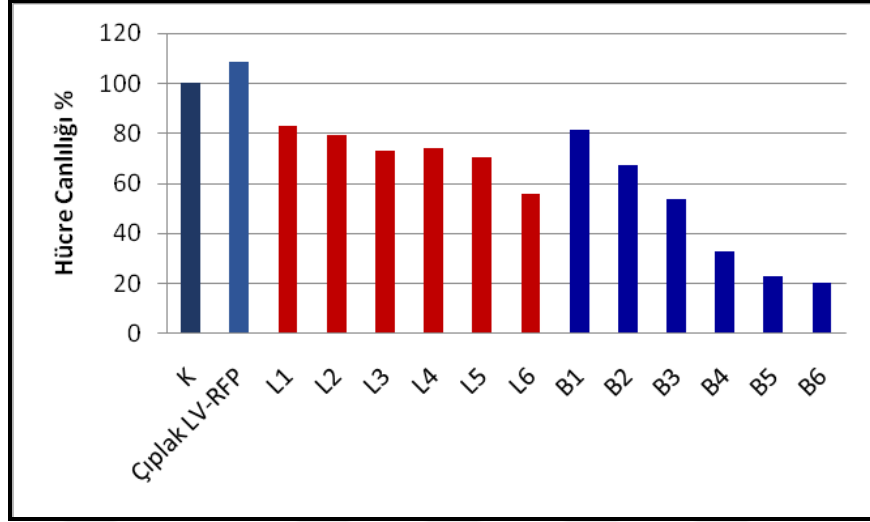
LV RFP pDNA'sı ile yapılan ön transfeksiyon ve sitotoksosite çalışmaları sonucunda seçilen polimer oranlarında pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA ile polipeksler hazırlanarak boyut ile yük ölçümleri Bölüm 3.5.1'de anlatıldığı şekilde yapıldı. Seçilen polipekslerin yük (zeta potansiyel) ve boyut değerleri Tablo 4.2'de belirtilmiştir.

Tablo 4.2. Dallanmış ve doğrusal polietilenimin ve polietilenimin-pDNA komplekslerinin boyut ve yük değerleri

	Doğrusal polietilenimin	Dallanmış polietilenimin	L1S	L2S	L3S	B1S	B2S
Zeta potansiyel (mV)	+24.5	+35.8	+19.8	+23.8	+25.1	+11.8	+21.9
Boyut (nm)	105	219.8	172.8	382	441	189.3	237

4.3.2. Taşıyıcı Sistemlerin Sitotoksitelerinin Değerlendirilmesi

Taşıyıcı sistemlerin sitotoksite değerlendirmeleri sadece transfeksiyonu gerçekleştirmiş olan polietilenimin ile hazırlanmış formülasyonlar için yapıldı. Transfeksiyon çalışması sonrasında hazırlanan taşıyıcı sistemlerin hücre proliferasyonuna (sitotoksite) etki edip etmediğini göstermek için Bölüm 3.5.3'de anlatıldığı şekilde MTT deneyi yapıldı. Yapılan MTT deneyi sonucunda dallanmış polietileniminin doğrusal polietilenimine göre daha toksik olduğu gözlemlendi. Poliplekslerin hücre proliferasyonuna etkisi Şekil 4.13'de gösterilmiştir.



Şekil 4.9 Polipekslerin hücre proliferasyonuna etkisi (n=3)

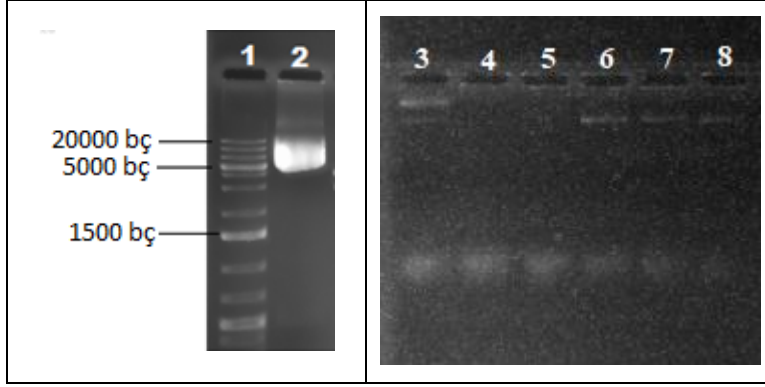
K: 4T1 kontrol hücresinin canlılığı, Çıplak LV-RFP: Çıplak pDNA ile transfekte edilen 4T1 hücresinin canlılığı, L1-6: Doğrusal PEI polipeksleri ile transfekte edilen 4T1 hücresinin canlılığı, B1-6: Dallanmış PEI polipeksleri ile transfekte edilen 4T1 hücresinin canlılığı

Transfeksiyon ve MTT testi sonuçlarına göre bundan sonraki pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA'sı ile yapacağımız transfeksiyon ve hücre proliferasyon çalışmalarında kullanılacak olan formülasyonlar belirlendi. pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA'sı ile polipeksler hazırlamak için doğrusal polietilenimin ile hazırladığımız L1, L2 ve L3; dallanmış polietilenimin ile hazırladığımız B1 ve B2 formülasyonlarında kullanılan polimer oranları uygun bulundu.

4.3.3. Taşıyıcı Sistemlerin Serum Stabilitelerinin Değerlendirilmesi

Transfeksiyon ve sitotoksisite ön çalışmalarından sonra uygun bulunan polimer:pDNA oranlarında hazırlanan polipekslerin serum stabiliteleri değerlendirildi. Serum stabilite değerlendirmesi Bölüm 3.5.2'de anlatıldığı şekilde yapıldı.

Serum (FBS) ile 30 dk inkübasyon sonrasında dallanmış polietilenimin ile hazırlanmış B1S ve B2S kodlu polipekslerin, doğrusal polietilenimin ile hazırlanmış L1S, L2S ve L3S kodlu polipekslerden daha stabil olduğu belirlendi. Polipekslerin serum içerisindeki stabiliteleri Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Poliplekslerin 30 dk boyunca serum içerisindeki stabiliteğini gösteren agaroz jel elektroforezi fotoğrafı

Örnek 1: DNA moleköl ağırlık standartı (1 kb plus DNA ladder Thermo)

Örnek 2: Çıplak plazmit DNA (pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA) (serumsuz)

Örnek 3: pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA %10 FBS içeren DMEM içinde

Örnek 4: B1S 1:1 (a:a)

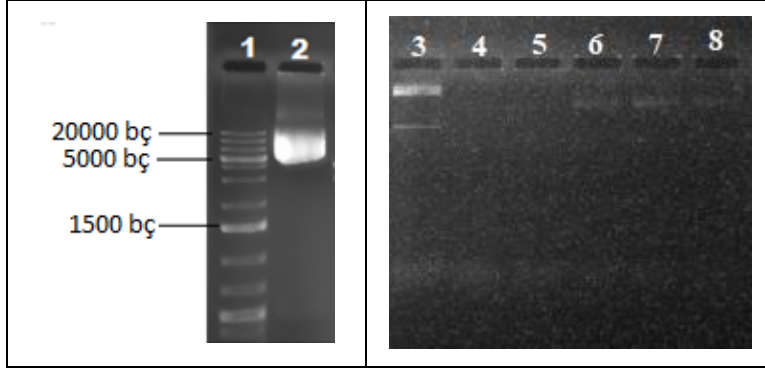
Örnek 5: B2S 2:1 (a:a)

Örnek 6: L1S 1:1 (a:a)

Örnek 7: L2S 2:1 (a:a)

Örnek 8: L3S 3:1 (a:a)

Serum (FBS) ile 4 saat inkübasyon sonrasında dallanmış polietilenimin ile hazırlanmış B1S ve B2S kodlu poliplekslerin, doğrusal polietilenimin ile hazırlanmış L1S, L2S ve L3S kodlu poliplekslerden daha stabil olduğu belirlendi. Poliplekslerin serum içerisindeki stabiliteğini Şekil 4.10'da görüldüğü gibidir.



Şekil 4.11. Poliplekslerin 4 saat boyunca serum içerisindeki stabiliteğini gösteren agaroz jel elektroforezi fotoğrafı

Örnek 1: DNA molekül ağırlık standartı (1 kb plus DNA ladder Thermo)

Örnek 2: Çıplak plazmit DNA (pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA) (serumsuz)

Örnek 3: pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA %10 FBS içeren DMEM içinde

Örnek 4: B1S 1:1 (a:a)

Örnek 5: B2S 2:1 (a:a)

Örnek 6: L1S 1:1 (a:a)

Örnek 7: L2S 2:1 (a:a)

Örnek 8: L3S 3:1 (a:a)

4.4. Taşıyıcı Sistemlerin Transfeksiyon Etkinliklerinin Değerlendirilmesi

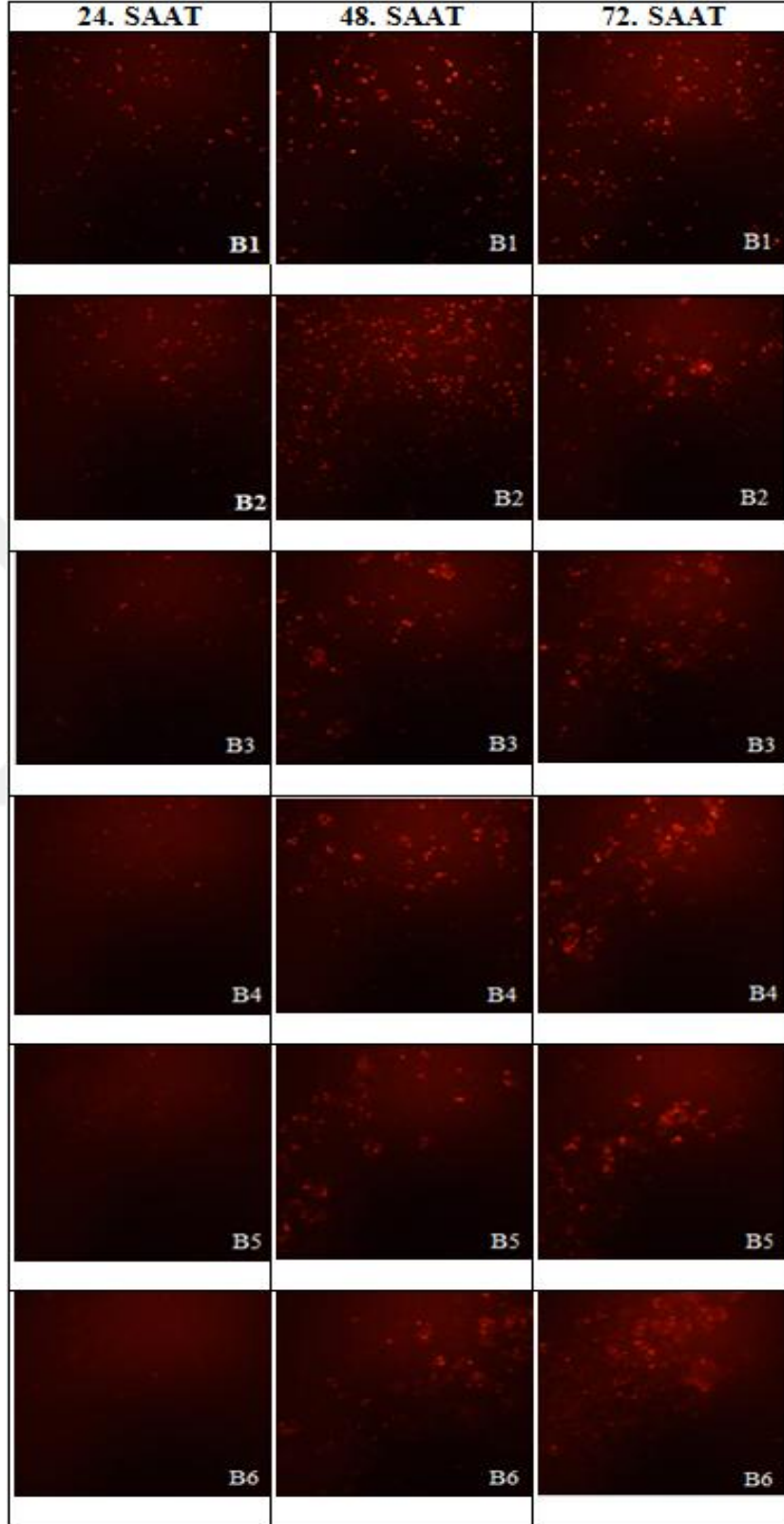
Düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı doğal bir polimer olan kitosan ile hazırlanan nanopartikül pDNA komplekslerinin 4T1 hücrelerine transfeksiyonu gerçekleştirilemedi. Doğrusal ve dallanmış polietilenimin ile hazırlanan taşıyıcı sistemin başarılı olup olmadığını görmek için transfeksiyon çalışmalarında ilk önce LV-RFP plazmit DNA'sı kullanıldı. LV-RFP plazmit DNA'sı ile hazırlanan poliplekslerin hücre içerisine aktarılıp aktarılmadığı ve gen ekspresyonunun başarılı olup olmadığı, floresan mikroskop altında 24., 48. ve 72. saatlerde kırmızı floresan proteinin ekspresyonuna bakılarak değerlendirildi.

