

NIHAL KARAKAŞ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2015

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**TERAPÖTİK PROTEİNLER SALGILAMAK ÜZERE
GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ KÖK HÜCRELERİN BEYİN
TÜMÖRLERİNİN TEDAVİSİNDE KULLANILMASI**

NİHAL KARAKAŞ

**DANIŞMAN
PROF. DR. SELMA YILMAZER**

**SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI
İLERİ NÖROLOJİK BİLİMLER PROGRAMI**

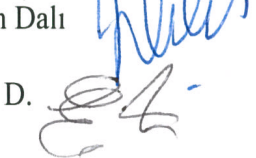
İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilim Anabilim Dalı İleri Nörolojik Bilimler Doktora Programında Nihal KARAKAŞ tarafından hazırlanan Terapötik Proteinler Salgılamak Üzere Genetiği Değiştirilmiş Kök Hücreler Kullanılarak Beyin Tümörlerinin Tedavi Edilmesi başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

25 / 06 / 2015

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Selma YILMAZER İ.Ü. CerrahpaşaTıp Fak. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
2.Prof. Dr. Hakan GÜRVİT İ.Ü. İstanbul Tıp Fak. Nöroloji Anabilim Dalı	
3.Prof. Dr. Yasemin GÜRSOY Koç Üni. Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	
4.Prof. Dr. Ülkan KILIÇ Medipol Üni. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
5.Doç. Dr. Erdem TÜZÜN İ.Ü. Deneysel Tıp Araş. Enst. Sinirbilim Anabilim D.	

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 çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Nihal KARAKAŞ



ITHAF

“Anneme, babama ve eşime ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarımın her aşamasında bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen, akademik kişiliği ve çalışma prensipleri ile bana örnek olan, yurt dışında deneysel çalışmalarımı yürütebilmem için yardımcı olan, kendisinden her zaman öğreneceklerim olduğuna inandığım değerli danışmanım Sn. Prof. Dr. Selma YILMAZER'e, Harvard Tıp Fakültesi, Massachusetts Genel Hastanesi'nde (MGH) tez çalışmalarımı gerçekleştirmeme olanak sağlayan, bilimsel çalışma prensiplerini ve tecrübelerini aktaran, Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunduğum süre içerisinde desteğini esirgemeyen ve her tür problemimle yakından ilgilenen Moleküler Nöroterapi ve Görüntüleme Laboratuvarı'nın yürütücüsü ve ikinci tez danışmanım olan Sn. Prof. Dr. Khalid SHAH'a, çalışma arkadaşlarım Daniel STUCKEY, Shawn HINGTGEN, Tuğba BAĞCI-ÖNDER, Jordi MARTINEZ-QUINTANILLA, Yanni ZHU, Sung Hugh CHOI, Wanlu DU, Nusrat JAHAN, Clemens REINSHAGEN, Deepak BHERE ve Sara PIGNATTA'ya, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde bulunduğum süre içerisinde güler yüzlerini esirgemeyen Duygu GEZEN-AK ve Erdinç DURSUN'a, teşekkür ederim.

Beni bu dünyaya getiren, insanlığa faydalı ve örnek bir insan olmam için eğitimimi şekillendiren, ve yaşamım boyunca hedeflerime erişebilmem için tüm benlikleriyle maddi manevi desteklerini esirgemeyen sevgili annem Ayten ÇAKMAK ve sevgili babam Mustafa ÇAKMAK'a, bir ömür boyu ellerimden tutacağını bildiğim ve beni aldığım her kararda destekleyerek yanımda olan, hayallerimi sahiplenen sevgili eşim Kadir KARAKAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Akademik çalışmalarına başladığım andan itibaren desteğini sürdüren ve doktora çalışmalarım için de "2221-Yurt İçi Doktora Bursu" ile destekleyerek bilimsel yolculuğuma katkıda bulunan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1.Glioblastoma Multiforme (GBM).....	4
2.2.Glioblastoma Multiforme Tedavisi	4
2.2.1.Cerrahi Tedavi.....	5
2.2.2.Radyoterapi	5
2.2.3.Kemoterapi.....	6
2.2.4.Glioblastoma Multiforme Tedavisinde Kan Beyin Bariyerinin Etkisi	6
2.3.Glioblastoma Multiforme Tedavisinde Alternatif Yaklaşımlar	6
2.2.3.1.Terapötik Protein Üreten Aracılar Olarak Kök Hücreler.....	8
2.4.Hedefli Toksinler veya İmmünotoksinler	9
2.4.1.Hedefli Toksinlerin Oluşturulması.....	10
2.4.1.1.Toksinler	10
2.4.1.2.Hedeflenen Reseptörler	11
2.4.2.Hedefli Toksinlerin Klinik Öncesi ve Klinik Denemelerde Kullanılması.....	15
2.5.Tümör Nekroz Faktör Bağımlı Apoptoz İndükleyici Ligand (TRAIL).....	17
2.5.1.TRAIL'ın GBM Tedavisinde Kullanılması ve Sınırlılıkları.....	19
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1.Hücre kültürlerinin hazırlanması	22
3.2.Hedefli toksinleri üreten hücre soylarının oluşturulması.....	23

3.2.1.Moleküler klonlama ve lentiviral plasmidlerin hazırlanması	23
3.2.2.Plasmid DNA'sının çoğaltılması ve izolasyonu	24
3.2.3.DNA miktar tayini	25
3.2.4.Toksine dirençli hücre soylarının oluşturulması	25
3.3.Biyogörüntülenebilir GBM hücre soylarının oluşturulması	27
3.4.Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	28
3.4.1.Total RNA izolasyonu	28
3.4.2.cDNA sentezi	29
3.4.3.PZR	29
3.5.Hücrelerden hedefli toksin içeren medyumların hazırlanması	31
3.6.Dot blot yöntemi ile terapötik protein salınmasının gösterilmesi ve protein miktar tayini	31
3.7.Protein sentezi inhibisyonunun gösterilmesi	32
3.8.Hücre ölümünün <i>in vitro</i> analizi	32
3.8.1.Lusiferaz ile işaretlenmemiş hücrelere ilişkin canlılık analizi	32
3.8.2.Lusiferaz ile işaretlenmiş hücrelere ilişkin canlılık analizi	33
3.9.Apoptozun analizi	33
3.9.1.Kaspaz 3/7 aktivasyonunun ölçümü	33
3.9.2.Western Blot	33
3.10.Terapötik kök hücrelerin GBM hücreleri ile birlikte kültürünün yapılması	36
3.11.Hedefli toksin üreten kök hücrelerin ve GBM hücrelerinin birlikte subkutan yolla enjeksiyonu	36
3.12.Beyin tümörü cerrahi olarak çıkarılan farelerde hedefli toksin üreten kök hücrelerin terapötik etkisinin gösterilmesi	38
3.13.Biyoluminesan görüntüleme	38
3.14.İmmünohistokimyasal boyama	38
3.15.Hedefli toksin üreten kök hücrelerin TRAIL ile kombine edilerek GBM hücreleri üzerinde terapötik etkisinin gösterilmesi	38
3.16.İstatistiksel yöntemler	39
4.BULGULAR	40
4.1.Hücrelerin toksine dirençli hale getirilmesine ve hedefli toksinleri üretmek üzere hazırlanmasına ait sonuçlar	40

4.2.Hedefli toksinlerin GBM hücrelerinde hücre döngüsü ve protein sentezi üzerine etkileri	44
4.3.Hedefli toksinleri salan kök hücrelerin GBM hücre ölümü üzerine etkileri.....	49
4.4.Subakutan tümörde hedefli toksinler üreten kök hücrelerin aynı anda protein sentezi ve tümör kütlesi değişimi üzerine etkileri.....	51
4.5.Terapötik kök hücre nakledilen GBM tümörlü farelerde, hedefli toksinlerin tümör kütesinin nüksü ve farelerin sağkalımı üzerine etkileri	52
4.6.Hedefli toksinler ile birlikte uygulanan TRAIL'ın çeşitli GBM hücreleri üzerinde terapötik etkisi.....	53
4.7.Hedefli toksinlerin, GBM hücrelerindeki TRAIL direnci ve TRAIL aracılı apoptoz üzerine etkileri.	55
4.8.GBM hücrelerinde hedefli toksin reseptörü ifadesinin, TRAIL duyarlılığı oluşturma üzerine etkisi	58
4.10.GBM primer hücrelerinde hedefli toksinler ile TRAIL'ın birlikte uygulamasının <i>in vitro</i> terapötik etkisi ve apoptozun analizi.....	61
4.11.TRAIL'a yarı duyarlı GBM hücrelerinde hedefli toksinler ile birlikte TRAIL uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisi	62
4.12.Hedefli toksinleri üreten terapötik kök hücreler ile kültürü yapılan GBM hücrelerinde TRAIL uygulamasının terapötik etkisi	64
4.13.GBM hücrelerinde IL13PE-TRAIL füzyon proteininin çift fonksiyonlu etkisi..	65
KAYNAKLAR	75
ETİK KURUL KARARI	84
ÖZGEÇMİŞ	85

TABLolar LISTESi

Tablo 3-1: PZR reaksiyon karışımı.....	30
Tablo 3-2: PZR sıcaklık döngüsü	30
Tablo 3-3: RT-PZR primerleri.....	31

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Hedefli toksin konstraktlarının oluşturulması.	10
Şekil 2-2: Nanokor ve diğer antikor yapılarının karşılaştırılması.....	14
Şekil 2-3: TRAIL sinyali ile apoptozun uyarılması	18
Şekil 3-1: Lentiviral vektörlere hedefli toksinlerin yerleştirilmesi (klonlama) aşamaları	24
Şekil 3-2: Toksine dirençli kök hücre soylarının ve hedefli toksin üreten kök hücrelerin elde edilme aşamaları.....	26
Şekil 3-3: GBM hücrelerinin lüsiferaz işaretlemesi ve subakutan tümör oluşturulmasının gösterimi.	37
Şekil 4-1: Toksine dirençli hale getirilen 293T ve hNSC hücrelerinin toksin muamelesi sonrası canlılık analizi sonuçları.....	41
Şekil 4-12: GBM rezeksiyonu sonrası fare beynine implante edilen hNSC-IL13-PE kök hücrelerinin <i>in vivo</i> terapötik etkisinin gösterilmesi.....	53
Şekil 4-13: TRAIL’a dirençli ve yarı dirençli GBM hücrelerinin, hedefli toksinler ile muamelesinin hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi.....	54
Şekil 4-14: Hedefli toksinlerden ENb-PE’nin, GBM hücrelerinde (LN229), DR4/5 reseptörlerini artırdığının ve anti-apoptotik XIAP seviyelerini azalttığının gösterilmesi.. ..	55
Şekil 4-15: GBM hücrelerinde, hedefli toksinlerden ENb-PE ve TRAIL’ın birlikte uygulamasının, hücre ölümüne ve apoptotik proteinlere etkisinin analizi.	57
Şekil 4-16: TRAIL’a dirençli GBM hücrelerinde, ENbPE’nin oluşturduğu TRAIL duyarlılığının şematik gösterimi.	58
Şekil 4-17: IL13R α 2 geni aktarılan GBM hücrelerinde (LN229-IL13R α 2), IL13PE’nin, TRAIL duyarlılığı ve hücre öümü üzerine etkisi.....	59
Şekil 4-18: LN229-IL13R α 2 hücrelerinde IL13PE ve TRAIL uygulaması sonuçları..	60
Şekil 4-19: LN229-IL13R α 2 hücrelerinde IL13-PE’nin oluşturduğu TRAIL duyarlılığının şematik gösterimi.	61
Şekil 4-22: Hedefli toksinleri üreten kök hücreler ile GBM hücrelerinin birlikte kültürüne TRAIL uygulamasının terapötik etkisinin analizi.. ..	65

Şekil 4-25: Hedefli toksinler ile birlikte TRAIL uygulamasının GBM hücrelerinde oluşturduğu apoptotik ölüm mekanizması.....	67
---	----

SEMBOLLER / KISALTMALAR LISTESİ

AV	Adenovirüs
AAV	Adeno ilişkili virüs
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive etme faktörü-1
Asp	Aspartik asit
Bcl-2	B hücreli lenfoma 2
cKasp	Kesilmiş Kaspaz
cDNA	Komplementer (tamamlayıcı) DNA
cFLIP	HücreSEL FLICE benzeri inhibitör proteini
CMV	Sitomegalovirüs
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid
DISC	Hücre ölümünü uyaran sinyal kompleksi
DMEM	Dulbecco'nun minimum esansiyel medyumunu
DR4/5	Ölüm reseptörü 4/5
DT	Difteri toksini
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
eEF-2	Ökaryotik elongasyon faktörü-2
ENb	Epidermal büyüme faktörü reseptörüne özgü nanokor
FAM TM	6-carboxyfluorscein
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
Fluc	Ateş böceği lusiferazı
FBS	Fetal sığır serumu
GAPDH	Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz
GBM	Glioblastoma Multiforme
GFP	Yeşil floresan proteini
HCAb	Ağır zincirli antikor
HEK-293T	İnsan embriyonik böbrek hücreleri
hNSC	İnsan nöral kök hücreleri
IAP	Apoptoz proteinleri inhibitörleri
IRES	İnternal ribozom giriş bölgesi
IL4	İnterlökin-4

IL13	İnterlökin 13
LRP	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörüne bağlı protein
LV	Lentivirüs
mEF-2	Mutant elongasyon faktörü-2
mCherry (mCh)	Bir çeşit kırmızı floresan protein
Nb	Nanokor
oHSV	Onkolitik Herpes Simpleks virüsü
PARP	Poli ADP riboz polimeraz
PE	Pseudomonas Ekzotoksin
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Rluc	Renilla lusiferazı
RT-PZR	Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
smRTKI	Küçük molekül reseptör tirozin kinaz inhibitörleri
ssODN	Tek zincirli oligodeoksinükleotid
TRAIL	Tümör nekroz faktör bağımlı apoptoz indükleyici ligand
TfR	Transferrin reseptörü
TGF- α	Transforme edici büyüme faktörü- α
TRAIL	Tümör nekroz faktör bağımlı apoptoz indükleyici ligand
TK	Timidin kinaz
CD	Sitozin diaminaz
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Karakas, N. (2015). Terapötik Proteinler Üretmek Üzere Genetiği Değiştirilmiş Kök Hücrelerin Glioblastoma Multiforme Tedavisinde Kullanılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilim ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Glioblastoma multiforme (GBM) yetişkinlerde en sık görülen, agresif ve malign bir beyin tümörüdür. GBM tedavisindeki bugünkü uygulamalar cerrahi tedavi ve bunu takip eden radyoterapi ile kemoterapidir. Ancak tümörün nüksü, tedavinin sağlıklı beyin dokusu üzerindeki sitotoksik etkileri ve kan beyin bariyerinin yapısı nedeniyle bu tedavi yöntemleri yetersiz kalmaktadır. Beyin tümörlü fare modellerinde yapılan çalışmalar, kök hücrelerin primer tümör alanlarına ve mikro seviyedeki invazif tümör odaklarına göç ettiğini göstermiştir. Böylece kök hücreler aracılığıyla terapötik proteinlerin tümör odaklarına gönderimi esasına dayanan bir GBM tedavi yaklaşımı gelişmiştir. GBM’i de içine alan kanser tedavilerinde öne çıkan terapötik proteinlerden biri hedefli toksinlerdir. Ancak, hedefli toksinlerle yapılan faz-III klinik denemeleri, sistemik toksisite, molekülün kısa yarı ömrü ve dokuya nüfuzunun yetersizliği nedeniyle başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Dolayısıyla, sağlıklı dokuya hasar vermeden devamlı olarak hedefli toksinlerin salınımını sağlayacak ve yan etkilerden koruyup terapötik etkinliği artıracak bir GBM tedavi şekline ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, mevcut terapötik ajanlara direnç gösteren GBM tümörlerini kök hücrelerden salınan hedefli toksinler ile tedavi etmek üzere, lentiviral vektörler kullanılarak Pseudomonas ekzotoksinini (PE) içeren ve epidermal büyüme faktörü yönelimli ENb-PE ile interlökin-13 yönelimli IL13-PE hedefli toksinleri geliştirildi. Bu hedefli toksinleri salgılamak üzere oluşturulan insan nöral kök hücrelerinin, toksin etkinliği sonucu GBM hücrelerinde protein sentezini bloke ederek anlamlı derecede terapötik etki oluşturduğu gösterildi. Terapötik kök hücrelerin, GBM tümörlü farelerde rezeksiyon sonrası tümör nüksünü yavaşlatarak farelerde sağkalım süresini artırdığı biyolüminesan görüntüleme yöntemi ile gösterildi. Ayrıca kanser hücrelerinde apoptoz sinyallerini tetikleyen tümör nekroz faktör bağımlı apoptoz indükleyici ligand (TRAIL)’a dirençli GBM hücrelerine, hedefli toksinler uygulandığında, TRAIL’a duyarlı hale geldiği gösterildi. Bu direncin önlenmesine, TRAIL’ın bağlandığı ölüm reseptörlerinden DR4/5’in ifade düzeylerindeki artışın ve apoptoz inhibe edici proteinlerin ifade düzeylerindeki azalışın öncülük ettiği belirlendi. TRAIL ve hedefli toksinlerin hem ekstrinsik hem de intrinsik apoptotik yolağın aktivasyonu ile GBM hücre ölümünü gerçekleştirdiği saptandı. Sonuç olarak, hedefli toksin üreten terapötik kök hücreler ile elde ettiğimiz bulgular, daha sonra GBM tedavisinde kullanılmak üzere klinik çalışmalara temel oluşturacak niteliktedir.

Anahtar Kelimeler : Pseudomonas Ekzotoksin, TRAIL, glioblastoma multiforme, kök hücre, biyolüminesan görüntüleme

Bu çalışma, “U.S National Institutes of Health Grants” tarafından desteklenmiştir. Proje No: RO1CA138922 ve R01CA173077

ABSTRACT

Karakas, N. Genetically engineered therapeutic stem cells for the treatment of brain tumors. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Neuroscience. PhD Thesis. İstanbul. 2015

Glioblastoma multiform (GBM), is the most common, aggressive and malignant form of brain tumors in adults. Current treatment implementations for GBM include surgical debulking with adjuvant chemotherapy and radiotherapy. Nevertheless, these treatment methods remain insufficient due to the recurrence of tumor, cytotoxicity on healthy brain tissue and blood-brain barrier characteristics. Stem cells have been shown as they have the ability to migrate primary tumor sites and microinvasive tumor deposits in mice bearing brain tumors. Therefore, a new GBM treatment approach has been developed including stem cells as delivery vehicles of therapeutic proteins migrating towards tumor foci. Among therapeutic proteins, targeted toxins are one of the most promising candidates for the treatment of many cancers including GBM. On the other hand, Phase-III clinical trials with targeted toxins were failed due to short half life, systemic toxicity and insufficient tissue penetration. There is therefore an urgent need to safely and continuously deliver targeted toxins to overcome side effects and maximize therapeutic efficacy. In this study, two cytotoxins involving *Pseudomonas* Exotoxin (PE) and targeting either epidermal growth factor receptor (ENb-PE) or interleukin-13 receptor alpha-2 (IL13-PE) were engineered using lentiviral vectors to treat recurrent GBMs by stem cell delivery of targeted toxins. Our results showed that human neural stem cells (hNSC) secreting targeted toxins have significant therapeutic effect on both GBM cell lines and patient derived GBM cells via inhibition of protein synthesis as a result of toxin action. Regression of GBM recurrence upon therapeutic stem cell delivery was monitored by bioluminescence imaging and thus, therapeutic stem cells increased long-term survival of mice. Moreover, when GBM cells treated with targeted toxins, they developed sensitivity to tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) via upregulation of death receptors DR4/5 and down regulation of anti-apoptotic proteins. Cell death in GBMs treated with a combination of targeted toxins and TRAIL were shown by the involvement of both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in a synergistic fashion. In conclusion, our findings serve a basis for the use of stem cells secreting targeted toxins to further adopt them into clinical applications of GBM treatment.

Key Words: *Pseudomonas* Exotoxin, TRAIL, glioblastoma multiform, stem cells, bioimaging

The present work was supported by the U. S. National Institute of Health. Project number : RO1CA138922 and R01CA173077.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Glioblastoma multiforme (GBM), tanı sonrasında sadece 12-15 ay kadar sağ kalım süreci olan, en sık görülen, agresif ve malign bir beyin tümörüdür [1]. Glioma tedavisinde, cerrahi rezeksiyon ve bunu takip eden radyoterapi ile kemoterapi yöntemleri uygulanmaktadır. Ancak tümör dokusunun yeniden oluşması, sağlıklı beyin dokusunda meydana gelen sitotoksikite, ve kan beyin bariyerinin karakteristik yapısı nedeniyle bu tedavi yöntemleri yetersiz kalmaktadır. Standart tedavi yöntemlerindeki bu yetersizlikler nedeniyle, glioma tedavisi için alternatif yaklaşımlar geliştirilmektedir [2]. Bu amaçla tümör hücrelerini hedef alan reseptör yönelimli tedaviler, tümör hücrelerinin sağ kalımını ve çoğalmasını kontrol eden faktörlerin baskılanması, tümöre özgün sitotoksik sinyallerin oluşturulması, tümöre ilişkin immün yanıtın harekete geçirilmesi gibi yaklaşımları içine alan tedavi yöntemleri üzerinde çalışılmaktadır [3, 4]. Bugünkü yaklaşımlara göre tümör ile mücadele, tümör hücrelerine ölüm sinyalleri göndererek yok etmek yönünde ilerlemektedir. Apoptoz sinyallerini tetikleyen sitokinlerden tümör nekroz faktörüne bağımlı apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) ile yapılan çalışmalarda kısa sürede ve büyük oranda tümör hücresinin yok edilebildiği ve tümör hacminde küçülmenin sağlandığı gösterilmiştir [5-13].

Nöral kök hücreleri de içine alan farklı yetişkin kök hücrelerinin, memeli beynine transplante edildiğinde beyin dokusuna entegre olabilmesi, bu kök hücrelerin terapötik araçlar olarak kullanılması fikrini doğurmuştur. GBM oluşturulan fare modellerinde yapılan çalışmalar, kök hücrelerin primer tümör alanlarına ve mikro seviyedeki invaziv tümör odaklarına göç ettiğini göstermiştir [7, 14, 15]. Tümör hücrelerinin yüzeyinde yüksek düzeyde ifade edilen veya bu hücrelere özgün reseptörleri hedefleyen tedavi modelleri, kanser tedavisinde önem taşımaktadır. Bu reseptörleri hedef alarak tümör gelişimini durduran terapötik ajanlar geliştirilmiş olmasına rağmen, klinik uygulamalarda bu ajanlar, glioma gibi ileri derecede malign beyin tümörlerinin tedavisinde sınırlı başarı gösterebilmiştir. [1].

Kanser hücrelerini hedef alan tedavi modellerinde öne çıkan bir diğer yaklaşım ise hedefli toksinlerin kullanılmasıdır. Bu kapsamda ilk antikor-toksin konjugatı 1970 yılında Moolten ve Cooperband tarafından geliştirilmiştir [16]. Bu yaklaşımda, maymun böbrek hücrelerinin yüzeyinde bulunan antijenlere yönelebilecek antikor-toksin

konjugatının oluşturulması fikri ortaya atılmıştır. Bu kapsamda antikor-toksin füzyon proteininin başarıyla neoplastik hücreleri hedefleyebildiği gösterilmiştir. Buradan hareketle, tümöre özgün antijenleri hedef alan monoklonal antikorların keşfedilmesi, kanser hücrelerini öldürmek üzere hedefli toksinlerin kullanılması çalışmalarına hız kazandırmıştır. Hedefli toksinler, diğer bir adıyla immünotoksinler, kanser hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilen proteinlere özgün olarak bağlanabilen rekombinant moleküllerdir. Bu rekombinant proteinler bir antikor ya da liganda bağlanmış toksin molekülünden oluşmaktadırlar. Hedef yönelimli bu sitotoksik molekülleri oluşturmada kullanılan toksinler, bitki, bakteri ve mantar gibi organizmalarda yan ürün olarak oluşan ve ökaryotik protein sentezini bloke eden doğal oluşumlardır. Bu özellikleri nedeniyle, kanser tedavisi araştırmalarında önemli ölçüde yer almış olup, GBM'yi de içine alan pek çok kanser çeşidinin tedavi edilmesinde birçok hedefli toksin, farklı faz uygulamaları ile klinik aşamalara kadar gelebilmiştir [17, 18].

Hedefli toksin kombinasyonunda en sık kullanılan toksinler, bakteri toksinlerinden “pseudomonas ekzotoksin A (PE)” ve “difteri toksini (DT)” ile bitki toksini “ricin” dir. Bu üç toksin molekülü de tek bir polipeptid zinciri şeklinde sentezlenip reseptör aracılı endositoz ile hücre içerisine alınır. Fonksiyonel olarak reseptör bağlayıcı bölgesi, translokasyon bölgesi, ve sitotoksik bölgesi olmak üzere 3 bölgeden oluşmaktadır. Bu proteinler, alt ünite kompozisyonu, büyüklük ve hücre seçiciliği açısından farklılık gösterse de fonksiyonel olarak ortak bir enzimatik aktivite gösterirler ki, bu da ökaryotik elongasyon faktörü-2 (eEF-2) veya 60S ribozomu inaktive ederek protein sentezinin baskılanmasıdır. Bir tek toksin molekülü dahi geri dönüşümsüz bir biçimde 35 dakikada 300 ribozomu inaktive ederek hücreleri öldürebilir [17, 19]. Doğada gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinde ifade edilen PE, 638 aminoasitten oluşan bir proproteinin sentezi esnasında N terminalinden 25 aminoasitin kesilmesiyle 613 aminoasitlik olgun proteine dönüşmektedir. Doğal PE toksininin reseptör bağlayıcı bölgesi, hücrelerdeki düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörüne bağlı proteine (LRP) bağlanır. Reseptör aracılı endositoz ile hücre içine alınıp sitotoksik etkisini eEF-2 inaktivasyonu ve bunu takip eden protein sentezi baskılanması şeklinde gösterir [20, 21]. PE'nin yapısal ve fonksiyonel bölgelerinin anlaşılması ile rekombinant hedefli toksinler oluşturulmaya çalışılmaktadır. Kimyasal konjugasyon ya da rekombinant DNA teknolojilerinden yararlanarak PE'nin reseptör bağlayıcı bölgesinin, antikor fragmanları, büyüme faktörleri, veya sitokinler ile

değiştirilip PE'nin kanser hücrelerine daha yüksek bir afinite ile bağlanması sağlanmaya çalışılmaktadır [18, 22-24].

Tüm bu bilgiler ışığında, bu çalışma ile, mevcut terapötik ajanlara farklı cevap veren tümör hücrelerinin tedavisi için kök hücrelerden salınan hedefli toksinlerin geliştirilmesi, bu hedefli toksinlerin hem GBM hücre hatları hem de hastalardan elde edilen GBM hücreleri üzerinde terapötik etkinliğinin saptanması, hedefli toksin ile TRAIL kombinasyonunun GBM hücrelerindeki terapötik etkisinin ve bu birlikteliğin moleküler mekanizmasının belirlenmesi ve böylece, hedefli toksinleri salgılayan terapötik kök hücrelerle GBM tedavisi için ilerde klinik çalışmalara uyarlanabilecek bir yöntemin geliştirilmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Glioblastoma Multiforme (GBM)

Gliomalar, tüm intrakranyal tümörlerin %40 kadarını oluşturan ve en sık görülen primer beyin tümörüdür. Histopatolojik olarak gliomalar, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) sınıflandırmasına göre, düşük grade (WHO I ve II) ve yüksek grade (WHO III ve IV) olmak üzere 2 ana gruba ayrılır. Gliomaların da %60-70 kadarını astrositomlar oluşturur [25, 26].

Astrositomlar, beynin destek hücrelerinden olan yıldız şeklindeki astrositlerden kaynaklanmaktadır ve bu tip tümörler, beyin sapı, omurilik ve beyin gibi santral sinir sistemi bölümlerinden herhangi birinde gelişebilmektedir. Astrositomlar, düşük dereceli astrositom, anaplastik astrositom ve glioblastoma multiforme (GBM) olarak başlıca 3 gruba ayrılır [27].

Yüksek grade gliomalardan olan malign glioblastoma multiforme (GBM) ise tüm beyin tümörleri içinde en sık görülen ve seyri en kötü olanıdır. GBM tümörleri, genellikle serebral hemisferlerin beyaz maddesinde yerleşirler. Bu tümörlerin büyük çoğunluğu hemisferlerde geniş dağılım gösterir ve en sık olarak frontal lob ve oksipital lob-parietal lob sınırlarında gözlenirler. GBM, hızlı büyür ve yakınındaki dokulara yayılır. GBM teşhisinden sonra hasta ortalama 12 ay kadar yaşamını sürdürebilmektedir [28]. Etiyopatogenez açısından en önemli risk etkeni travma ve mesleki kimyasala maruz kalma durumudur. Ayrıca X ışını ve radyasyon etkisiyle GBM geliştiği bildirilmiştir. GBM'nin prognozu, hastanın yaşı, ve tümörün grade'i gibi özelliklere bağlıdır [29, 30].

2.2.Glioblastoma Multiforme Tedavisi

Glioblastoma multiformenin standart tedavisini, cerrahi operasyonla tümör kütesinin uzaklaştırılması ve bunu takip eden radyoterapi ile sistemik olarak uygulanan kemoterapi (çoğunlukla temazolomide) oluşturmaktadır [4, 31-33]. GBM tedavisinde en verimli tedavi şekli ise cerrahi tedavi ile tümör kütesinin olabildiğince çıkarılması ve böylece hastanın yaşam süresinin uzatılmasıdır. Tüm uygulamaların en uygun şekilde yapılması halinde bile malign glioblastoma için tedavi yöntemleri oldukça yetersiz

kalmakta ve tanıdan 5 yıl sonra hastaların ancak %5'inden daha azı hayatta kalabilmektedir.

2.2.1.Cerrahi Tedavi

Gliomanın cerrahi yöntemle tedavisinde ilk seçenek, ameliyattan mümkün olduğu kadar kaçınmak ve çoğu zaman “bekle ve gör” şeklinde nitelendirilen yaklaşımı seçmektir. Bir diğer seçenek, histopatolojik bulguları incelemek üzere lezyona ait biyopsi örneği alındıktan sonra cerrahi olarak erişilebilen tüm tümör dokusunu çıkarmaktır.

Genellikle cerrahi tedaviyi destekleyici tedavilerden radyoterapi ve kemoterapi uygulamaları izlemektedir. Diğer taraftan, yüksek grade lezyon tanısı konan hastaların büyük çoğunluğunda, bu tümörü oluşturan hücrelerin infiltratif doğası gereği ve var olan yöntemlerle tümör dokusunun tamamen yok edilememesi nedeniyle, tedavi sonrası tümör dokusunun nüksü gerçekleşmektedir. Klinik araştırmalar göstermiştir ki, sağkalım süresinde maksimum fayda sağlamak için tümör kütlelerinin en az %95'inin cerrahi operasyon ile çıkarılması gerekmektedir. Fakat bu, teknik olarak her durumda mümkün olmamakta ve hastalarda operasyon sonrası hasar gören beyin bölgelerine ilişkin fonksiyon kayıplarına (motor faaliyetler, duysal algı, konuşma bozuklukları vb.) neden olabilmektedir. Bu bakımdan, beyin bölgelerine zarar vermeden tümör dokusunu maksimum seviyede uzaklaştırmak için nörogörüntüleme, nöronavigasyon, fonksiyonel haritalama ve fotodinamik terapisi gibi uygulamalar cerrahi tedaviye entegre edilerek yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir [34].

2.2.2.Radyoterapi

Glioma tedavisinde cerrahi tedaviden sonraki adım radyoterapidir. Bu yöntemin uygulanmasındaki amaç, ameliyatla çıkarılamamış olan tümör kütlelerinin DNA hasarı sağlanarak yok edilmesi ve nüksünün engellenmesidir. Radyoterapi, genellikle küçük lezyonlar üzerinde etkilidir ve cerrahi tedavi ile birlikte destekleyici tedavi (adjuvant) olarak uygulanmaktadır. Radyasyona bağlı normal doku hasarını en aza indirmek için ise, uygulanacak olan doz geleneksel yöntemde olduğu gibi bir kerede değil de parçalar halinde verilmektedir. Fakat cerrahi tedavi ve adjuvan radyoterapi ile tümör dokusunun nüksü tamamen durdurulamamakta ve sadece hastanın yaşam süresinde iyileştirme oluşturulmaktadır [35].

2.2.3.Kemoterapi

Cerrahi tedavi ve radyoterapinin yanında bir diğerk standart glioma tedavi yöntemi kemoterapidir. Radyoterapide olduğu gibi, kemoterapi de cerrahi tedavi ile [36] birlikte destekleyici tedavi olarak uygulanmaktadır. Kemoterapi, oldukça küçük tümör bölgelerine nüfuz ederek etki gösterebilir ve tedavide etkili sonuç için öncelikle cerrahi tedavi ile tümör kütleinin maksimum seviyede çıkarılması gerekir. GBM tedavisinde uygulanan başlıca kemoterapi ilaçları, alkilleyici ajanlar ile anti-anjiyogenik ajanlardan oluşmaktadır.