Kontrol grubu olarak LV-RFP plazmit DNA'sı, polimerik taşıyıcılar ile kompleksleştirilmeden, çıplak olarak transfekte edildi. Çıplak plazmit DNA kontrol grubunda 24., 48. ve 72. saatlerde transfeksiyon gerçekleşmediği; polipleksler ile transfeksiyonun gerçekleştiği ve kırmızı floresan proteinin ekspresyonunun 48. ve 72. saatlerde arttığı gözlemlendi. Kontrol grubuna ait floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.12'de gösterilmiştir.

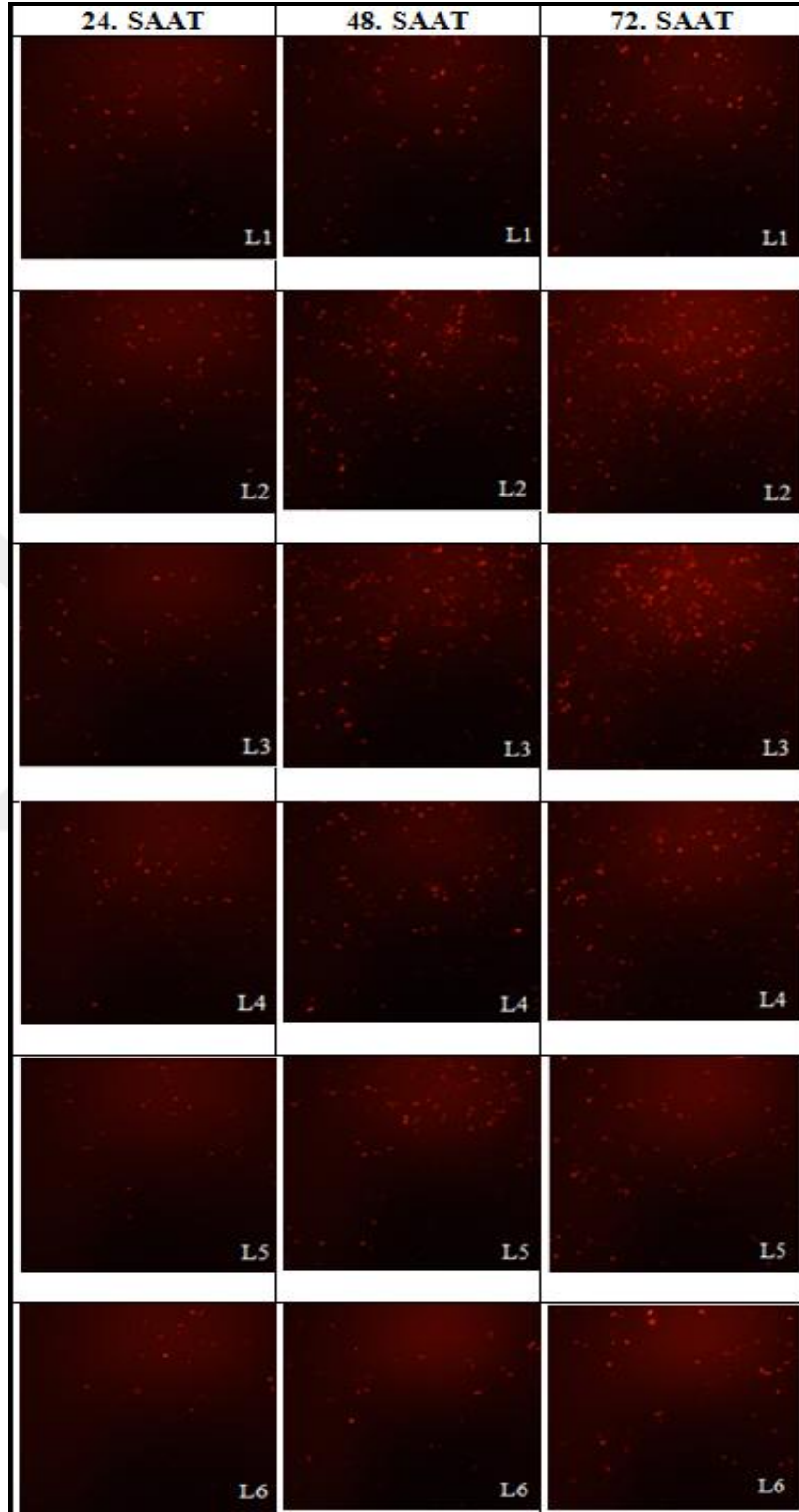
48. ve 72. saat sonuçlarına göre pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA ile hazırlanan poliplekslerin transfeksiyon çalışmaları için B1, B2, L1, L2 ve L3 kodlu formülasyonlar seçildi. Transfeksiyon çalışmalarına ait floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Çıplak LV-RFP pDNA ile transfekte edilen 4T1 hücrelerine ait floresan mikroskop fotoğrafları



Şekil 4.13. Dallanmış polietilenimin ve LV-RFP pDNA'sı ile hazırlanmış polipeksler ile transfekte edilen 4T1 hücresine ait floresan mikroskop fotoğrafları

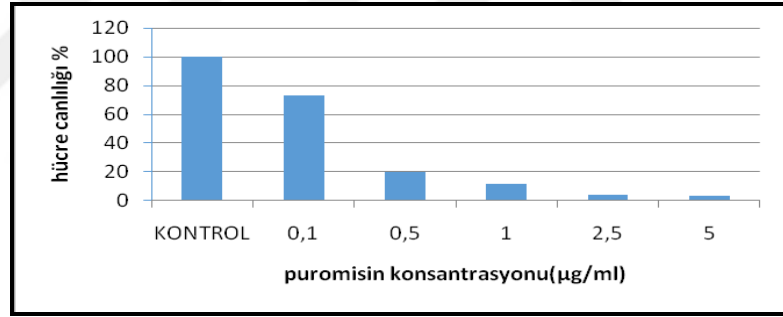


Şekil 4.14. Doğrusal polietilenimin ve LV-RFP pDNA'sı ile hazırlanmış polipeksler ile transfekte edilen 4T1 hücrelerine ait floresan mikroskop fotoğrafları

4.4.1.pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA ile Hazırlanan Poliplekslerin Transfeksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

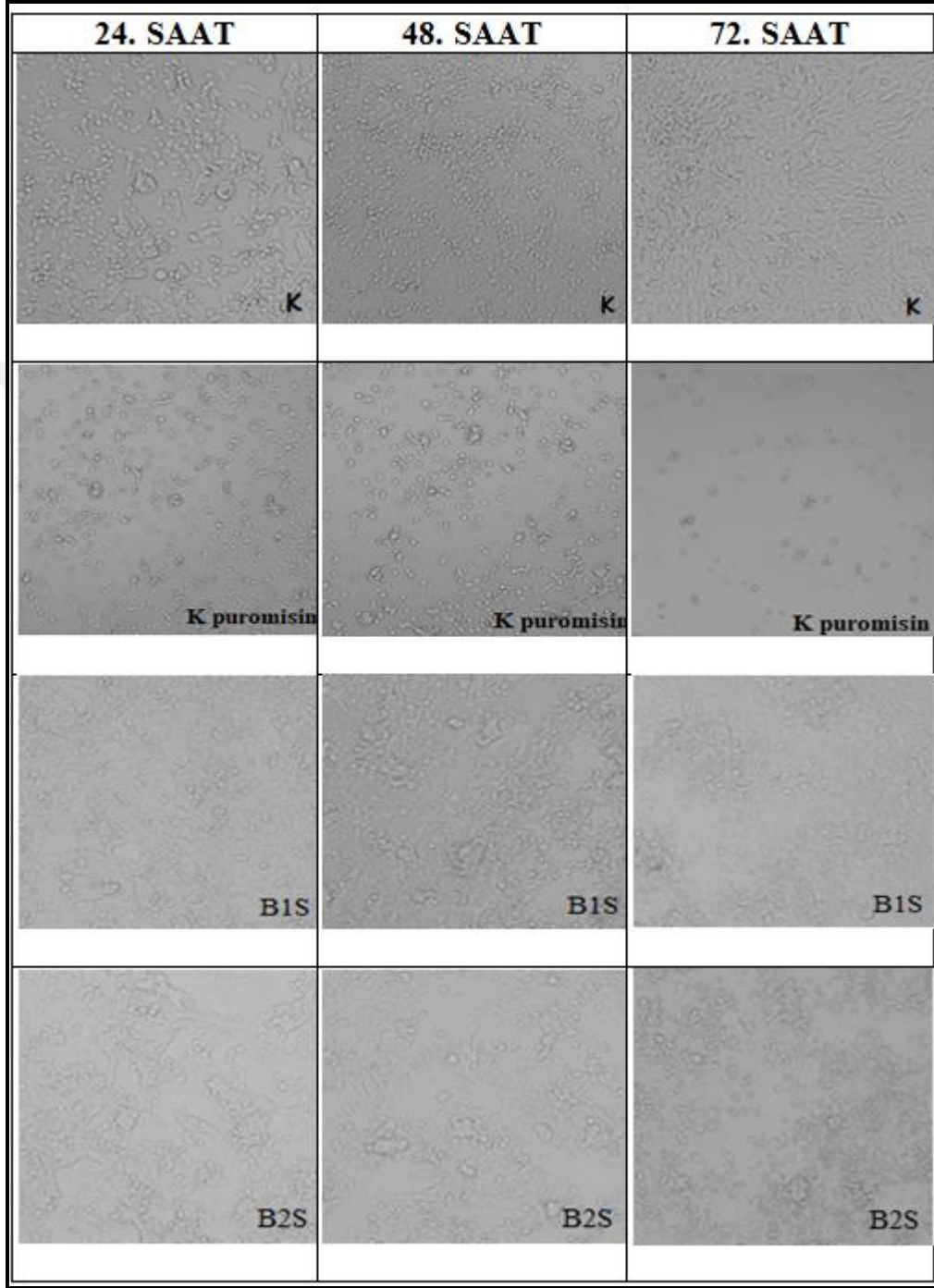
Sitotoksosite çalışması sonuçlarına göre belirlenen L1, L2, L3, B1 ve B2 kodlu formülasyonlarda kullandığımız polietilenimin:pDNA oranlarıyla pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA'sı kullanılarak polipleksler hazırlandı ve transfeksiyon etkinliği değerlendirildi.