2.2.4.Glioblastoma Multiforme Tedavisinde Kan Beyin Bariyerinin Etkisi

Kan beyin bariyeri, terapötik ajanların geçişini seçici olarak önleyerek GBM'nin kemoterapi yöntemi ile sistemik olarak tedavisinde engel oluşturmaktadır. Kan beyin bariyerini aşmak ve merkezi sinir sistemi hastalıklarını tedavi edebilmek için çeşitli yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla, geçirgenliği artırmak üzere küçük lipofilik moleküller sistemik olarak verilmiştir. Ancak bu yaklaşım, ilacın plazma proteinine bağlanması ve ekstrasvazasyon ile sistemik dolaşıma geri katılması neticesinde, kan beyin bariyerini aşmak için ancak sınırlı bir etki oluşturmıştır. Diğer taraftan, intra-arteriyel olarak verilen *mannitol* gibi ajanlar ile osmotik modifikasyon sonucu kan beyin bariyerinin geçirgen hale getirilmesi hedeflenmiştir. Bu gibi ajanların kullanılması ise, moleküllerin yarı ömrünün kısa olması sebebiyle gereken konsantrasyonda tutulamaması sonucu etkili olamamıştır [37, 38]. Bu yönde çalışmalar cerrahi yöntemleri de içine alacak şekilde devam ettirilmektedir.

2.3.Glioblastoma Multiforme Tedavisinde Alternatif Yaklaşımlar

Glioblastoma multiforme tedavisinde, tümörün tekrar oluşması, kan beyin bariyerinin yapısı, sistemik toksisite ve normal dokularda meydana gelen hasar, moleküllerin yarı ömrünün kısa olması gibi nedenlerle geleneksel yöntemlerin yetersiz kalması, cerrahi tedaviye alternatif yaklaşımların geliştirilmesini gerektirmiştir. Bu yaklaşımlar,

- i) Polimer implantların kullanılması,
- ii) Nanopartiküllerin kullanılması,
- iii) İmmünoterapi,
- iv) Gen ve kök hücre tedavisini kapsamaktadır.

Polimer implantlar, tedavi edici nitelikteki kimyasal ajanların, sentetik polimerler içine yerleştirilerek cerrahi operasyonla tümör bölgesine implantasyonunu ve böylece tümör dokusuyla direk temas sağlayarak polimerin bozulması sonucu istenilen konsantrasyonda ilacın tümör bölgesinde tutulması hedeflenmektedir. Bu yaklaşım, tümör dokusunun ameliyatla alınmasından sonra, oluşan kaviteden içeri ilaç taşıyan polimerin implantasyonunu gerektirir. Bu şekilde en çok çalışılan polimer implantı, içine *carmustine* hapsedilmiş olan “*Gliadel*” dir ve şu anda malign glioma tedavisinde kullanılması uygun bulunan tek doku içi kemoterapi uygulamasıdır. Polimer implantı, tümörün çıkarılması esnasında yerleştirilebileceği gibi daha sonra nüks etmesi durumunda da uygulanabilir. Bu yöntemle tedavi edilen ilk glioma tümörlerinde, Gliadel implantının yapılmadığı kontrol grubunda yaşam süresi 11,6 ay iken implantın gerçekleştiği grupta 13,9 ay süren yaşam süreci kaydedilmiştir [39-41].

Glioma tedavisinde diğer önemli bir yöntem ise **nanopartiküllerin kullanılmasıdır**. Kan beyin bariyerini geçebilecek kadar küçük olan 7-10nm çaplı küresel yapıdaki nanopartiküller, ilacın salınımına imkan verecek kovalent olmayan bağlarla birleşmiş polimer ya da lipozomlardan oluşmaktadır [42, 43]. Dolayısıyla nanopartiküller, hem sistemik olarak damar yoluyla verilebilir hem de doğrudan beyin dokusuna kateter yardımıyla yerleştirilebilir. Ancak, nanopartiküllerin kateter ile direk olarak beyin dokusuna implante edilmesi tümör dokusuna nüfuz etmesi açısından daha avantajlı olmaktadır. Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda nanopartiküllerin kullanılmasının, malign glioma tedavisinde yaşam süresini artırdığı gösterilmiştir. Nanopartiküller ayrıca, tümör kütesinin görüntülenmesi ve termal kanser tedavisi gibi araştırmalarda da kullanılmaktadır [44].

Glioma ile mücadelede bir diğer önemli yaklaşım **immünoterapi** yöntemidir. Klinik araştırmaların yürütüldüğü iki kategoride immün tedavi uygulanmakta olup ve bunlar pasif ve aktif immünoterapi olarak adlandırılır. Pasif immünoterapi, sitotoksik efektör hücrelerin vücut dışında (*ex vivo*) aktivasyonu ve tekrar hastaya nakledilmesini içeren bir yöntemdir. Bugünkü klinik denemeler, glioma ilişkili antijenlere duyarlı hale getirilen sitotoksik efektör T lenfositleri ve NK (natural killer) hücrelerinin aktivasyonundan oluşmaktadır [45]. Aktif immünoterapi ise ekzojenik bir uyarının hastanın vücudundaki endojenik bir efektör hücreyi aktive ederek etki göstermesi işlemidir. Genellikle aktif immünoterapi, tümöre karşı aşı geliştirilmesi şeklinde sağlanmaktadır. Bu çalışmaların bazılarında, aktivatör ajanlar direk olarak ameliyat

enasasında verilmektedir. Glioma tedavisinde immünoterapi, faz-II ve faz-III klinik denemelerine devam edilen önemli bir tedavi yaklaşımını oluşturmaktadır [46].

GBM tedavisinde bir diğer gelişmekte olan yaklaşım **gen tedavisi** yöntemidir. Bu tedavi şeklinde, tümör hücrelerine apoptotik genlerin gönderilmesi esas alınmıştır. In vivo gen tedavisinin en etkili metodlarından biri terapötik gen taşıyıcı olarak viral vektörlerin kullanılmasıdır. Beyin tümörü tedavisinde kullanılan viral vektörler, retrovirüsler, adenovirüsler, ve herpes simplex virüsü-1 (HSV-1)'dir. Replikasyon yeteneği iyi olan retrovirüslerin, normal hücrelere anlamlı ölçüde zarar vermeden kanser hücrelerini %97 oranında enfekte edebildiği gösterilmiştir [47]. Adenovirüsler ve HSV-1'in farklı replikasyon yeteneğine sahip formları kullanılmış ve kararlı gen ifadesine sahip oldukları gösterilmiştir. Adenovirüs vektörüne yerleştirilen herpes-simplex timidin kinaz geninin, hızlı bölünen kanser hücrelerinde gansiklovir fosforilasyonu sonrası DNA transkripsiyonunu durdurarak terapötik etki oluşturduğu gösterilmiştir [48]. Viral gen aktarımı her ne kadar umut veren bir yaklaşım olsa da, gen aktarımı sonucu oluşabilecek mutagenез, kanser hücrelerinin enfekte edilebilme yeteneğinin farklılık göstermesi, viral vektörlerin beyin parankimasına düşük seviyede nüfuz etmesi gibi sınırlılıkları da beraberinde getirmektedir. Buna karşılık, **kök hücrelerin terapötik protein üreten araçlar olarak kullanılması**, gen terapisinin uygulanabilirliğini sağlayabilecek bir yöntem olarak öne çıkmaktadır [15].

2.2.3.1.Terapötik Protein Üreten Araçlar Olarak Kök Hücreler

Nöral kök hücreler ve mezenkimal kök hücrelerle yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, bu hücrelerin tümöre hedeflenebildiğini göstermiştir. Kök hücre aracılı tedavi yaklaşımı, çoğunlukla terapötik gen ifadesi ve terapötik ajanların gönderilmesi esasına dayanır. Böylelikle terapötik özellik kazandırmak üzere modifiye edilen kök hücreler, sadece tümör dokusu içerisine yönelmekle kalmayıp, tümör dokusu içindeki daha malign hücrelere de ulaşabilmektedir [49]. Ayrıca uzun süre boyunca terapötik gen ifadesi veya terapötik ajan üretimi sağlamaktadır. Kök hücreler, doğrudan sitotoksik moleküller (örn. tümör nekroz faktör bağımlı apoptoz indükleyici ligand, TRAIL gibi) üretmek üzere veya intihar genleri (sitozin deaminaz veya HSV-timidin kinaz) ifade edecek şekilde de modifiye edilebilir. İntihar geni sitozin deaminaz, CD (cytosine deaminase-HB1.F3.CD) ifade eden ölümsüzleştirilmiş nöral kök hücrelerle GBM tedavisi için klinik denemeler sürdürülmektedir. İntihar geni CD, oral olarak hastaya

verilen ve öncül bir ilaç olan 5-florositozin'in aktivasyonunu indükleyerek 5-florourasil'e dönüştürür, böylece tümör içi kemoterapi sonucu tümör küçülmesi sağlanır. 5-florourasil'in sitotoksik özelliği 5-floro deoksiüridin monofosfat ve 5-floroüridin trifosfat'a dönüşümü ile ortaya çıkar. 5-floro deoksiüridin monofosfat timidilat sentaz enzimini inhibe eder ki; bu enzim DNA sentezi boyunca replike olan hücrelere timidin nükleotidini sağlar. 5-floroüridin trifosfat ise üridin 5-trifosfat yerine RNA yapısına katılarak RNA sentezini inhibe eder [50].

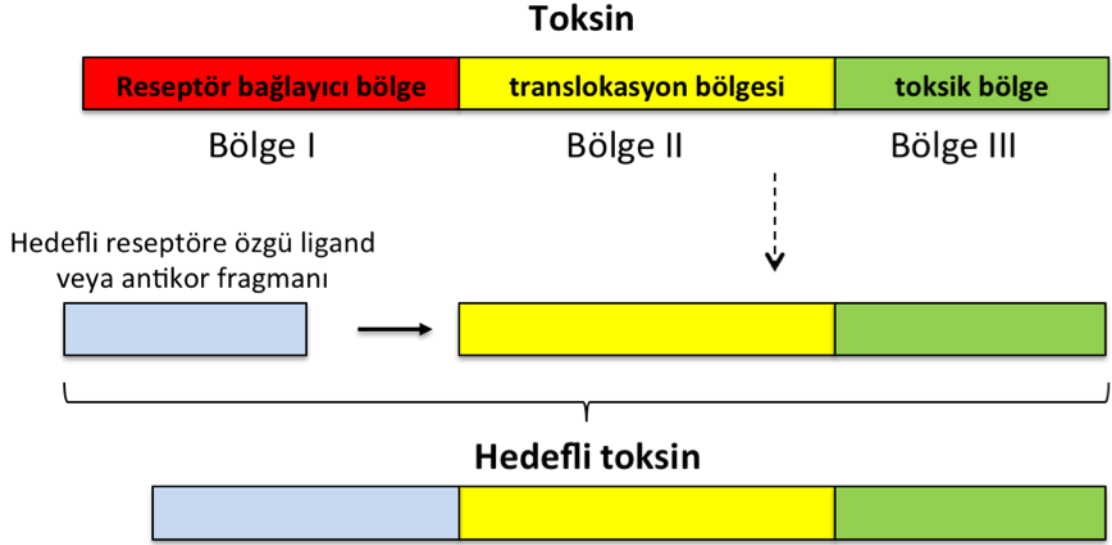
Kök hücreler ayrıca, tümör dokusu içinde (*in situ*) immünomodülatör sitokinler, antikorlar ve onkolitik virüsler gibi terapötik ajanları üreten fabrikalar olarak da fonksiyon gösterebilirler. Farelerde intrakranyal GBM tümörü oluşturulan bir çalışmada, *lusuferaz* geni ile işaretlenmiş olan nöral kök hücreler, kontralateral beyin parankimasına implantasyonu ve ventriküllere enjeksiyon sonrası biyoluminesan görüntüleme ile 3 hafta boyunca takip edilmiştir. Sonuç olarak, nöral kök hücrelerin, *corpus callosum* yoluyla tümör dokusuna doğru göç ettiği ve devam eden çalışmalarda ise apoptotik TRAIL ifade etmesi sağlanan nöral kök hücrelerin, tümör bölgesine yönelmesiyle birlikte tümör kütleinde azalma meydana gelmesini sağladığı gösterilmiştir [51]. Bunu takip eden bir dizi çalışmada, çeşitli terapötikler kök hücrelerce GBM tümörüne nakledilerek tümör kütleindeki küçülme takip edilmiştir [52-54]. Kök hücrelerin terapötik taşıyıcılar olarak kullanılması, standart tedavi yöntemlerine ilave çözümler getiren ve klinik çalışmalara öncülük edebilecek etkili bir GBM tedavi yaklaşımı olarak hızla gelişmektedir.

2.4.Hedefli Toksinler veya İmmünotoksinler

Beyin tümörlerinin tedavisinde oluşan toksik etkileri azaltmak üzere hedefli terapötiklerin kullanılması etkin bir yaklaşım olarak hızla gelişmektedir. Kanser hücrelerine ölüm sinyalleri göndermek üzere, tümör dokusunu özgün olarak hedef alabilen toksinlerin oluşturulması, GBM tedavisinde önemli bir yer edinmiştir. Toksinler, immünotoksin ve sitotoksin konstraktlar olmak üzere, hedefli toksinler halinde oluşturularak klinik öncesi ve bunu takip eden klinik araştırmalarda yer almaktadır. Hedefli toksinler ile kanser hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilen veya sadece kanser hücrelerinde ifade edilen reseptörler hedef alınarak, sağlıklı dokuya zarar vermeden kanser hücrelerine özgü hücre ölümünü tetiklemek amaçlanmıştır [19, 55-57].

2.4.1.Hedefli Toksinlerin Oluşturulması

Tedavi amaçlı hedefli toksinleri oluşturmada rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılır. Toksin molekülünün reseptör bağlayıcı bölgesi çıkarılarak kanser hücrelerine bağlanmak üzere hedeflenen reseptörün ligandı (veya reseptöre özgü antikor fragmanları) ile birleştirilir (Şekil 2-1). Böylece hedefli toksinler, toksin bölgesi, translokasyon bölgesi ve reseptör bağlayıcı bölge olmak üzere üç kısımdan oluşur [58].



Şekil 2-1: Hedefli toksin konstraktlarının oluşturulması.

2.4.1.1.Toksinler

Kanser tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen hedefli toksinler, bakteri toksinlerinden “Difteri toksini” ve “Pseudomonas egzotoksini A” ile bitki toksinlerinden “ricin”den oluşmaktadır. Bu toksinler, alt ünite kompozisyonu, büyüklük ve hücre seçiciliği açısından farklılık gösterse de fonksiyonel olarak ortak bir etki gösterirler ki, bu da ökaryotik elongasyon faktörü-2’yi (eEF-2) veya 60S ribozomu inaktive ederek protein sentezinin baskılanmasıdır [59, 60].

Hedefli toksinler, kanser hücresindeki reseptörüne bağlanır bağlanmaz reseptör aracılı endositoz ile hücre içine alınarak, endozom aracılığıyla lizozoma iletilir. Lizozomdaki düşük pH’da, fürin proteazların enzimatik aktivitesi sonucu hedefli toksin kesilir ve toksini kanser hücresine taşıyan ligand bölgesi ile toksin ayrılır. Toksin molekülüne ait toksik bölge, elongasyon faktörü-2’yi etkisiz kılar ve böylece protein sentezini baskılar [18, 19].

Pseudomonas egzotoksini A (PE)

Pseudomonas aeruginosa bakterisi tarafından üretilen Pseudomonas egzotoksin A (PE), tek zincirli bir polipeptid olup, 3 fonksiyonel bölgeden oluşur: Bölge Ia; N ucundaki bağlanma bölgesi, bölge II; translokasyon bölgesi ve bölge III; C ucunda yer alan ve adenozin difosfat (ADP) ribozilasyonunu katalizleyerek elongasyon faktörü-2'nin etkisiz hale getirip protein sentezini bloke eden ve böylece hücreyi ölüme götüren toksik bölgedir. PE, hücrelerde düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörüne bağlı proteine (LRP1), diğer bir adıyla alfa-2-makroglobulin reseptörüne (CD91) bağlanarak toksik fonksiyonunu yerine getirir. Bu reseptör insan hücrelerinin plazma membranında yer alır ve klatrin aracılı endositoz ile hücre içine alınır. C ucundaki 37kDa'luk fragmanı (amino asit 280-612) proteolitik yıkım sonucu serbest kalır [61, 62]. Daha sonra bu fragman, endoplazmik retikulumla gönderilir, sitoplazmaya geçer ve elongasyon faktörü-2'yi inaktive ederek hücre ölümünü tetikler [20, 63, 64] .

2.4.1.2.Hedeflenen Reseptörler

GBM tedavisi için hedefli toksinleri oluşturmada interlökin-4 reseptörü, interlökin-13 reseptörü, epidermal büyüme faktörü reseptörü, ve transferrin reseptörü hedef alınmaktadır.

İnterlökin-4 Reseptörü

İnterlökinler, T hücreleri tarafından üretilen ve hemen hemen tüm immün hücreler üzerinde etki göstererek immün sistemi aktive eden bir sitokinler grubudur. İnterlökin-4, aktif T hücreleri, mast hücreleri ve bazofillerce üretilerek, hematopoezin erken evrelerinde ve B hücre aktivasyonunda sinerjik etki gösterir [65]. Endotel hücreleri, B hücreleri, mikroglia ve astrositler gibi normal hücreler, oldukça düşük seviyelerde IL-4 reseptörü (IL-4R), ifade ederler [65, 66]. Buna karşılık, cerrahi tedavi sırasında alınan malign glioma ve malign astrositik tümör örneklerinde yapılan incelemelerde, bu tümör hücrelerinin yüksek düzeyde IL-4R ifade ettikleri gösterilmiştir. Böylece, IL-4 reseptörünü (IL-4R) ifade eden hücreleri hedeflemek üzere, PE toksininin bağlanma bölgesinin çıkarılarak yerine IL-4 yerleştirilmesi ile IL4-PE hedefli toksinleri geliştirilmiştir. Klinik öncesi çalışmalar ile, IL4-PE'nin glioma hücrelerinde sitotoksik etki meydana getirirken normal doku hücrelerinde daha az

toksinite oluşturduğu gösterilmiştir. Ayrıca timusu olmayan (atimik) çıplak fareler (nude mice) ile yapılan çalışmalarda, IL4-PE'nin bu farelerde oluşturulan insan GBM tümöründe anti-tümör aktivite göstererek tümör kütlesinde küçülmeye neden olduğu gösterilmiştir. İlk klinik öncesi denemelere göre de IL4-PE, nükseden GBM'de sistemik toksinite oluşturmadan tümör dokusunda belirgin bir şekilde nekroza sebep olmuştur [67-69].

İnterlökin-13 Reseptörü

İnterlökin-13 (IL-13), yapısal olarak IL-4'e benzer ve tip-2 T hücreleri ile mast hücrelerinden salınır. Bu sitokin, insan monositleri ve B hücrelerinin fonksiyonlarını düzenler, T hücre fonksiyonu üzerinde ise bir etki oluşturmamaktadır. IL-13, 3 zincire (IL13-R α 1, IL13-R α 2, ve IL4-R α) bağlanır ve STAT-6 fosforilasyonunu indükler. IL-13, GBM hücrelerini de içeren birçok solid tümör hücresinde yüksek düzeylerde ifade edilmesi ve normal hücrelerden sadece B hücreleri ve monositleri hedef alması nedeniyle tedavi amaçlı kullanıma uygun bulunmuştur. IL-13 reseptörleri (IL13-R), tümöre özgü olup, IL-13 ligandı reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Böylece IL-13, hedefli toksinler oluşturmada önemli bir ligand olmuştur [70-78].

Normal beyin dokusuna hasar vermeden glioma hücrelerini hedef almak üzere geliştirilen ve mutasyona uğratılmış PE toksinini içeren kimerik IL-13, klinik denemelerde uygulanmıştır. Bu hedefli toksin, IL-13 reseptörü α 2'ye (IL13-R α 2) bağlandığında reseptör aracılı endositoz ile hücre içine alınır ve daha sonra toksin sitozole geçerek hücre ölümünü tetikler. IL13-PE'nin, kültür ortamında glioma hücrelerine özgü sitotoksinite meydana getirerek, *in vivo*'da ise sağlıklı dokuya daha az toksinite oluşturduğu ve önemli derecede anti-tümör etkisi ile GBM tümörlerinde küçülmeye neden olduğu gösterilmiştir .

Transferrin Reseptörü

Transferrin (Tf) reseptörü (TfR), hücrelere demir transportunu sağlamakta ve bölünen hücrelerin artan demir ihtiyaına bağlı olarak bu hücrelerde yüksek düzeylerde ifade edilmektedir. Glioma hücrelerini de içeren tümör hücreleri, yüzeylerinde yüksek miktarlarda transferrin reseptörü bulundurmaktadır. Diğeri toksini ile oluşturulan transferrin reseptörüne bağlanan hedefli toksin Tf-CRM107, glioma hücreleri üzerinde

toksinite meydana getirmiş ve malign glioma tedavisinde Tf-CRM107 kullanımı için başlayan klinik öncesi çalışmalar, faz II klinik çalışmalara kadar gelebilmiştir [79].

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

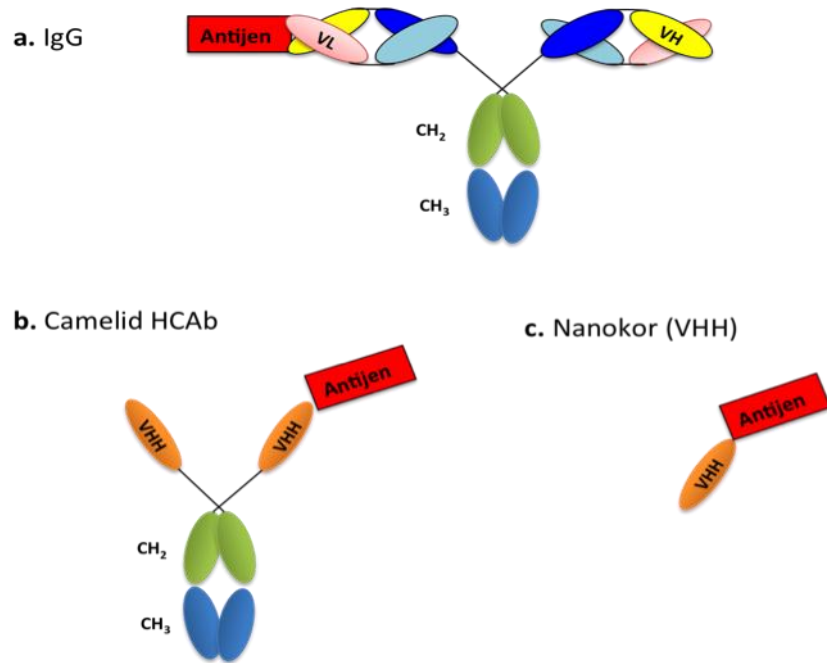
Reseptör tirozin kinaz ailesinin üyelerinden biri olan epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörü (EGFR), ekstraselüler bölgesine ligand bağlanması sonucu sitozolik bölgesindeki tirozin kinazların aktivasyonu ile hücre çoğalması, farklılaşması, göçü ve sağ kalımı yollarını tetikleyen sinyal kaskadlarının başlatılmasını sağlar [80]. Normal dokuda da bulunmasına karşılık malign glioma hücrelerinde EGFR ve çeşitli varyantları yüksek düzeyde ifade edilip, bunlardan EGFR-VIII mutant formu tümöre özgü bir dağılım göstermektedir. Ayrıca tümör hücre proliferasyonu, ilerlemesi ve ilaç direncinde yer almaktadır [81-84]. Son yıllarda EGFR aktivitesini bloke etmeye yönelik anti-kanser ajanlarını içeren çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiş ve böylece tümör gelişiminin durdurulduğu ve bazı noktalarda geriletildiği gösterilmiştir. EGFR sinyalini inhibe etmeye yönelik en yaygın farmakolojik yaklaşımlar içinde, küçük molekül reseptör tirozin kinaz inhibitörleri (smRTKI) (Gefinitib ve Erlotinib vb.) ve monoklonal antikorlar (Cetuximab, Panitumumab ve Matuzumab) bulunmaktadır. Bunlardan smRTKI'lar, EGF reseptörünün intraselüler bölgesindeki tirozin kinaz aktivitesini inhibe eder, monoklonal antikorlar ise ekstraselüler ligand bağlanma bölgesini bloke eder [85, 86]. smRTKI'lardan Erlotinib ve Gefitinib, çeşitli tümörlerdeki klinik denemelerde orta düzeyde başarı gösterirken, monoklonal antikor tedavisi, kanser hastalarında kısıtlı başarı ya da başarısızlıkla sonuçlanmıştır [87].

EGFR düzeylerinin tümör hücrelerinde yüksek olması ve tümöre özgü mutant formlarının bulunması, bu reseptörü EGFR sinyalizasyonunun bloke edilmesinin yanı sıra, hedefli toksin oluşturmada da önemli hale getirmiştir. EGFR'ye bağlanan transforme edici büyüme faktörü α , (TGF α) ile oluşturulan hedefli toksinler de (TGF α -PE; TP-38) beyin tümörlerinin tedavisi için faz II klinik denemelerine kadar uzanan araştırmalarda kullanılmıştır [17].

GBM Teşhis ve Tedavisinde EGFR'ye Özgü Nanokorlar (Nanobody)

Antikorların kullanımına dayanan anti-kanser tedavileri, Fab, scFv ve nanokorlar gibi küçük antikor fragmanlarının kullanılmasıyla hız kazanmaktadır [88]. Son yıllarda tanı ve teşhise yönelik ajan geliştirilmesinde ve immünoterapi

modellerinde öne çıkan nanokorlar, ağır zincirden türetilen tek antikor olup ilk olarak *camelidae* ailesi üyelerinden *camelid*ler'de (develerde) bulunmuş olan ve sadece ağır zincir bölgesinden (single variable heavy chain, VHH) oluşan fragmanlardır. Camelidlerde, normal antikorlardan farklı olarak, hafif zincirlerin bulunmadığı ve antijenlerin bağlandığı iki adet ağır zincirden oluşan antikorlar (HCAb) bulunur [89, 90]. Nanokorlar ise, antikorların orjinal ağır zincirleri gibi antijen bağlama kapasitesine sahip olan (hafif zincir yokluğunda tamamen fonksiyonel) yaklaşık 15kDa büyüklüğündeki en küçük antikor fragmanlarıdır (Şekil 2-2). Normal antikorlara kıyasla, dokulara nüfuzu, bilinmeyen ya da gizli epitopları da tanınması nedeniyle daha etkili antikor parçalarıdır [87, 91].



Şekil 2-2: Nanokor ve diğer antikor yapılarının karşılaştırılması.a) Geleneksel antikor, Immünoglobulin-G, b) *Camelid*'lere özgü ağır zincirli antikor, c) *Camelid* ağır zincirli antikorumun sadece tek bir antijen bağlayıcı bölgesinden oluşan antikor fragmanı olan nanokor (VHH) yapısı görülmektedir.

EGF reseptörüne özgün olarak geliştirilen nanokorların (ENb), reseptörün EGF bağlanan bölgesini örterek EGFR sinyalinin bloke edilmesini sağladıkları gösterilmiştir. Ayrıca nöral kök hücrelerden salınan EGFR nanokorlarının, tümör hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü durdurucu etki gösterdiği ve sitotoksik moleküllerle kombine edildiğinde önemli derecede tedavi edici etkisi olduğu gösterilmiştir [54, 92].

2.4.2.Hedefli Toksinlerin Klinik Öncesi ve Klinik Denemelerde Kullanılması

Hedefli toksinlerin, diğer adıyla immünotoksinlerin kanser hücrelerini öldürebilme potansiyeli, 1970'li yılların başında keşfedilmiştir. Başlangıçta modifiye edilmemiş toksinler ile, tedaviye yanıt vermeyen metastatik kanserlerin tedavisi için klinik çalışmalar yapılmıştır [59, 93]. Daha sonra, immünotoksinlerin terapötik etkinliği ve toksisitesi üzerindeki klinik denemeleri lösemi, Hodgkin's lenfoma ve multiple myelom gibi hematolojik kanserlerde yapılmış ve tedavide önemli gelişmeler kaydedilmiştir [57, 94]. Beyin tümörleri gibi solid tümörler, tümör bölgesine ulaşma sorunları ve immün sistemin etkinliği nedeniyle immünotoksin tedavisine direnç göstermektedir. İmmünotoksinlerin merkezi sinir sistemi tümörleri üzerindeki terapötik etkinliği ilk olarak 1987 yılında gösterilmiştir [95]. Oluşturulan ilk jenerasyon immünotoksinler, monoklonal antikorların Fc bölgesi ile toksinlerin birleştirilmesiyle elde edilmiştir ve bunlar ile yapılan klinik denemelerde önemli terapötik etki tespit edilememiştir. Daha sonra toksinler, Fab veya sentetik proteinlerle birleştirilerek, ikinci jenerasyon immünotoksinler oluşturulmuştur. İkinci jenerasyon immünotoksinler ile yapılan klinik denemelerin, birinci jenerasyona göre daha etkin fakat yine de yetersiz olduğu bildirilmiştir [59].

a.IL4-PE: Hastalarda oluşacak toksisiteyi belirlemek üzere yapılan faz I denemeleri ile klinik öncesi çalışmalar neticesinde belirlenen dozlarda IL4-PE, malign glioma nüksü görülen hastalara özel bir kanül yardımıyla doğrudan tümör dokusuna girilerek (CED, convection enhanced delivery yöntemiyle) uygulanmıştır [96]. Sonuç olarak, hastalarda IL4-PE infüzyonu etkisiyle oluşan sistemik bir toksisite bildirilmemiştir. Tedavi sonucu alınan biyopsi örneği incelemesinde, IL4-PE'nin normal beyin dokusuna zarar vermediği kaydedilmiştir. Ayrıca IL4-PE tedavisinin, hastalarda kalıcı nörolojik hasara sebep olmadığı ve hastaların sağkalım süresinde artış gözlemlendiği bildirilmiştir. Ancak, IL4-PE infüzyonu uygulanan hastalarda intrakranyal basınçta artış ve ödem oluşumu tespit edilmiştir.

Tedaviye uygun maksimum dozun (MTD; maximum tolerated dose) belirlenmesi için yapılan faz II klinik denemelerinde sistemik etkiler gözlenmemiştir [97, 98]. IL-4 sitotoksini merkezi sinir sistemi dışında tespit edilemezken, PE'ye karşı artan IgG antikorları tespit edilmiştir. Devam eden klinik denemelerde, tedaviye uygun bir maksimum doz belirlenmemiş ve yaşam süresinde artış henüz gözlenmemiştir.

Ancak, GBM nüksü görülen bir hastaya IL4-PE'nin tümör içine infüzyonu ile hastanın tedavi sonrası 3 yıl kadar yaşamını devam ettirdiği bildirilmiştir.

b.IL13-PE: Grade III-IV malign glioma hastaları için fazI/II klinik denemelerinde kullanılan IL13-PE, CED yöntemi ile intrakranyal olarak uygulanmıştır [99-101]. İntraparankimal MTD konsantrasyonu 6 güne kadar 0,5µg/ml olup, bu konsantrasyonda tümör nekrozu gözlenmiştir. Optimum ilaç dağılımı için kateterin yerleştirildiği yer önemlidir ve tüm hastalar genelinde yaşam süresi 42,7 hafta olarak kaydedilirken, uygun pozisyonda kateter yerleşimi yapılan hastalarda sağkalım süresi 55,6 hafta olarak tespit edilmiştir.

IL13-PE sitotoksini için PRECISE olarak adlandırılan faz III klinik denemeleri de GBM nüksünün gerçekleştiği hastalar üzerinde tamamlanmıştır. Malign glioma tedavisinde ilk faz III denemesi olan bu çalışmada toplam 52 merkezde 296 hasta denemelerde yer almıştır. Sonuç olarak, PRECISE-faz III klinik denemeleri neticesinde, hastaların yaşam süresinde istatistiki olarak anlamlı derecede bir artış kaydedilmemiştir [102].

c.Tf-CRM107: Toksisite ve MTD (maximum tolerated dose) belirlemek üzere Tf-CRM107 için faz I klinik denemeleri tamamlanmıştır [103]. Malign glioma nüksü oluşan hastalara Tf sitotoksini, antibiyotik ve glukokortikosteroid (deksametazon) infüzyonu yapılmıştır. Toplam 40ml infüzyon hacmi içerisinde MTD değeri 0,67µg/ml olarak belirlenmiş ve bu değerde lokal toksisite gözlenmemiştir. Geçici olarak artan intraserebral basınç gözlenmiş ve giderilmiştir. Tedaviye yanıt vermeyen hastalarda 36 hafta olan yaşam süresinin, tedaviye yanıt veren hastalarda 74 hafta olduğu bildirilmiştir. Tf sitotoksini ile malign glioma tedavisinin güvenliliğini ve etkinliğini değerlendirmek üzere faz II klinik denemeleri yapılmıştır [103, 104]. Çalışmada 44 hasta yer almış, tedaviye yanıt veren hastaların her birinde infüzyona bağlı ödem ve nöbet görüldüğü bildirilmiştir. Çalışmada yer alan tüm hastalar, giderek artan hastalık seyrine sahip olsa da hastaların %48'inde tümörün durakladığı görülürken, %30'u bir yıldan daha az süre yaşayabilmiştir. 2005 yılında faz III denemelerine başlanan Tf-CRM107'nin terapötik etkinlik gösterememesi nedeniyle klinik denemelerine devam edilememiştir.

d.TGFα-PE (TP-38): Toksisite ve MTD belirlemeleri için TGFα-PE, faz I klinik denemelerine tabi tutulmuştur [105-108]. Beyin tümörü içine TGFα-PE infüzyonu yapıldıktan sonra, ödem oluşumunu önlemek için hastaya, tedavi

başlangıcından itibaren 72. saate kadar kortikosteroidler verilmiştir. Sonuç olarak hastada, sistemik bir toksisite meydana gelmemiş fakat daha sonra giderilen, nöbet, başağrısı, nöropati, görme ve konuşma bozuklukları gözlenmiştir. Ancak MTD belirlenememiş olup hastaların sağkalım süresinde farklılık oluşmamıştır [107]. TGF α -PE ile tedavi edilen 15 hastanın 3'ünde tümör kütlelerinde azalma görülmüştür.