Transfeksiyon çalışmalarına başlamadan önce puromisin antibiyotiğinin 4T1 hücreleri için uygun konsantrasyonunu belirlemek için Bölüm 3.6.4'de anlatıldığı şekilde konsantrasyon çalışmaları yapıldı. 0.1 µg/ml konsantrasyonda hücrelerin %70'inin canlı kaldığı, 0.5 µg/ml konsantrasyonda ise hücrelerin %20'sinin canlı kaldığı gözlenerek, hedeflenen %50 hücre canlılığı için puromisin konsantrasyonu 0.3 µg/ml olarak tayin edildi. Puromisin konsantrasyonlarına bağlı hücre canlılığı Şekil 4.15'de görülmektedir.

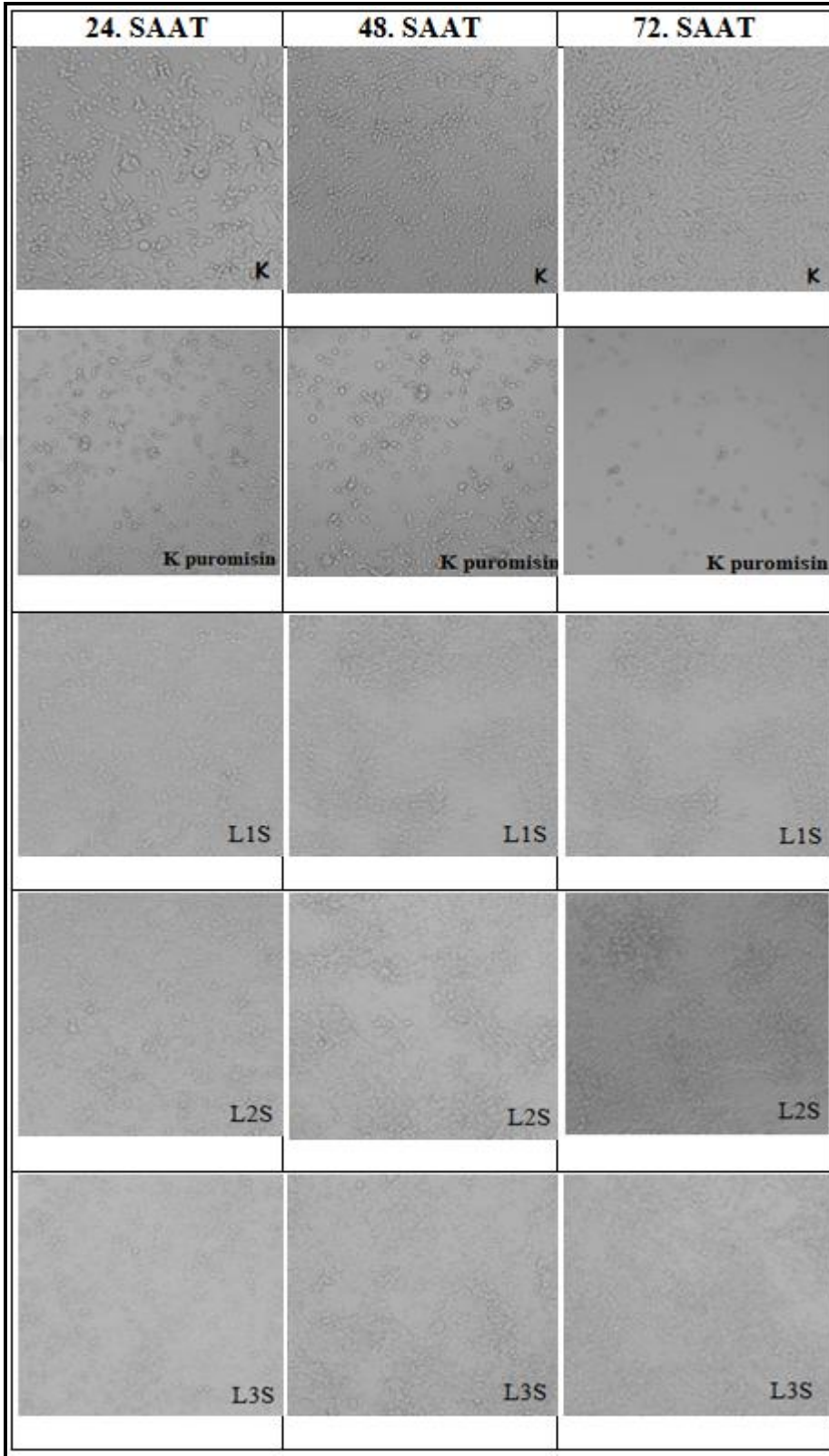


Şekil 4.15. 4T1 meme kanseri hücrelerinde puromisin konsantrasyonuna bağlı hücre canlılığı

pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA'sı üzerinde puromisin direnç geni bulunduğu için transfekte olan hücreler puromisin içeren ortamda canlılığını korur. 0.3 µg/ml konsantrasyonda puromisin kullanılarak yapılan transfeksiyon çalışmasına ait ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de gösterilmiştir. Plazmit kullanılmadan puromisinin eklendiği kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında tüm polipleks formülasyonlarınının 72. saate kadar hücre canlılığını koruduğu gözlemlendi.



Şekil 4.16. Dallenmiş polietilenimin ve pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA'sı ile hazırlanmış polipeksler ile transfekte edilen 4T1 hücresine ait ışık mikroskobu fotoğrafları (K: Kontrol)

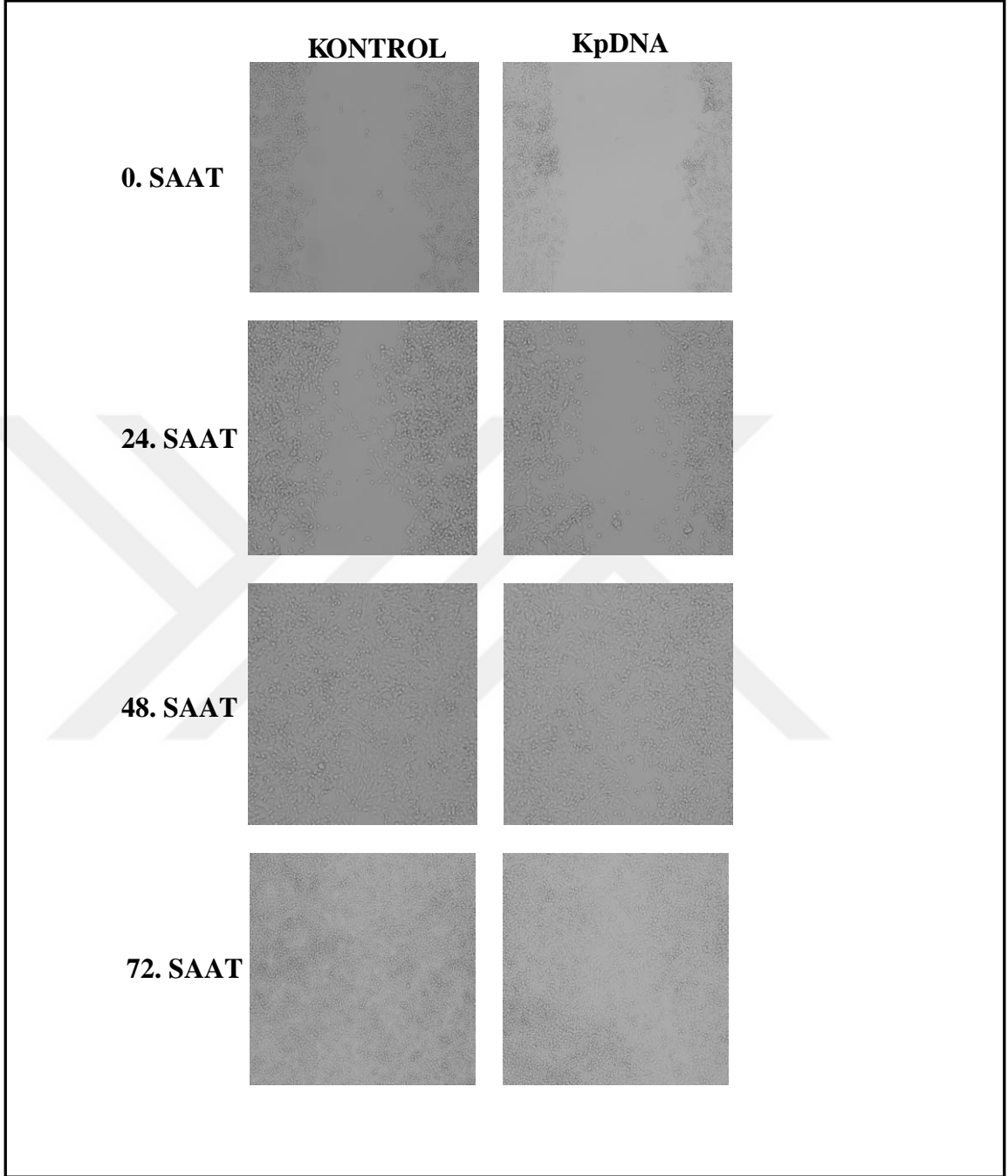


Şekil 4.17. Doğrusal polietilenimin ve pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA'sı ile hazırlanmış polipeksler ile transfekte edilen 4T1 hücrelerine ait ışık mikroskobu fotoğrafları (K: Kontrol)