2.5. Tümör Nekroz Faktör Bağımlı Apoptoz İndükleyici Ligand (TRAIL)

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü, erişkin dokularının yapısının korunmasında ve embriyo gelişiminde istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılmasına imkan vererek homeostazın devamlılığını sağlar. Gelişim basamakları için gerekli olan apoptoz, ayrıca kanser hücrelerinin apoptotik ajanlar ile hedeflenerek yok edilmesinde de önemli bir hücresel süreçtir.

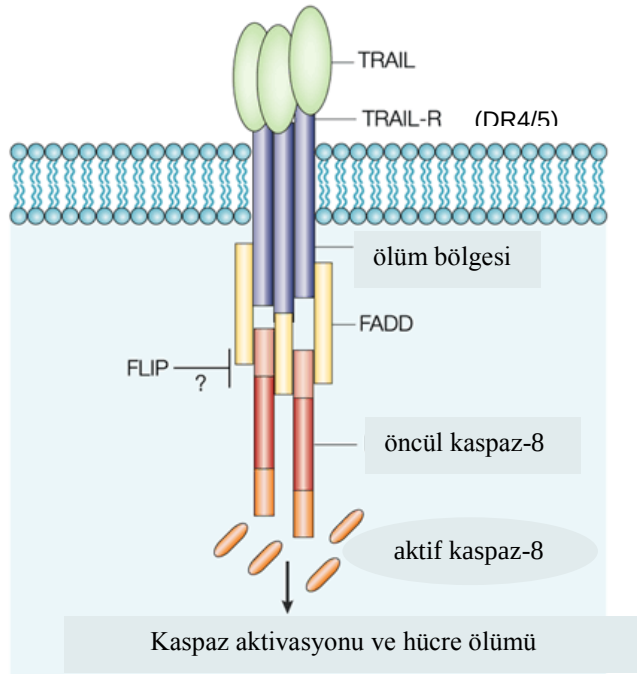
Hücrede apoptoz sırasında, karakteristik morfolojik değişiklikler görülür. Kromozomal DNA, genelde nükleozomlar arasından kesilmesi sonucunda parçalara ayrılır, kromatin yoğunlaşır ve çekirdek parçalara bölünür. Sonuç olarak hücre büzülerek küçülür ve apoptotik cisimcikler denilen zarla çevrili parçalara ayrılır.

C. elegans gelişimi esnasındaki apoptoz çalışmaları ile, programlı hücre ölümünü pozitif yönde düzenleyen Ced-3 ve Ced-4 (hücre ölüm genleri) ile negatif yönde düzenleyen Ced-9 genleri tanımlanmıştır [109]. Ced-3 geninin memeli hücrelerindeki karşılığı ise, **kaspazlar** adı verilen proteazlardır. Kaspazlar, aktif bölgelerinde sistein (C) içerdiği ve substratı olan proteinleri aspartik asitten (Asp) sonra kestiği için bu adı almıştır. Kaspazlar inaktif öncüller olarak sentezlenip (prokaspazlar), genellikle diğer kaspazlarca proteolitik kesime uğrayarak aktif formlarına (kesilmiş kaspazlara) dönüştürülürler. Prokaspaz, aşağı yöndeki bir dizi kaspazın aktivasyonunu ve böylece hücreyi ölüme götüren bir seri reaksiyonu başlatır.

Memelilerde, Ced-4 geninin homoloğu olan Apaf-1, kaspazlara bağlanarak onların aktivasyonunu uyarır. Buna karşılık, Ced-9 ile ilişkili olan **Bcl-2** ailesi üyeleri, apoptozu inhibe edici ya da uyarıcı etki gösterirler. Ayrıca kaspazların, apoptoz proteinleri inhibitörleri (**IAP**) tarafından doğrudan baskılanması ile apoptoz negatif yönde düzenlenir.

Hücrelere apoptotik ölüm sinyalleri, “ekstrinsik/hücre dışı” ve “intrinsik/hücre içi” olmak üzere iki farklı yolak ile iletilmektedir. Ekstrinsik (harici) yolak, hücreye

dışarıdan gelen bir sinyal ile apoptozun başlatılmasını gerektirir. Hedef hücrelerdeki reseptörüne bağlanarak apoptozu direk olarak uyaran sinyal molekülleri, tümör nekroz faktörü (TNF) ailesine ait polipeptidlerdir. TNF sinyal molekülleri, TNF reseptör ailesi üyelerine bağlanırlar ve bunlardan Fas en iyi tanımlanmış üyelerden olup bağışıklık sisteminde hücre ölümünü kontrol eder. 1990 ortalarında normal hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerini öldürebilen TNF ailesinin yeni bir üyesi olan TNF bağımlı apoptoz indükleyici ligand “**TRAIL**” tanımlanmıştır. TRAIL, kanser hücrelerinin yüzeyinde bulunan ölüm reseptörleri **DR4** (TRAIL-R1) ve **DR5** (TRAIL-R2)’e bağlanarak hücre dışı apoptoz sinyallerini başlatır. Reseptörlerin sitoplazmik bölgelerinde özel ölüm bölgesi (death domain, DD) bulunur ve bu ölüm bölgesi FADD adaptör proteini ve prokaspazlar (kaspaz-8/10) ile etkileşerek DISC’i (ölüm uyarıcı sinyal kompleksi) oluştururlar. Prokaspaz-8 aktif forma dönüşür ve aşağı yoldaki kaspazların (kaspaz 3/6/7) aktivasyonunu başlatır. Böylece proteolitik kesimlere neden olan bir dizi kaspaz aktivitesi sonucu hücre ölümü gerçekleşir [110]. Proteaz aktivitesinden yoksun kaspaz anaolğu olan **cFLIP** (hücrel FLICE inhibitör proteini) ise kaspaz-8 aktivasyonunu engelleyerek apoptozu bloke edici etki gösterir (Şekil 2-3).



Şekil 2-3: TRAIL sinyali ile apoptozun uyarılması [111].

TRAIL, aynı zamanda TRAIL-R3 (DcR-1) ve TRAIL-R4 (DcR-2) olmak üzere hücre yüzeyinde bulunan diğer reseptörlerine de bağlanır. Ancak bu reseptörlerin

sitoplazmik bölgelerinde ölüm bölgesi bulunmaz ya da kesilmiş kısa formda bulunur. Dolayısıyla, TRAIL'ın sağlıklı doku hücrelerinde de bulunan DcR-1 ve DcR-2 reseptörlerine bağlanması hücrede apoptozu tetiklemez ve böylece TRAIL aracılı hücre ölümü sadece DR4/5 reseptörünü bulunduran kanser hücrelerinde gerçekleşebilir [112].

DNA hasarı ve hücrel stres gibi mitokondride hasara yol açan uyarılar intrinsik yolağı aktive eder. Mitokondriyel yolak olarak da adlandırılan intrinsik yolağın başlatıcı kaspazı, **kaspaz-9**'dur. Mitokondride hasar meydana geldiğinde, sitokrom-c mitokondriden sitozole salınır ve burada Apaf-1'e bağlanır. Apaf-1, kaspaz-9 ile etkileşir ve çok alt üniteli **apoptozom** adı verilen kompleksi oluştururlar. Böylece kaspaz-9 aktif hale getirilir. Daha sonra kaspaz-9, kaspaz-3 ile sonlanan aşağı yöndeki kaspazları keserek aktive eder ve sonunda hücre ölür. Bcl-2 ailesi üyeleri, sitokrom-c salınımı ve kaspaz aktivasyonunu düzenleyerek mitokondriyel yolağı inhibe edici ya da aktive edici etki gösterirler. Ancak mitokondri hasarı sadece sitokrom-c değil apoptozu uyaran diğer moleküllerin salınımı ile de sonuçlanabilir.

Her iki apoptoz yolağında da aşağı kaspazlardan kesilmiş kaspaz-3, ve DNA hasarı ile ilişkili olan kesilmiş poli ADP ribozil polimeraz (PARP) oluşumu, hücrelerde meydana gelen apoptozun biyokimyasal belirteçlerindendir.

2.5.1. TRAIL'ın GBM Tedavisinde Kullanılması ve Sınırlılıkları

Doğrudan tümör hücrelerini hedef alan öldürebilme potansiyeli nedeniyle, insan hücrelerinden salınan TRAIL'ın değişik varyasyonları kanser araştırmalarında kullanılmıştır. Primatlarda yapılan çalışmalarda insan hücrelerinden salınan TRAIL'ın yaklaşık 30 dakika süren kısa bir ömrü olduğu ve küçük bir molekül olduğundan sistemik olarak verildiğinde de böbreklerden hızlı bir şekilde atıldığı gösterilmiştir. Böylece, TRAIL'ın kan dolaşımında daha uzun süre kalabilmesi ve etkin bir tedavi olabilmesi için ard arda sistemik enjeksiyonları ya da daha kompleks gönderim metodları ile uygulanması gerekliliği oluşmuştur. Buradan hareketle, TRAIL'ın sistemik dolaşımında uzun süre kalmasını sağlayacak modifikasyonlarla gönderimi ve reseptör düzeylerini artırmaya yönelik monoklonal antikor enjeksiyonu gibi yaklaşımlar gelişmiştir. Ancak monoklonal antikorların kan beyin bariyerini aşamaması gibi sıkıntılar, çalışmaları istenilen düzeyde etkin kılamamıştır.

Bir diğerk yaklaşımd ise TRAIL’ın viral yolla hedef dokuya ulaştırılmasıdır. Farklı viral vektörler içerisine yerleştirilen salınabilir formdaki TRAIL pek çok kanser çalışmasında kullanılmıştır. Adeno virüsler (AVs) ile gönderilen salınabilir TRAIL, GBM de dahil olmak üzere birçok malign tümörün tedavisinde kullanılmıştır. Fakat adenovirüslerin immünogenik olması ve nakledilen gen ifadesinin yitirilmesi gibi nedenlerle bu virüslerin terapötik kullanımları sınırlanmıştır. Benzer şekilde TRAIL, adeno ilişkili virüsler (AAVs) ile de karsinomaların tedavilerinde kullanılmış ancak klonlama kapasitelerinin yetersiz oluşu ile büyük genlerin transferini zorlaştırmaları nedeniyle bunlar da yeterli bir tedavi şekli oluşturamamıştır. Retrovirüs ailesine ait olan lentivirüsler, yüksek klonlama kapasiteleri ile gen aktarımı için uygun vektörler olarak kullanılmaktadır. Lentivirüs aracılığıyla TRAIL gönderimi, adenovirüsler ve adeno ilişkili virüslere kıyasla daha etkili bir yaklaşım olmuştur. Fakat kanser tedavileri için onkolitik virüslerin kullanımı tüm diğerk virüs tiplerine kıyasla en etkili olanıdır. Onkolitik virüsler, enfeksiyonla birlikte hücrede replike olarak kanser hücrelerini parçalarken, normal hücrelere zarar vermez. Şimdiye kadar geliştirilen onkolitik virüslerden onkolitik herpes simplex virüsü (oHSV)-1, çeşitli kanser türlerinin tedavisi için kullanılmıştır. Laboratuvarımızda da TRAIL taşıyan onkolitik virüsler ile TRAIL’a dirençli pek çok GBM hücresinin yok edilebildiği gösterilmiştir [113, 114] . Klinik öncesi uygulamalarda önemli başarılar gösteren TRAIL’ın viral yolla gönderimi stratejisinin, klinik çalışmalara kaynaklık edebilmesi için virüs kaynaklı zararlı etkilerinin (immün yanıt, DNA’nın genoma rastgele entegrasyonu) güvenli hale getirilmesi gerekmektedir.

Kök hücrelerin terapötik taşıyıcılar olarak kullanılması, viral yolla ve sistemik olarak TRAIL nakline çözümler getiren bir yaklaşım olmuştur. Birçok *in vitro* çalışmayı da kapsayan laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda ve diğerk araştırmalarda, GBM tümörlü farelerin tümörleri içine salınabilir formdaki TRAIL’ın kök hücre aracılı olarak implantasyonunun, tümör kütleini azalttığı ve farelerde sağkalım süresinin uzattığı gösterilmiştir [10, 11, 115].

Kanser hücrelerinin çoğunda olduğu gibi GBM hücrelerinin yaklaşık %50 kadarı TRAIL’a dirençli oldukları için TRAIL tedavisine yanıt vermemektedir. Dolayısıyla, TRAIL’ın daha etkili bir tedavi olabilmesi için hücreleri TRAIL’a duyarlı hale getirebilecek ajanlar ve farklı ölüm mekanizmalarını hedef alan terapötikler ile

kombinasyon çalışmaları hız kazanmıştır [116]. Bu ajanlar ile kombine edildiğinde GBM hücrelerinde farklı ölçülerde TRAIL’a yanıt oluşabildiği gösterilmiştir. Ancak bu ajanların çoğu sentetik moleküller olup, diğer kemoterapi ilaçlarının karşılaştığı temel sorunlar (kısa yarı ömürleri, normal dokuda oluşturulan toksisite, vb.) ile sınırlanmaktadır [12, 117-119]. Dolayısıyla, TRAIL ile kombine edilecek terapötik ajanın kök hücreler aracılığıyla tümör dokusuna nakli, sınırlılıkları ortadan kaldıracabilecek bir tedavi şekli olacaktır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Terapötik proteinler üreten genetiği değiştirilmiş kök hücrelerin beyin tümörlerinin tedavisinde kullanılması çalışmaları için gerekli deneyler 03.10.2011- 15.07.2014 tarihleri arasında Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesi, Massachusetts Genel Hastanesi, Radyoloji Bölümü, Moleküler Nöroterapi ve Görüntüleme Laboratuvarı'nda (MNIL), Prof. Dr. Khalid Shah'ın danışmanlığında gerçekleştirildi (Massachusetts Genel Hastanesi tarafından verilen etik kurul onayı ekte sunulmuştur).

Çalışmamız kapsamında, GBM hücrelerindeki epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve interleukin-13 reseptörü- $\alpha 2$ (IL13-R $\alpha 2$)'yi hedef alan bakteri toksinleri lentiviral vektörler kullanılarak geliştirildi. Bu vektörler yardımıyla hedefli toksinleri salan embriyonik böbrek hücresi (HEK-293T) ile insan nöral kök hücre hatları (hNSC) oluşturuldu. Hedefli toksinleri sentezlemek üzere bu hücreler, öncelikle toksine dirençli hale getirildi. Hedefli toksin üreten kök hücrelerin terapötik etkinliğini saptamak üzere deneyler 3 grupta toplandı:

- 1) Rekombinant DNA teknolojileri ile hedefli toksin içeren lentiviral vektörlerin hazırlanması, ve gen mühendisliği yöntemleri ile kök hücrelerin toksine dirençli hale getirilerek hedefli toksin ifade eden hücre soylarının oluşturulması,
- 2) Hedefli toksinlerin *in vitro* terapötik etkinliğinin saptanması,
- 3) Biyoluminesan görüntüleme teknikleri ile hedefli toksinler üreten kök hücrelerin terapötik etkisinin *in vivo* takibinin yapılması.

3.1.Hücre kültürlerinin hazırlanması

Çalışmamızda, insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293T/17), NIH/3T3 fare fibroblast hücreleri (ATCC, ABD), 293DT toksin dirençli hücreleri (Benjamin Rich tarafından sağlanmıştır), primer GBM hücreleri (GBM4, GBM6, GBM8, GBM18, GBM23, GBM64, BT74) (Massachusetts Genel Hastanesi tarafından sağlanmıştır), glioma hücre hatları U138, U251, LN229, U373, U87, Gli36, Gli36Delta (Gli36-EGFRviii) ve insan nöral kök hücreleri (hNSC) kullanıldı. Bu hücre hatları, %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve %1 antibiyotik (penicillin/streptomycin) içeren DMEM (Gibco) besiyerinde, invazif tümör oluşturan GBM primer hücreleri ise 3mM L-glutamine,

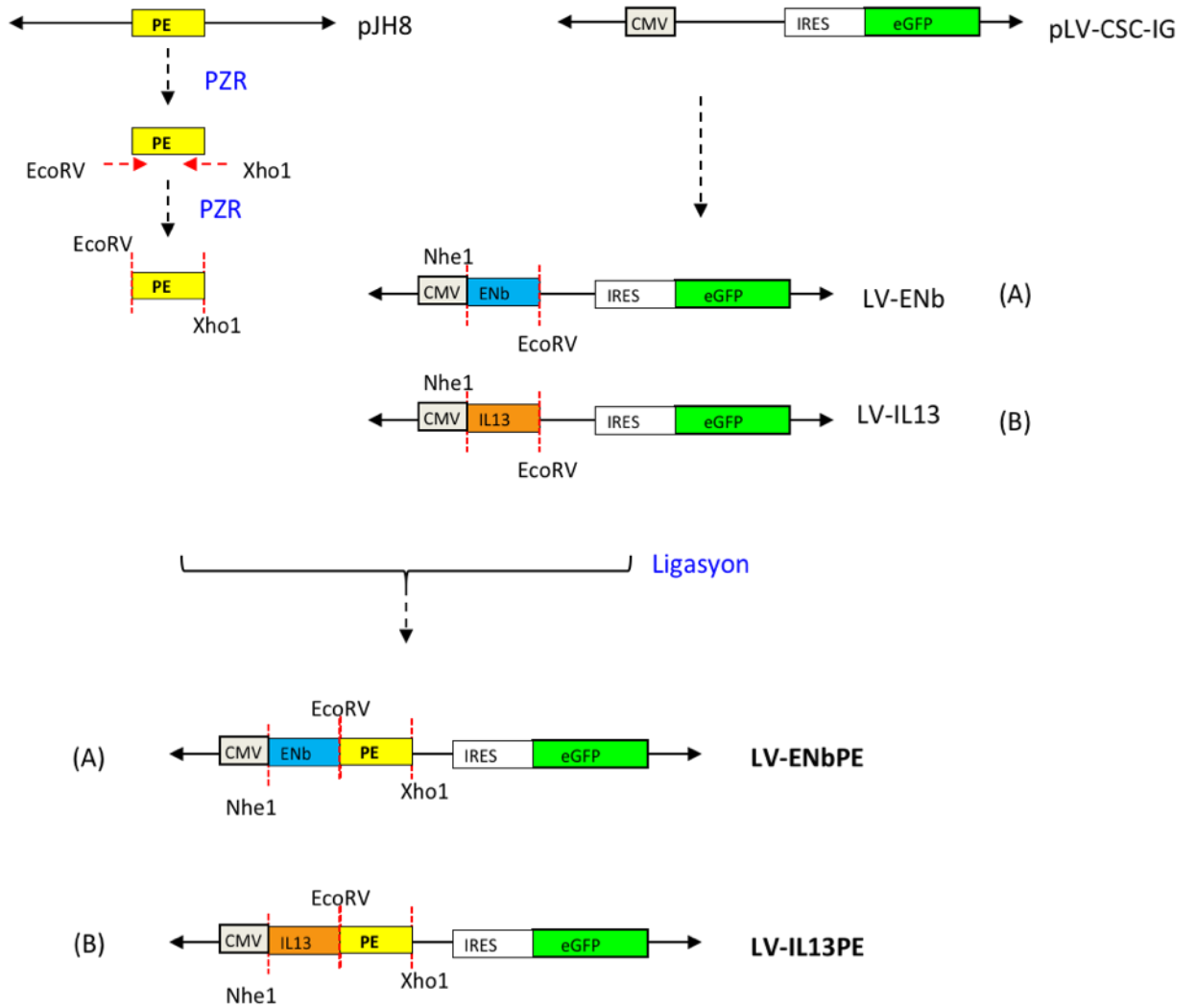
2µg/ml heparin, 20ng/ml EGF, ve 20ng/ml bFGF içeren nörobazal medyum (Invitrogen) içerisinde büyütüldü. hNSC kök hücrelerinin ise 1:3 oranında karıştırılan nöral kök hücre medyum ve C17 medyum içerisinde kültürü yapıldı [119-122].

3.2.Hedefli toksinleri üreten hücre soylarının oluşturulması

Hedefli toksinleri ifade eden 293T ve hNSC hücre soylarını elde etmek için hücreler, öncelikle toksine dirençli hale getirildi.

3.2.1.Moleküler klonlama ve lentiviral plasmidlerin hazırlanması

Lentiviral transfer vektörü pLV-CSC/IG [21] ile tanısal LV-GFP/Fluc, LV-GFP/Rluc, LV-mCh/Rluc, veya terapötik LV-ENb-PE, LV-IL13-PE, ve LV-TRAIL lentiviral vektörleri oluşturuldu. Floresan ve biyoluminesan işaretleyicileri içeren tüm vektörler daha önce tanımlandığı şekilde hazırlandı [14]. EGFR nanokorlarının ENb-PE sitotoksik varyantını oluşturmak üzere, reseptör bağlayıcı bölge taşımayan Pseudomonas ekzotoksin (PE) zincirini kodlayan cDNA, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile pJH8 (ATCC) kalıp DNA kullanılarak çoğaltılıp LV-ENb plasmidine EcoRV ve Xho1 enzim kesim bölgeleri arasında yerleştirildi. Aynı şekilde LV-IL13-PE toksik bileşenini oluşturmak üzere Nhe1 ve EcoRV enzim kesim bölgeleri arasına PCR ile pORF5-hIL13 (Invitrogen) kalıp DNA kullanılarak çoğaltılan IL13 cDNA sı pLV-CSC-IG lentiviral vektöre yerleştirildi. Ayrıca “puromycin” direnç genini ve mCherry floresan proteinini içeren pico2 vektörüne de IL13-PE klonlandı. Protein sentezi ölçümleri için dsluc, pAD-Luc1 (Dr. David Haslam) vektöründen Nhe1/Xho1 kesim bölgeleri kodlayan primerler hazırlanarak çoğaltıldı ve Nhe1/Xho1 ile kesilen pLV-CSC-IG vektörüne yerleştirildi. LN229 hücrelerinin IL13Rα2 reseptörü ifadesini sağlamak üzere IL13Rα2-GFP/Rluc, entegre edilerek vektöre yerleştirildi. Böylece ileriki aşamalarda sabit hücre soyları oluştururken floresan proteinleri ya da puromycin direnç geni yardımı ile hücre ayırımının gerçekleştirilmesi sağlandı.



Şekil 3-1: Lentiviral vektörlere hedefli toksinlerin yerleştirilmesi (klonlama) aşamaları. A) LV-ENbPE'nin, B) LV-IL13PE'nin hazırlanması.

3.2.2. Plasmid DNA'sının çoğaltılması ve izolasyonu

Hazırlanan plazmidler öncelikle Ecoli bakteri soylarından DH10B (Invitrogen) içerisine transformasyon yöntemi ile aktarıldı. Bunu takiben, petri kaplarına ekilen bakteriler 37°C' deki etüvde 18 saat inkübe edildi. Her bir bakteri kolonisi ayrı ayrı LB (lactose broth) sıvı besiyeri içerisinde çoğaltıldı. DNA izolasyon kiti (MiniPrep, Qiagen) kullanılarak elde edilen DNA miktarı agaroz jel elektroforezi ile tayin edildi. Enzim kesimleri yapılarak DNA fragmanlarının büyüklükleri kontrol edildi. Daha sonra uzunlukları doğrulanmış olan DNA'arı içeren bakteriler LB sıvı besiyerlerinde çoğaltıldı ve sonra MidiPrep veya MegaPrep (Qiagen) kiti ile DNA izolasyonu yapıldı. DNA saflığı spektrofotometrik yöntemler ile kontrol edildi (Nanodrop 2000). Enzim kesimleri ile DNA dizi uzunlukları tekrar kontrol edildi. Vektörlerin transfeksiyon ve

transdüksiyon işlemlerinde kullanılmadan önce DNA dizi analizi ve mutasyon taramaları yapıldı (CLC Sequence Viewer Software).

3.2.3.DNA miktar tayini

DNA miktarını tayin etmek üzere konsantrasyonu bilinen 1µg/µl örnek plazmid DNA'sı, 1:10, 1:50 ve 1:200 oranlarında seyreltilti. Yükleme boyası (Thermo Scientific) içeren tüm DNA örnekleri, yatay elektroforez (Bio-Rad) sistemi kullanılarak etidyum bromür içeren 1%'lik agaroz jel üzerinde ve 100 volt (V)'da 20-30 dak. yürütüldü.

Agaroz jel üzerindeki DNA'lar Gel-Doc (Bio-Rad) sistemi ile görüntülendi. DNA miktarı, DNA ladder'a ait bilinen konsantrasyon değerleri ile örnek DNA kıyaslanarak hesaplandı. Hücre kültürü çalışmaları öncesinde DNA saflığı ve konsantrasyonu Nanodrop 2000 cihazında spektrofotometrik ölçüm ile doğrulandı.

3.2.4.Toksine dirençli hücre soylarının oluşturulması

1.Endojenik EF-2'nin mutant formunu kodlayan hücrelerin hazırlanması

Toksine dirençli hücre hatlarını oluşturmak üzere elongasyon faktörü-2'nin (EF-2) mutant formunu (mEF-2) taşıyan tek zincirli oligonükleotidler (ssODN; IDT, Coralville, IA) hazırlandı. Toksine direnç ile ilişkili mutant formu elde etmek için, ökaryotik EF-2'nin 47 bazlık oligonükleotid zincirinin 717. kodonundaki ilk nükleotid olan guaninin (G), adenozin (A) ile yer değiştirecek şekilde bir ssODN dizayn edildi (ssODN-mEF-2). Oligonükleotidlerin hücreye alımını floresan mikroskobunda takip etmek üzere ayrıca 6-carboxyfluorescein (FAMTM) işaretli ikinci bir ssODN dizayn edildi (ssODN-mEF-2-FAM). Daha sonra hücrelere, JET transfeksiyon ajanı (Polyplus-transfection SA, Illkrich) kullanılarak dizayn edilen oligonükleotidler aktarıldı. Transfeksiyondan 24 saat (sa) sonra hücrelerin medyumunu değiştirilerek floresan mikroskobu altında ssODN-mEF-2-FAM oligonükleotidi aktarılan grup kontrol edildi. Hücreler 72sa boyunca etüvde (37°C, %5 CO₂) bekletildi.

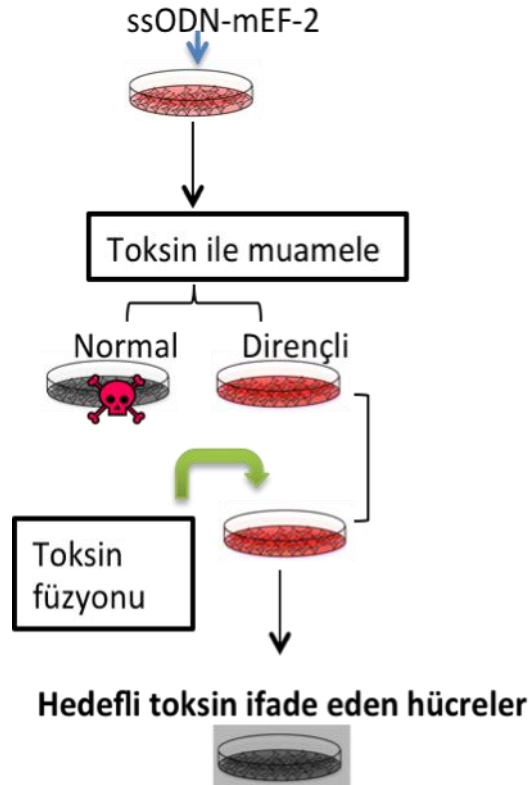
2.Toksine dirençli hücrelerin seçilmesi

Çoğalmakta olan hücrelerin medyumunu, 72sa sonunda, 20ng/ml difteri toksini (DT) içeren medyum ile değiştirildi. Toksin içeren medyum içinde hücreler 48 sa etüvde bekletildi ve 48sa sonunda normal medyum ile değiştirildi. Bu işlem, 24sa boyunca, sırasıyla 20ng/ml, 50ng/ml ve 100ng/ml DT içeren medyum için 3 kez tekrar edildi.

Toksine dirençli hücrelerden tekli klonlar seçilerek her bir klon kültür ortamında ayrı ayrı çoğaltıldı.

3.Hedefli toksinlerin transfeksiyon yöntemi ile tanımlanması

Toksine dirençli hale getirilen 293T insan embriyonik böbrek hücreleri ve hNSC insan nöral kök hücreleri 6 kuyulu petrilere 3×10^5 /kuyu olacak şekilde ekildi. Hücreler 24sa sonra 1,5 μg LV-IL13-PE veya LV-ENb-PE lentiviral vektörleri ile transfeksiyon ajanı (JET Polyplus Transfection) kullanılarak transfekte edildi. İnkübatörde 24sa bekletildikten sonra transfeksiyon medyumunu tazelendi. Floresan mikroskopunda transfeksiyon etkinliği floresan protein (GFP veya mCherry) ifadesi kontrol edilerek belirlendi. Puromycin'e direnç geni içeren pico2 vektörü ile transfeksiyon işlemi yapılan hücrelerin tazelenmiş olan medyumuna 48sa sonra 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin eklenerek 5 gün boyunca kültürü yapıldı. Tekli klonlar halinde elde edilen pseudomonas ekzotoksinine dirençli hücre soyları (hNSC-IL13-PE) toplanarak kültürde çoğaltıldı ve IL13-PE ekspresyonu teyit edildikten sonra deneylerde kullanıldı.



Şekil 3-2: Toksine dirençli kök hücre soylarının ve hedefli toksin üreten kök hücrelerin elde edilme aşamaları.

Puromycin direnç geni içermeyen vektörler kullanılarak transfekte edilen ve floresan proteinleri ifade eden hücreler (hNSC-ENb-PE) ise FACS Aria Cell Sorting System (BD Biosciences) ile transfekte olmayan hücrelerden ayrılarak kültür ortamında çoğaltıldı ve ENb-PE eksprese edip etmediği kontrol edilerek deneylerde kullanıldı.

3.3.Biyogörüntülenebilir GBM hücre soylarının oluşturulması

Floresan ve/veya biyoluminesan işaretli GBM hücre hatları oluşturularak hedefli toksinlerin hem *in vitro* hem de *in vivo* anti-tümör etkisi belirlendi. Bu amaçla yeşil floresan proteinini (GFP) veya kırmızı floresan proteinini (mCherry; mCh) içeren lentiviral vektörler, biyoluminesan görüntüleme ajanlarından *Renilla lusiferaz* (Rluc), *Ateş böceği (Firefly) lusiferazı* (Fluc), ya da *destabilize lusiferaz* (dsluc) içerecek şekilde hazırlandı [14]. Deneylerin amacına bağlı olarak bu luminesan ajanları içeren ya da içermeyen vektörler kullanılarak GBM hücre soyları oluşturuldu. Daha sonra lusiferaz ifade eden GBM hücrelerinde lusiferaz sinyal ölçümü için Fluc ve dsluc enzimlerine özgü *D-luciferin* (Biotium) ve Rluc enzimine özgü *Coelenterazin* (Nanolight) substratları kullanıldı.

Lentiviral paketleme

Lentiviral plasmid DNA'ları HEK293T/17 hücrelerinde lentiviral vektörler olarak daha önce tanımlanan şekilde paketlenildi [120]. Toksin molekülü kodlayan plasmid DNA'ları ise 293T hücrelerinin toksin dirençli bir formu olan 293DT hücrelerinde lentiviral vektörler oluşturmak üzere paketlenildi.

Lentiviral transdüksiyon

Floresan proteinleri ve biyoluminesan görüntüleme ajanlarını ifade eden GBM hücre hatlarını oluşturmak üzere, hücreler, 6 kuyulu petrilere (Falcon) her bir kuyuda $2-3 \times 10^5$ hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler 24sa sonra $4 \mu\text{g/ml}$ protamin sülfat (Sigma-Aldrich) içeren besiyerinde görüntüleme ajanlarını taşıyan lentivirüslerle çeşitli “multiplicity of infection” (moi) değerlerinde (moi: 2-5) enfekte edildi. Hücrelerin medyumunu 15-24sa sonra normal medyum ile değiştirildi. Hücreler, 24sa sonra yeşil floresan proteini, GFP ve kırmızı mCherry (mCh) floresan proteini ifadesini takip için floresan mikroskopunda görüntülendi. Floresan işaretli hücreler FACS Aria IIu Cell Sorter (BD Biosciences) cihazı ile işaretlenmemiş hücrelerden ayrıldı.

IL13R α 2 reseptörünü ve Renilla lusiferaz (Rluc) görüntüleme ajanını ifade eden GBM hücre soyunu (LN229-IL13R α 2) oluşturmak için ise LN229 hücreleri, LV-IL13R α 2-GFP/Rluc ile, kontrol grubu hücreleri ise sadece GFP taşıyan LV-GFP ile enfekte edildi. Daha sonra, GFP ifade eden hücrelerin ayırım işlemi yapıldı ve hücrelerden izole edilen RNA örnekleriyle RT-PZR yapılarak bu hücrelerde reseptöre ait mRNA'nın bulunup bulunmadığı saptandı.

3.4.Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

3.4.1.Total RNA izolasyonu

Örnekler hazırlanırken ribonükleaz (RNaz) kontaminasyonunu engellemek için RNaz'dan yoksun mikropipet uçları (Fisher), deney tüpleri (Thermo Scientific) petriler kullanıldı ve çalışma öncesinde ortam ve cihazlar RNaseZap (Ambion) dekontaminasyon solüsyonu ile temizlendi. Kültür ortamındaki hücrelerden total RNA izolasyonu, RNA izolasyon kiti (RNeasy RNA extraction kit, Qiagen) kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapıldı.

1. Hücrelerin, 3×10^5 hücre /kuyu olacak şekilde 6 kuyulu petrilere ekilerek 24sa boyunca 37°C'deki %5 CO₂ etüvünde kültürü yapıldı.
2. Medyum 24sa sonra çekilerek hücreler 2ml/kuyu soğuk PBS ile yıkandı.
3. PBS çekildikten sonra petriler buz kabı üzerine alınarak hücreler 350 μ l RLT lizis solüsyonu ile muamele edildi.
4. Hücre lizati 1,5ml'lik tüplere aktarıldı ve vorteks ile saydamlaşana kadar karıştırıldı.
5. Homojenizasyon : hücre lizati QIAshredder kolonuna aktararak 2 dk yüksek devirde santrifüj edildi.
6. Homojenatın üzerine 350 μ l %70'lik etanol eklendi ve tüm örnek RNA izolasyon kiti kolonuna aktararak 13.000 devirde (rpm) 30 saniye (sn) santrifüj edildi.
7. Kolon yeni bir tüpe yerleştirilerek üzerine 700 μ l RW1 yıkama solüsyonu eklendi ve 30sn 13.000 devirde santrifüj edildi.
8. Kolona 500 μ l RPE yıkama solüsyonu eklendi ve 30sn santrifüj edildi.
9. Kolona 500 μ l RPE yıkama solüsyonu eklendi ve 2dk santrifüj edildi.
10. Kolon, yeni bir tüpe yerleştirilerek 1dk daha santrifüj edildi.
11. Kolondan RNA'nın toplanması (elüsyon): 1,5ml'lik toplama tüpüne kolon yerleştirildi ve 20 μ l RNaz'dan arındırılmış su eklenerek 1dk 13.000 rpm'de santrifüj

edildi ve elde edilen örnekte RNA konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) cihazı ile belirlendi.

-RNA konsantrasyonu, 260nm'deki optik yoğunluk (OD) ölçülerek hesaplandı.

-RNA saflığı, $OD_{260}/OD_{280}=2$ formülüne göre hesaplandı.

RNA örnekleri, saflığı tespit edildikten sonra (Nanodrop) -80°C'de saklandı.

3.4.2.cDNA sentezi

RNA örnekleri normalize edildi ve cDNA sentez kiti (SuperScript®VILO™ cDNA Synthesis Kit, Invitrogen) ile, her bir örnek için eşit miktarda (500ng) RNA kullanılarak cDNA sentezi, kit protokolüne göre aşağıdaki aşamaları takip ederek yapıldı.

1. Her bir örnek için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı.

5X VILO™ Reaction Mix	4µl
10X SuperScript® Enzyme Mix	2µl
Total RNA	500ng
DEPC-treated water	Toplam hacim 20µl olacak şekilde
	20µl

2. Reaksiyon karışımı, oda sıcaklığında (25°C), 10dk bekletildi.
3. Daha sonra karışım, 42°C'deki su banyosunda 60dk bekletildi.
4. 85°C'de 5dk bekletilerek reaksiyon sonlandırıldı ve örnekler -20°C'de saklandı.

3.4.3.PZR

Reaksiyon solüsyonları (Thermo), primerler (IDT) ve cDNA lar buz kabı üzerine alınarak çözüldü. Solusyonlar pipet yardımıyla karıştırılarak 5sn santrifüjlendi (cDNA ve primerler santrifüjlenmedi). Primerler, otoklavlanmış distile su (dH₂O) ile 1mg/ml final konsantrasyonuna getirilecek şekilde çözüldü.

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak her bir primer seti dizayn edildi (IDT, USA.) (Tablo 3-3). Bu primerler kullanılarak PZR reaksiyonu karışımı hazırlandı (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: PZR reaksiyon karışımı

Reaksiyon bileşenleri	Hacim
cDNA	1µl
İleri Primer (IDT)	1µl
Geri Primer (IDT)	1µl
dNTP (Invitrogen)	1µl
Taq polimeraz (NEB)	0.5µl
10X Taq çözeltisi (NEB)	2.5µl
dH ₂ O	18µl
<i>Toplam</i>	<i>25µl</i>

PZR reaksiyonu Termal döngü cihazında (Thermo Scientific) gerçekleştirildi. Kullanılan sıcaklık döngüleri Tablo 3-2’de görülmektedir. GAPDH primerleri için ilk amplifikasyon aşaması 55°C ve amplifikasyon döngü sayısı 25 olarak optimize edildi. Diğer primerler için ise döngü sayısı 30 olarak belirlendi.

Tablo 3-2: PZR sıcaklık döngüsü

Reaksiyon aşaması	Süre
Pre-inkübasyon:	
95°C	5dk
Amplifikasyon:	
95°C	30sn
60°C	45sn
72°C	45sn
72°C	10dk
Soğutma:	
4°C	∞

PZR ürünleri, yatay elektroforez tankında, etidyum bromür içeren %1’lik agaroz jel üzerinde 100V’ta 30dk yürütüldü. Gel Doc (Bio-Rad) cihazında jelin görüntüsü alınarak

kaydedildi. Hedefli toksinler ve interlökin-13 reseptörü- $\alpha 2$ 'nin (IL13R $\alpha 2$) ekspresyon düzeyleri, Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (GAPDH) housekeeping geni ile karşılaştırılarak belirlendi.

Tablo 3-3: RT-PZR primerleri

	İleri Primer	Geri Primer	Uzunluk
<i>Pseudomonas</i> <i>Ekzotoksin (PE)</i>	5'-GAACCCGAC GCACGCGGCCGG-3'	5'-CCGCTCGAGCTT CAGGTCCTCGCGCGGCG-3'	445 bç
<i>IL13R$\alpha 2$</i>	5'-ATGGCTTTC GTTTGCTTGGCTAT-3'	5'-TCATGTATCACA GAAAAATTCTGG-3'	1130 bç
<i>GAPDH</i>	5'-GTCAGTGGT GGACCTGACCT-3'	5'-TGCTGTAGCCAA ATTCGTTG-3'	245 bç

3.5.Hücrelerden hedefli toksin içeren medyumların hazırlanması

Serum içermeyen besiyerinde 24sa inkübasyon sonucu toplanmış olan IL13-PE ve ENb-PE hedefli toksinleri, 15ml'lik tüplere (Falcon) yerleştirildi ve 1600 rpm'de 10 dk +4°C'de santrifüj edilerek medyumda bulunan hücreler çöktürüldü. Bir kez daha aynı işlemler tekrarlanarak hedefli toksin içeren medyum hücrelerden arındırıldı. Medyumlardan hedefli toksinlerin konsantrasyonu için 15ml'lik filtre tüplerinde (Amicon) +4°C'deki soğutmalı santrifüjde 30dak yüksek devirde filtre edildi. Konsantre edilen IL13-PE, ENb-PE ve kontrol (sadece GFP içeren tanısal vektör ile transfekte edilen hücrelerden elde edilen medyum) medyumları karakterize etmek ve sonrasında terapötik etki ölçümlerinde kullanmak üzere 1,5ml'lik santrifüj tüplerine bölünerek –80°C'de muhafaza edildi.

3.6.Dot blot yöntemi ile terapötik protein salınmasının gösterilmesi ve protein miktar tayini

Hedefli toksinlerin hücrelerden salınıp salınmadığı ve miktarı dot blot yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla, IL13-PE, ENb-PE hedefli toksinlerini ifade eden ve kontrol hücrelerinden elde edilerek konsantre edilen medyumlar, nitroselülöz membrana 1, 3, ve

5µl olacak şekilde damlatılarak aktarıldı. Önceden konsantrasyonu bilinen örnek medyumlar da aynı miktarlarda membrana aktarıldı. Membran, çalkalayıcı üzerinde düşük devirde 5% yağsız süt ile 45dk muamele edilerek anti-PE (Sigma), anti-IL13 (Abcam) ve anti-ENb (anti-VHH, alphaHCV K208) antikorları ile 30dk inkübe edildi. Membran Tween 20 içeren TBS solüsyonu ile yıkanarak SuperSignal™ West Pico (Thermo Scientific) kemilüminesan substrat ile muamele edildi. Substrat ile muamele edilen membrandaki sinyal karanlık odada röntgen filmlerine aktarıldı ve sinyal yoğunluğu NIH ImageJ programı ile analiz edilerek miktar tayini yapıldı. Protein miktarını belirlemede önceden konsantrasyonu bilinen saf PE (Sigma) ve IL13 (Chemicon) proteininden ve negatif kontrol olarak da GFP içeren besiyerinden yararlanıldı.

3.7. Protein sentezi inhibisyonunun gösterilmesi

Hedefli toksin aktivitesi sonucu GBM hücrelerinde protein sentezindeki değişimi ölçmek üzere, hızlı bir şekilde yıkılan özel bir lusiferaz olan “destabilized luciferase (dsluc)” in gen ifadesi takip edildi. Bu amaçla, dsluc ifade eden GBM hücre soyları oluşturmak üzere bölüm 3.3.4’de belirtilen şekilde LV-dsluc lentivirüsleri ile enfekte edildi. Daha sonra dsluc ifade eden bu GBM hücreleri, 1000-1500 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu siyah petrilere (Cellstar) ekildi. Bu hücreler, 24sa sonra 25ng/ml ENb-PE, IL13-PE ve kontrol medyumları ile inkübe edildi. Hücrelere 48sa sonra D-luciferin ilave edilerek 10 dk oda sıcaklığındaki çalkalayıcıda inkübe edildi. Glutamax Multi Detection System (Promega) cihazında dsluc sinyali okutularak protein sentezi ölçümü yapıldı.

3.8. Hücre ölümünün *in vitro* analizi

Hücre ölümü analizi yapılacak olan GBM hücreleri, tüm deneylerde her bir grup için üç kuyu (triple) olacak şekilde 96 kuyulu siyah kültür kaplarına ekildi. Hücrelerin lusiferaz ifade edip etmemesine bağlı göre canlılık analizinde 2 yöntem kullanıldı.

3.8.1. Lusiferaz ile işaretlenmemiş hücrelere ilişkin canlılık analizi

Herhangi bir lusiferaz ile işaretlenmeyen normal hücrelere ilişkin canlılık testi, total metabolik aktivitenin ölçümüne dayanan CellTiter Glo (Promega) reaktifi kullanılarak yapıldı. Hücre kültüründe terapötik inkübasyonlar sonlandığında, kuyulardan medyum çekilerek her bir kuyuya 1µl/kuyu Celltiter Glo reaktifi içerecek şekilde 50µl yeni

medyum eklendi. Siyah kültür kapları alimünyum folyo ile kaplanarak ışık alması engellendi ve 10dk boyunca çalkalayıcı üzerinde düşük devirde inkübe edildi. Kültür kapları Glutamax Multi Detection System (Promega) cihazında okutularak canlı hücrelerin sayısal değerleri belirlendi.

3.8.2.Lusiferaz ile işaretlenmiş hücrelere ilişkin canlılık analizi

Lusiferaz işaretli hücrelerde lusiferaz aktivitesini ölçerek (Fluc veya Rluc) canlılık testi gerçekleştirildi. 96 kuyulu siyah kültür kaplarında kültürü yapılan ve canlılık testine hazırlanan hücrelerden eski medyum çekilerek Fluc için “D-luciferin” ve Rluc için “Coelenterazin” substratlarını içeren medyum hücrelere verildi. Kültür kapları alimünyum folyo ile kaplanarak ışık alması engellendi ve 10dk boyunca çalkalayıcı üzerinde düşük devirde inkübe edildi. Lusiferaz sinyali, Glutamax Multi Detection System (Promega) cihazında okutularak canlı hücrelerin sayısal değerleri saptandı.

3.9.Apoptozun analizi

GBM hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü saptamak üzere hem kaspaz 3/7 aktivitesi ölçümü hem de western blot yöntemi kullanıldı. Apoptotik yolağın aşağı basamaklarında görev alan kaspaz 3/7 aktivasyon tayini ile tüm apoptotik yollara ait hücre ölümünü kapsayan bir apoptoz analizi gerçekleştirildi. Yine apoptotik kaskad içinde apoptozun gerçekleştiğini gösteren kesilmiş proteinlerin varlığı ve anti-apoptotik proteinlerin ise ifade düzeyi araştırıldı.

3.9.1.Kaspaz 3/7 aktivasyonunun ölçümü

Hücre canlılık testleri için hücreler 96 kuyulu siyah kültür kabına ekilirken, bir kaba daha ekilerek kaspaz 3/7 aktivitesine bakıldı. Canlılık testlerinden farklı olarak, kaspaz 3/7 aktivitesi ölçümü apoptoz sonlanmadan önce yani sTRAIL ilavesinden 18sa sonra gerçekleştirildi. Kuyulardan medyum çekilerek 50µl/kuyu Caspase 3/7 Glo (Promega) ajanı eklendi. Kültür kapları alimünyum folyo ile kaplanarak ışık alması engellendi ve 30dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Kaspaz aktivitesi Glutamax Multi Detection System (Promega) cihazında okutularak apoptoza ilişkin kantitatif sonuçlar elde edildi.

3.9.2.Western Blot

GBM hücrelerinin terapötik ajanlarla veya kontrol medyumunu ile muamelesi sonrasında elde edilen hücre lizatları hazırlandı. Kesilmiş PARP (cPARP), FLIP, prokaspazlar

(kaspaz 8/9, kaspaz 3/7) ve kesilmiş aktif kaspazlara karşı antikorlar kullanılarak bu proteinlerin western blot analizi yapıldı.

Ayrıca GBM hücrelerinde EGFR ve IL13R α 2 ve hedefli toksin ile muamele edilen GBM hücrelerinde DR4/5 proteinlerinin düzey analizleri için de Western Blot yönteminden yararlanıldı.

Western Blot yöntemi aşağıda açıklanan aşamaları takip ederek uygulandı.

Hücrelerden protein örneklerinin hazırlanması

GBM hücreleri, çoğalma kapasitelerine bağlı olarak, 6 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 1×10^5 ile 3×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Belirlenen zaman aralıklarında konsantre edilen terapötik proteinler veya kontrol medyum hücrelere eklendi.

i) Sadece hedefli toksinlerle (25ng/ml) inkübe edilen LN229 ve LN229-IL13R α 2 hücreleri, hedefli toksin ilavesinden 18, 24, 32 sa sonra,

ii) Hedefli toksin (25ng/ml) ve sTRAIL (500ng/ml) kombine edilerek inkübe edilen hücreler, sTRAIL ilavesinden 24sa sonra hücre lizatı oluşturmak üzere buz dolu kap üzerine yerleştirildi.

- 1) Hücrelerin üzerindeki medyum 15ml'lik steril tüplere aktararak 10dk 1200rpm devirde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi.
- 2) Medyum atılarak, pellet 5ml soğuk PBS ile yıkandı ve tekrar santrifüj edildi. Aspiratör ile PBS tamamen uzaklaştırılarak pellet buz üzerine yerleştirildi.
- 3) Petri kablarındaki hücreler de 3ml soğuk PBS ile yıkanarak PBS tamamen uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyuya NP40 lizis tamponu, proteaz inhibitörü (Roche), ve fosfataz inhibitörlerini (Sigma) birlikte içeren 100 μ l lizis solüsyonu eklendi ve hücre kazıyıcı aparatla toplanarak 1,5ml'lik steril tüplerde toplandı. 15ml'lik tüplerdeki pelete ise 50 μ l lizis solüsyonu eklenerek mikropipet yardımıyla karıştırıldı ve hücre lizatının aktarıldığı örneğe ait ilgili tüpe aktarıldı.
- 4) Tüm örnekler $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki çalkalayıcı üzerinde 30dak inkübe edildikten sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10dk santrifüj edildi.

- 5) Proteinleri içeren tüm üst sıvı ($\geq 100\mu\text{l}$) yeni bir tüpe aktararak $10\mu\text{l}$ 'si başka bir tüpte protein miktar tayini için -80°C 'ye ayrıldı.
- 6) Jelde yürütmek üzere ayrılan üst sıvıya, final konsantrasyonu 1X olacak şekilde beta-merkaptetanol ($\beta\text{-Me}$) ve SDS (sodyum dodesil sülfat) içeren 2X Laemmli örnek çözeltisinden (Bio-Rad) eklenerek örnekler 5dk 100°C 'de kaynatıldı ve buz üzerine alınarak -20°C 'de saklandı.

Protein miktar tayini

Western blot örneklerinin protein miktarları, DCTM Protein Assay Kit (Bio-Rad) ile kit kullanma kılavuzuna göre 96 kuyulu kaplarda (Cellstar) tayin edildi. Standart eğri oluşturmak üzere sığır serum albumin (BSA; Thermo Scientific) proteini farklı konsantrasyonlarda hazırlandı. BSA standart eğrisinden yararlanarak formül yardımıyla örnekler ait protein değerleri hesaplandı ve örnekler eşit konsantrasyonlara getirildi. Böylece tüm örneklerden eşit miktarda protein yüklemesi yapılarak örnekler arasında protein ifadesi kıyaslandı.

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Protein örnekleri ve renkli protein marker (Bio-Rad), %10'luk veya %4-15'lik (Bio-Rad) poliakrilamid jelde 100V 'ta 1sa ile 1,5sa arasında dikey elektroforez tankında (Bio-Rad) yürütüldü.

Proteinlerin nitroselülöz membrana aktarılması

Soğuk transfer çözeltisi içeren kapta transfer kasetleri içine sırasıyla, sünger-filtre kağıdı-jel-nitroselülöz membran-filtre kağıdı-sünger olacak şekilde dizildi. Kaset kapatılarak, soğuk transfer çözeltisi bulunan transfer tankına yerleştirildi. Tank, buz dolu kap içine koyularak, 90V 'ta 1sa yürütüldü.

Membranın antikorlar ile inkübe edilmesi

Transfer işleminden sonra membran %5'lik yağsız süt ya da BSA solüsyonu içinde oda sıcaklığında 1sa bekletildi. Daha sonra 1sa boyunca her 15dk içinde değiştirilecek şekilde TBST solüsyonunda yıkandı. Primer antikor solüsyonu hazırlandı ve membran 1sa boyunca primer antikor solüsyonunda bekletildikten sonra 1sa boyunca TBST ile yıkandı. IL13R α 2 antikor; R&D Systems, DR4 ile DR5; ProScience ve tüm diğer primer antikorlar, Cell Signalling (USA)'ten temin edildi.

HRP (horse raddish peroxidase) konjuge edilmiş sekonder antikorlar (goat anti-mouse, goat anti-rabbit, rat anti-goat; Bio-Rad) ile de 2sa inkübe edildikten sonra 1sa boyunca membran yıkanarak kemilüminesan substrat (Super Signal; Thermo Scientific) ilave edildi. Membran ve film kasete yerleştirildi.

Membranın kemilüminesan görüntülenmesi

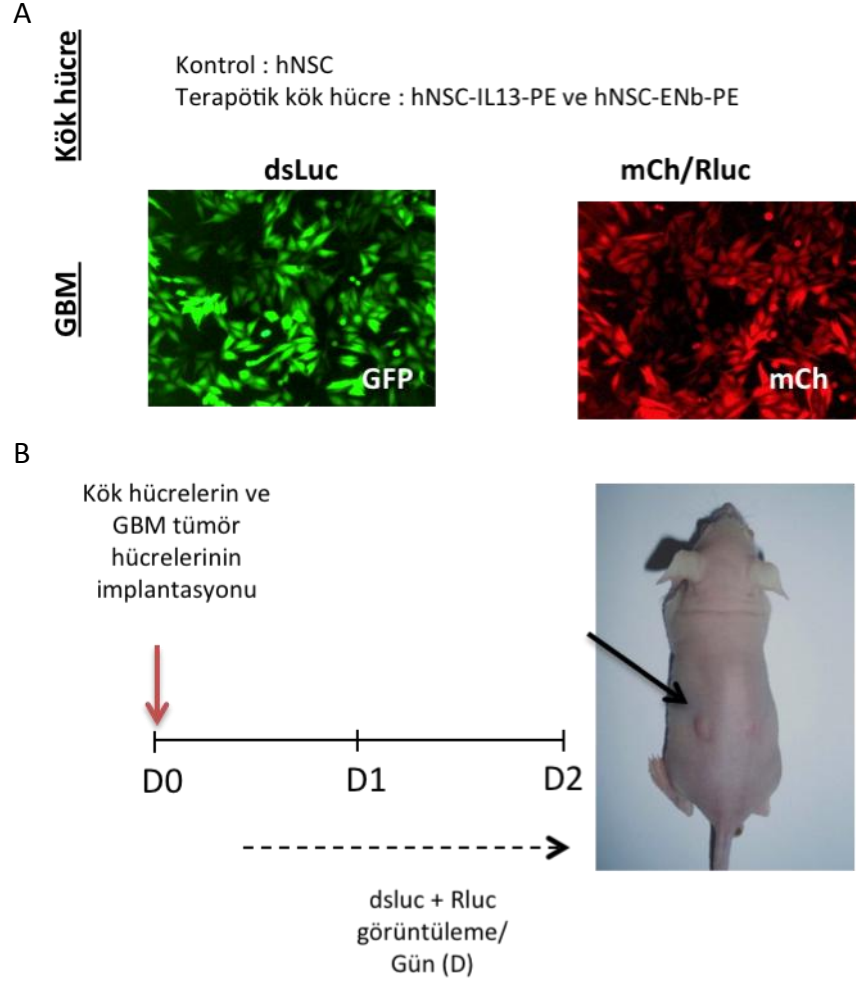
Röntgen filmlerindeki kemilüminesan sinyali tespit etmek üzere filmler, görüntüleme cihazına yerleştirildi. Membrandan film üzerine aktarılan ve proteinlere ilişkin bant yoğunlukları NIH ImageJ programı ile hesaplandı.

3.10.Terapötik kök hücrelerin GBM hücreleri ile birlikte kültürünün yapılması

Lusiferazları ifade eden tümör hücre hatları elde edildikten sonra bu hücreler GFP, ENb, ve ENb-PE salgılayan hNSC hücreleri ile birlikte “hNSC kök hücre medyumu” içerisinde kültür kaplarına ekildi. Protein sentezi inhibisyonunu tayin etmek üzere 48 saat sonra 150µg/ml D-luciferin substrat ilavesiyle dsluc sinyali ölçüldü. Hücre canlılığını tayin etmek için ise Fluc veya Rluc ifade eden GBM hücreleri, ilgili substratlar (D-luciferin veya Coelenterazine) ile inkübe edilerek hücrelerdeki lusiferaz sinyali ölçüldü. Tüm ölçümler Glutamax Multi Detection System (Promega) cihazında yapıldı.

3.11.Hedefli toksin üreten kök hücrelerin ve GBM hücrelerinin birlikte subkutan yolla enjeksiyonu

Protein sentezi ve hücre canlılığı kinetiklerini *in vivo* olarak eş zamanlı ölçmek üzere, U251 ve LN229 GBM hücreleri hem GFP/dsluc hem de mCh/Rluc ifade edecek şekilde lentivürüslerle enfekte edilerek hazırlandı (Şekil 3-2-A) . Daha sonra bu GBM hücre soyları (2×10^5) terapötik hNSC hücreleri veya kontrol hNSC hücreleri (1×10^5) ile karıştırılarak, atimik çıplak farelere veya immün yetersiz SCID (Severe Combined Immunodeficiency) farelere (3 haftalık Cox-7, MGH, Boston; $n \geq 3$) subkutan (s.c.) yolla implante edildi (Şekil 3-2-B). Bu farelerde, tümör hücrelerindeki *in vivo* dsluc ve Fluc biyolüminesan sinyali görüntülenerek (IVIS; PerkinElmer) protein sentezi ve tümör dokusundaki gerilemenin takibi yapıldı. Bu amaçla, subkutan tümör enjeksiyonunu takiben 0.sa, 1.gün ve 2.gün aralıklarında önce coelenterazine (CaliperLS, Xenolight; 3,3µg/g vücut ağırlığı) ve sonra D-luciferin (4,5mg/fare) intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonu ile lusiferaz aktiviteleri görüntülendi.



Şekil 3-3: GBM hücrelerinin lüsiferaz işaretlemesi ve subkutan tümör oluşturulmasının gösterimi.

3.12.Beyin tümörü cerrahi olarak çıkarılan farelerde hedefli toksin üreten kök hücrelerin terapötik etkisinin gösterilmesi

Beyin tümörlerinin rezeksiyonu sonrası tümör dokusunun tekrar oluşmasını önlemek amacıyla hNSC-IL13 kök hücrelerinin terapötik etkinliğini saptamak üzere farelerde beyin tümörü rezeksiyon modeli oluşturuldu. Bu amaçla SCID farelerde (n=25) kranyal pencere oluşturuldu ve $0,5 \times 10^6$ U87-GFP/Fluc hücreleri implante edildi. İmplantasyondan 6 gün sonra tümör dokusu daha önce tanımlanan şekilde rezekte edildi [6]. Kök hücreler (2×10^6), biyobozunur sentetik ekstraselüler matriks (sECM) (Glycosan, Hystem-C Hydrogels, Biotine Inc.) içerisine hapsedilerek rezeksiyon kavitesine yerleştirildi. Deney grupları aşağıdaki gibi oluşturuldu:

- 1. grup: hNSC-IL13-PE (n=7)
- 2. grup: hNSC-mCh (n=7)
- 3. grup: IL13-PE (n=5) (40ng)
- 4. grup: Sadece rezeksiyon (n=4)

Tümördeki gerileme, tedavi başlangıcından itibaren 1.gün ve 85.günler arasında bir dizi Fluc aktivitesi görüntülemesi ile tespit edildi.

3.13.Biyolüminesan görüntüleme

Beyin tümörü modelinde biyolüminesan görüntüleme için anestezi (Ketamin+Xylazine) altındaki farelere 1mg/ml D-luciferin intraperitoneal yolla enjekte edildi. Biyolüminesan sinyali görüntülemek için fareler, cihaza (IVIS; PerkinElmer) yerleştirildi ve 1sn-1dk arasında çeşitli saniyelerde görüntü kaydedildi. Farelerin normal ışık altındaki görüntüsü de kaydedilerek, tümör sinyalleri ile karşılaştırıldı. Living Image Software yardımıyla biyolüminesan sinyal sayısal değerlere dönüştürüldü.

3.14.İmmünohistokimyasal boyama

Paraformaldehit perfüzyonu ile fareler öldürülerek beyinleri çıkarıldı. Beyin dokusundan vibratomda alınan kesitlerde mCherry (mCh; kırmızı) pozitif kök hücreleri ile GFP (yeşil) pozitif tümör hücreleri floresan mikroskopunda görüntülendi.

3.15.Hedefli toksin üreten kök hücrelerin TRAIL ile kombine edilerek GBM hücreleri üzerinde terapötik etkisinin gösterilmesi

Kırmızı floresan proteini mCherry ve Fluc görüntüleme ajanını bir arada (Fluc/mCh) ifade eden GBM hücreleri, hNSC medyumuna içerisinde 96 kuyulu siyah kültür kaplarına

ekildi. Hücreler 24saat inkübe edildikten sonra hNSC-ENb-PE, hNSC-IL13-PE terapötik kök hücreleri veya hNSC-GFP kontrol kök hücreleri eklenerek hNSC medyumunda içinde kültürleri yapıldı. Kök hücrelerin kültüre ekiminden 48saat sonra hücreler, 500ng/ml STRAIL veya kontrol besiyeri ile muamele edildi ve 24saat sonra da hücre canlılığı Fluc sinyali ölçümü ile tespit edildi.

3.16.İstatistiksel yöntemler

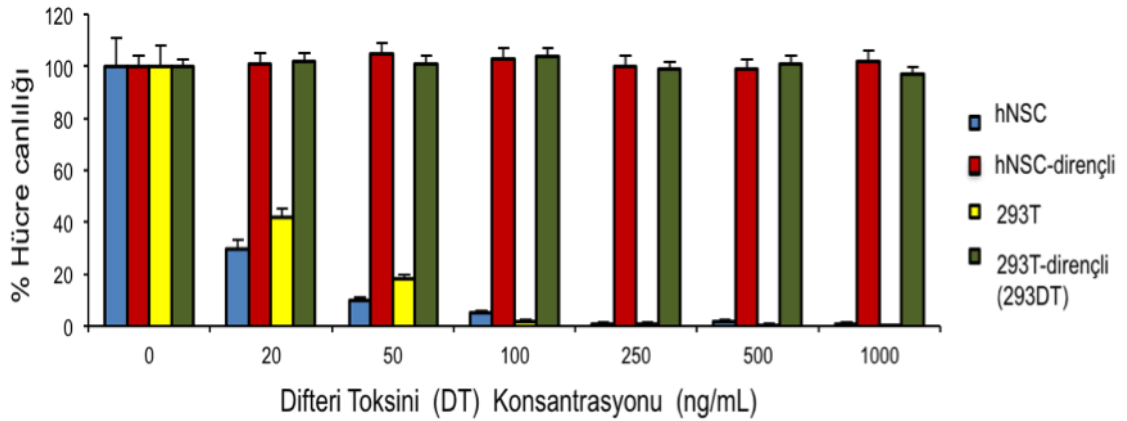
Veriler , iki grup karşılaştırıldığında Student's T-test ile analiz edildi. Veriler +/- SEM ile ifade edildi ve farklılıklar $p^* < 0,05$, $p^{\#} < 0,01$, $p^{\$} < 0,001$, ve $p^{**} < 0,0001$ olacak şekilde belirlendi. Sağ kalım analizleri farklı gruplardaki farelerde Mantel Cox log-rank test ile kıyaslandı.

4.BULGULAR

Çalışmamızda, GBM tümörlerini tedavi etmek üzere, lentiviral vektörler kullanılarak Pseudomonas ekzotoksinini (PE) içeren ve epidermal büyüme faktörü yönelimli ENb-PE ile interlökin-13 yönelimli IL13-PE hedefli toksinleri geliştirildi. Bu hedefli toksinleri salgılamak üzere oluşturulan insan nöral kök hücrelerinin, GBM hücreleri ve GBM tümörü nüksü üzerindeki etkileri araştırıldı.

4.1.Hücrelerin toksine dirençli hale getirilmesine ve hedefli toksinleri üretmek üzere hazırlanmasına ait sonuçlar

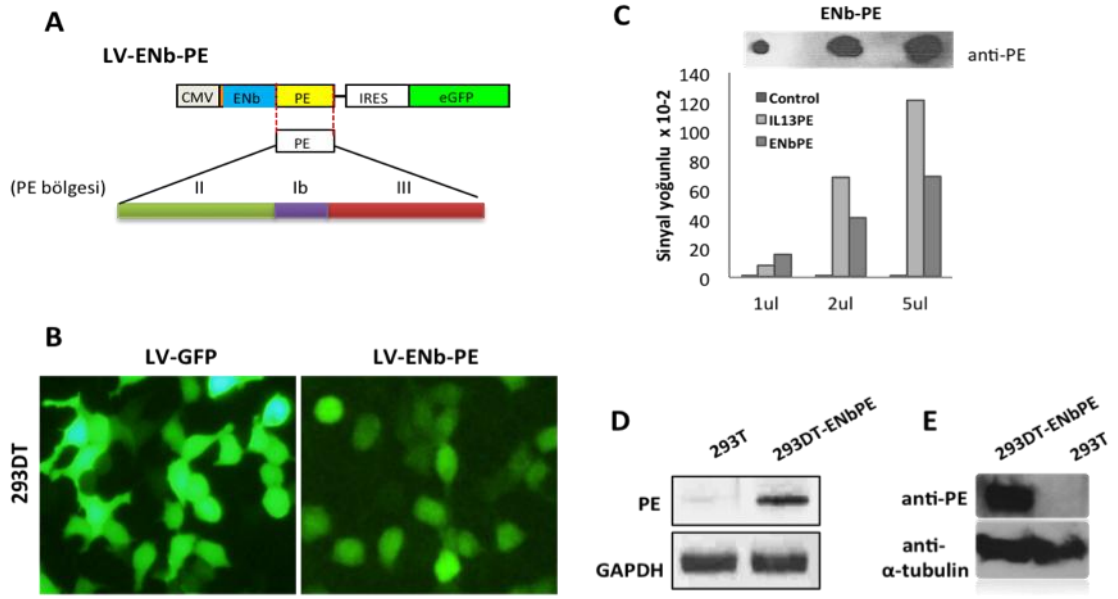
Bu çalışma kapsamında terapötik özellik kazandırmak üzere insan nöral kök hücreleri (hNSC) ve embriyonik böbrek hücreleri (293T), öncelikle intraselüler toksin moleküllerine dirençli hale getirilerek hedefli toksinin hücrelerde oluşturacağı toksik etki önlenmiş oldu. Normal ve toksine dirençli hale getirilen insan nöral kök hücre soyları (hNSC) ve embriyonik böbrek hücreleri (293T), 100-250 ng/ml difteri toksini (DT) ile muamele edildiğinde, canlılık yüzdesi, normal hücrelerde $\leq$ %5 iken dirençli hücrelerin canlılığının %100 olduğu saptandı. Difteri toksininin konsantrasyonu, 250-1000 ng/ml aralığında artırılarak uygulandığında ise her iki hücre tipi için de normal hücrelerin tamamının öldüğü ve canlılıklarının $\leq$ %2 olduğu tespit edildi. Buna karşılık, her iki hücre tipinde de 250-1000 ng/ml difteri toksini ile muamele edilen toksine dirençli hücrelerin canlılık yüzdesi tüm konsantrasyonlar için $\geq$ % 98 olarak saptandı. Böylece toksine dirençli hale getirilen nöral kök hücrelerin ve 293DT hücrelerinin yüksek toksin konsantrasyonlarına maruz kaldıklarında dahi canlılıklarını sürdürmeye devam ettikleri (Cell Titer Glo, Promega) gösterildi (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: Toksine dirençli hale getirilen 293T ve hNSC hücrelerinin toksin muamelesi sonrası canlılık analizi sonuçları. Normal hücreler ≥ 100 ng/ml difteri toksini muamelesi sonucu $\leq 5\%$ canlılık gösterirken, toksine dirençli hücrelerin tüm konsantrasyonlarda (0-1000 ng/ml) yapılan toksin muamelesi sonucu canlılıklarının $\geq 98\%$ oranında devam ettiği görülmektedir.