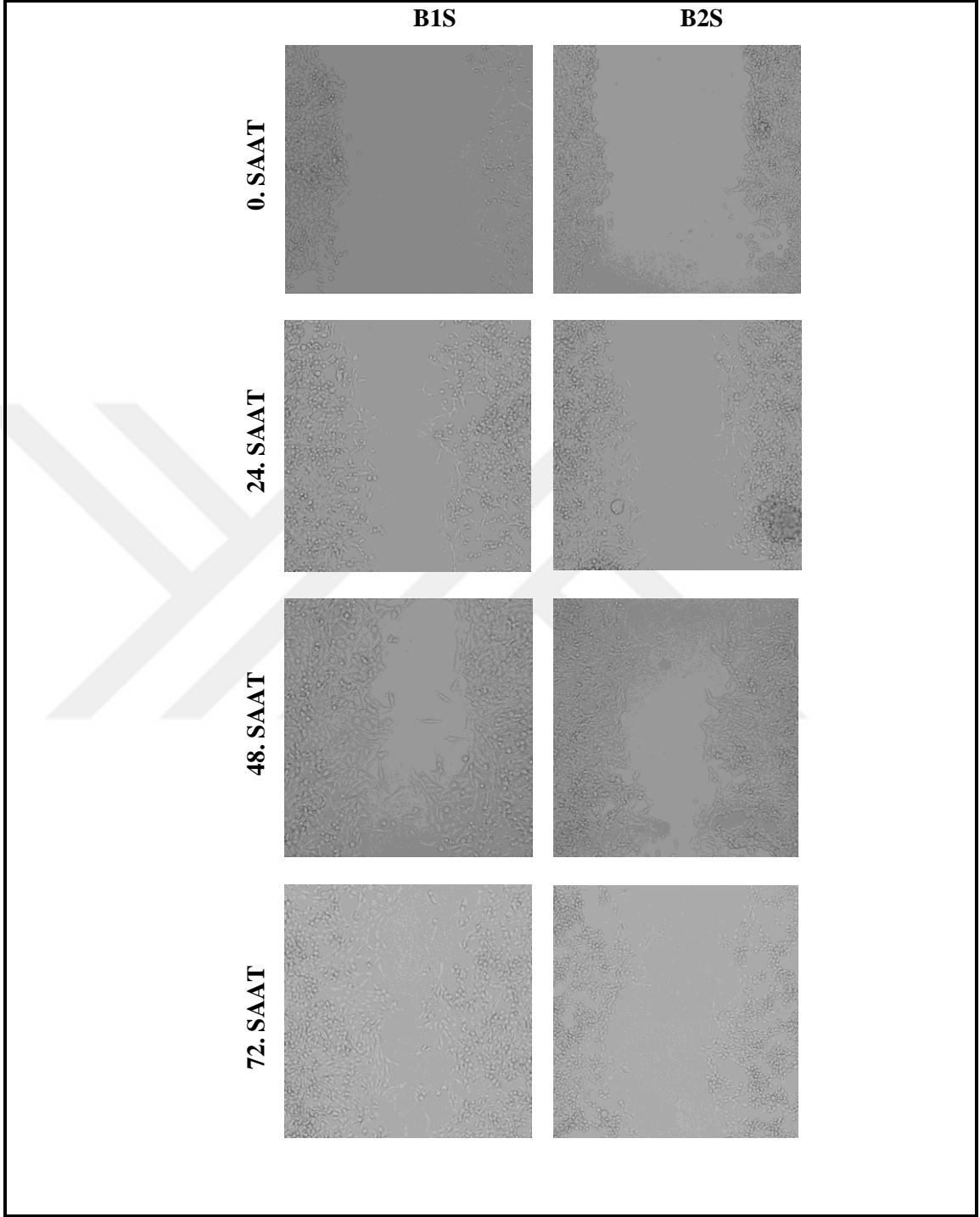
4.5. Hücrenin Migrasyonunun (Yara İyileşmesinin) Değerlendirilmesi

4T1 hücrelerinin migrasyonunun değerlendirilmesi Bölüm 3.7'de anlatıldığı şekilde yapıldı. Hücre plakları üzerinde oluşturulan yarık hücrelerin migrasyonu ile kapanmakta ve yara iyileşmesi gerçekleşmektedir. Çıplak plazmit DNA tek başına hücre içerisine aktarıldığında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücrenin migrasyonunu olumlu bir etkisinin olmadığı gözlemlendi. Hazırlanan poliplekslerin migrasyona etkisi değerlendirildiğinde 72. saat sonunda B2S ve L3S kodlu poliplekslerin kanser hücrelerinin migrasyonunu yavaşlattığı görüldü. Çalışmaya ait fotoğraflar Şekil 4.18-20'de gösterilmiştir.

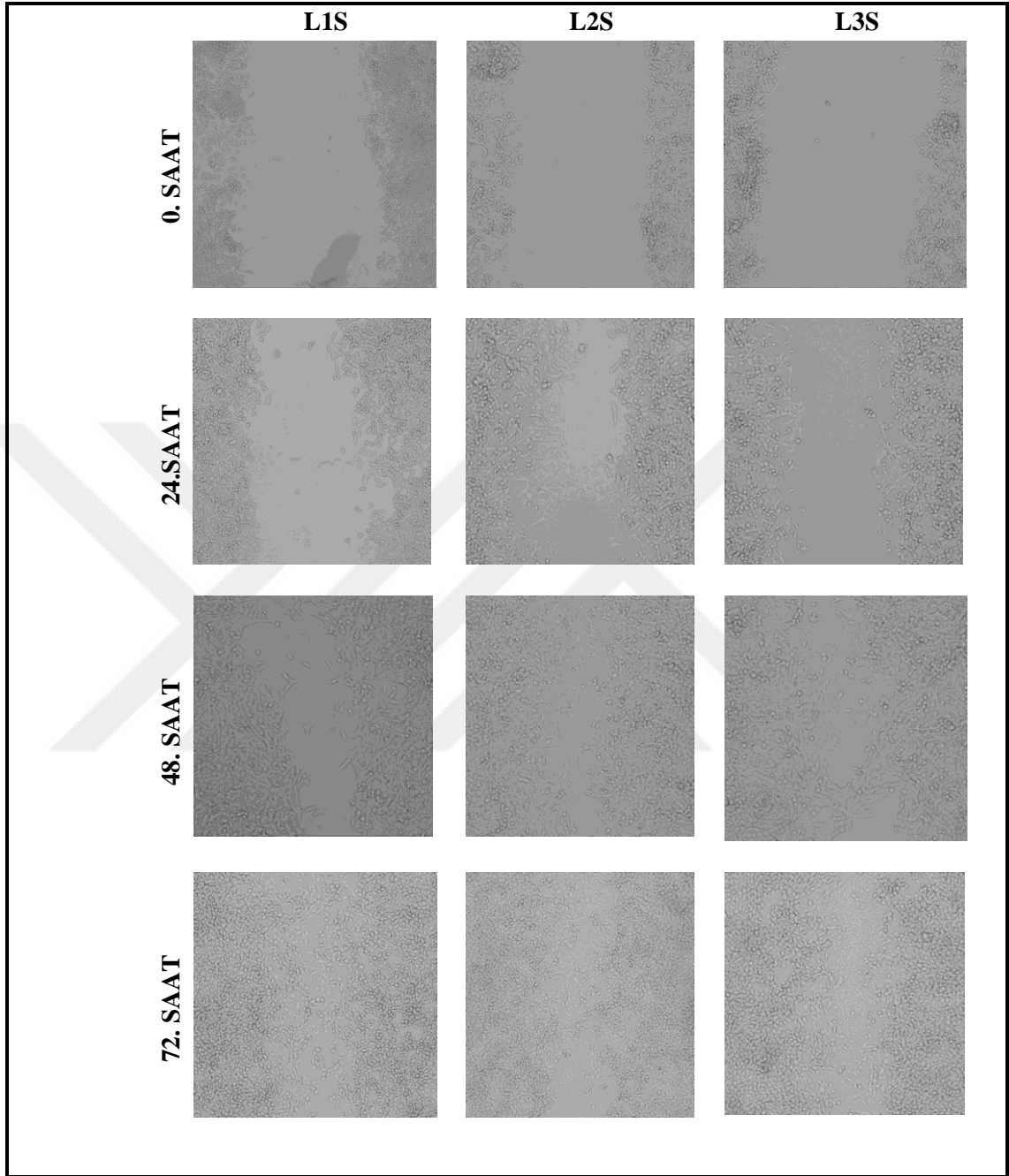




Şekil 4.18. 4T1 hüresinin migrasyonun değerlendirilmesinde kontrol gruplarına ait ışık mikroskobu fotoğrafları (K: Kontrol hücresi, KpDNA: Çıplak pDNA'nın aktarıldığı kontrol hücresi)

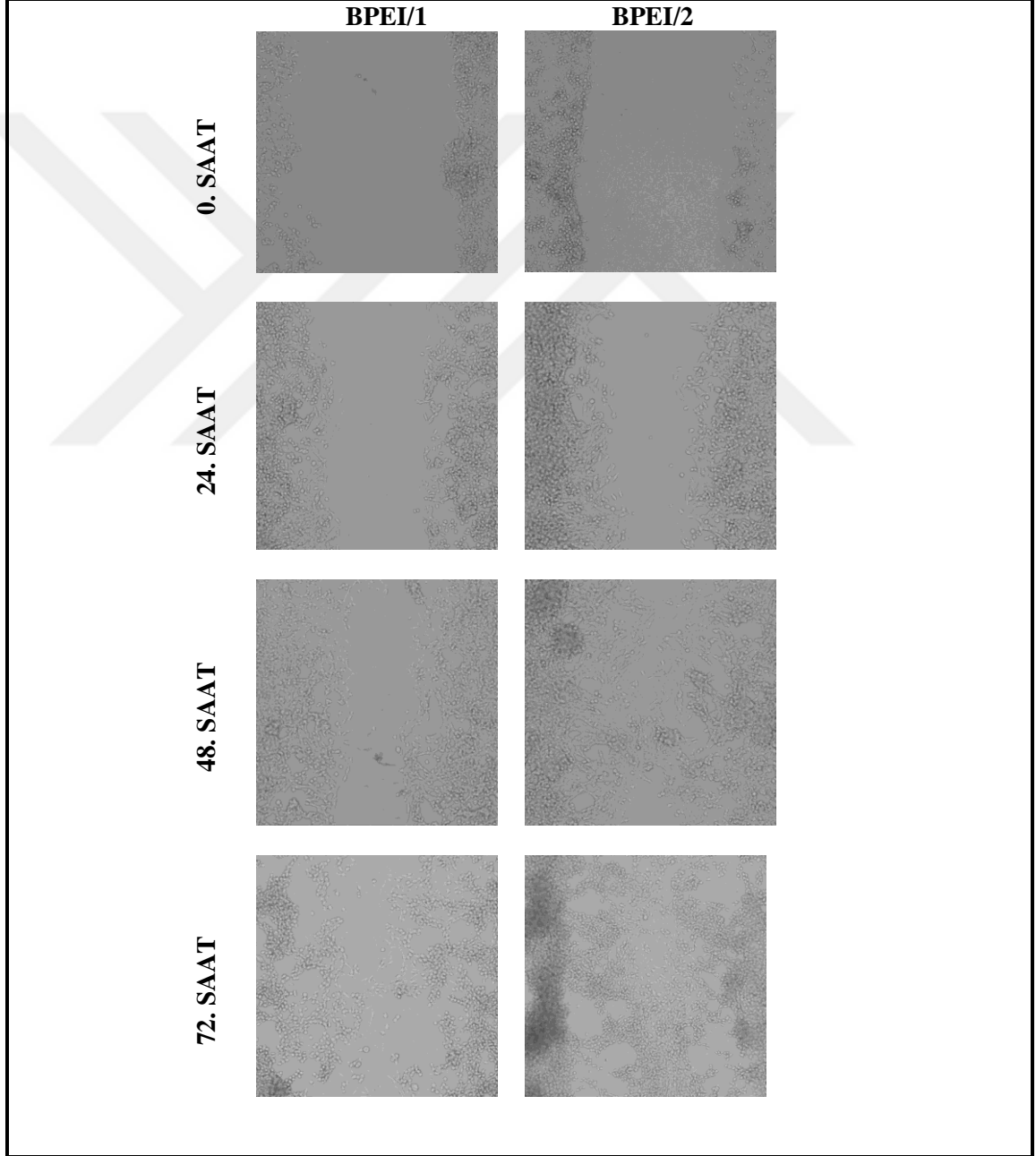


Şekil 4.19. Dallanmış polietilenimin ve pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA'sı ile hazırlanmış polipleksler ile transfekte edilen 4T1 hücresinin migrasyonuna ait ışık mikroskobu fotoğrafları