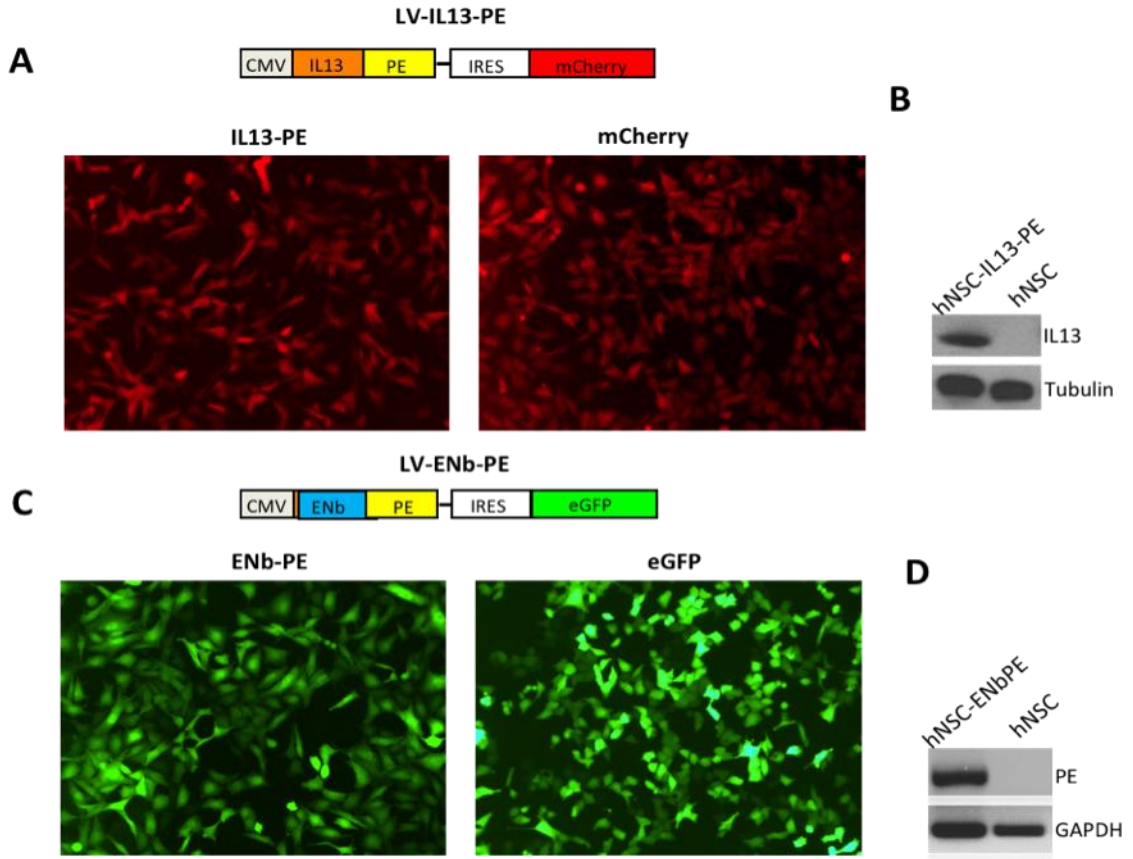
DNA dizi analizi ile, lentiviral vektörlere yerleştirilen hedefli toksinlerin, PE zincirinin hem translokasyon (II) hem de katalitik (III, Ib) bölgelerini ve de ligand bağlama bölgesini (ENb veya IL13) içerdiği gösterildi. Ayrıca DNA dizi analizi verileri kullanılarak, hedefli toksinin aminoasit dizilimini değiştirebilecek herhangi bir mutasyon bulundurmadığı “CLC Sequence Viewer Software” yazılımı ile yapılan analizlerle doğrulandı. (Şekil 4-2A). Oluşturulan vektörlerde, doğal PE molekülünde yer alan ligand bağlama bölgesi yerine ENb veya IL13 yerleştirilmesiyle hücrelerden salınan hedefli toksinin, sırasıyla EGFR ve IL13R α 2 reseptörlerine özgün olarak bağlanması sağlandı.

Toksine dirençli 293DT hücreleri, sadece GFP kodlayan kontrol vektörü (LV-GFP) veya hem GFP hem de ENbPE kodlayan LV-ENbPE vektörü ile transfekte edilerek (Şekil 4-2B), transfeksiyon etkinliği $\%90-100$ olduğunda bu hücrelerden kültür medyumunu toplandı ve konsantre edildi. Bu 50 kat daha konsantre hale getirilmiş olan kültür medyumunun, hedefli toksin bulundurduğu dot blot yöntemi ile gösterildi ve ImageJ programı ile bant yoğunlukları hesaplandı. Aynı işlemler ile önce IL13-PE hedefli toksin konsantrasyonu 4 ng/ml olarak kontrole kıyaslanarak belirlendi. Miktarı belirlenen IL13-PE kullanılarak aynı yöntemle ENb-PE miktarı 2 ng/ml olarak hesaplandı (Şekil 4-2C). Ayrıca bu hücrelerde hedefli toksinlerin ifade edildiği RT-PZR (Şekil 4-2D) ve Western Blot yöntemleriyle gösterildi (Şekil 4-2E).



Şekil 4-2: 293DT hücrelerinde hedefli toksinlerden ENb-PE'nin ifadesinin analizi. A) LV-ENb-PE'nin DNA dizi analizi sonucu, vektörde tespit edilen ENb ve PE bölgeleri görülmektedir. B) GFP ifade eden 293DT-GFP ve 293DT-ENbPE hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü, C) Dot blot yöntemi ile 293DT-ENbPE hücrelerinin medyumunda bulunan ENb-PE'nin miktar tayini grafiği, D) RT-PZR yöntemi ile ENb-PE'nin mRNA ifadesinin gösterimi, E) Western Blot yöntemi ile ENb-PE protein ifadesinin gösterimi.

Daha sonra, toksine dirençli kök hücreler LV-ENbPE ve LV-IL13PE lentiviral vektörleri ile transfekte edildi. Transfeksiyon etkinliği yeşil floresan protein (GFP) veya kırmızı floresan proteini mCherry ekspresyonunun floresan mikroskobunda görüntülenmesi ile belirlendi. GFP/mCherry eksprese eden hücre klonları seçilerek çoğaltılarak Western Blot ve RT-PCR yöntemleriyle hedefli toksinlerin ekspresyonu gösterildi (Şekil 4-3).

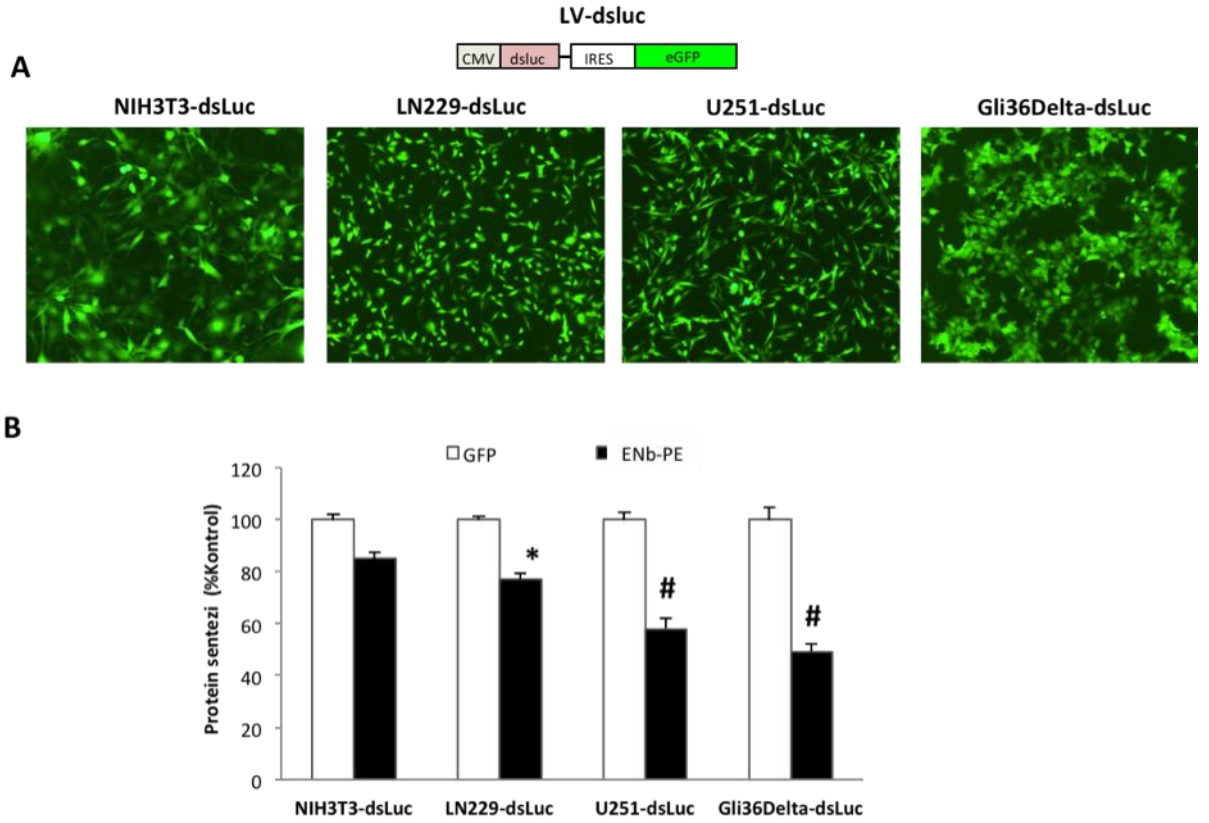


Şekil 4-3: Toksine dirençli kök hücrelerin hedefli toksinleri ifade ettiğinin gösterilmesi. Hedefli toksinleri eksprese eden A) IL13-PE ve mCherry kırmızı floresan proteinini bir arada bulunduran lentiviral vektör ve hNSC-IL13PE/mCherry hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü. C) ENb-PE ve GFP yeşil floresan proteinini bir arada bulunduran lentiviral vektör ve hNSC-ENbPE/GFP hücrelerinin floresan mikroskobu görüntüsü. B) hNSC-IL13PE hücrelerinde Western Blot yöntemi ile gösterilen IL13-PE ekspresyonu. D) hNSC-ENb-PE hücrelerinde RT-PZR yöntemi ile gösterilen ENb-PE ekspresyonu.

Bu deneyler sonucunda, 1) toksine dirençli 293DT hücrelerinde hedefli toksinlerin ekspresyonu ve bu hücrelerden salınması doğrulandı, 2) 293DT hücrelerinden salınmış olan ENb-PE ve IL13-PE hedefli toksinleri medyum içerisinde toplandı ve hedefli toksinlerin miktarı hesaplandı, 3) hedefli toksinleri eksprese eden insan nöral kök hücre soyları hNSC-ENbPE ve hNSC-IL13PE geliştirildi. Daha sonra 293DT hücrelerinden elde edilen hedefli toksinler ve kök hücreler (hNSC-ENbPE ve hNSC-IL13PE) terapötik etkinin belirlenmesi deneylerinde kullanıldı.

4.2.Hedefli toksinlerin GBM hücrelerinde hücre döngüsü ve protein sentezi üzerine etkileri

Toksin patogenezi hesaplamaya yönelik stabilize lusiferaz (dsLuc) aktivitesine dayalı kantitatif ve duyarlı bir metottan faydalınılmıştır. Kısa süren intraselüler yarı ömrü nedeniyle dsLuc, saatler içinde değişen gen ekspresyonu seviyesini takip etmeye imkan sağlamaktadır. Bu amaçla, GBM hücreleri LV-dsLuc lentivirüsü ile enfekte edilerek dsLuc ifade eden sabit hücre hatları elde edildi (Şekil 4-4A). 293DT-ENbPE hücrelerinden elde edilen ENbPE ile 48sa muamelesi sonrasında hesaplanan dsLuc aktivitesine göre, ENbPE ile muamele edilen U251 hücrelerindeki protein sentezi yüzdesi, kontrol hücrelerine kıyasla %59 ve LN229 hücrelerinde %77 olarak belirlendi . Yüksek seviyede EGFR ve mutant EGFRvIII varyantını ifade eden ve ENbPE ile muamele edilen Gli36vIII hücrelerinde ise protein sentezi yüzdesi kontrol hücrelerine kıyasla %49 olarak hesaplandı. Diğer taraftan, EGFR ifade etmeyen NIH-3T3 fare fibroblast hücreleri ise negatif kontrol olarak kullanıldı ve ENbPE muamelesi sonucu NIH-3T3 hücrelerindeki protein sentezi yüzdesinde kontrole oranla anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 4-4B).

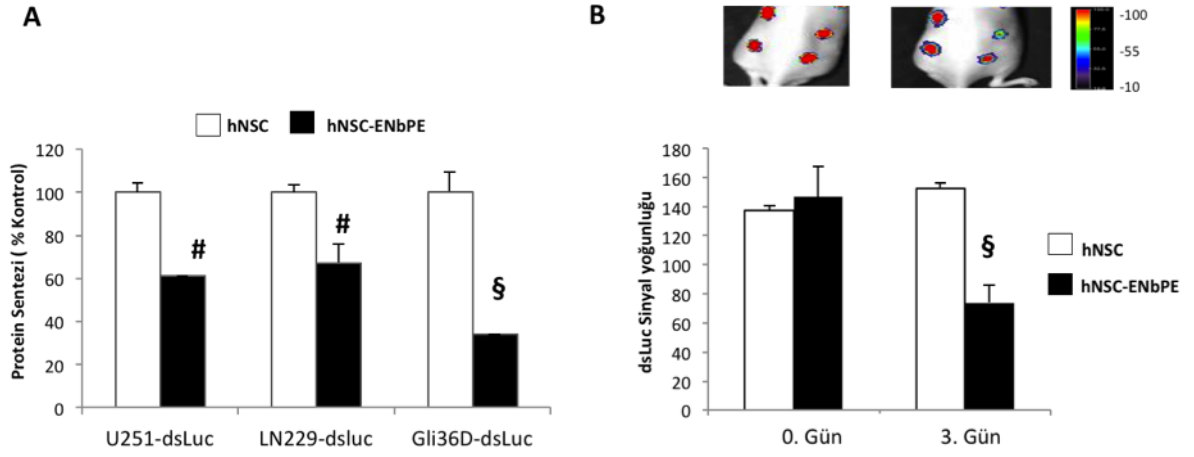


Şekil 4-4: ENb-PE hedefli toksini uygulamasının GBM hücrelerinde, protein sentezi üzerine etkilerinin analizi. A) dsluc içeren lentiviral vektör ile GBM hücrelerinde ENb-PE muamelesi sonucu protein sentezini tayin etmek üzere hücrelerin “dsluc” ile işaretlenmiş floresan mikroskobu görüntüsü. B) 48h boyunca ENbPE ile muamele edilen GBM hücrelerinde dsluc sinyaline bağlı olarak tayin edilen protein sentezi yüzdeleri.

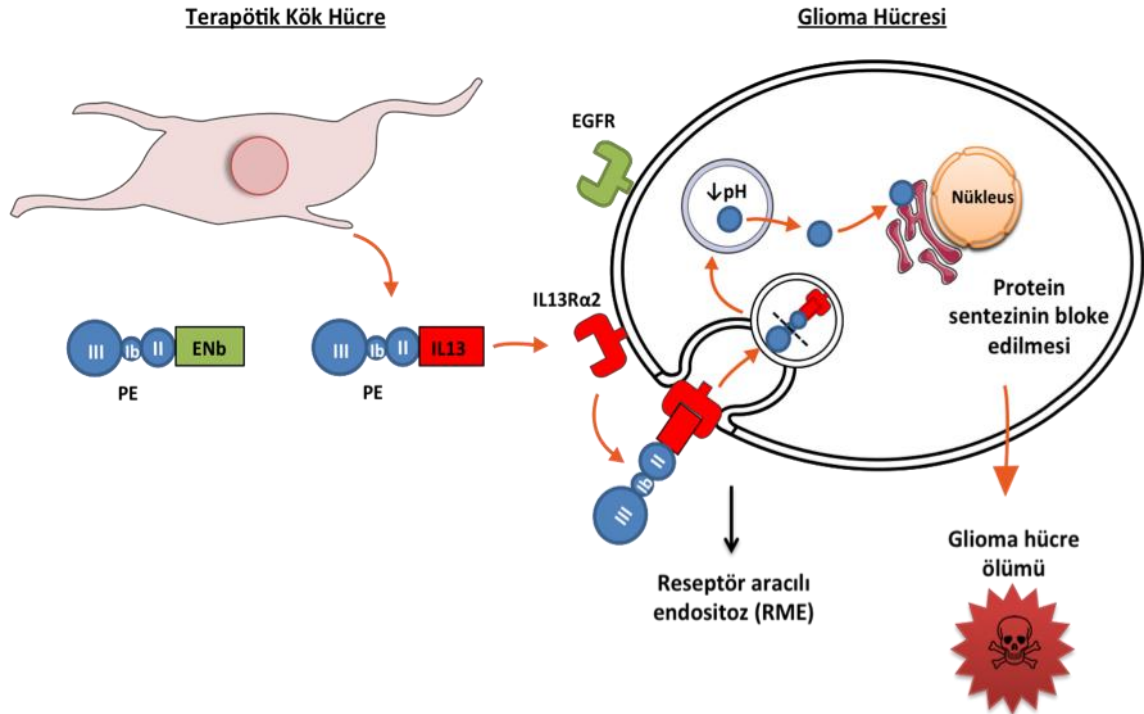
Kök hücreler tarafından sentezlenen hedefli toksinlerin de protein sentezi üzerine etkilerini araştırmak üzere, hNSC-ENbPE kök hücreleri ve U251-dsluc, LN229-dsluc ve Gli36Delta-dsluc (Gli36vIII-dsluc)’un birlikte kültürü yapılarak protein sentezi kinetiği hesaplandı. Sonuç olarak, kök hücreler tarafından sentezlenen ENb-PE’nin, 293DT hücrelerinden elde edilen ENbPE’ye benzer fonksiyonel etki gösterdiği ve protein sentezi dinamiklerini, GBM hücrelerinin EGFR reseptörü seviyelerine paralel olarak değiştirdiği saptandı (Şekil 4-5A).

ENbPE ifade eden kök hücrelerin *in vivo* terapötik etkinliğini saptamak üzere, dsLuc ifade eden GBM hücreleri ile terapötik hNSC-ENbPE kök hücreleri karıştırılıp subakutan olarak atimik çıplak farelere enjekte edildi. Enjeksiyonun hemen sonrasında (0.gün) ve 3 gün sonrasında intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edilen D-lusiferin ile

tümör hücrelerinin biyoluminesan görüntülenmesi yapıldı ve sinyal yoğunluğunda %50 azalma kaydedildi (Şekil 4-5B).



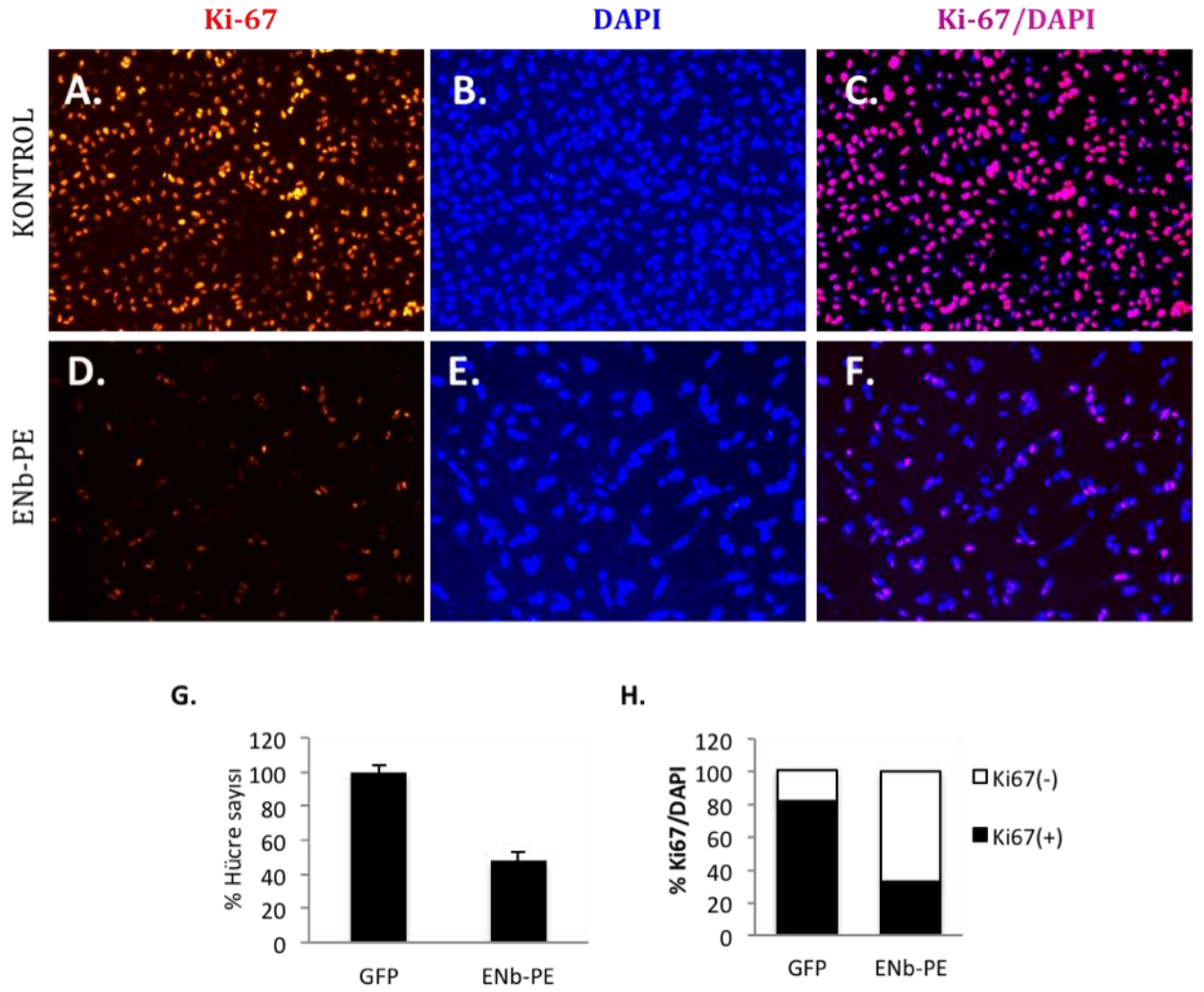
Şekil 4-5: Hedefli toksin ifade eden hNSC-ENbPE kök hücrelerinin, GBM hücrelerinde protein sentezi üzerine etkilerinin analizi. A) dsLuc ifade eden ve hNSC-ENbPE ve kontrol grubu hNSC kök hücreleriyle birlikte kültürü yapılan GBM hücrelerinde protein sentezinin analizi. B) dsLuc ifade eden ve hNSC-ENbPE ve kontrol grubu hNSC kök hücreleriyle birlikte atimik çıplak farelere subakutan yolla enjekte edilen GBM hücrelerinde protein sentezi kinetiğinin *in vivo* görüntülenmesi.



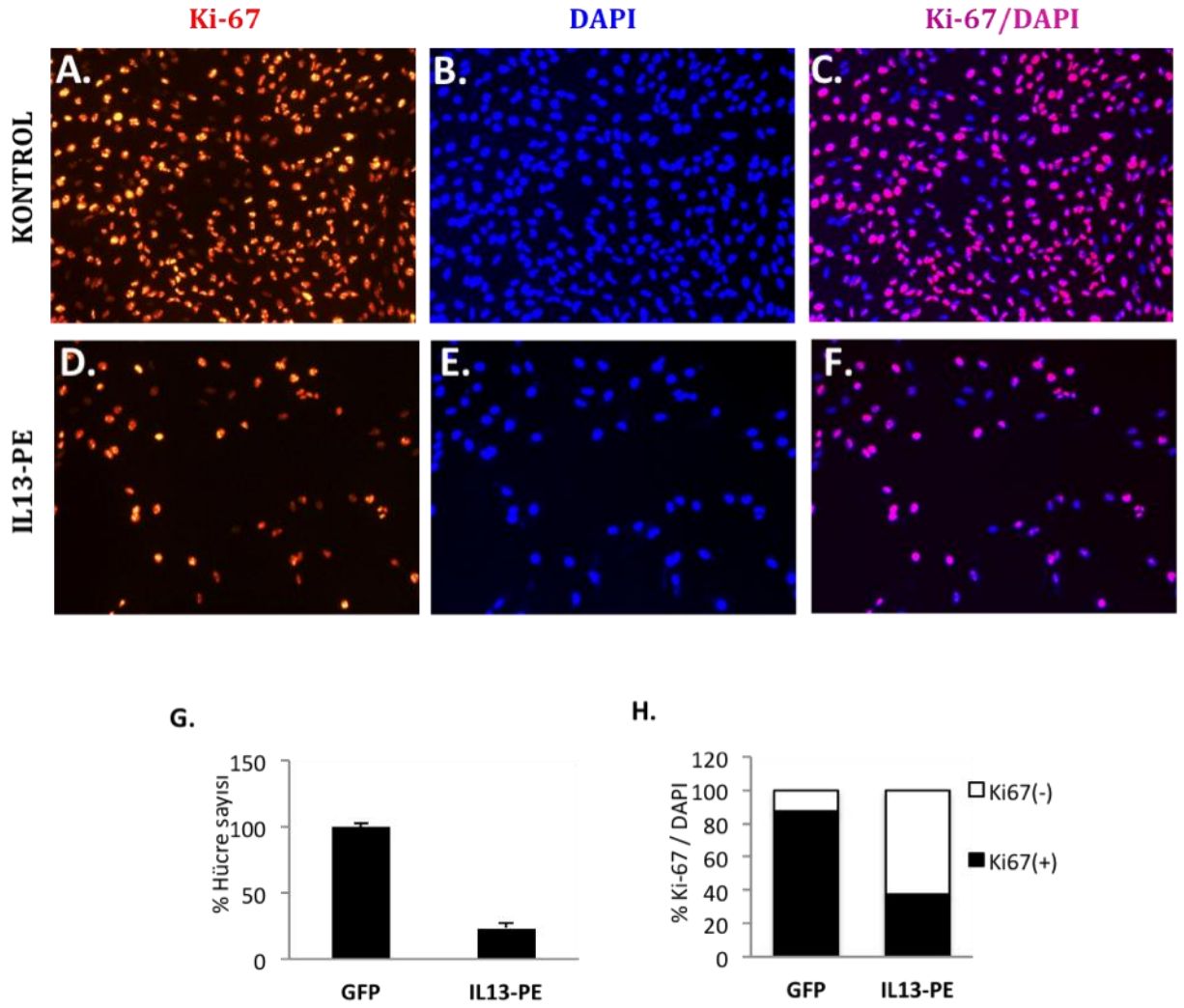
Şekil 4-6: Kök hücrelerden salınmış olan hedefli toksinlerin GBM hücrelerinde protein sentezini bloke etme aşamaları

Bu deneyler sonucunda, 293T-ENbPE hücrelerinden toplanan ENbPE ve hNSC-ENbPE hücrelerinin GBM hücre soylarında protein sentezini bloke ettiği ve hNSC-ENbPE kök hücrelerinin protein sentezi üzerine *in vivo* etkinliği gösterilmiştir.

GBM hücreleri, ENb-PE ve IL13-PE hedefli toksinleri ile muamele edildiğinde PE toksininin, hücre çoğalmasını bloke ettiği Ki-67 immüno Floresan boyaması ile gösterildi (Şekil 4-7A-F ve Şekil 4-8A-F). Sonuçlarımıza göre, 48sa süresince ENbPE ile muamele edilen LN229 ve IL13PE ile muamele edilen U251 hücrelerinde Ki-67 boyanmış hücre sayısı DAPI ile boyanmış hücre sayısına oranla %20-40 olarak hesaplandı (Şekil 4-7H ve Şekil 4-8H). Ayrıca DAPI ile boyanmış hücreler sayılarak hedefli toksin ile muamele edilen hücre sayısının kontrol grubu hücrelerine oranla %40-50 oranında azaldığı saptandı (Şekil 4-7G ve Şekil 4-8G).



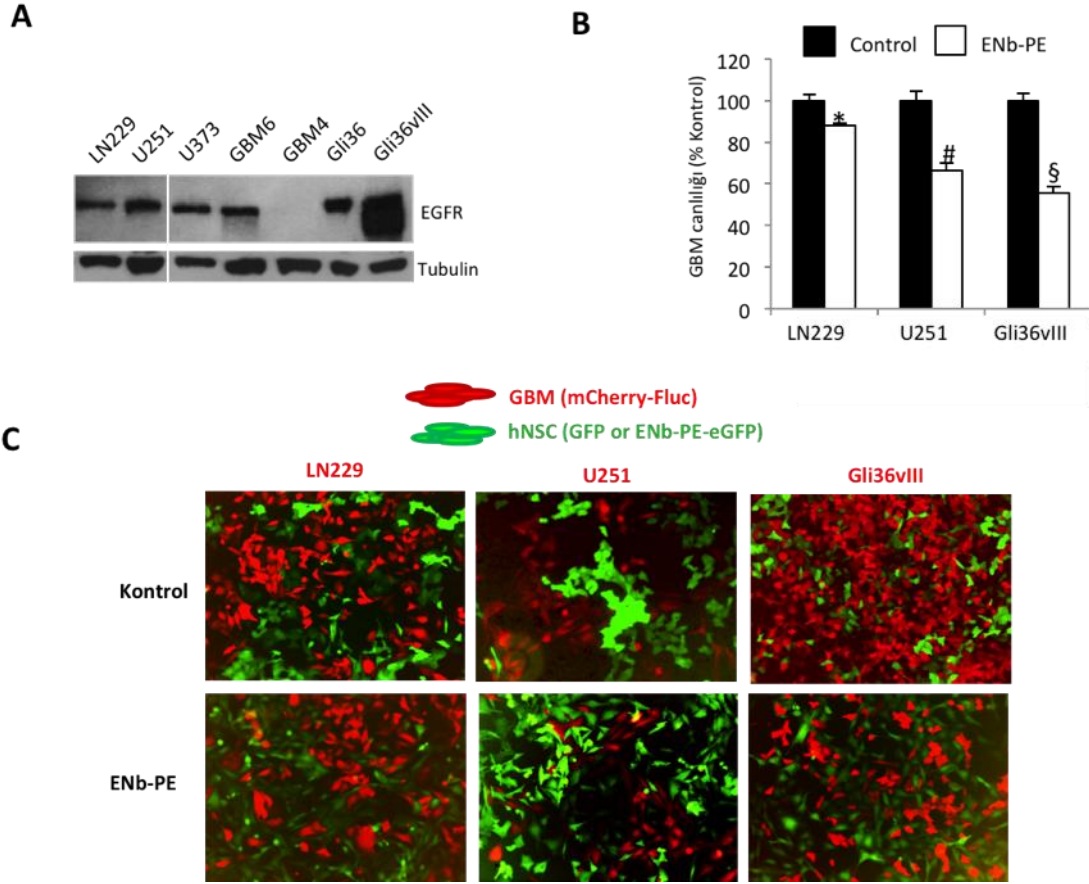
Şekil 4-7: ENb-PE'nin, GBM hücre çoğalması üzerine etkilerinin analizi. (A-F) ENb-PE ve kontrol medyumunu (GFP) ile 48 saat boyunca muamele edilen GBM hücrelerinde (LN229) çoğalmakta olan hücrelerin Ki-67 antikorları kullanılarak immunofloresan boyanması. G) ENb-PE ile muamele edilen GBM hücrelerinin kontrol medyumuna (GFP) kıyasla toplam hücre sayısındaki azalma ve H) Ki-67⁺ hücrelerin sayısındaki azalma görülmektedir ($p < 0,001$). (Kırmızı: Ki-67; mavi: DAPI; pembe: iki görüntünün çakışması). (Büyütme; X20).



Şekil 4-8: IL13-PE'nin GBM hücre çoğalması üzerine etkilerinin analizi. (A-F) IL13-PE ve kontrol medyumuna ile 48 saat boyunca muamele edilen GBM hücrelerinde (U251) çoğalmakta olan hücrelerin Ki-67 antikorları kullanılarak immunofloresan boyanması. G) IL13-PE ile muamele edilen GBM hücrelerinin kontrol medyumuna (GFP) kıyasla toplam hücre sayısındaki azalma ve H) Ki-67 pozitif hücrelerin sayısındaki azalma görülmektedir ($p < 0,001$). (Kırmızı: Ki-67; mavi: DAPI; pembe: iki görüntünün çakışması) (Büyütme; X20).

4.3.Hedefli toksinleri salan kök hücrelerin GBM hücre ölümü üzerine etkileri

GBM hücrelerinden Renilla lusiferaz (RLuc) ifade eden hücreler, enzim aktivitesine bağlı olarak hücre canlılık analizi için terapötik hNSC-ENbPE veya kontrol hNSC-GFP kök hücreleriyle birlikte kültür kaplarına ekildi ve 72sa sonra Rluc sinyali ölçümü yapıldı. 72sa kültürden sonra GFP (yeşil) ifade eden kök hücreleri ile MCherry (kırmızı) ifade eden GBM hücreleri floresan mikroskopunda görüntülendi (Şekil 4-9C). Sonuçlarımıza göre, kontrol grubu GBM hücreleri sayısında artış gözlenirken, hNSC-ENbPE ile kültürü yapılan GBM hücrelerinin sayılarında belirgin bir azalma meydana geldiği tespit edildi (Şekil 4-9B).