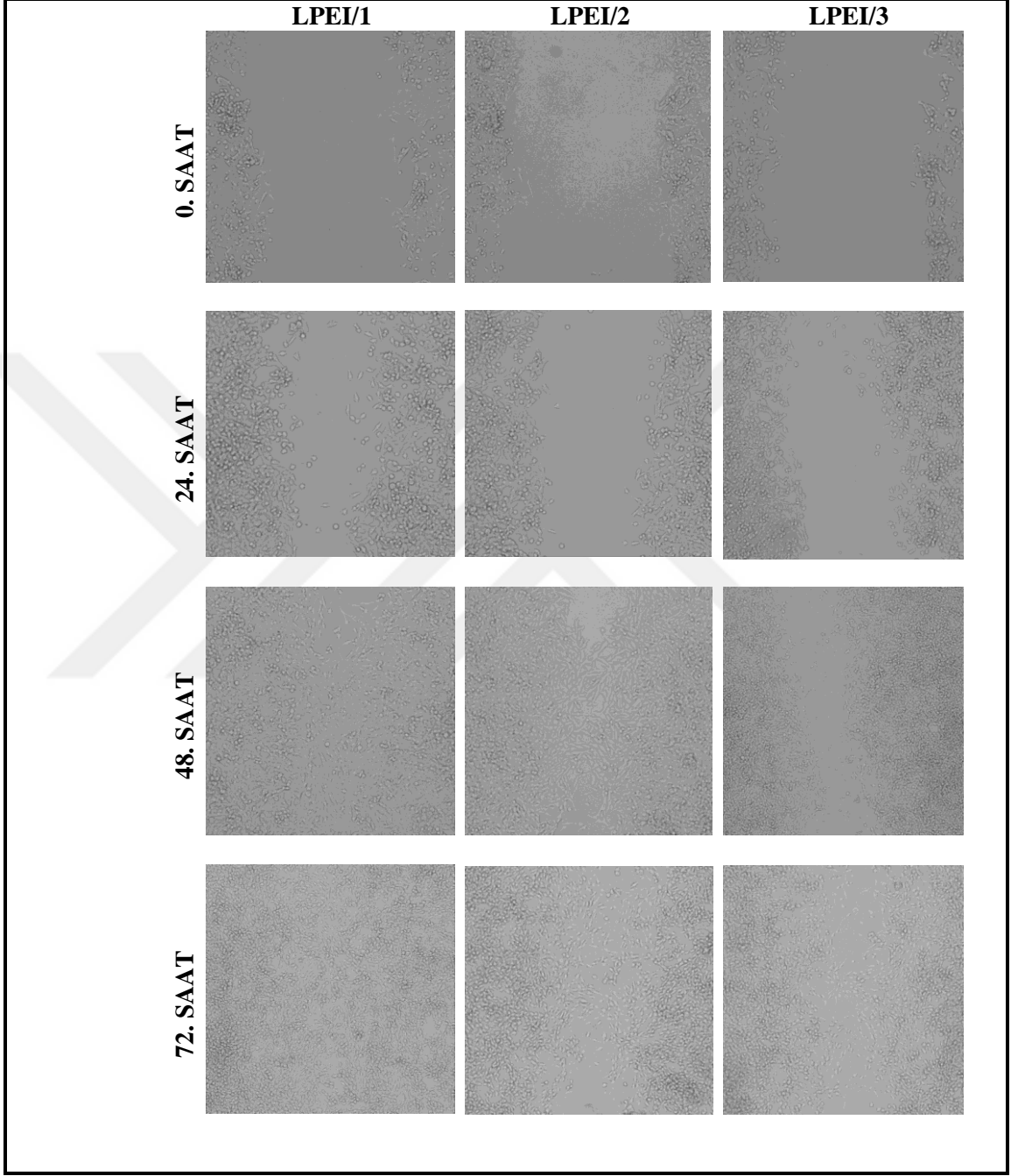


Şekil 4.20. Doğrusal polietilenimin ve pSIH1-puro STAT3 shRNA pDNA'sı ile hazırlanmış polipleksler ile transfekte edilen 4T1 hücrenin migrasyonuna ait ışık mikroskobu fotoğrafları

Hücre invazyon deneyinde kullandığımız polimerin bir etkisi olup olmadığını değerlendirmek için hücreler sadece formülasyonları hazırlarken kullandığımız oranlarda doğrusal ve dallanmış polietilenimin ile muamele edildi. Sonuçlar değerlendirildiğinde, polimerlerin 72. saat sonunda kanser hücrelerinin canlılığı ve migrasyon hızı üzerine bir etkisinin olmadığı gözlemlendi. Çalışmaya ait ışık mikroskobu fotoğrafları Şekil 4.21 ve Şekil 4.22’de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Dalların polietileniminin 4T1 hücreleri migrasyonuna ait ışık mikroskobu fotoğrafları



Şekil 4.22. Doğrusal polietileniminin 4T1 hücrelerinin migrasyonuna ait ışık mikroskobu fotoğrafları

5. TARTIŞMA

Üçlü negatif meme kanserinde östrojen hormon reseptörü (ER), progesteron hormon reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2) reseptörleri bulunmamaktadır. Nadir görülen üçlü negatif meme kanseri oldukça agresif bir meme kanseri çeşididir. Kanser tedavisinde güncel tedavi yaklaşımları kemoterapi, radyoterapi, cerrahi işlem ve immünoterapi ile tedavidir. Günümüzde meme kanseri tedavisinde kullanılan hormon tedavisi ve hedefe yönelik ilaçlar bu meme kanseri türünde kullanılamazken, bu kanser türü sadece kemoterapi ile tedavi edilmektedir. Son yıllarda kanser tedavisinde yeni bir tedavi seçeneği olarak gen tedavisi yaklaşımları araştırılmaya başlanmıştır. Bu tez çalışmasında üçlü negatif meme kanseri gen tedavisinde kullanılabilecek yeni bir nükleik asit taşıyıcı sistem geliştirilerek, etkinliği değerlendirildi.

Kanser gen tedavisi yaklaşımlarının çoğu etkili gen ekspresyonunun inhibisyonunun sağlanması amacıyla, short hairpin RNA (shRNA; tek iplik RNA hairpin loop yapısında), shRNA kodlayan plazmit DNA ve küçük engelleyici RNA (siRNA; çift iplik RNA) içeren endojen gen ekspresyonunu düzenleyen sistemleri kullanma üzerine oluşturulmuştur. Bu RNAi sistemlerin mRNA düzeyinde protein sentezini durdurduğu; spesifik genlerin transkripsiyonunu engelleyen ya da gen ekspresyonunu translasyon aşamasında inhibe eden bir mekanizmaya sahip olduğu literatürde bildirilmiştir (Dogini, Pascoal ve ark., 2014).

Sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörleri (STAT) hücre içi sinyal iletimine aracılık eder (Siveen, Sikka ve ark., 2014). Bu STAT ailesinden sinyal ileticisi transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3) tümör invazyonunda ve metastazında pek çok yolak üzerinden bir çok kanser türünü tedavi etmek ya da önlemek için potansiyel hedef olarak düşünülmektedir (Lin ve Karin 2007). Bu tez çalışmasında RNAi teknolojisi olarak STAT3 geninin ekspresyonunu baskılayabilecek, shRNA geni klonlanmış pDNA; kanser modeli olarak 4T1 fare meme kanseri hücresi (3. evre insan meme kanserini taklit eden) kullanıldı. 4T1 fare meme kanseri hücrelerinin çok fazla metastatik özellikte olduğu

yapılan önceki çalışmalarda gösterilmiştir ve STAT3' ün daha çok üçlü negatif meme kanseri ile ilişkili olduğu literatürde bildirilmiştir (Dai, Cheng ve ark., 2011).

Başarılı ve etkin bir gen tedavisi için genlerin hücre içerisine taşıyıcı sistemler ile aktarılması gerekmektedir. Çok daha güvenli viral olmayan gen taşıyıcı sistemler alternatif nükleik asit taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır. Güvenli taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi için, gen ekspresyonunu etkileyen fizikokimyasal ve farmakokinetik problemlerin çözülmesi gerekmektedir. Katyonik lipidler ve katyonik polimerler gen taşıyıcı sistem olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında, klasik kemoterapiden farklı bir yaklaşımla, doğal ve sentetik polimerler ile, üçlü negatif meme kanserinin tedavisinde kullanılacak yeni bir viral olmayan gen tedavi ajanının geliştirilmesi amaçlandı. Taşıyıcı sistemlerin partikül büyüklüğü ve yapısı, yükü gibi parametreler taşıyıcı sistemin hücre yüzeyi ile etkileşmesinde önemli rol oynamaktadır ve hücre içine alımını etkilemektedir. Genetik materyalin çıplak olarak hücre içine alınması büyük boyutlu olması ve yüksek negatif yükü olmasından dolayı sınırlıdır (Patil ve Panyam 2009).

Bu tez çalışmasında viral olmayan taşıyıcı sistem olarak polimerik yapıdaki taşıyıcı sistemler kullanıldı. Düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı doğal kitosan polimerleri ve düşük (doğrusal) ve yüksek (dallanmış) molekül ağırlıklı sentetik polietilenimin polimerleri kullanılarak hazırlanan taşıyıcı sistemler ile üçlü negatif 4T1 fare meme kanseri hücresinde STAT-3 gen ekspresyonunu susturabilecek shRNA kodlayan plazmit DNA'nın etkin bir şekilde aktarılması ve meme kanseri gen tedavisi için viral olmayan yeni bir gen-ilaç geliştirilmesi hedeflendi.

Gen aktarımı için kullanılacak taşıyıcı vektörün fizikokimyasal karakterizasyonu yapılarak, serum stabilitesi, hücre proliferasyonuna etkisi (sitotoksitesi), transfeksiyon etkinliği ve meme kanseri hücresinin migrasyonuna etkisi değerlendirildi. STAT-3 geninin ekspresyonunu baskılayacak shRNA kodlayan plazmit DNA'nın hücreye transfeksiyonunu sağlayacak taşıyıcı sistem iki farklı polimer ile hazırlandı. Taşıyıcı sistemlerin etkinliklerinin değerlendirilmesi ilk olarak üzerinde kırmızı floresan protein geni bulunan model LV- RFP plazmit DNA kullanılarak yapıldı. Çalışmalar sırasında

kullanılacak terapötik etkili pDNA ve model pDNA başarılı bir şekilde çoğaltıldı ve saflık tayini yapıldı. A260/280 oranı DNA'nın saflığını gösterir ve saf DNA çözeltilerinin 260/280 oranı 1.8-2 arasındadır (Chiang CL ve ark., 2005). Çalışmamızda izole edilen pDNA'ların saflığı bu aralıkta bulundu. Restriksiyon enzimi kesimi yapılarak pDNA doğrulandı ve örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. pDNA bantlarının molekül ağırlıklarına uygun yerde çıktığı Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı doğal kitosan polimerleri ve TPP kullanılarak iyonik jelyasyon yöntemi ile kitosan nanopartikülleri hazırlandı (Calvo, Remunan-Lopez ve ark., 1997). pLV-RFP ile kitosan nanopartiküllerinin kompleks oluşturduğu oranlar agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi. Komplekslere ait agaroz jel elektroforezi fotoğrafları Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5'de gösterilmiştir. Katyonik bir doğal polimer olan kitosan negatif yüklü pDNA ile elektrostatik etkileşim göstererek kompleks oluşturulmuştur. Aynı konsantrasyonlarda hazırlanan düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı kitosanların pDNA bağlama oranları arasında fark görülmedi. Düşük, orta ve yüksek moleküler ağırlıklı kitosan nanopartikülleri ile hazırlanan pDNA komplekslerinin yüzey yükü ve partikül boyutları Tablo 4.2'de verilmiştir. Partikül boyutları karşılaştırıldığında; yüksek molekül ağırlıklı kitosan nanopartiküllerinin boyutlarının, orta ve düşük molekül ağırlıklı kitosan nanopartiküllerinin boyutlarından daha büyük çıktığı gözlemlendi. Kitosan nanopartiküllerinin, pDNA kompleks oluşturmadan önce ve kompleks oluşturduktan sonraki yük ve boyut değerleri birbirinden farklı bulundu. Polimerin katyonik olması ve pDNA'nın negatif yüke sahip olması nedeniyle elektrostatik etkileşim ile kompleks oluşmakta; buna göre parçacığın yüzey yükü ve boyutu değişmektedir.