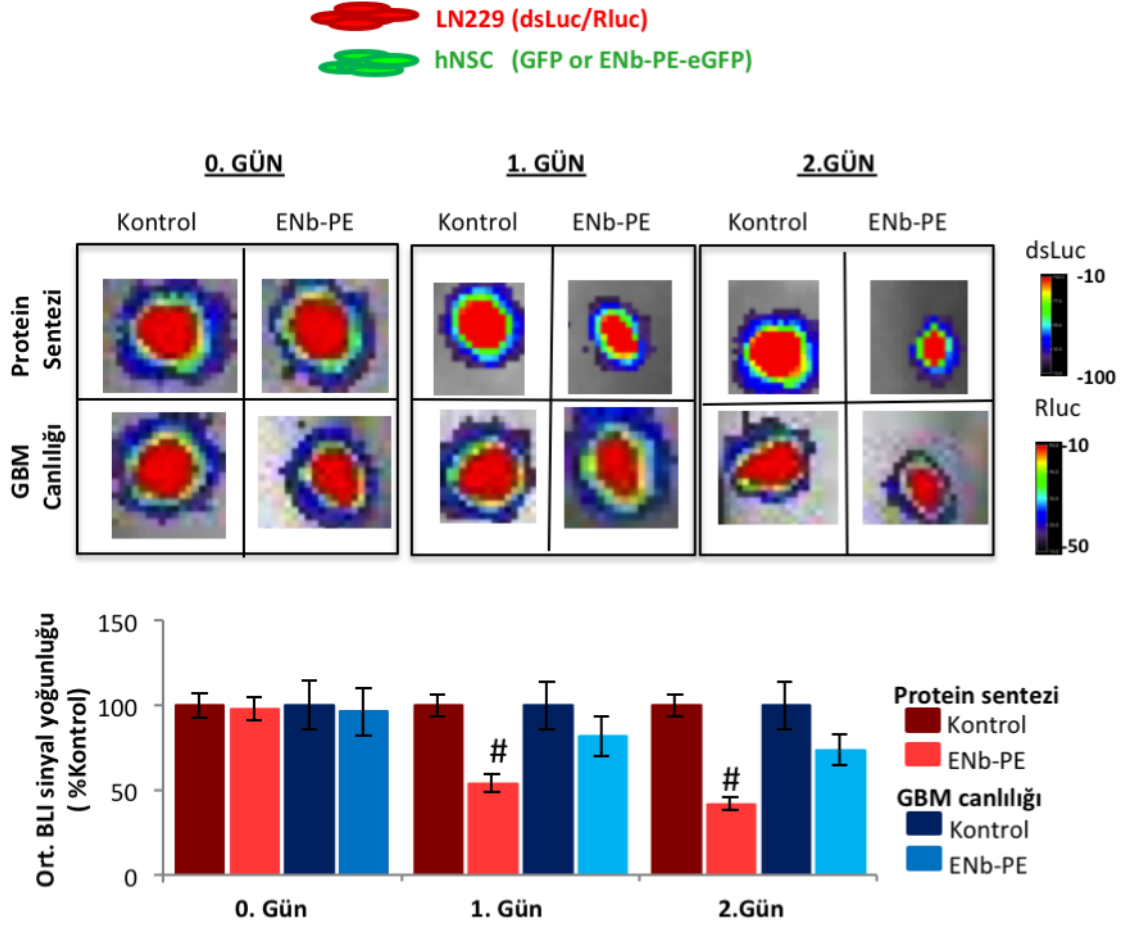
Şekil 4-9: Hedefli toksinler üreten kök hücreler ile GBM hücrelerinin birlikte kültürünün GBM hücre canlılığı üzerine etkisinin analizi. A) Bir dizi GBM hücrelerinde, Western Blot ile tespit edilen EGFR düzeyleri. Farklı düzeylerde EGFR bulunduran ve Rluc işaretli GBM hücrelerinin (LN229, U251 ve Gli36vIII), hNSC-ENbPE terapötik kök hücreleri ile birlikte 72sa kültürünün B) GBM hücre canlılığında oluşturduğu azalma ($p^* < 0,05$; $p^# < 0,01$ ve $p^\$ < 0,001$). C) floresan mikroskobu görüntüsü görülmektedir (Büyütme, X10).

Ayrıca GBM hücre canlılığındaki azalmanın, EGFR reseptörlerinin hem doğal hem de mutant formlarını ifade eden Gli36vIII hücrelerinde LN229 ve U251 hücrelerine oranla daha fazla olduğu ($\leq \%50$) saptandı (Şekil 4-9).

Sonuç olarak, ENbPE hedefli toksinini sentezleyen kök hücrelerin, anlamlı düzeyde GBM hücre ölümüne neden olduğu ve kök hücrelerin terapötik etkisinin GBM hücrelerindeki EGFR düzeyleriyle ilişkili olduğu saptandı.

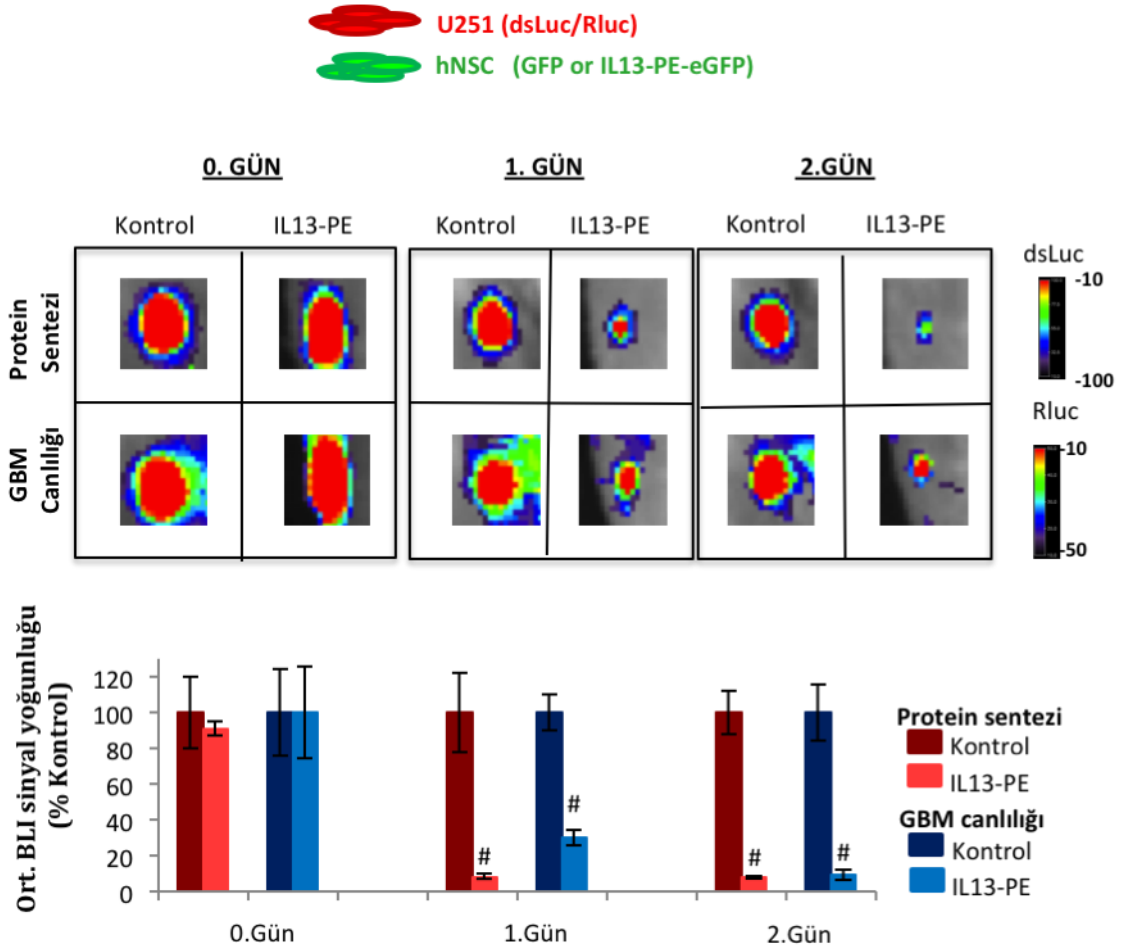
4.4.Subkutan tümörde hedefli toksinler üreten kök hücrelerin aynı anda protein sentezi ve tümör kütlesi değişimi üzerine etkileri

Hem dsluc hem Rluc işaretli GBM hücreleri ile terapötik kök hücreler (hNSC-ENbPE veya hNSC-IL13PE) birlikte subakutan yolla atimik çıplak farelere enjekte edildiğinde,



Şekil 4-10: GBM hücrelerinin, hNSC-ENbPE ile atimik çıplak farelere subkutan enjeksiyonu sonrası biyoluminesan görüntülenmesi ile terapötik kök hücrelerin GBM hücrelerinde protein sentezi ve tümör kütlesi üzerine etkilerinin gösterilmesi. Subakutan enjeksiyon sonrası GBM tümörünün 0-2 gün arası biyoluminesan görüntüsü ve kantitatif olarak tümör kütlesindeki değişimin analizi görülmektedir ($p < 0,01$).

hedefli toksinlerin eş zamanlı olarak protein sentezini bloke ettiği ve tümör kütlesinde azalma oluşturduğu saptandı. Terapötik etkinin zamanla artarak devam ettiği görüldü. Ayrıca, U251 hücrelerinde IL13PE'nin oluşturduğu terapötik etkinin ENbPE'nin LN229 hücrelerinde oluşturduğu terapötik etkiye kıyasla daha fazla olduğu tespit edildi. (Şekil 4-10 ve Şekil 4-11).

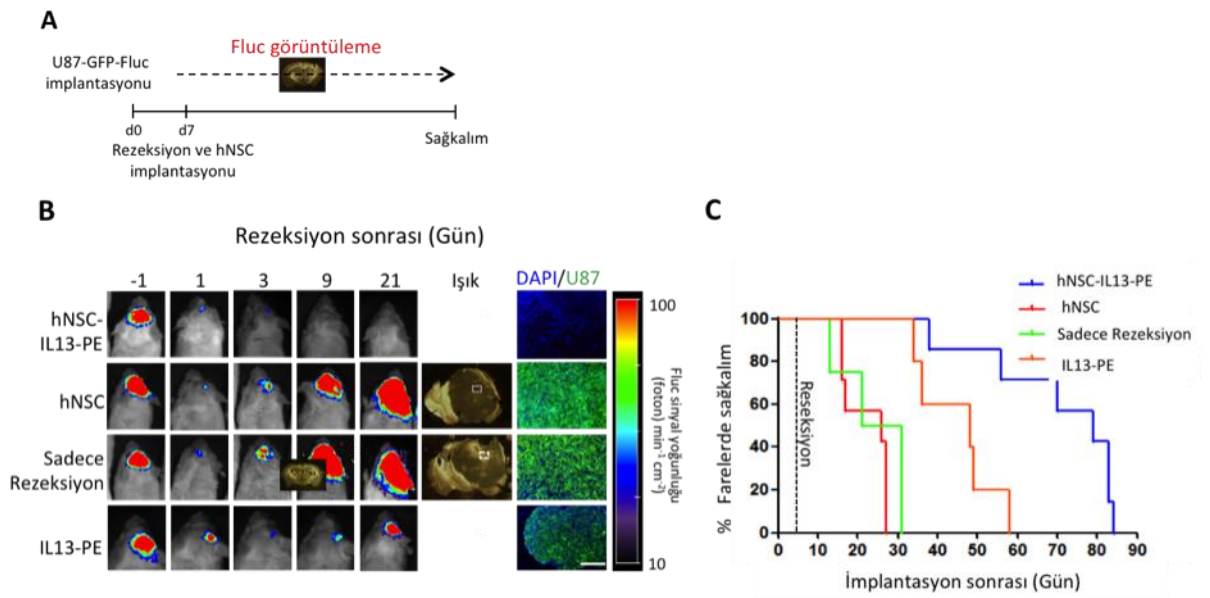


Şekil 4-11: GBM hücrelerinin, hNSC-IL13PE ile atimik çıplak farelere subkutan enjeksiyonu sonrası biyoluminesan görüntülenmesi ile terapötik kök hücrelerin GBM hücrelerinde protein sentezi ve tümör kütleleri üzerine etkilerinin gösterilmesi. Subakutan enjeksiyon sonrası GBM tümörünün 0-2 gün arası biyoluminesan görüntüsü ve kantitatif olarak tümör kütlelerindeki değişimin analizi görülmektedir ($p < 0,01$).

4.5. Terapötik kök hücre nakledilen GBM tümörlü farelerde, hedefli toksinlerin tümör kütlelerinin nüksü ve farelerin sağkalımı üzerine etkileri

Klinik tabloyu oluşturmak üzere, GBM tümörlü farelerde, cerrahi tedavi (rezeksiyon) ile tümör kütleleri çıkarıldı. GBM hücre hatları floresan işaretli olduğu için operasyon, intravital mikroskop altında takip edilerek gerçekleştirildi. Daha sonra sentetik bir ekstraselüler matriks olan biyobozunur jel içine yerleştirilen terapötik kök hücreler (hNSC-IL13PE), rezeksiyon kavitesine implante edildi. GBM hücreleri lusiferaz görüntüleme ajanı taşıdığı için , tümör kütleleri belirli aralıklarla bioluminesan olarak görüntülendi (4-12A). Böylece, GBM hücrelerine floresan ve bioluminesan görüntüleme işaretleyicilerinin birlikte entegre edilmesi ile kök hücrelerin terapötik etkisinin *in vivo* takibinin yapılması sağlandı.

Hedefli toksinleri salgılayan kök hücrelerin implante edildiği beyin tümörü rezeksiyonu yapılan fare modelinin biyoluminesan görüntüleme ile izlenmesi sonucu hedefli toksinler üreten kök hücrelerin, sadece rezeksiyon yapılan farelere ve modifiye edilmemiş kök hücrelere kıyasla anlamlı derecede terapötik etki gösterdiği saptandı (Şekil 4-12B). Tümör rezeksiyonu ve hedefli toksinleri salgılayan kök hücre naklinin farelerde sağkalım süresini, kontrol gruplarına kıyasla ≥ 50 gün uzattığı tespit edildi (Şekil 4-12C).



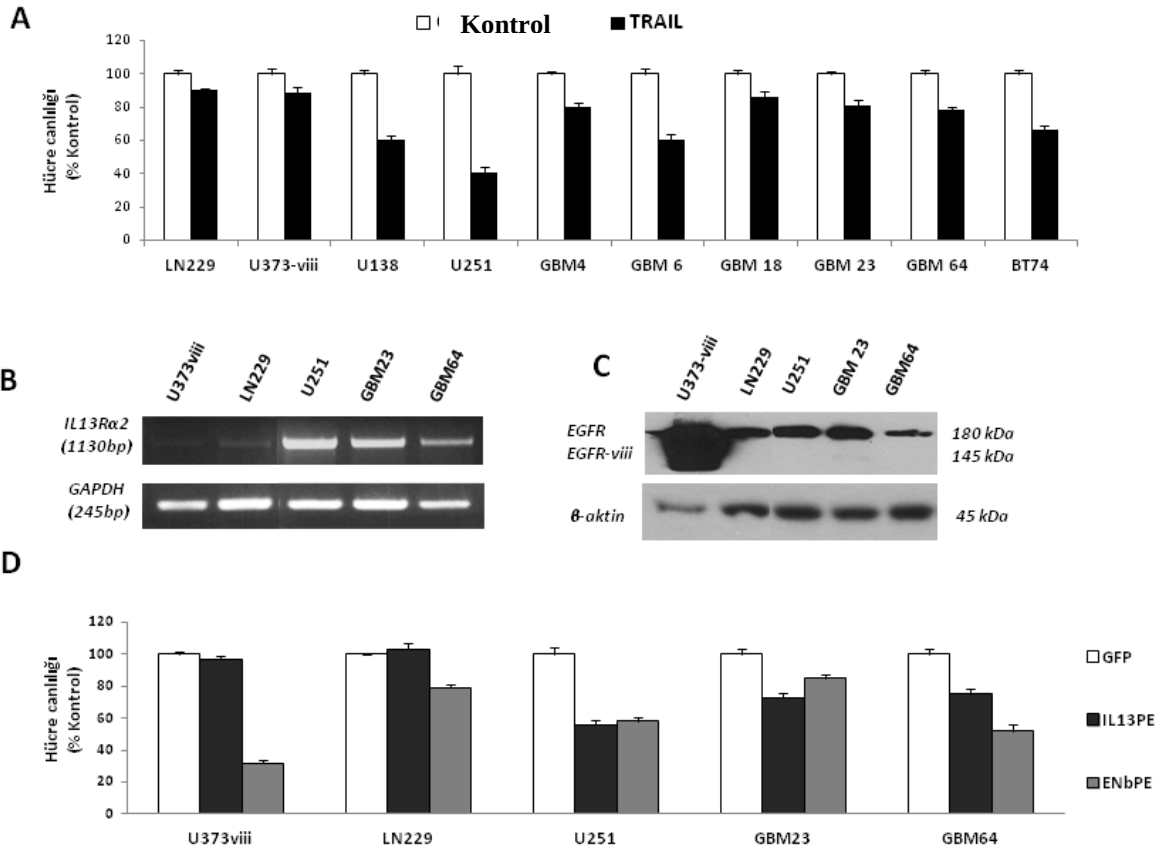
Şekil 4-12: GBM rezeksiyonu sonrası fare beynine implante edilen hNSC-IL13-PE kök hücrelerinin *in vivo* terapötik etkisinin gösterilmesi. A) Floresan ve bioluminesan olarak isaretlenmiş U87-GFP-Fluc hücrelerinin implantasyonu, tümör rezeksiyonu ve kök hücre implantasyonunun uygulanma şeması. B) Sentetik ekstraselüler matriks (sECM) ile enkapsüle edilen hNSC-IL13-PE terapötik kök hücrelerinin, tümör rezeksiyonunu takiben gerçekleştirilen implantasyon sonrası tümör hacminin, biyoluminesan görüntüleme ile zamana bağlı takibi. Koronal kesit ile beyin dokusunun tümör hücreleri içeriğinin floresan mikroskobu görüntüsü Nukleuslar, mavi (DAPI boyaması) ve GBM hücreleri (U87), yeşil renkte görülmektedir. C) Kaplan-Meier sağkalım eğrileri.

4.6.Hedefli toksinler ile birlikte uygulanan TRAIL'ın çeşitli GBM hücreleri üzerinde terapötik etkisi

Laboratuvarımızda oluşturduğumuz ve kanser hücrelerinde iki farklı reseptörü hedef alan hedefli toksinler ile apoptoz indükleyici ajanlardan Tümör nekroz faktör bağlantılı

apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) birlikte uygulanarak, GBM hücrelerinde oluşturduğu hücre ölümü ve bunun moleküler mekanizması araştırılmıştır.

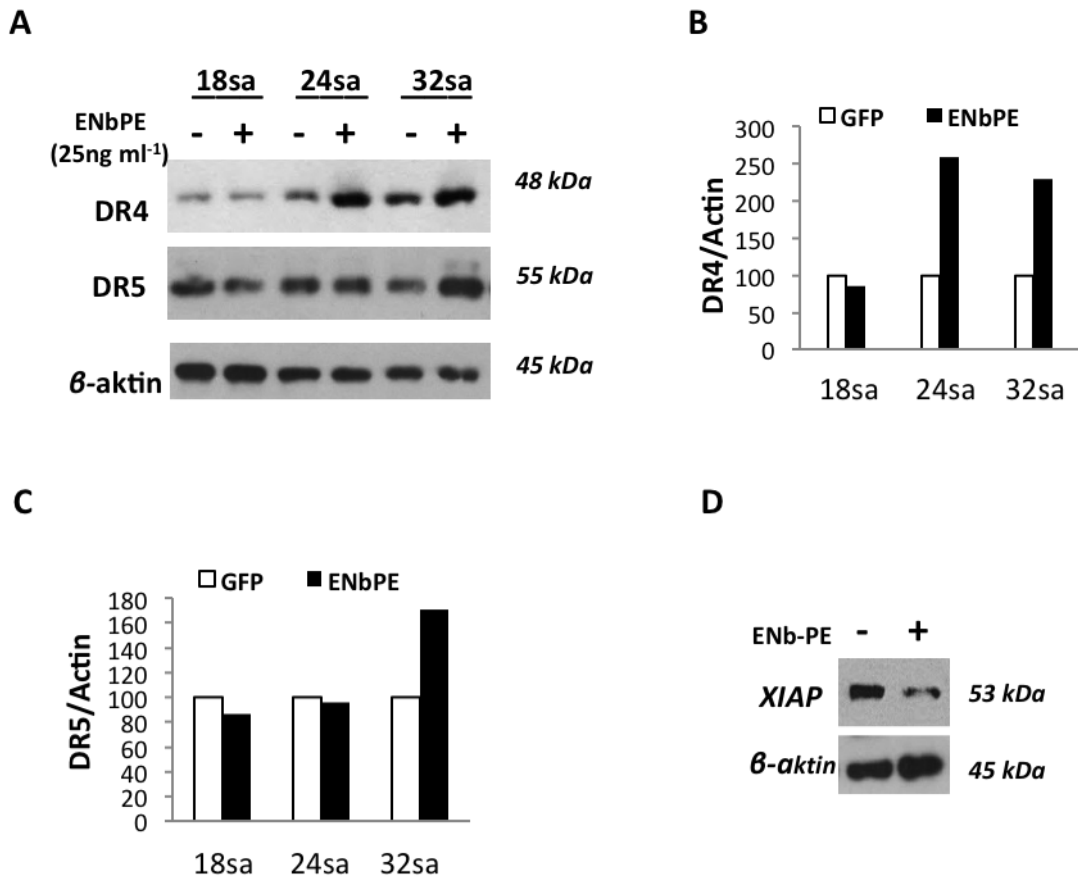
Farklı GBM hücre soyları ve hastadan alınan primer GBM hücrelerinden oluşan ve *in vivo* büyüme yeteneğine sahip bir grup hücrede, TRAIL (500ng/ml) yanıtı gösterildi (Şekil 4-13A). Bu hücrelerden TRAIL'e direnç gösteren bir grup hücrede hedefli toksinlerin bağlandığı yüzey reseptörleri olan IL13R α 2 ve EGFR'nin gen ifade düzeyleri saptandı (Şekil 4-13B,C). Reseptörleri ifade eden hücreler, hedefli toksinler ile ayrı ayrı inkübe edildiğinde, hedefli toksinlere de farklı oranlarda direnç gösterdikleri saptandı (Şekil 4-13D).



Şekil 4-13: TRAIL'a dirençli ve kısmi dirençli GBM hücrelerinin, hedefli toksinler ile muamelesinin hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi. A) 500ng/ml TRAIL ile 24sa bekletilen GBM hücrelerinde Cell Titer Glo ile TRAIL'a yanıtın ölçümü. Yüksek oranda TRAIL direnci gösteren GBM hücrelerinde B) RT-PZR yöntemi ile IL13R α 2 mRNA düzeyleri, C) EGFR reseptörünün Western blot yöntemi ile tayin edilen protein düzeyleri. D) TRAIL dirençli hücrelerde hedefli toksinlerin (IL13-PE ve ENb-PE) *in vitro* terapötik etkisini gösteren hücre canlılığı yüzdeleri.

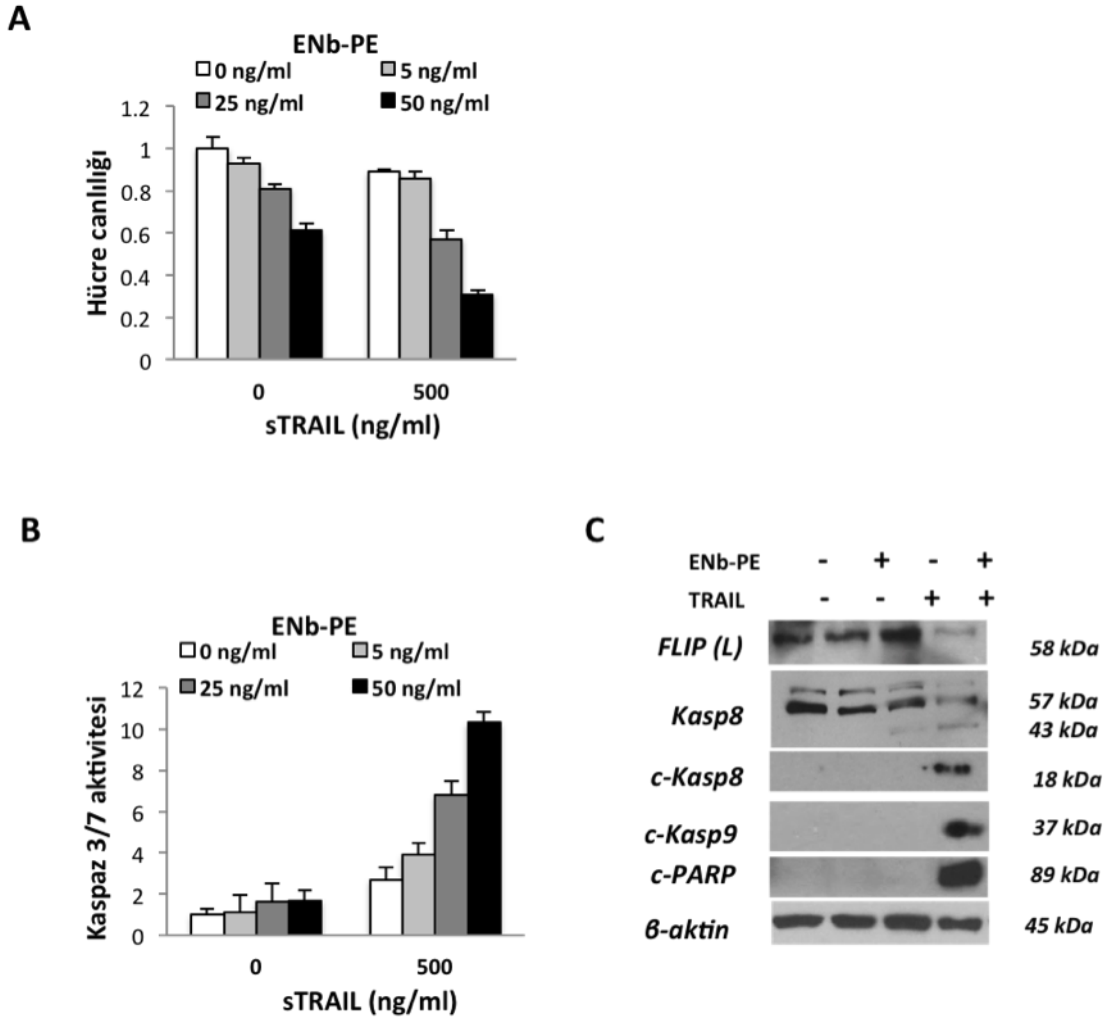
4.7.Hedefli toksinlerin, GBM hücrelerindeki TRAIL direnci ve TRAIL aracılı apoptoz üzerine etkileri.

GBM hücrelerinden, TRAIL'a yüksek seviyede direnç gösteren LN229 hücreleri ENbPE hedefli toksini ile 48sa kültürde muamele edildi. ENbPE uygulanan LN229 hücrelerinde, TRAIL direncinin belirleyicilerinden DR4/5 reseptörlerinin seviyelerinde artış olduğu saptandı (Şekil 4-14A-C). Ayrıca ENbPE uygulaması sonucu LN229 hücrelerinde, IAP (apotoz inhibitör proteinleri) ailesi anti-apoptotik proteinlerinden XIAP seviyelerinde de azalma meydana geldiği tespit edildi (Şekil 4-14D).

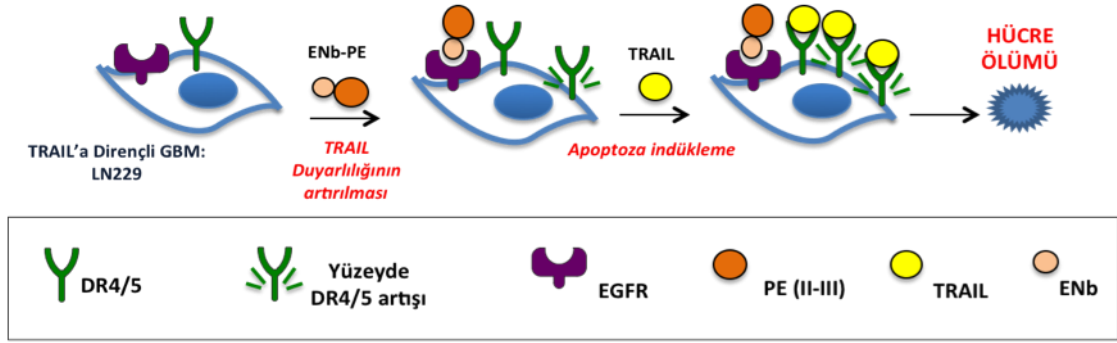


Şekil 4-14: Hedefli toksinlerden ENb-PE'nin, GBM hücrelerinde (LN229), DR4/5 reseptörleri seviyelerini artırdığının ve anti-apoptotik XIAP seviyelerini azalttığının gösterilmesi. A) ENbPE ve kontrol (GFP) medyumı ile 18, 24, ve 32sa muamele edilen LN229 hücrelerinde TRAIL reseptörlerinin (DR4/5) protein düzeylerinin western blot yöntemi ile gösterilmesi. B) ENbPE uygulanan LN229 hücrelerinde DR4 reseptöründeki artışı gösteren bantların Image-J programı ile analizi. C) ENbPE uygulanan LN229 hücrelerinde DR5 reseptöründeki artışı gösteren bantların Image-J programı ile analizi. D) ENbPE uygulanan LN229 hücrelerinde apoptoz inhibitör proteinlerinden XIAP protein seviyelerinin Western Blot yöntemi ile gösterilmesi.

Daha sonra ENbPE, TRAIL ile birlikte birçok terapötik ajana yüksek seviyede direnç gösteren LN229 hücrelerine uygulandı ve canlılık analizleri ile apoptotik yolağın alt basamaklarında meydana gelen kaspaz 3/7 aktivasyonu ölçümleri yapıldı. LN229 hücrelerinde bu kombinasyonun %70 civarında hücre ölümüne neden olduğu ve uygulanan dozlarla orantılı kaspaz 3/7 aktivasyonunun gerçekleştiği gösterildi (Şekil 4-15A-B). Daha sonra bu hücrelerden protein örnekleri hazırlanarak Western blot yöntemi ile PARP (poli ADP ribozil polimeraz), kaspaz-8 ve kaspaz-9 proteinlerinin kesilmiş formlarının varlığı belirlenerek apoptotik hücre ölümünün analizi yapıldı. ENb-PE (25ng/ml) ve TRAIL (500ng/ml) ile ayrı ayrı muamele edilen hücrelere kıyasla ENb-PE ve TRAIL kombinasyonunun LN229 hücrelerinde TRAIL direncini kırdığı ve apoptozun son basamaklarından PARP kesimi ile DNA yıkımı ve hücre ölümünün gerçekleştiği tespit edildi. Ayrıca kaspaz 8/9'un kesilmiş formlarının varlığı gösterilerek hem ekstrinsik (hücre dışı) hem de intrinsik (hücre içi/mitokondriyal) apoptotik yolağın aktive olduğu gösterildi. (Şekil 4-15C). LN229 hücrelerinde, hedefli toksinlerin DR4/5 artışı ile oluşturduğu TRAIL duyarlılığı ve hücre ölümü şematize edildi (Şekil 4-16).



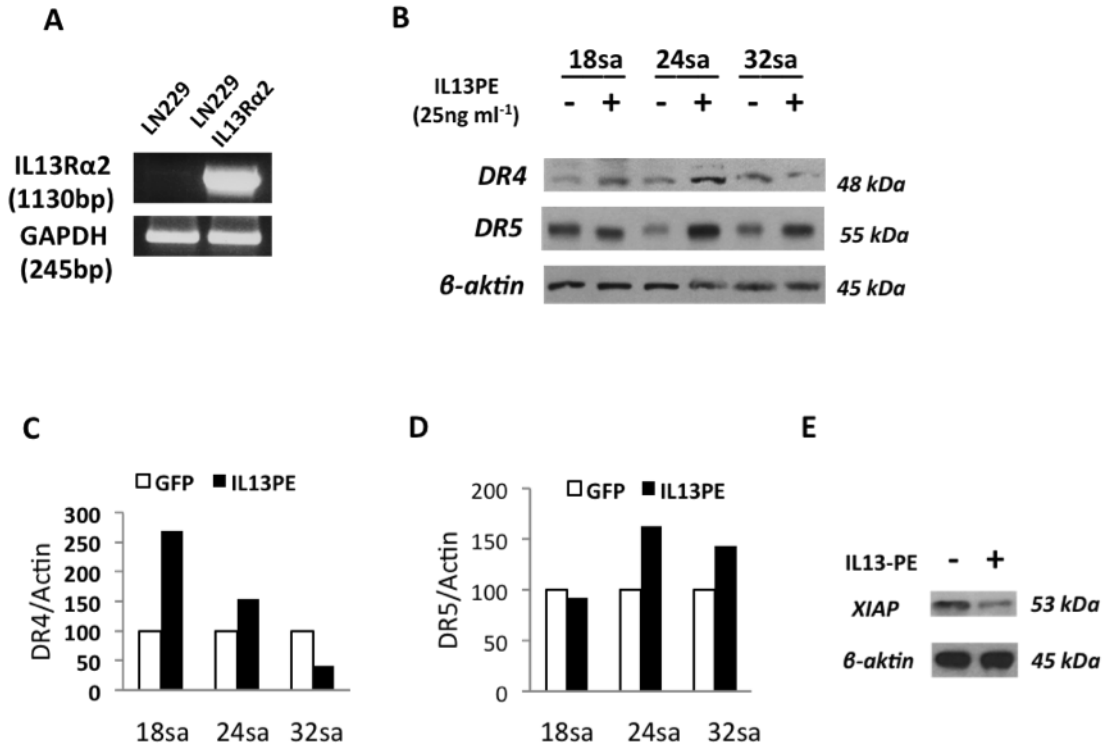
Şekil 4-15: GBM hücrelerinde, ENb-PE ve TRAIL'ın birlikte uygulamasının, hücre ölümüne ve apoptotik proteinlere etkisinin analizi. A) ENb-PE ve TRAIL ile kültürü yapılan LN229 hücrelerinde canlılık analizi (Cell titer Glo, Promega) sonuçları. B) ENb-PE ve TRAIL ile kültürü yapılan LN229 hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivitesi sonuçları. C) 48sa boyunca ENbPE, TRAIL, ENbPE + TRAIL ile muamele edilen LN229 hücrelerinde, hedefli toksin ve TRAIL kombinasyonunun apoptoz proteinlerinden kesilmiş PARP (c-PARP), kaspaz-8 (Kasp-8), kesilmiş kaspaz-8(c-Kasp), kesilmiş kaspaz-9 (c-Kasp) ve FLIP düzeylerine etkisini gösteren Western Blot sonuçları.