4T1 üçlü negatif meme kanserine transfeksiyon çalışmalarında kitosan ile başarı sağlanamayınca, çalışmada sentetik yapıda yüksek molekül ağırlıklı (dallanmış) ve düşük molekül ağırlıklı (doğrusal) polietilenimin polimerleri kullanılmıştır. Dallanmış polietilenimin yüksek transfeksiyon etkinliği sergiler fakat oldukça sitotoksiktir; düşük moleküler ağırlıklı polietileniminler biyolojik olarak uyumludur, ancak nükleik asitlerin yetersiz bağlanması, zayıf alımı ve internalizasyonu nedeniyle daha az verimlidir

(Breunig, Hozsa ve ark., 2008). Genellikle, dallanmış polietileniminin nükleik asit ile kompleks oluşturmasının; aynı moleküler ağırlıktaki doğrusal polietilenimine kıyasla daha kolay olduğu ancak hücre içine alındıktan sonra ise nükleik asitin serbest bırakılmasının doğrusal polietilenimine kıyasla daha zor olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Breunig, Hozsa ve ark., 2008). Polimer/pDNA kompleksleri hazırlanırken amin/fosfat (N/P) oranı veya ağırlık:ağırlık (a:a) oranı kullanılır (Costa, Briscoe ve ark., 2015). Bu tez çalışmasında polimer:pDNA kompleksleri ağırlık:ağırlık oranı kullanılarak hazırlandı. Hazırlanmış olduğumuz poliplekslerin partikül boyutu ve yüzey yükü Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Hücre membranı negatif yüke sahiptir ve hazırlanan polimerik taşıyıcının yüzey yükünün pozitif olması hücre membranı ile etkileşimini sağlayarak, aktarılan genetik materyalin hücre içine girmesini kolaylaştırır (Ulasov ve ark., 2011).

pDNA tek başına (ıplak plazmit) hücreye aktarıldığında ortamda bulunan nükleazlar tarafından parçalanmaktadır. Taşıyıcı sistemler, genetik materyali nükleazlara karşı koruyarak stabil kalmalarını sağlamak ve hedef hücreye taşıyabilmek amacıyla geliştirilmektedir. Taşıyıcı sistem olarak lipid ve polimerik yapıda hazırlanan viral olmayan vektörler kullanılmaktadır. Katyonik polimerler pDNA'ya iyi bağlanma özelliği gösterir (Costa, Briscoe ve ark., 2015). Bu çalışmada katyonik polimer olarak doğal ve sentetik polimerler kullanıldı. Taşıyıcı sistemlerin serum içindeki stabilitelerini değerlendirmek için SDS salımlı serum stabilite çalışması yapıldı (Akbaba, 2010). 30 dakika ve 4 saat inkübasyon sonrasında B1S ve B2S kodlu poliplekslerin L1S, L2S ve L3S kodlu poliplekslerden daha stabil olduğu, çıplak plazmidin ise daha hızlı parçalandığı gözlendi. Serum içerisinde stabilite çalışmasına ait agaroz jel elektroforezi fotoğrafları şekil 4.9 ve 4.10'da gösterilmiştir.

Transfeksiyon çalışmalarında ilk olarak, gen aktarımını floresan mikroskop ile gözlemleyebileceğimiz, LV-RFP pDNA kullanıldı. Transfeksiyon işlemi sonrası hücreler floresan mikroskop altında değerlendirilerek, gen aktarımının başarılılabildiği, kırmızı floresan protein ekspresyonunun gözlendiği formülasyonlar seçilerek pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA'nın aktarımı için kullanıldı.

Kitosan nanopartikülleri farklı oranlarda denenmesine rağmen 4T1 meme kanseri hücresine transfeksiyon sağlanamadı. Kitosanın doğallığını ve kalitesini etkileyen başlıca faktörler geniş bir deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığıdır. Deasetilasyon derecesinin, başta çözünme özelliği olmak üzere birçok parametre üzerinde büyük etkisi bulunmaktadır. Daha önceki yapılan çalışmalarda iyi bir çözünürlük için kitosanın minimum %75-80 deasetilasyon derecesine sahip olması gerektiği gösterilmiştir. Kitosan ile hazırlanan taşıyıcı sistemlerin transfeksiyon etkinliğini; çözündüğü ortamın asit konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve viskozite gibi değişken parametreler etkilemektedir (Vilchez ve ark., 2005). 4T1 meme kanseri hücresinin ve kullandığımız kitosan polimerlerinin özelliklerinin transfeksiyonun gerçekleşmemesine etkisinin olduğu düşünüldü.

Doğal polimer kitosan ile gerçekleşmeyen transfeksiyon çalışması bir diğer polimer olan sentetik polietilenimin ile yapıldı. Polietileniminin dallanmış ve doğrusal formları kullanılarak hazırlanan LV-RFP pDNA polipleksleri ile ön çalışmalar gerçekleştirildi ve tüm poliplekslerde 72. saate kadar transfeksiyon sağlandı. Transfeksiyon çalışmalarına ait floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te verilmiştir. LV-RFP plazmit DNA'sının hücre içine başarılı bir şekilde aktarılıp aktarılmadığı, üzerinde bulunan kırmızı floresan proteinin ekspresyon göstererek ışımaya vermesi sonucunda değerlendirildi.

Hücre proliferasyon hızının belirlenmesi tümör biyolojisinin temel parametrelerinin anlaşılmasında, özellikle kanser gibi hastalıklarda önemlidir (Terzioğlu, Keskin ve ark., 2013). Hücre proliferasyon testleri DNA sentezi, metabolik aktivite ve ATP içeriğinin ölçümlerine bakılarak yapılan testlerdir. Bu çalışmada hazırlanan polipleks formülasyonlarının in vitro sitotoksitelerinin değerlendirilmesi yapılan MTT testi sonucunda belirlendi. Ön çalışma olarak LV-RFP pDNA ile hazırlanan komplekslerin hücre sitotoksitesi üzerine etkileri ölçüldü. MTT testi sonucunda dallanmış polietilenimin ile hazırlanan poliplekslerin, doğrusal polietilenimin ile hazırlanan poliplekslerden daha toksik olduğu gözlenmiştir. Bulgular Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Daha önce polietilenimin ile hazırlanan poliplekslerin toksisite çalışmalarında da dallanmış polietileniminin doğrusal polietilenimine göre daha toksik olduğu bildirilmiştir

(Breunig, Bauer ve ark., 2008). Bu sonuçlara göre toksik olmadığı belirlenen oranlar, STAT-3 genini susturacak shRNA kodlayan pDNA için kullanıldı.

Ön çalışmalarda belirlenen oranlarda hazırlanan pSIH1-puro-STAT3 shRNA pDNA polipeksleri için belirlenmiş puromisin konsantrasyonunda transfeksiyon çalışmaları gerçekleştirildi. 24., 48. ve 72. saatlerde alınan görüntüler Şekil 4.16 ve 4.17'de verilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında polipeksler ile gen aktarımı yapılan hücrelerde transfeksiyonun gerçekleştiği gözlemlendi.

Kompleksler için aynı moleküler ağırlıkta (25.000 Mw) doğrusal ve dallanmış polietilenimin kullanıldı. Genel olarak, dallanmış polietileniminin aynı molekül ağırlıktaki doğrusal polietileniminden daha fazla avantaja sahip olduğu ve hücre içine girişi arttırdığı düşünülmektedir (Breunig, Hozsa ve ark., 2008). Farklı özelliklerde ve farklı oranlarda polietilenimin kullanılarak hazırlanan polipeks gen taşıyıcı sistemlerin en etkinini B2 kodlu dallanmış PEI ile 2:1 (a:a) polimer:DNA oranında hazırlanan polipeks formülasyonu oldu. B2 polipeks formülasyonunun zeta potansiyeli +21.9 mv, partikül boyutu 237 nm olarak ölçüldü. Tüm formülasyonlara ait ölçülen değerler Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tez çalışmamızda migrasyon deneyi için, yara iyileştirme modeli kullanılarak hücrenin hareket hızı değerlendirildi. 4T1 hücresi çoğu tümör modelinin aksine oldukça tümörojenik ve invaziv özellik göstermekte olup meme bezindeki primer tümörden lenf nodları kan, karaciğer, akciğer, beyin ve kemik gibi farklı dokulara spontan olarak metastaz yapabilir (Pulaski ve Ostrand-Rosenberg 2001). 4T1 fare meme kanseri hücre dizisi morfolojik olarak epitelyal hücreye benzemektedir (ATCC CRL-259). 4T1 hücresine mikroskopta baktığımızda yuvarlak ve fibroblast yapıda heterojen bir görüntü görülmektedir. Tablo 3.5'de verilen oranlarda hazırlanmış olduğumuz polietilenimin:pSIH1-puro-STAT3 shRNA plazmid DNA polipeksleri ile yarı oluşturduğumuz 4T1 hücrelerine transfeksiyon işlemi yapıldı. Ayrıca Tablo 3.6'da verilen tek başına doğrusal ve dallanmış polietilenimin çözeltilerinin ve çıplak olarak uygulanan pDNA'nın da hücrenin hareket hızına etki edip etmediği değerlendirildi. 0., 24., 48. ve 72. saatlerde inverted mikroskop altında görüntüleme yapıldı. 4T1

hücrelerine transfeksiyonu yapılan dallanmış polietilenimin ile hazırladığımız B2S kodlu polipleks formülasyonunun diğer uygulanan polipleks formülasyonlarına göre fibroblast hücrelerinin hareketini engellediği, yuvarlak şekilde gördüğümüz hücrelerin kohezyonunu artırarak kümeleşmelerini sağladığı gözlemlendi. Şekil 4.19’da görüldüğü gibi, her iki etki de 48. ve 72. saatlerde belirgin olarak artmıştır. Bu etkinin polimer kaynaklı olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla polipleks formülasyonlarında kullanılan dallanmış ve doğrusal polietilenimin polimerleri tek başına hücreler ile muamele edildi ve Şekil 4.21 ve Şekil 4.22’de görüldüğü gibi bu etkinin polimer kaynaklı olmadığı anlaşıldı.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Üçlü negatif meme kanseri tüm meme kanserleri arasında yaklaşık %10 oranında görünen oldukça agresif bir kanser çeşidi olup henüz hedefe yönelik tedavi seçeneği bulunmadığından günümüzde kemoterapi ile tedavi edilmektedir. Bu tez çalışmasında, üçlü negatif meme kanserinin tedavisinde kullanılabilecek yeni bir gen tedavi ajanının geliştirilmesi amaçlandı. Polimer yapısındaki gen taşıyıcı sistemler nükleik asitlerin başarılı bir şekilde hücre içine taşınmasında kullanılan viral olmayan vektörlerdir. Viral gen taşıyıcı sistemlere göre üstünlükleri bulunan viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerin en büyük sorunu etkin taşıyıcı sistemin optimum bir şekilde hazırlanmasıdır. Bu tez çalışmasında klasik kemoterapiden farklı bir yaklaşımla; düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı doğal kitosan polimerleri ve düşük (doğrusal) ve yüksek (dallanmış) molekül ağırlıklı sentetik polietilenimin polimerleri ile üçlü negatif 4T1 fare meme kanseri hücresinde STAT-3 gen ekspresyonunu susturabilecek shRNA kodlayan plazmit DNA'nın etkin bir şekilde aktarılması ile meme kanserinde gen tedavisi için yeni bir viral olmayan gen tedavi ajanı, yani gen-ilaç geliştirilmesi hedeflendirildi.