Şekil 4-16: TRAIL'a dirençli GBM hücrelerinde, ENbPE'nin oluşturduğu TRAIL duyarlılığının şematik gösterimi.

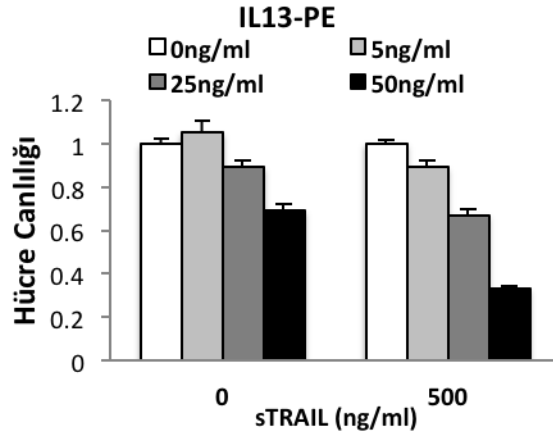
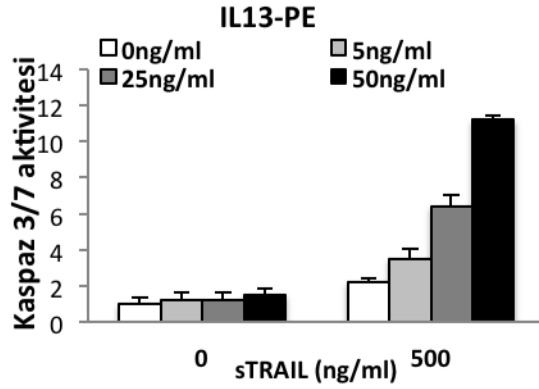
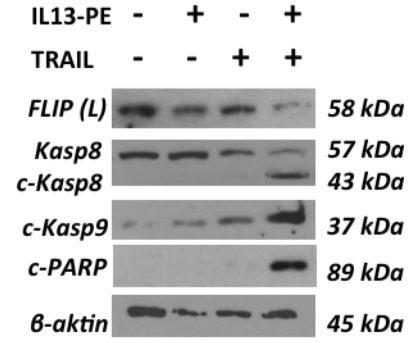
4.8.GBM hücrelerinde hedefli toksin reseptörü ifadesinin, TRAIL duyarlılığı oluşturma üzerine etkisi

Hedefli toksinler ile TRAIL'ın birlikte neden olduğu hücre ölüm mekanizmasını doğrulamak üzere, laboratuvarında geliştirdiğimiz diğer hedefli toksin olan IL13-PE ve TRAIL kombinasyonu da test edildi. Bu amaçla, LN229 hücreleri IL13-PE reseptörünü (IL13R α 2) normalde barındırmadığı için öncelikle lentiviral vektörlerle bu reseptörü ifade eden LN229-IL13R α 2 hücre soyu hazırlandı ve RT-PZR ile IL13R α 2 reseptörünün ekspresyonu gösterildi (Şekil 4-17A). Daha sonra bu hücreler, IL13-PE hedefli toksini ile muamele edildi ve TRAIL reseptörleri DR4/5 seviyelerinde artış saptandı (Şekil 4-17B-D). Ayrıca IL13-PE hedefli toksini uygulaması sonucu XIAP seviyelerinde azalma görüldü (Şekil 4-17E).

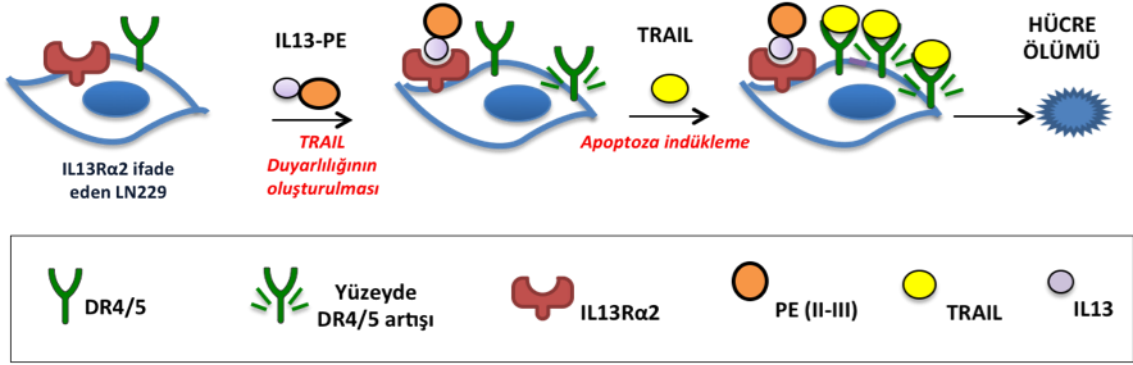


Şekil 4-17: IL13Rα2 geni aktarılan GBM hücrelerinde (LN229-IL13Rα2), IL13PE'nin, TRAIL duyarlılığı ve hücre öümü üzerine etkisinin gösterilmesi. A) RT-PZR yöntemi ile LN229-IL13Rα2 hücre soyunda IL13Rα2 mRNA ifadesinin tespiti. B) IL13-PE ile ve kontrol (GFP) medyumı ile 18, 24, 32sa muamele edilen LN229-IL13Rα2 hücrelerinde TRAIL reseptörlerinin (DR4/5) protein seviyesindeki artışın Western Blot yöntemi ile gösterilmesi. C) ImageJ programı ile DR4 protein düzeylerine ait Western Blot bant yoğunluklarının analizi. D) ImageJ programı ile DR5 protein düzeylerine ait Western Blot bant yoğunluklarının analizi. E) IL13PE ile muamele edilen LN229-IL13Rα2 hücrelerinde XIAP protein seviyelerinin azaldığının Western Blot yöntemi ile gösterilmesi.

Daha sonra, LN229-IL13Rα2 hücreleri, çeşitli dozlarda IL13-PE ve TRAIL ile muamele edilerek hücre canlılık analizi ve kaspaz 3/7 aktivasyonu ölçümü yapıldı. Hücrelerde TRAIL ile kombine edilen IL13-PE'nin %70 oranında hücre ölümüne neden olduğu ve bununla uyumlu olarak kaspaz 3/7 aktivasyonunun arttığı gösterildi (Şekil 4-18A,B). IL13-PE ve TRAIL ile muamele edilen LN229-IL13Rα2 hücre soyunda kaspaz 8/9 kesimi sonucu apoptotik hücre ölümü gerçekleştiği Western Blot yöntemiyle gösterildi (Şekil 4-18C).

A**B****C**

Şekil 4-18: LN229-IL13R α 2 hücrelerinde IL13PE ve TRAIL uygulamasının hücre canlılığı ve apoptoz üzerine etkilerinin gösterilmesi. A) IL13PE ve TRAIL uygulanan LN229-IL13R α 2 hücrelerinin canlılık analizi ve B) LN229-IL13R α 2 hücrelerinde IL13PE ve TRAIL uygulaması sonucu kaspaz 3/7 aktivitesinin arttığı görülmektedir. C) 48sa boyunca IL13PE, TRAIL, IL13PE + TRAIL ve kontrol içeren besiyeri ile muamele edilen LN229-IL13R α 2 hücrelerinde apoptoz proteinlerinden kesilmiş PARP (c-PARP), kaspaz-8 (Kasp8), kesilmiş kaspaz-8 (c-Kasp8), kesilmiş kaspaz-9 (c-Kasp9) ve FLIP düzeylerine etkisi.



Şekil 4-19: LN229-IL13Rα2 hücrelerinde IL13-PE'nin oluşturduğu TRAIL duyarlılığının şematik gösterimi.

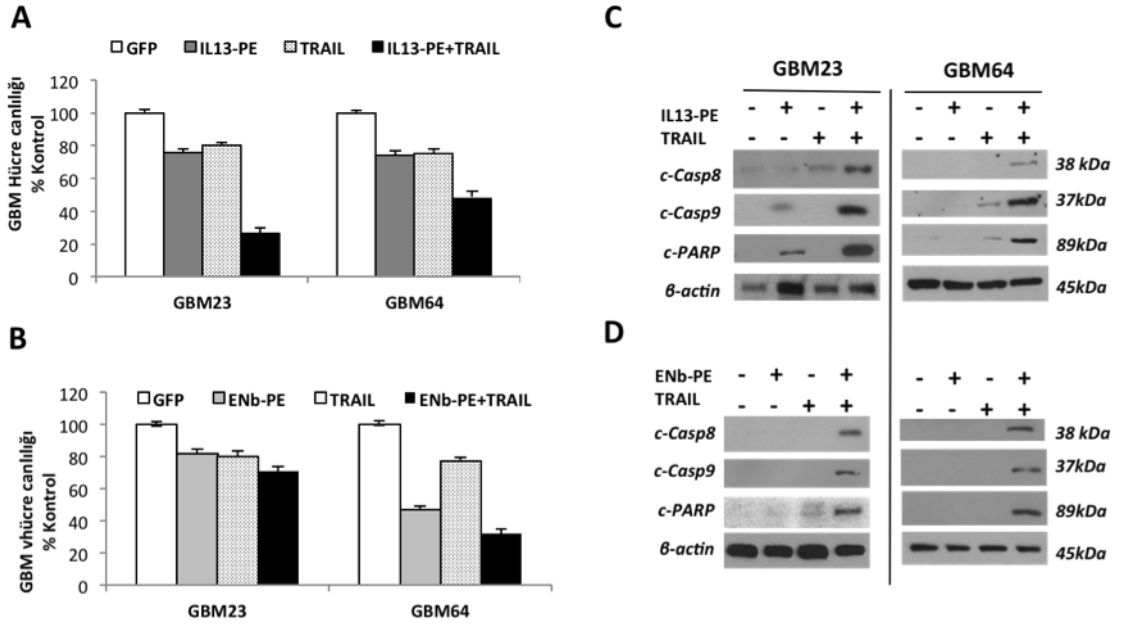
Ayrıca, hedefli toksinler ve TRAIL kombinasyonu ile inkübe edilen hücrelerde kaspaz-8 analogu ve ekstrinsik yolda TRAIL aracılı apoptozu bloke edici moleküllerden olan FLIP (hücresel FLICE benzeri inhibitör protein) protein seviyesinde azalma tespit edildi (Şekil 4-15C ve Şekil 4-18C).

Sonuç olarak, IL13Rα2 reseptörü varlığında LN229 hücrelerinde, IL13PE ve TRAIL ile ENbPE ve TRAIL'ın benzer mekanizma ile hücre ölümüne neden olduğu tespit edildi. GBM hücrelerinde hedefli toksinlerin, DR4/5 seviyelerinin artması ve anti apoptotik FLIP ve XIAP seviyelerinin azalmasına neden olarak TRAIL duyarlılığı oluşturduğu saptandı. Ayrıca hedefli toksinlerin TRAIL ile kombinasyonunun kaspaz-8 ve kaspaz-9 aracılı apoptotik yolları (ekstrinsik ve intrinsik) aktive ederek GBM hücre ölümünü gerçekleştirdiği tespit edildi. Hedefli toksinlerin aracılığıyla, LN229-IL13Rα2 hücre soyunda oluşan DR4/5 artışı ile oluşan TRAIL duyarlılığı ve hücre ölümü mekanizması Şekil 4-19'de görülmektedir.

4.10. Primer GBM hücrelerinde hedefli toksinler ile TRAIL'ın birlikte uygulamasının *in vitro* terapötik etkisi ve apoptozun analizi

TRAIL ile birlikte uygulanan IL13PE ve ENbPE hedefli toksinlerinin terapötik etkisi, hastalardan alınan primer GBM hücrelerinden hazırlanan kültürlerde test edildi. Hem EGFR hem de IL13Rα2 reseptörlerini ifade eden ve TRAIL'a dirençli GBM 23 ve GBM 64 hücreleri, 24sa boyunca IL13PE/ENbPE veya kontrol (GFP) besiyeri ile bekletildikten sonra kültür ortamına TRAIL veya kontrol besiyeri eklendi. Her iki reseptörü de barındıran GBM23 ve GBM64 hücrelerinde, hedefli toksinlerin TRAIL direncini kırarak canlı hücre oranını anlamlı derecede azalttığı gösterildi (Şekil 4-20A,

B). Bu sonuçlara göre, LN229 hücre soylarında olduğu gibi primer hücrelerde de kaspaz 8/9 ve PARP kesilmesi ile apoptozun gerçekleştiği saptandı (Şekil 4-20C,D).



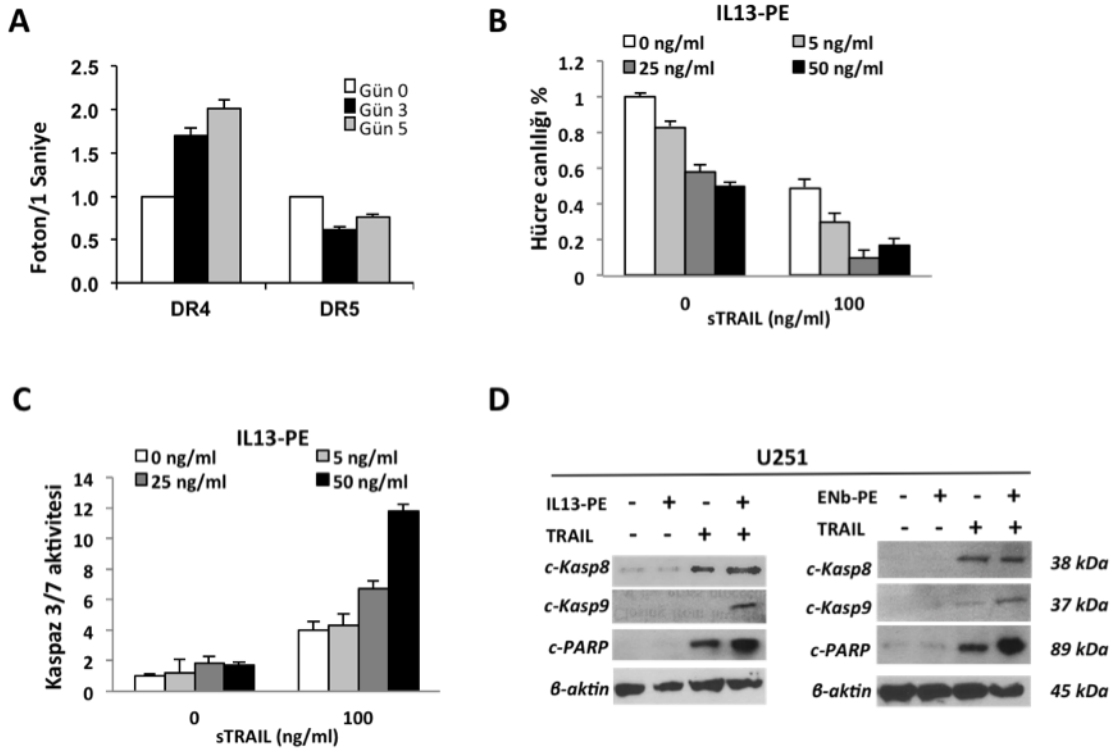
Şekil 4-20: Hedefli toksinler ile birlikte uygulanan TRAIL'ın primer GBM hücreleri üzerine terapötik etkilerinin analizi. A) IL13PE ve TRAIL'ın GBM23 ile GBM64 primer GBM hücrelerinde oluşturduğu *in vitro* terapötik etkinin (Cell titer Glo, Promega) gösterilmesi. B) ENb-PE ve TRAIL kombinasyonunun primer GBM hücrelerinde oluşturduğu *in vitro* terapötik etkinin canlılık testi ile gösterilmesi. C) IL13-PE ve TRAIL ile muamele edilen GBM23 ve GBM64 hücrelerinde apoptoz proteinlerinin Western Blot ile tespiti. D) ENbPE ve TRAIL ile muamele edilen GBM23 ve GBM64 hücrelerinde apoptoz proteinlerin tespiti.

4.11. TRAIL'a kısmi duyarlı GBM hücrelerinde hedefli toksinler ile birlikte TRAIL uygulamasının hücre ölümü üzerine etkisi

U251 hücreleri, DR4 ve DR5 promotörü altına klonlanan lusiferaz taşıyan lentiviral vektörlerle modifiye edildi. Daha sonra bu hücreler IL13PE ile muamele edildi ve biyoluminesan sinyalleri ölçümü yapılması sonucu U251 hücrelerinde de hedefli toksine bağlı DR4 ve DR5 reseptörlerinde artış tespit edildi (Şekil 4-21A). Kombinasyonun etkisini TRAIL'a daha az dirençli hücrelerde test etmek üzere, U251 hücreleri, IL13PE ve TRAIL ile muamele edilerek hücre canlılık ve kaspaz aktivasyonu analizi yapıldı. U251 hücrelerinde birlikte uygulanan IL13PE ve TRAIL'ın, her ikisinin de tek başına uygulandığı gruplara kıyasla hücre ölümünde artışa neden olduğu tespit edildi.

Kombinasyonun, yüksek dozlarda ve tek başına uygulanan TRAIL'a göre daha yüksek oranda (3 kat fazla) hücre ölümüne sebep olduğu gösterildi (Şekil 4-21B). Kaspaz 3/7

aktivasyon ölçümlerinden hücre canlılık analizi ile uyumlu sonuçlar elde edildi (Şekil 4-21C). IL13PE ve TRAIL kombinasyonunun apoptoz proteinleri üzerine etkisinin analizini yapmak üzere U251 hücreleri 25ng/ml IL13PE ve 100ng/ml TRAIL ile muamele edildi ve Western Blot yöntemi ile apoptoz proteinlerinin düzeylerine bakıldı. TRAIL'a yarı duyarlı U251 hücrelerinde, kombinasyonun, TRAIL tek başına uygulanan gruba kıyasla artan miktarlarda PARP kesilmesine neden olduğu gösterildi. Ayrıca IL13-PE ve TRAIL uygulaması sonucu, U251 hücrelerinde hem kaspaz-8 hem de kaspaz-9'un kesilmiş formları görülürken, TRAIL grubunda sadece kaspaz 8 kesilmesinin gerçekleştiği saptandı (Şekil 4-21D).



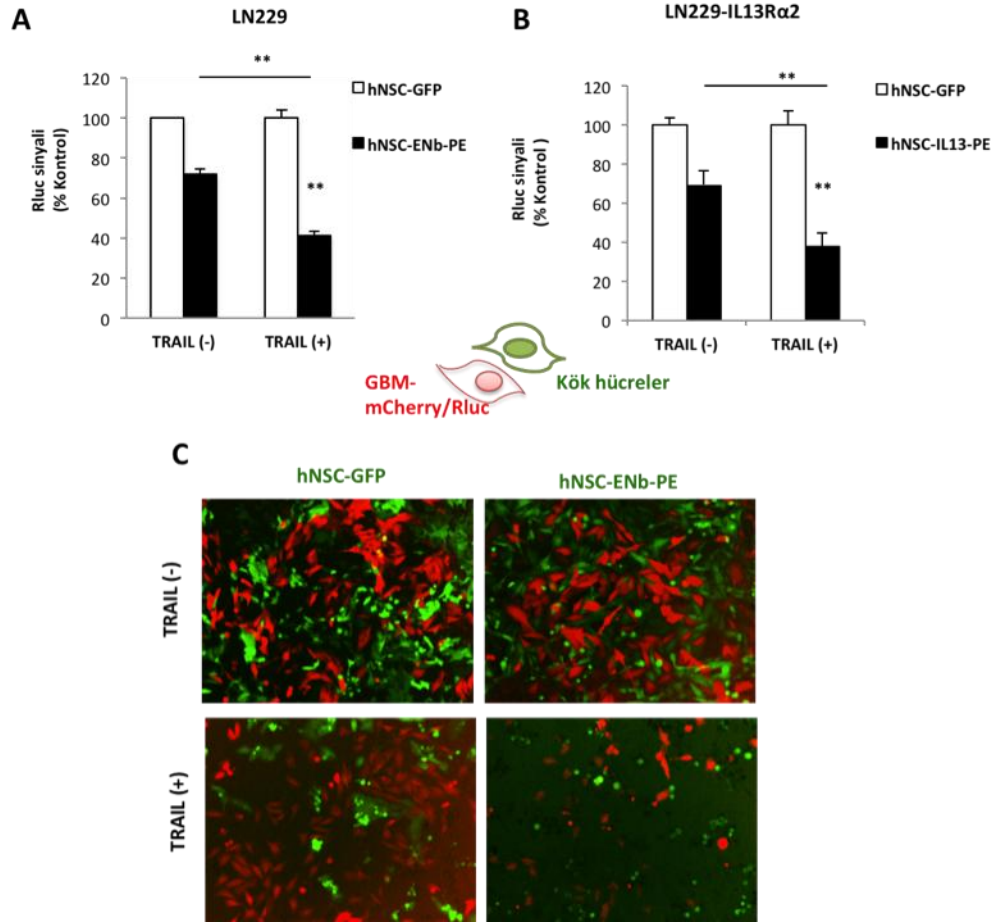
Şekil 4-21: TRAIL'a kısmi duyarlı GBM hücrelerinde (U251) hedefli toksin ve TRAIL kombinasyonunun apoptotik etkisinin gösterilmesi. A) IL13-PE ile inkübe edilen U251 hücrelerinde lusiferaz aktivitesi ölçümü ile DR4 ve DR5 reseptörlerindeki artışın gösterilmesi. B) U251 hücrelerine 24sa boyunca IL13-PE veya kontrol medyum ve sonra 24sa TRAIL veya kontrol medyum uygulaması sonucu hücre canlılığının analizi. C) U251 hücrelerine 24sa boyunca IL13-PE veya kontrol medyum ve sonra 24sa TRAIL veya kontrol medyum uygulaması sonucu kaspaz 3/7 aktivasyonunun ölçüm sonucu. D) U251 hücrelerine 24sa boyunca IL13-PE veya ENbPE ve sonra 24sa TRAIL uygulaması sonucu apoptoz proteinlerinin Western Blot yöntemi ile tespiti.

Böylece, TRAIL'a kısmi direnç gösteren U251 hücrelerinde, 1) hedefli toksinlerin TRAIL duyarlılığını artırdığı, 2) yalnızca TRAIL muamele edilen hücelere

kıyaslandığında U251 hücre ölümündeki artışa, hedefli toksinlerin etkisiyle mitokondriyel apoptotik yolağın dahil olduğu tespit edildi.

4.12.Hedefli toksinleri üreten terapötik kök hücreler ile kültürü yapılan GBM hücrelerinde TRAIL uygulamasının terapötik etkisi

In vitro ortamda terapötik etkisi saptanan hedefli toksin ve TRAIL kombinasyonunun, kök hücre aracılı terapötik etkisini incelemek üzere daha önce laboratuvarında oluşturduğumuz toksine dirençli hNSC-ENb-PE ve hNSC-IL13-PE nöral kök hücre hatları ile biyoluminesan ve floresan proteinlerle işaretlenmiş GBM hücrelerinin birlikte kültürü yapıldı. Kültür ortamına 48sa sonra 500ng/ml TRAIL ilave edildi ve bundan 24sa sonra da hücrelerde canlılık analizi yapmak üzere bioluminesan sinyal okuması yapıldı. 293DT hücrelerinden toplanan hedefli toksinler ve TRAIL ile birlikte muamele edilen hücrelerde olduğu gibi, kök hücrelerden salınan hedefli toksin ve TRAIL kombinasyonunun da TRAIL direncini kırarak GBM hücre ölümüne yol açtığı tespit edildi (Şekil 4-22A, B). Ayrıca, floresan mikroskop altında incelenen kültürlerde de kök hücrelerden salınan hedefli toksin ve TRAIL kombinasyonu uygulamasının, canlı hücre sayısında azalmaya neden olduğu gösterildi (Şekil 4-22C).

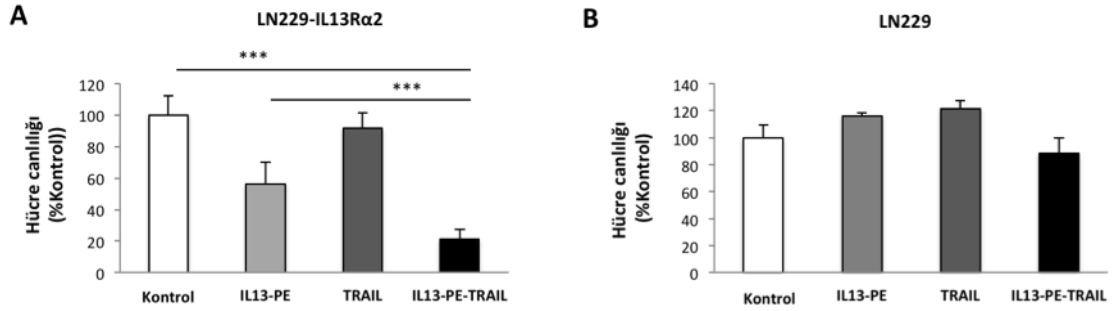


Şekil 4-22: Hedefli toksinleri üreten kök hücreler ile GBM hücrelerinin birlikte kültürüne TRAIL uygulamasının terapötik etkisinin analizi. A) hNSC-ENbPE terapötik kök hücreleri ve LN229-mCh/Rluc hücrelerini içeren kültür ortamına TRAIL ilavesinin GBM hücre canlılığı üzerine etkisinin Rluc sinyali ölçümü ile gösterilmesi. B) hNSC-IL13PE terapötik kök hücreleri ve LN229-IL13Rα2-Rluc hücrelerini içeren kültür ortamına TRAIL ilavesinin GBM hücre canlılığı üzerine etkisinin Rluc sinyali ölçümü ile gösterilmesi. C) Birlikte kültürü yapılan bu hücrelere TRAIL uygulaması sonrası hücre kaybının floresan mikroskobu görüntüsü (yeşil; kök hücre ve kırmızı; GBM; Büyütme, X10) ($p^{**}<0,001$).

4.13.GBM hücrelerinde IL13-PE-TRAIL füzyon proteininin çift fonksiyonlu etkisi

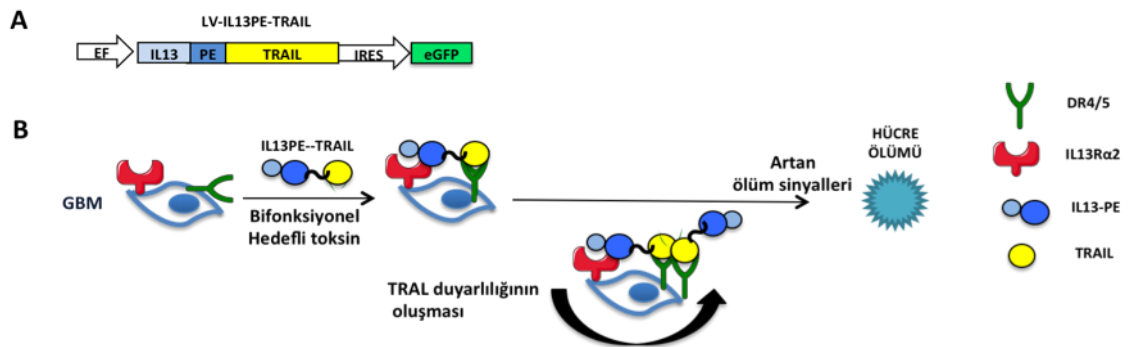
Her iki terapötik molekülün aynı kök hücre kaynağından salınmasını sağlamak ve beyin tümörü fare modellerine uygulamak üzere IL13PE ve TRAIL'in entegre edildiği LV-IL13PE-TRAIL lentiviral vektörü oluşturuldu. Daha sonra, IL13PE altına klonlanan TRAIL ile elde edilen IL13PE-TRAIL'in çift fonksiyonlu etkisi araştırıldı. 293DT hücrelerinin bu vektörle transfeksiyonu sonucu toplanan IL13PE-TRAIL ile muamele edilen LN229-IL13Rα2 hücrelerinde canlılığın azaldığı tespit edilirken (Şekil 4-23A), IL13 reseptörünü eksprese etmeyen LN229 hücrelerinde IL13PE-TRAIL'in terapötik etki oluşturmadığı saptandı (Şekil 4-23B). IL13PE-TRAIL füzyon proteininin GBM

hücrelerinde oluşturduğu TRAIL duyarlılığı ve hücre ölümü aşamaları Şekil 4-24'te görülmektedir.

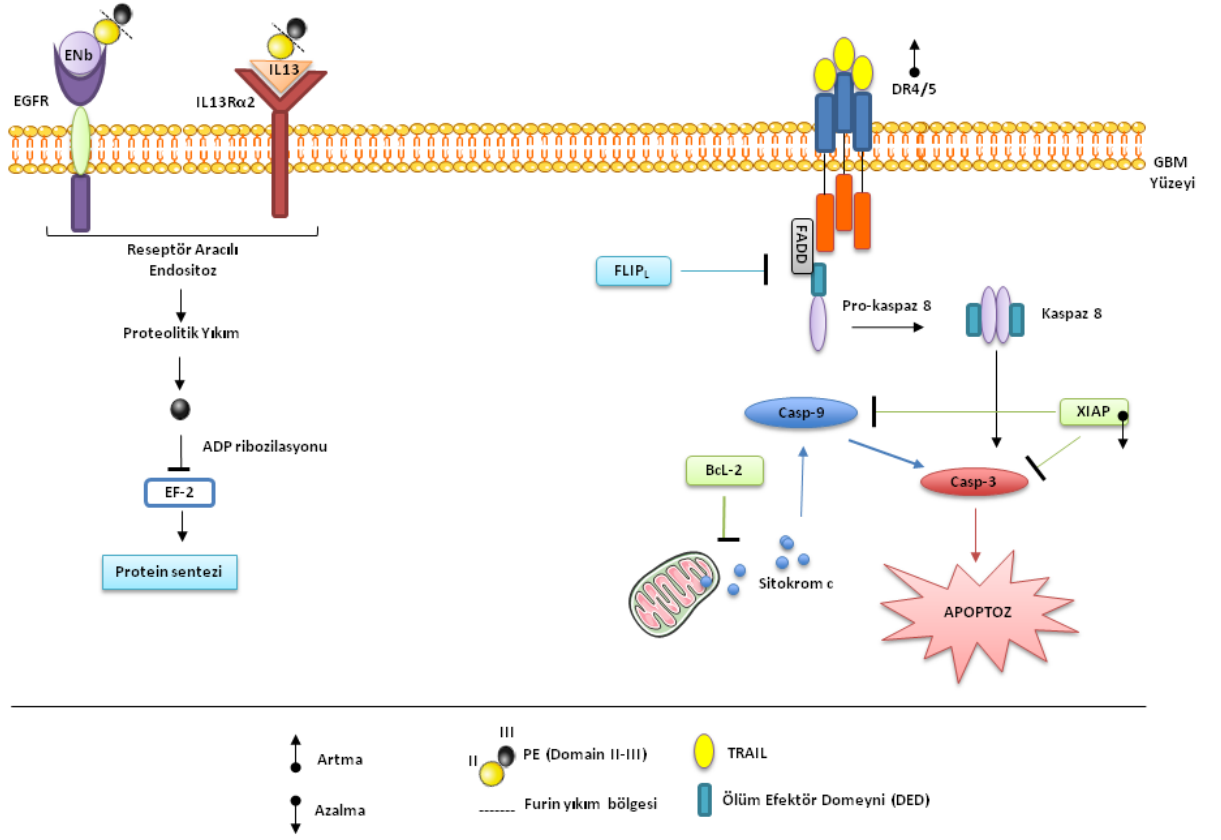


Şekil 4-23: IL13PE-TRAIL füzyonunun GBM hücreleri üzerinde terapötik etkisinin canlılık analizi ile gösterilmesi. A) LN229-IL13Rα2 ve B) LN229 hücrelerinde IL13PE-TRAIL füzyon proteininin hücre canlılığı üzerine etkisi ($p^{***} < 0,0001$).

Laboratuvarımızda oluşturduğumuz hedefli toksinlerin, GBM hücrelerini TRAIL'a duyarlı hale getirerek ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yollarını harekete geçirdiği, hem GBM hücre hatlarında hem de primer GBM hücrelerinde ölüm oranını anlamlı derecede artırdığı gösterildi. Sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere çift fonksiyonlu IL13PE-TRAIL füzyon protein oluşturuldu ve çift fonksiyonlu ölüm sinyalleri şematize edildi (Şekil 4-24). Ayrıca hedefli toksinlerin TRAIL duyarlılığı oluşturarak neden olduğu hücre ölüm mekanizmasına açıklık getirildi (Şekil 4-25).



Şekil 4-24: IL13PE-TRAIL füzyonunun GBM hücreleri üzerinde oluşturduğu çift fonksiyonlu etkinin şematik gösterimi. A) TRAIL taşıyan lentiviral vektöre IL13PE'nin klonlanması ile IL13PE-TRAIL füzyonu eldesi. B) IL13PE-TRAIL füzyonunun GBM hücrelerindeki çift fonksiyonlu etkisinin şematik gösterimi.



Şekil 4-25: Hedefli toksinler ile birlikte TRAIL uygulamasının GBM hücrelerinde oluşturduğu apoptotik ölüm mekanizması.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, glioblastoma multiforme (GBM) beyin tümörü hücrelerindeki reseptörlerden IL13R α 2 ve EGFR'a yönelen sırasıyla IL13-PE ve ENb-PE hedefli toksinlerini salgılayan taşıyıcılar olarak, toksine dirençli embriyonik böbrek hücre (HEK-293T) ve insan nöral kök hücre (hNSC) hatları oluşturulmuştur. Sonuçlarımıza göre, hedefli toksinler, bir dizi GBM hücresinde protein sentezini inhibe etmiş, hücre çoğalmasını durdurmuş ve hücre ölümüne neden olmuştur. Ayrıca subkutan oluşturulan tümörlerde hedefli toksinlerin oluşturduğu terapötik etki, hem protein sentezi hem de hücre canlılığı dinamikleri açısından eş zamanlı olarak görüntülenmiştir. Buna ek olarak, laboratuvarında oluşturduğumuz GBM tümörü cerrahi operasyonla çıkartılmış fare modelinde, hedefli toksinler salgılayan terapötik kök hücrelerin nüksünü yavaşlattığı ve farelerde sağkalım süresini artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, hedefli toksinlerin terapötik etkinliği primer GBM hücre kültürlerinde de gösterilerek çalışmanın klinik önemi ortaya konmuştur.