Belirlenen hedefler doğrultusunda kitosan nanopartikülleri ve polietilenimin polipleksleri hazırlandı. Bu taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonları yapıldı ve hücreye olan sitotoksiteleri değerlendirildi. Düşük, orta ve yüksek molekül ağırlıklı kitosan nanopartikülleri ile 4T1 hücrelerine transfeksiyon sağlanamazken; doğrusal ve dallanmış polietilenimin polipleksler ile transfeksiyon başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Farklı özelliklerde ve farklı oranlarda polietilenimin kullanılarak hazırlanan polipleks gen taşıyıcı sistemlerin en etkinini B2 kodlu dallanmış PEI ile 2:1 (a:a) polimer:DNA oranında hazırlanan polipleks formülasyonu oldu. B2S polipleks formülasyonunun heterojen hücre yapısına sahip (yuvarlak ve fibroblast) üçlü negatif meme kanserinde fibroblast hücrelerinin hareketini engellediği, yuvarlak hücrelerin ise kohezyonunu artırarak kümeleşmelerini sağladığı görüldü. Bu bulgunun cerrahi işlem ile tedavi seçeneği için de olumlu bir gelişme olabileceği düşünülmektedir.

Çalışma sonucunda elde edilen bulgular protein tayin analizleri ve in-vivo çalışmalar ile desteklenerek, STAT-3 gen ekspresyonunun baskılanıp baskılanmadığı ve dolayısıyla STAT-3 ekspresyonuna bağlı hangi genlerin ekspresyonunun nasıl etkilendiği ortaya çıkarılmalıdır.

Bu bulgular in-vivo pre-klinik çalışmalar ile desteklendiği takdirde üçlü negatif meme kanserinin tedavisi için klinik çalışmalara aday toksisitesi düşük, etkinliği yüksek bir gen-ilaç geliştirilmiş olacaktır.



KAYNAKLAR

Akbaba H, Gen Tedavisi Amacıyla DNA yüklü Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması. Ege Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2010, İzmir, (Danışman: Doç. Dr. Gülten Kantarcı, Yrd. Doç. Dr. Devrim DEMİR DORA)

Aslakson CJ ,Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. Cancer research.1992, 52, 6, 1399-1405.

Avalle L, Pensa S, Regis G, Novelli F ,Poli V. STAT1 and STAT3 in tumorigenesis: A matter of balance. Jak-Stat.2012, 1, 2, 65-72.

Baltayiannis G, Baltayiannis N ,Tsianos E. Suppressors of cytokine signaling as tumor repressors. Silencing of SOCS3 facilitates tumor formation and growth in lung and liver. Journal of BU ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology.2008, 13, 2, 263-265.

Banerjee T, Mitra S, Singh AK, Sharma RK ,Maitra A. Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. International journal of pharmaceutics.2002, 243, 1, 93-105.

Barajas M, Mazzolini G, Genové G, Bilbao R, Narvaiza I, Schmitz V, Sangro B, Melero I, Qian C ,Prieto J. Gene therapy of orthotopic hepatocellular carcinoma in rats using adenovirus coding for interleukin 12. Hepatology.2001, 33, 1, 52-61.

Bertram JS. The molecular biology of cancer. Molecular aspects of medicine.2000, 21, 6, 167-223.

Beyth N, Yudovin-Farber I, Perez-Davidi M, Domb AJ ,Weiss EI. Polyethyleneimine nanoparticles incorporated into resin composite cause cell death and trigger biofilm stress in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences.2010, 107, 51, 22038-22043.

Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr J-P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.1995, 92, 16, 7297-7301.

Breunig M, Bauer S, Göpferich A. Polymers and nanoparticles: intelligent tools for intracellular targeting? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.2008, 68, 1, 112-128.

Breunig M, Hozsa C, Lungwitz U, Watanabe K, Umeda I, Kato H, Goeperich A. Mechanistic investigation of poly (ethylene imine)-based siRNA delivery: disulfide bonds boost intracellular release of the cargo. *Journal of controlled release*.2008, 130, 1, 57-63.

Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced drug delivery reviews*.2002, 54, 5, 631-651.

Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE. Stat3 as an oncogene. *Cell*.1999, 98, 3, 295-303.

Bunnell BA, Morgan RA. Gene therapy for infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*.1998, 11, 1, 42-56.

Cailleau R, Olive M, Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*.1978, 14, 11, 911-915.

Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato JL, Alonso M. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*.1997, 63, 1, 125-132.

Chai EZP, Shanmugam MK, Arfuso F, Dharmarajan A, Wang C, Kumar AP, Samy RP, Lim LH, Wang L, Goh BC. Targeting transcription factor STAT3 for cancer prevention and therapy. *Pharmacology & therapeutics*.2016, 162, 86-97.

Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, Burlinchon S, Boissière F, Laune D, Roques S, Lazennec G. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Research*.2007, 9, 1, R15.

Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast disease*.2010, 32, 1-2, 35.

Chiang CL, Sung CS, Wu TF, Chen CY, Hsu CY. Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells. *Journal of Chromatography B*. 2005, 822, 1-2, 54-60.

Costa D, Briscoe WH, Queiroz J. Polyethylenimine coated plasmid DNA–surfactant complexes as potential gene delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.2015, 133, 156-163.

Curtis C, Shah SP, Chin S-F, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *nature*.2012, 486, 7403, 346-352.

Dai L, Cheng L, Zhang X, Jiang Q, Zhang S, Wang S, Li Y, Chen X, Du T, Yang Y. Plasmid-based STAT3-siRNA efficiently inhibits breast tumor growth and metastasis in mice. *Neoplasma*.2011, 58, 6, 538-547.

Darnell Jr JE, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science-AAAS-weekly paper edition-including guide to scientific information*.1994, 264, 5164, 1415-1420.

Davis ME. Non-viral gene delivery systems. *Current opinion in biotechnology*.2002, 13, 2, 128-131.

Dent R, Hanna WM, Trudeau M, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*.2009, 115, 2, 423-428.

Diken Özlem; Elektroporasyon, İ.Ü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü 2005

Dogini DB, Pascoal VD, Avansini SH, Vieira AS, Pereira TC ,Lopes-Cendes I. The new world of RNAs. *Genetics and molecular biology*.2014, 37, 1, 285-293.

Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nature reviews Drug discovery*.2003, 2, 5, 347-360.

Duncan R. Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nature Reviews Cancer*.2006, 6, 9, 688-701.

Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo JA ,Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer treatment reviews*.2012, 38, 6, 698-707.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D ,Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*.2015, 136, 5,

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE ,Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature*.1998, 391, 6669, 806-811.

Fraley R, Subramani S, Berg P ,Papahadjopoulos D. Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *Journal of Biological Chemistry*.1980, 255, 21, 10431-10435.

Gao X, Kim K-S, Liu D. Nonviral Gene Delivery: What we know and what is next, *AAPS Journal* 2007; 9(1) E92-E104

Gao Y, Xie J, Chen H, Gu S, Zhao R, Shao J ,Jia L. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment. *Biotechnology advances*.2014, 32, 4, 761-777.

Garay JP ,Gray JW. Omics and therapy—a basis for precision medicine. *Molecular oncology*.2012, 6, 2, 128-139.

Gibbs WW. Roots of cancer. *Sci Am*.2003, 56-65.

Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR ,Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012—an update. *The journal of gene medicine*.2013, 15, 2, 65-77.

Grayson ACR, Doody AM ,Putnam D. Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery in vitro. *Pharmaceutical research*.2006, 23, 8, 1868-1876.

Groner B ,Hennighausen L. Linear and cooperative signaling: roles for Stat proteins in the regulation of cell survival and apoptosis in the mammary epithelium. *Breast Cancer Research*.2000, 2, 3, 149.

Hanahan D ,Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *cell*.2000, 100, 1, 57-70.

Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F ,Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochemical journal*.1998, 334, 2, 297-314.

Hsieh F-C, Cheng G ,Lin J. Evaluation of potential Stat3-regulated genes in human breast cancer. *Biochemical and biophysical research communications*.2005, 335, 2, 292-299.

Humphrey LL, Helfand M, Chan BK ,Woolf SH. Breast cancer screening: a summary of the evidence for the US Preventive Services Task Force. *Annals of internal medicine*.2002, 137, 5_Part_1, 347-360.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E ,Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*.2011, 61, 2, 69-90.

Jorcyk CL, Holzer RG ,Ryan RE. Oncostatin M induces cell detachment and enhances the metastatic capacity of T-47D human breast carcinoma cells. *Cytokine*.2006, 33, 6, 323-336.

Katare DP ,Aeri V. Progress in gene therapy: A Review. *IJTPR*.2010, 1, 33, e41.

Katas H ,Alpar HO. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of controlled release*.2006, 115, 2, 216-225.

Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO ,Gelmon K. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *Journal of clinical oncology*.2010, 28, 20, 3271-3277.

Khan MK, Nigavekar SS, Minc LD, Kariapper MS, Nair BM, Lesniak WG ,Balogh LP. In vivo biodistribution of dendrimers and dendrimer nanocomposites—implications for cancer imaging and therapy. *Technology in cancer research & treatment*.2005, 4, 6, 603-613.

Kishimoto T, Taga T ,Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell*.1994, 76, 2, 253-262.

Knüpfer H ,Preiß R. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*.2007, 102, 2, 129-135.

Kotmakçı M, Çetintaş VB, Kantarcı AG. Preparation and characterization of lipid nanoparticle/pDNA complexes for STAT3 downregulation and overcoming chemotherapy resistance in lung cancer cells. *International journal of pharmaceutics*.2017, 525, 1, 101-111

Kozłowski L, Zakrzewska I, Tokajuk P ,Wojtukiewicz M. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku (1995)*.2003, 48, 82-84.

Kritikou EA, Sharkey A, Abell K, Came PJ, Anderson E, Clarkson RW ,Watson CJ. A dual, non-redundant, role for LIF as a regulator of development and STAT3-mediated cell death in mammary gland. *Development*.2003, 130, 15, 3459-3468.

Lee CC, Mackay JA, Fréchet JM, Szoka FC. Designing dendrimers for biological applications. *Nature biotechnology*.2005, 23, 12, 1517-1526.

Levy DE, Darnell J. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature reviews Molecular cell biology*.2002, 3, 9, 651-662.

Lin W-W, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *Journal of Clinical Investigation*.2007, 117, 5, 1175.

Liu H, Zang C, Fenner M, Possinger K, Elstner E. PPAR γ ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro. *Breast cancer research and treatment*.2003, 79, 1, 63-74.

Macka D K, Weia R, Elbagarria A, Abbeyb N, McGrathc S M. A novel method for DEAE-dextran mediated transfection of adherent primary cultured human macrophages. *Journal of Immunological Methods*. 1998,211,1-2,79-86

Malmö J, Sörgård H, Vårum KM, Strand SP. siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing. *Journal of controlled release*.2012, 158, 2, 261-268.

Mansoori B, Shotorbani SS, Baradaran B. RNA interference and its role in cancer therapy. *Advanced pharmaceutical bulletin*.2014, 4, 4, 313.

Marotta LL, Almendro V, Marusyk A, Shipitsin M, Schemme J, Walker SR, Bloushtain-Qimron N, Kim JJ, Choudhury SA, Maruyama R. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44⁺ CD24⁻stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *The Journal of clinical investigation*.2011, 121, 7, 2723.

Mcneish I, Bell S, Lemoine N. Gene therapy progress and prospects: cancer gene therapy using tumour suppressor genes. *Gene therapy*.2004, 11, 6, 497-503.

Mehrabadi FS, Fischer W, Haag R. Dendritic and lipid-based carriers for gene/siRNA delivery (a review). *Current Opinion in Solid State and Materials Science*.2012, 16, 6, 310-322.

Mitomo K, Griesenbach U, Inoue M, Somerton L, Meng C, Akiba E, Tabata T, Ueda Y, Frankel GM, Farley R, Singh C, Chan M, Munkonge F, Brum A, Xenariou S, Escudero-Garcia S, Hasegawa M, Alton EW. Toward gene therapy for cystic fibrosis using a lentivirus pseudotyped with Sendai virus envelopes. *Mol Ther.*2010, 18, 6, 1173-1182.

Mulligan RC, Howard BH, Berg P. Synthesis of rabbit β -globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV40 β -globin recombinant genome. *nature.*1979, 277, 5692, 108-114.

Nanjwade BK, Bechra HM, Derkar GK, Manvi F, Nanjwade VK. Dendrimers: emerging polymers for drug-delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.*2009, 38, 3, 185-196.

Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced biomedical research.*2012, 1,

Nimesh S, Gupta N, Chandra R. Cationic polymer based nanocarriers for delivery of therapeutic nucleic acids. *Journal of biomedical nanotechnology.*2011, 7, 4, 504-520.

Niu G, Bowman T, Huang M, Shivers S, Reintgen D, Daud A, Chang A, Kraker A, Jove R, Yu H. Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth. *Oncogene.*2002, 21, 46, 7001.

Oettgen H. The history of cancer immunotherapy. *Biologic therapy of cancer.*1991, 53-66.

Ogris M, Brunner S, Schüller S, Kircheis R, Wagner E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene therapy.*1999, 6, 4,

Onishi H, Machida Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials.*1999, 20, 2, 175-182.

Pack DW, Hoffman AS, Pun S, Stayton PS. Design and development of polymers for gene delivery. *Nature reviews Drug discovery.*2005, 4, 7, 581-593.

Pathak A, Patnaik S ,Gupta KC. Recent trends in non-viral vector-mediated gene delivery. *Biotechnology journal*.2009, 4, 11, 1559-1572.

Patil Y ,Panyam J. Polymeric nanoparticles for siRNA delivery and gene silencing. *International journal of pharmaceutics*.2009, 367, 1, 195-203.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H ,Akshen LA. Molecular portraits of human breast tumours. *nature*.2000, 406, 6797, 747-752.

Pulaski BA, Terman DS, Khan S, Muller E ,Ostrand-Rosenberg S. Cooperativity of Staphylococcal aureus enterotoxin B superantigen, major histocompatibility complex class II, and CD80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastases in a clinically relevant postoperative mouse breast cancer model. *Cancer research*.2000, 60, 10, 2710-2715.

Putnam D, Gentry CA, Pack DW ,Langer R. Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.2001, 98, 3, 1200-1205.

Queen MM, Ryan RE, Holzer RG, Keller-Peck CR ,Jorcyk CL. Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer research*.2005, 65, 19, 8896-8904.

Reis-Filho J ,Tutt A. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*.2008, 52, 1, 108-118.

Resemann HK, Watson CJ ,Lloyd-Lewis B. The Stat3 paradox: a killer and an oncogene. *Molecular and cellular endocrinology*.2014, 382, 1, 603-611.

Resnier P, Montier T, Mathieu V, Benoit J-P ,Passirani C. A review of the current status of siRNA nanomedicines in the treatment of cancer. *Biomaterials*.2013, 34, 27, 6429-6443.

Said NAB ,Williams ED. Growth factors in induction of epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cells Tissues Organs*.2011, 193, 1-2, 85-97.

Sambrook J, Fritsch EF ,Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press, 1989,

Scholz C ,Wagner E. Therapeutic plasmid DNA versus siRNA delivery: common and different tasks for synthetic carriers. *Journal of controlled release*.2012, 161, 2, 554-565.

Sen GL ,Blau HM. A brief history of RNAi: the silence of the genes. *The FASEB journal*.2006, 20, 9, 1293-1299.

Shi F, Rakhmilevich AL, Heise CP, Oshikawa K, Sondel PM, Yang N-S ,Mahvi DM. Intratumoral injection of interleukin-12 plasmid DNA, either naked or in complex with cationic lipid, results in similar tumor regression in a murine model. *Molecular cancer therapeutics*.2002, 1, 11, 949-957.

Shigemasa Y ,Minami S. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*.1996, 13, 1, 383-420.

Shu X ,Zhu K. The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.2002, 54, 2, 235-243.

Siegel R, Naishadham D ,Jemal A. *Cancer statistics, 2013*. CA: a cancer journal for clinicians.2013, 63, 1, 11-30.

Singh MS ,Peer D. RNA nanomedicines: the next generation drugs? *Current opinion in biotechnology*.2016, 39, 28-34.

Siveen KS, Sikka S, Surana R, Dai X, Zhang J, Kumar AP, Tan BK, Sethi G ,Bishayee A. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-reviews on cancer*.2014, 1845, 2, 136-154.

Sledge GW, Mamounas EP, Hortobagyi GN, Burstein HJ, Goodwin PJ, Wolff AC. Past, present, and future challenges in breast cancer treatment. *Journal of clinical oncology*.2014, 32, 19, 1979-1986.

Spitzner M, Roesler B, Bielfeld C, Emons G, Gaedcke J, Wolff HA, Rave-Fränk M, Kramer F, Beissbarth T, Kitz J. STAT3 inhibition sensitizes colorectal cancer to chemoradiotherapy in vitro and in vivo. *International journal of cancer*.2014, 134, 4, 997-1007.

Svenson S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.2009, 71, 3, 445-462.

Tan DS, Marchió C, Jones RL, Savage K, Smith IE, Dowsett M, Reis-Filho JS. Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast cancer research and treatment*.2008, 111, 1, 27-44.

Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*.2003, 4, 5, 346-358.

Tong R, Cheng J. Anticancer polymeric nanomedicines. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*.2007, 47, 3, 345-381.

Ulasov AV, Khramtsov YV, Trusov GA, Rosenkranz AA, Sverdlov ED, Sobolev AS. Properties of PEI-based polyplex nanoparticles that correlate with their transfection efficacy. *The American Society of Gene & Cell Therapy*.2011, 19, 1, 103-112.

Vilchez S, Jovancic P, Manich A.M, Julia M. R, Erra P. Chitosan Application on Wool Before Enzymatic Treatment. *Journal of Applied Polymer Science*. 2005, 98, 1938-1946.

Von Harpe A, Petersen H, Li Y, Kissel T. Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *Journal of controlled release*.2000, 69, 2, 309-322.

Walker SR, Nelson EA, Zou L, Chaudhury M, Signoretti S, Richardson A, Frank DA. Reciprocal effects of STAT5 and STAT3 in breast cancer. *Molecular Cancer Research*.2009, 7, 6, 966-976.

Walsh CE. Gene therapy progress and prospects: gene therapy for the hemophilias. *Gene therapy*.2003, 10, 12, 999-1003.

Weigelt B, Peterse JL, Van't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature reviews cancer*.2005, 5, 8, 591-602.

Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy. *Gene*.2013, 525, 2, 162-169.

Wolinsky JB, Grinstaff MW. Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment. *Advanced drug delivery reviews*.2008, 60, 9, 1037-1055.

Wong K, Sun G, Zhang X, Dai H, Liu Y, He C, Leong KW. PEI-g-chitosan, a novel gene delivery system with transfection efficiency comparable to polyethylenimine in vitro and after liver administration in vivo. *Bioconjugate chemistry*.2006, 17, 1, 152-158.

Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *Journal of Biological Chemistry*.1987, 262, 10, 4429-4432.

Yoneda T, Michigami T, Yi B, Williams PJ, Niewolna M, Hiraga T. Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma. *Cancer*.2000, 88, S12, 2979-2988.

Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling. *Clinical reviews in allergy & immunology*.2005, 28, 3, 205-220.

Yu H, Jove R. The STATs of cancer—new molecular targets come of age. *Nature reviews cancer*.2004, 4, 2, 97-105.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Feride	Uyruğu	TC
Soyadı	ÖNER	Tel no	05067558236
Doğum tarihi	15.02.1990	e-posta	feride.onerr@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Mahmutlar Şükrü Kaptanoğlu Lisesi	2006
Lisans	Abant İzzet Baysal Üniversitesi Biyoloji Bölümü (ingilizce)	2013
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi	2014-devam ediyor
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Kısmi Zamanlı Öğrenci	Abant İzzet BAysal Üniversitesi İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı	6 ay kısmi zamanlı
Mikrobiyoloji Laboratuvar	Alanya Özel Hayat Hastanesi	3 ay Staj

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	57,5

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
114S410-Diyabetik sıçan İzole Kalp preparatlarında Glukagon Benzeri Peptid-1 Analogları ve Sitagliptin'in Kalp Hızı Üzerine Etkileri	TÜBİTAK	2016-2017

Yayınlar ve Bildiriler/

P-106 Adaçayı Ekstresinin Penisilin Modeli Deneysel Epilepsi Üzerine Etkileri

(39. Ulusal Fizyoloji Kongresi 10-14 Eylül 2013)

Evaluation Of Chitosan-Pdna Nanocomplexes As Non-Viral Gene Delivery Vectors In Hek 293t Cells; F. Öner, D. Demir Dora 16 th International Pharmaceutical Technology Symposium 2016 (18-21 Eylül 2016)

P-0825 Cytotoxicity of Polyethylenimine/pDNA Complexes on 4T1, MDA-MB- 231 and MCF-7 Breast Cancer Cells ; Devrim Demir Dora, Feride Öner, Özlem Yılmaz (3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi 26-29 Nisan 2017)

S-035 Development and Evaluation of Polyethylenimine/pDNA Complexes as Non-viral Gene Delivery Systems for Breast Cancer; Devrim Demir Dora, Feride Öner, Özlem Yılmaz (3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi 26-29 Nisan 2017)

Makale

A. Bahadır¹, S. Demir², H. Orallar³, E. Beyazcicek², **F. Oner**³; Effects of an Extract of Salvia Miltiorrhiza on a Penicillin-Induced Epilepsy Model in Rats *Neurophysiology*, Vol. 47, No. 3, June, 2015