Pastan ve Weldon tarafından yapılan öncü çalışma ile hedefli toksinler, kanser tedavilerinde kullanılmak üzere klinik araştırmalara sunulmuştur. Böylece, pseudomonas ekzotoksin (PE) ile entegre edilmiş antikor fragmanları ve ligandlar çeşitli kanser türlerini hedef alacak şekilde oluşturularak malign tümörlerin tedavisinde denenmiştir [19]. Umut verici klinik öncesi sonuçlara rağmen, proteinlerin kısa yarı ömürleri ve tümör kütesine etkin bir şekilde gönderilemeyişi gibi problemler, hedefli toksinlerin insan tümörlerinin tedavisinde kullanılmasını engellemiştir. Tekrar eden GBM tümörlerinin tedavisinde kullanılmak üzere IL13-PE'nin faz III klinik denemeleri, standart tedavi yöntemlerine kıyasla önemli bir etki gösteremediği için başarısızlıkla sonuçlanmıştır [102]. Raporlara göre, kateterlerin sadece %68'i, IL13PE'nin tedavi etmede etkili olan konsantrasyonlarda aktarımına imkan sağlayacak şekilde yerleştirilebilmiştir.

Tümörü hedef alan lokal tedaviler için kök hücrelerin, "terapötik proteinler ile yüklü araçlar" olarak kullanılması hem çalışmamızın gerçekleştirilmiş olduğu Dr. Shah'ın labratuvarında yapılan önceki çalışmalarla hem de farklı araştırmacılarca gösterilmiştir [123-126]. Böylece bu çalışmada, PE taşıyan hedefli toksinlerin kök hücreler tarafından sürekli salınımı ile mevcut çalışmalardaki engelleri kaldırmak

hedeflenmiştir. Elongasyon faktörü-2 (EF-2)'nin mutant bir formunun toksine direnç oluşturduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [127, 128]. Bu mutant EF-2 (mEF-2) formunu taşıyan memeli hücreleri, difteri toksinini üretmek üzere modifiye edilebilmiştir [129]. Benzer strateji ile, laboratuvarımızda PE içeren hedefli toksinleri (ENb-PE ve IL13-PE) üreten toksine dirençli kök hücre hatları oluşturmak üzere, mEF-2 kodlayan tek zincirli oligonükleotidler (ssODN-mEF-2) dizayn edilmiştir. Bu hedefli toksinleri ifade eden kök hücrelerin sentetik ekstraselüler matriks (sECM) içine hapsedilerek, GBM tümörlü farelerde rezeksiyon sonrası kaviteye yerleştirilmesiyle terapötik proteinlerin devamlı bir şekilde lokal gönderimi sağlanmıştır. Böylece geri kalan tümör kütlesi üzerinde hedefli toksinler sürekli fonksiyon gösterebilmiştir.

GBM tümörlü hastaların tedavisinde ilk aşama, cerrahi operasyonla tümör kütlelerinin olabildiğince uzaklaştırılmasıdır [130, 131]. GBM tedavisinde klinik öncesi çalışmaların büyük çoğunluğu, herhangi bir tedavi edici işlem görmemiş solid tümörlerin üzerinde terapötik ajanların denenmesi esasına dayanır. Bu amaçla, GBM tümörü rezeksiyonunun kritik rolünü de göz önünde bulundurarak klinik uyarlanabilirliği olan tedavi yaklaşımı için deneylerde GBM tümörü rezeksiyonla çıkarılmış fare modeli oluşturulmuştur. Daha önce birkaç klinik öncesi çalışmada da rezeksiyon modeli kullanılmıştır [6, 132]. Bu modellerden farklı olarak çalışmamızda, GBM rezeksiyon modeli, daha önceki çalışmalarımızda da kullandığımız invazif olmayan biyoluminesan görüntüleme (BLI) olanakları ile birleştirildi [14, 121]. Böylece, kök hücrelerin ve tümör hücrelerinin hem floresan hem de biyoluminesan işaretleyicileri ifade etmesi ile 1) rezeksiyon sürecinin, 2) sECM içindeki IL13-PE salgılayan insan nöral kök hücrelerinin (hNSC-IL13-PE) doğrudan rezeksiyon kavitesine ulaşmasının, 3) hedefli toksinin arta kalan tümör kütlelerinde oluşturduğu geriletilici terapötik etkinin, 4) hedefli toksin gönderimi ile protein sentezi kinetiklerinin görüntülenmesi sağlanmıştır. Biyoluminesan görüntüleme ile sECM içine hapsedilen nöral kök hücrelerin en az 24sa rezeksiyon kavitesinde canlı olarak kalabildiği gösterilmiştir. Diğer taraftan, sECM içine hapsedilerek aktarımdan 72sa sonra rezeksiyon kavitesinde canlı kök hücre görüntülenememiştir. Deneylerde immün sistemi baskılanmış fareler kullanılmış olmasına rağmen, iki tür arasındaki uyumsuzluk nedeniyle insan hücreleri fare beyninde canlılığını sürdürememiş olabilir. Buradan hareketle, hedefli toksinleri salan fare kök hücrelerinin GBM tümörü çıkarılmış fare beynine nakledilmesiyle (syngeneic model) türler arası uyumsuzluğun önüne geçilebilir.

Ayrıca bu model ile hedefli toksinlerin tedavi edici etkisi de insanlardaki durumu taklit edebilecek sonuçlar verecektir.

Bu çalışma kapsamında, kanser hücrelerinde ifade edilen farklı iki reseptörü hedef alan iki ayrı hedefli toksin geliştirildi: IL13-PE ve ENb-PE. Bu hedefli toksinlerden IL13-PE, insan kanser hücrelerinin pek çoğunda ve GBM'nin yaklaşık %50'sinde eksprese edilen interlökin-13 reseptörünün bir çeşidi olan IL13R α 2'ye, normal reseptörüne (IL13R) oranla daha yüksek afinite ile bağlanmaktadır [133-136]. Glioma oluşumunda epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) yolağı oldukça aktif olup EGFR'nin mutant formları tüm GBM'lerin %70'inde görülmektedir [137]. Bulgularımıza göre, hedefli toksinlerin etkinliği ilgili reseptörün hücreler tarafından ekspresyon düzeyi ile doğru orantılıdır. Ancak EGFR'nin tüm vücut hücrelerinde ifade edilmesi [138] ve IL13-PE'nin kanser hücrelerini daha seçici olması nedeniyle rezeksiyon modelinde hedefli toksinlerden IL13-PE'nin terapötik etkinliği araştırılmıştır. Yine rezeksiyon modelinde GBM hücrelerinden U87'nin kullanılmasının 3 nedeni vardır : 1) iyi tanımlanmış bilinen bir GBM hücre soyudur, 2) patofizyolojik duruma benzer şekilde orta derecede IL13R α 2 ifade eder, 3) ve nodüler kütle şeklinde büyüme göstermesi ile rezeksiyon ile çıkarılması kolaydır. Diğer yandan, U87 pek çok GBM tümörü araştırmalarında kullanılmasına rağmen, ileri derecede invaziv tümör olması gibi nedenler, tüm GBM tümörleri adına ideal bir model oluşturmasını kısıtlamaktadır [139].

Hedefli toksinlere ilişkin tedavilerde rastlanan bir diğer durum ise hedeflenen reseptörün kanser hücrelerinde ifade edilmeyişi veya bu hücrelerde heterojenik reseptör popülasyonlarının bulunmasıdır. Çalışmada kullandığımız GBM hücrelerinin %50'si IL13R α 2'yi eksprese etmeyip toksin tedavisine cevap vermemiştir. Ancak, histon diasetilaz inhibitörlerinin pankreatik kanser hücrelerinde IL13R α 2'nin ekspresyon düzeylerinde artışa neden olduğu ve hücreleri IL13-PE'ye duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir [140]. Dolayısıyla epigenetik mekanizmaları hedef alan inhibitörler gibi hedefli toksin duyarlılığına neden olan ajanlar ile hedefli toksin tedavileri optimize edilebilir. Toksine direnci azaltabilecek peptit formda ajanların ve birden fazla reseptöre ilişkin hedefli toksinlerin kök hücrelerce salınması ile heterojenik yapıdaki kanser hücre popülasyonları bulunduğu yerde (in situ) hedeflenebilir. Bununla birlikte, bulgularımıza göre hedefli toksinlerin primer GBM hücrelerinde de önemli derecede terapötik etkinlik

göstermesi, bu tedavi yaklaşımının klinik önemini vurgulamaktadır. Diğer taraftan reseptör ekspresyonuna dayanan bir terapötik yönelim olduğundan, hedefli toksinin bağlandığı reseptörü bulunduran diğer kanser türlerine de uyarlanabilirliği açısından önem taşımaktadır.

Hedefli toksinleri salan kök hücrelerin klinik uygulanabilirliği için ise, rezekte edilen tümör kütlelerinin moleküler profili çıkarılmalı, hedeflenebilecek reseptörler ve en uygun kombinasyonlar belirlenip bu ajanları üretebilecek kök hücreler oluşturulmalıdır. Fare beynine kıyasla insan beyninde rezeksiyon kavitesi oldukça fazla sayıda terapötik kök hücre nakli gerektirecektir ki bu durum, rezeksiyon kavitesinin, jel (sECM) içerisine hapsedilmiş hücrelerce kaplanması ve kavite merkezine tedavi edici faktörlerin yerleştirilmesi ile sağlanabilir.

Dr. Horita, EGFR hedefli difteri toksini olan DT-EGF'in anti-apoptotik FLIP proteini seviyelerini azaltarak kanser hücrelerinin, apoptoz indükleyici sitokinlerden TRAIL'a (tümör nekroz faktör bağımlı apoptoz indükleyici ligand) olan direncini kırdığını göstermiştir [141] Hedefli toksinlerle yapılan çalışmalarda benzer etki, melanoma gibi kanser hücrelerinde de gösterilmiştir. Biz de bu çalışma kapsamında, laboratuvarıda ürettiğimiz IL13-PE ve ENb-PE hedefli toksinleri, TRAIL ile kombine ederek çeşitli GBM hücrelerindeki terapötik yanıtı ve bu yanıtın moleküler mekanizmasını araştırdık. Sonuçlarımıza göre hedefli toksinler, TRAIL'a direnç gösteren hem GBM hücre soylarını hem de primer GBM hücrelerini TRAIL'a duyarlı hale getirmiş ve anlamlı derecede hücre ölümüne sebep olmuştur.

TRAIL, sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerinde ölüm sinyallerini tetikleyen bilinen en etkili sitokindir. Şimdiye kadar yapılan klinik çalışmalarda TRAIL, Faz I ve II denemelerinde anlamlı sonuçlar vermediği için TRAIL tedavisinde Faz III denemelerine geçilememiştir [142] Ayrıca, hem bu çalışmada hem de diğerlerinde gösterilmiştir ki kanser hücreleri, TRAIL tedavisine çeşitli derecelerde direnç göstererek farklı yanıt vermektedir. Buradan hareketle, TRAIL ile kanser tedavisinde kombinasyon tedavilerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla, tümör oluşumunu engellemek için TRAIL duyarlılığı oluşturan birçok ajan ile TRAIL'ın kombinasyon tedavisi çalışmaları yapılmıştır [143, 144]. Fakat bu yaklaşımın klinik uygulamalarına, terapötiklerin kısa yarı ömürleri, kan-beyin bariyeri, sağlık dokuda oluşan toksisite, ve yetersiz terapötik etkinlik gibi nedenler engel oluşturmıştır. Ayrıca TRAIL duyarlılığı

oluşturduğu bilinen ajanların hemen hemen hepsi sentetik moleküllerdir ve dolayısıyla biyolojik olarak sentezlenebilir formda değildirler [12, 144]. Böylece bu çalışmamız ile, hücreler tarafından üretilen hedefli toksinler ve TRAIL'ın kombinasyonu ile, GBM tedavisinde uygulanabilir bir yaklaşım ortaya konulmuştur. Böylece, 1) normal doku hasarının engellenmesi, 2) TRAIL direncinin ortadan kaldırılması, 3) terapötiklerin *in situ* olarak sürekli üretimi, 4) tümör dokusunun yeniden oluşumunu engelleyen cerrahi rezeksiyon ve tümör dokusunu biyogörüntülemeyi bir araya getiren kök hücre aracılı hedefli toksin ve TRAIL tedavisi daha ileri araştırmalara sunulmuştur.

Tümör hücrelerinin TRAIL tedavisine düşük yanıt vermesi ya da hiç yanıt vermemesinin en belirgin sebeplerinden birisi, TRAIL'ın bağlandığı hücre ölüm reseptörlerinden DR4/5'in kanser hücrelerinde düşük düzeylerde ifade edilmesidir [142]. Ayrıca, TRAIL duyarlılığı oluşturan bir ajan, apoptotik kaskadın alt basamaklarında etkili olan anti-apoptotik proteinlerin seviyelerini de değiştirerek fonksiyon gösterebilir. Sonuçlarımıza göre, hedefli toksinler IL13-PE ve ENb-PE, hücre kültüründe 24sa içerisinde TRAIL'a oldukça dirençli GBM hücrelerini dahi TRAIL'a duyarlı hale getirmiş ve TRAIL kültür kaplarına ilave edildikten sonra da 24 saatten az bir sürede hücreler canlılığını yitirmiştir. Bu zaman aralığında TRAIL duyarlılığına sebep olabilecek protein seviyelerini araştırdığımızda ise hedefli toksinlerle muamele edilen GBM hücrelerinde DR4/5 seviyelerinde artış, anti-apoptotik proteinlerden FLIP (FLICE-benzeri inhibitör protein) ve XIAP'de azalma tespit edildi. Böylece, TRAIL duyarlılığı oluştururken hedefli toksinlerin DR4/5 dinamiklerinde değişime sebep olduğu ilk defa bu çalışmamız ile gösterilmiştir. Hücre içinde apoptoz blokajı oluşturan FLIP_L (FLIP'in uzun formu) seviyelerindeki azalma, öncül kaspaz-8 aktivitesini serbest bırakarak kaspazın kesilmesine ve böylece de dışsal (ekstrinsik) apoptotik yolağın harekete geçmesine izin vermiştir. Diğer taraftan IAP (apoptoz inhibe edici protein) ailesi proteinlerinden XIAP seviyesindeki azalma, kaspaz 3 ve kaspaz 9 üzerindeki blokajın kalkmasına ve hücre içi ölüm sinyallerinin artmasına imkan sağlamıştır.

Hedefli toksinlerin, yönedikleri reseptörün seviyeleri ile TRAIL duyarlılığı arasındaki ilişkiyi araştırmak üzere, normal şartlarda IL13R α 2 ifade etmeyen TRAIL'a oldukça dirençli LN229 hücreleri ile IL13R α 2 ifade eden LN229-IL13R α 2 hücre hattı oluşturularak bu hücreler, IL13-PE ve TRAIL ile muamele edildi. Reseptörünün varlığında IL13-PE, bu hücreleri (LN229-IL13R α 2), TRAIL'a duyarlı hale getirmiştir.

Fakat normal LN229 hücrelerinde IL13R α 2 reseptörü bulunmadığı için, IL13PE uygulaması TRAIL duyarlılığı oluşturmamıştır. Böylece sonuçlarımız, hedefli toksinler ve TRAIL'ın, bağlandıkları reseptörlerin ifade edildiği diğer kanser hücrelerinde de TRAIL'a duyarlılık oluşturabileceğini ve reseptör seviyeleri ile terapötik etkinin ilişkili olduğunu göstermiştir. TRAIL'a daha az dirençli olan GBM hücre soylarından U251 ile yaptığımız çalışmalar sonucunda, hedefli toksinler ile kombine edilerek uygulanan TRAIL'ın, bu hücrelerdeki ölüm oranını, yalnızca TRAIL uygulanan hücrelere kıyasla anlamlı derecede arttırdığı tespit edildi. Sonuçlarımıza göre, hedefli toksinlerle kombine edilerek uygulanan TRAIL grubunda hücre ölüm sinyallerinin artışına, kaspaz-9 aracılı apoptozun yer alması neden olmuştur. Hücre canlılığı analizinin total metabolik aktiviteyi ölçerek yapıldığı göz önünde bulundurulursa, hücre ölümündeki bu artışın tek bir hücre davranışı mı yoksa tüm hücrelerin ortak davranışları mı olduğu sorusunu sormak gerekir. TRAIL'a belirli bir derecede duyarlılık gösteren U251 hücrelerinin TRAIL'a dirençli bir alt popülasyonunun olduğu ve DR4/5 reseptör seviyelerindeki artışa imkan sağlayan hedefli toksinler ile bu hücrelerdeki direncin kırıldığı söylenebilir.

Hedefli toksinler protein sentezini inhibe ederek ve hücre çoğalmasını bloke ederek de GBM canlılığını tehdit etmektedir. Dolayısıyla, TRAIL ile kombine edilerek hedefli toksinlerle muamele edilen ve hedefli toksinlere anlamlı yanıt veren GBM hücreleri, ayrıca hedefli toksinlerin tek başına fonksiyonları ile de hücre ölümüne yönlendirmiştir. GBM hücrelerinin hedefli toksinler ile TRAIL'a duyarlı hale gelmesinin ardından TRAIL, hücreleri 24sa içerisinde kaspaz-8 aracılı ölüme sürüklemiştir. Buna ek olarak hedefli toksinler, 48sa sonra protein sentezi dinamiklerini etkileyerek hücrelerde ölüm sinyallerini artırmıştır. Böylece hedefli toksinler ve TRAIL, farklı hücresel mekanizmaları tetikleyerek sinerjik bir etki ile GBM hücre ölümüne sebep olmaktadır. Genel olarak, hedefli toksinler ve TRAIL kombinasyonu, GBM hücrelerinde ölümü, hedefli toksinlerin yönlendirdiği iki ayrı mekanizma ile gerçekleştirmektedir: 1) 24sa içerisinde TRAIL'a duyarlılık oluşturup TRAIL aracılı apoptoz ile hücre ölümü, 2) 48sa sonrasında protein sentezinin bloke edilmesini takip eden hücre ölümü.

TRAIL ve hedefli toksin kombinasyonu ile yaptığımız çalışmalar, kanser hücrelerini hedefleyebilen bu iki terapötik ajanın, GBM tedavisinde kullanılması için umut verici bir yaklaşım olmuştur. Buradan hareketle çalışmamızda, TRAIL'a direnç

gösteren primer GBM hücreleri (GBM23 ve GBM 64) üzerinde de “TRAIL ve hedefli toksin (hem IL13-PE hem de ENb-PE)” kombinasyonunun terapötik etkisi araştırılmış ve GBM hücre soylarına benzer şekilde anlamlı derecede hücre ölümüne neden olduğu saptanmıştır. Primer GBM hücrelerindeki ölüm mekanizmasının analizi yapıldığında, kaspaz-8 ve kaspaz-9 kesilmesinin tespiti ile bu iki terapötüğün sebep olduğu hücre ölümü mekanizmasının, GBM hücre soylarındaki gibi gerçekleştiği teyit edilmiştir. Böylece, hedefli toksinler ve TRAIL kombinasyonu çalışmasının klinik uyarlanabilirliği ortaya konmuştur. Ayrıca kök hücrelerden salınan hedefli toksinlerin de hedefli toksinler içeren medium uygulaması ile aynı fonksiyonel etkiyi oluşturup TRAIL duyarlılığı sağlaması, kök hücre aracılı hedefli toksin ve TRAIL tedavisinin etkinliğini göstermektedir.

Sonuç olarak, çalışmamız ışığında toksine ve TRAIL’a dirençli kök hücreler oluşturularak, her iki terapötik molekülü üretebilen kök hücrelerin elde edilmesi ile, anti-kanser ajanlara direnç oluşması, moleküllerin yarı ömrünün kısa oluşu, sağlıklı dokuda oluşabilecek hasar gibi engellerin önüne geçebilecek bir GBM tedavi şekli geliştirilebilecektir. Ayrıca, hedefli toksinlerin terapötik etkileri ile bunun hücresel mekanizmaları, reseptörleri ifade eden diğer kanser türlerinde de araştırılabilecek ve TRAIL’a ek olarak hedefli toksinlerle kombinasyonlar ile kanser tedavisinde kullanılan terapötik ajanlara karşı direnç oluşmasının önüne geçilebilecektir.

KAYNAKLAR

1. Lamborn, K.R., et al., *Progression-free survival: an important end point in evaluating therapy for recurrent high-grade gliomas*. Neuro Oncol, 2008. **10**(2): p. 162-70.
2. Auffinger, B., et al., *New therapeutic approaches for malignant glioma: in search of the Rosetta stone*. F1000 Med Rep, 2012. **4**: p. 18.
3. Patel, M., et al., *Molecular targeted therapy in recurrent glioblastoma: current challenges and future directions*. Expert Opin Investig Drugs, 2012. **21**(9): p. 1247-66.
4. Carlsson, S.K., S.P. Brothers, and C. Wahlestedt, *Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme*. EMBO Mol Med, 2014.
5. Hingtgen, S., et al., *A first-generation multi-functional cytokine for simultaneous optical tracking and tumor therapy*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40234.
6. Kauer, T.M., et al., *Encapsulated therapeutic stem cells implanted in the tumor resection cavity induce cell death in gliomas*. Nat Neurosci, 2012. **15**(2): p. 197-204.
7. Carney, B.J. and K. Shah, *Migration and fate of therapeutic stem cells in different brain disease models*. Neuroscience, 2011. **197**: p. 37-47.
8. Shah, K., *Mesenchymal stem cells engineered for cancer therapy*. Adv Drug Deliv Rev, 2012. **64**(8): p. 739-48.
9. Shah, K., *Imaging fate of stem cells at a cellular resolution in the brains of mice*. Methods Mol Biol, 2011. **680**: p. 91-101.
10. Shah, K., et al., *In vivo imaging of S-TRAIL-mediated tumor regression and apoptosis*. Mol Ther, 2005. **11**(6): p. 926-31.
11. Shah, K., et al., *Real-time imaging of TRAIL-induced apoptosis of glioma tumors in vivo*. Oncogene, 2003. **22**(44): p. 6865-72.
12. Stuckey, D.W. and K. Shah, *TRAIL on trial: preclinical advances in cancer therapy*. Trends Mol Med, 2013. **19**(11): p. 685-94.
13. Shah, K., et al., *Inducible release of TRAIL fusion proteins from a proapoptotic form for tumor therapy*. Cancer Res, 2004. **64**(9): p. 3236-42.
14. Shah, K., et al., *Bimodal viral vectors and in vivo imaging reveal the fate of human neural stem cells in experimental glioma model*. J Neurosci, 2008. **28**(17): p. 4406-13.
15. Aleynik, A., et al., *Stem cell delivery of therapies for brain disorders*. Clin Transl Med, 2014. **3**: p. 24.
16. Moolten, F.L. and S.R. Cooperband, *Selective destruction of target cells by diphtheria toxin conjugated to antibody directed against antigens on the cells*. Science, 1970. **169**(3940): p. 68-70.
17. Chandramohan, V., et al., *Toxin-based targeted therapy for malignant brain tumors*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 480429.
18. Madhumathi, J. and R.S. Verma, *Therapeutic targets and recent advances in protein immunotoxins*. Curr Opin Microbiol, 2012. **15**(3): p. 300-9.

19. Weldon, J.E. and I. Pastan, *A guide to taming a toxin--recombinant immunotoxins constructed from Pseudomonas exotoxin A for the treatment of cancer*. FEBS J, 2011. **278**(23): p. 4683-700.
20. Wick, M.J., et al., *Structure, function, and regulation of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A*. Annu Rev Microbiol, 1990. **44**: p. 335-63.
21. Pastrana, D.V., et al., *LRP 1 B functions as a receptor for Pseudomonas exotoxin*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1741**(3): p. 234-9.
22. Feng, X.L., et al., *Expression, purification and characterization of recombinant toxins consisting of truncated gastrin 17 and pseudomonas exotoxin*. Protein Pept Lett, 2015. **22**(2): p. 193-201.
23. Soldatenkova, A.V., et al., *[Production and properties evaluation of monoclonal antibodies against Pseudomonas aeruginosa exotoxin A]*. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 2014(1): p. 30-5.
24. Wolf, P. and U. Elsasser-Beile, *Pseudomonas exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent*. Int J Med Microbiol, 2009. **299**(3): p. 161-76.
25. Vigneswaran, K., S. Neill, and C.G. Hadjipanayis, *Beyond the World Health Organization grading of infiltrating gliomas: advances in the molecular genetics of glioma classification*. Ann Transl Med, 2015. **3**(7): p. 95.
26. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2010*. CA Cancer J Clin, 2010. **60**(5): p. 277-300.
27. Ichimura, K., Y. Narita, and C.E. Hawkins, *Diffusely infiltrating astrocytomas: pathology, molecular mechanisms and markers*. Acta Neuropathol, 2015. **129**(6): p. 789-808.
28. Louis, D.N., *Molecular pathology of malignant gliomas*. Annu Rev Pathol, 2006. **1**: p. 97-117.
29. Aldape, K., et al., *Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers*. Acta Neuropathol, 2015. **129**(6): p. 829-48.
30. Elsamadicy, A.A., et al., *Radiation-Induced Malignant Gliomas: A Current Review*. World Neurosurg, 2015. **83**(4): p. 530-542.
31. Dos Santos, M.A., et al., *Systematic review and meta-analysis of phase I/II targeted therapy combined with radiotherapy in patients with glioblastoma multiforme: quality of report, toxicity, and survival*. J Neurooncol, 2015.
32. Liu, Y., et al., *Long-term temozolomide might be an optimal choice for patient with multifocal glioblastoma, especially with deep-seated structure involvement: a case report and literature review*. World J Surg Oncol, 2015. **13**: p. 142.
33. Carlson, J.A., et al., *Hypofractionated-intensity modulated radiotherapy (hypo-IMRT) and temozolomide (TMZ) with or without bevacizumab (BEV) for newly diagnosed glioblastoma multiforme (GBM): a comparison of two prospective phase II trials*. J Neurooncol, 2015.
34. Acerbi, F., et al., *Fluorescein-guided surgery for malignant gliomas: a review*. Neurosurg Rev, 2014. **37**(4): p. 547-57.
35. Laperriere, N., et al., *Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review*. Radiother Oncol, 2002. **64**(3): p. 259-73.

36. Keles, G.E., et al., *Volume of residual disease as a predictor of outcome in adult patients with recurrent supratentorial glioblastomas multiforme who are undergoing chemotherapy*. J Neurosurg, 2004. **100**(1): p. 41-6.
37. Foley, C.P., et al., *Intra-arterial delivery of AAV vectors to the mouse brain after mannitol mediated blood brain barrier disruption*. J Control Release, 2014. **196**: p. 71-8.
38. Youn, S.W., et al., *Feasibility and Safety of Intraarterial Pericyte Progenitor Cell Delivery Following Mannitol-Induced Transient Blood-Brain Barrier Opening in a Canine Model*. Cell Transplant, 2014.
39. Lawson, H.C., et al., *Interstitial chemotherapy for malignant gliomas: the Johns Hopkins experience*. J Neurooncol, 2007. **83**(1): p. 61-70.
40. Valtonen, S., et al., *Interstitial chemotherapy with carmustine-loaded polymers for high-grade gliomas: a randomized double-blind study*. Neurosurgery, 1997. **41**(1): p. 44-8; discussion 48-9.
41. Westphal, M., et al., *Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial*. Acta Neurochir (Wien), 2006. **148**(3): p. 269-75; discussion 275.
42. Sarin, H., *Recent progress towards development of effective systemic chemotherapy for the treatment of malignant brain tumors*. J Transl Med, 2009. **7**: p. 77.
43. Jain, K.K., *Nanobiotechnology-based strategies for crossing the blood-brain barrier*. Nanomedicine (Lond), 2012. **7**(8): p. 1225-33.
44. Jain, K.K., *Nanobiotechnology-based drug delivery to the central nervous system*. Neurodegener Dis, 2007. **4**(4): p. 287-91.
45. Yamanaka, R., *Dendritic-cell- and peptide-based vaccination strategies for glioma*. Neurosurg Rev, 2009. **32**(3): p. 265-73; discussion 273.
46. Hickey, M.J., et al., *Cellular and vaccine therapeutic approaches for gliomas*. J Transl Med, 2010. **8**: p. 100.
47. Rainov, N.G. and C.M. Kramm, *Recombinant retrovirus vectors for treatment of malignant brain tumors*. Int Rev Neurobiol, 2003. **55**: p. 185-203.
48. Germano, I.M., et al., *Adenovirus/herpes simplex-thymidine kinase/ganciclovir complex: preliminary results of a phase I trial in patients with recurrent malignant gliomas*. J Neurooncol, 2003. **65**(3): p. 279-89.
49. Nakano, I., *Stem cell signature in glioblastoma: therapeutic development for a moving target*. J Neurosurg, 2015. **122**(2): p. 324-30.
50. Aboody, K., et al., *Translating stem cell studies to the clinic for CNS repair: current state of the art and the need for a Rosetta stone*. Neuron, 2011. **70**(4): p. 597-613.
51. Tang, Y., et al., *In vivo tracking of neural progenitor cell migration to glioblastomas*. Hum Gene Ther, 2003. **14**(13): p. 1247-54.
52. Redjal, N., Y. Zhu, and K. Shah, *Combination of Systemic Chemotherapy with Local Stem Cell Delivered S-TRAIL in Resected Brain Tumors*. Stem Cells, 2014.
53. Choi, S.H., et al., *Antiangiogenic variant of TSP-1 targets tumor cells in glioblastomas*. Mol Ther, 2015. **23**(2): p. 235-43.

54. van de Water, J.A., et al., *Therapeutic stem cells expressing variants of EGFR-specific nanobodies have antitumor effects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(41): p. 16642-7.
55. King, G.D., et al., *Gene therapy and targeted toxins for glioma*. Curr Gene Ther, 2005. **5**(6): p. 535-57.
56. Wayne, A.S., et al., *Immunotoxins for leukemia*. Blood, 2014. **123**(16): p. 2470-7.
57. Kreitman, R.J. and I. Pastan, *Immunotoxins in the treatment of hematologic malignancies*. Curr Drug Targets, 2006. **7**(10): p. 1301-11.
58. Dosio, F., et al., *Advances in anticancer antibody-drug conjugates and immunotoxins*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2014. **9**(1): p. 35-65.
59. Frankel, A.E., E.P. Tagge, and M.C. Willingham, *Clinical trials of targeted toxins*. Semin Cancer Biol, 1995. **6**(5): p. 307-17.
60. Kawakami, M., K. Kawakami, and R.K. Puri, *Interleukin-4-Pseudomonas exotoxin chimeric fusion protein for malignant glioma therapy*. J Neurooncol, 2003. **65**(1): p. 15-25.
61. Nicholls, P.J. and R.J. Youle, *The structure of Pseudomonas exotoxin A as a guide to rational design*. Targeted Diagn Ther, 1992. **7**: p. 439-46.
62. Kreitman, R.J., *Chimeric fusion proteins--Pseudomonas exotoxin-based*. Curr Opin Investig Drugs, 2001. **2**(9): p. 1282-93.
63. Hwang, J., et al., *Functional domains of Pseudomonas exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in E. coli*. Cell, 1987. **48**(1): p. 129-36.
64. Hwang, J. and M.S. Chen, *Structure and function relationship of Pseudomonas exotoxin A. An immunochemical study*. J Biol Chem, 1989. **264**(4): p. 2379-84.
65. Nelms, K., et al., *The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 701-38.
66. Liu, H., et al., *In vivo expression of the interleukin 4 receptor alpha by astrocytes in epilepsy cerebral cortex*. Cytokine, 2000. **12**(11): p. 1656-61.
67. Kawakami, K., M. Kawakami, and R.K. Puri, *Overexpressed cell surface interleukin-4 receptor molecules can be successfully targeted for antitumor cytotoxin therapy*. Crit Rev Immunol, 2001. **21**(1-3): p. 299-310.
68. Puri, R.K., et al., *Preclinical development of a recombinant toxin containing circularly permuted interleukin 4 and truncated Pseudomonas exotoxin for therapy of malignant astrocytoma*. Cancer Res, 1996. **56**(24): p. 5631-7.
69. Puri, R.K., *Development of a recombinant interleukin-4-Pseudomonas exotoxin for therapy of glioblastoma*. Toxicol Pathol, 1999. **27**(1): p. 53-7.
70. Minty, A., et al., *Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses*. Nature, 1993. **362**(6417): p. 248-50.
71. Zurawski, G. and J.E. de Vries, *Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells*. Immunol Today, 1994. **15**(1): p. 19-26.
72. Skinnider, B.F., U. Kapp, and T.W. Mak, *Interleukin 13: a growth factor in hodgkin lymphoma*. Int Arch Allergy Immunol, 2001. **126**(4): p. 267-76.
73. Jiang, H., M.B. Harris, and P. Rothman, *IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(6 Pt 1): p. 1063-70.

74. Debinski, W., et al., *Human glioma cells overexpress receptors for interleukin 13 and are extremely sensitive to a novel chimeric protein composed of interleukin 13 and pseudomonas exotoxin*. Clin Cancer Res, 1995. **1**(11): p. 1253-8.
75. Debinski, W., et al., *A novel chimeric protein composed of interleukin 13 and Pseudomonas exotoxin is highly cytotoxic to human carcinoma cells expressing receptors for interleukin 13 and interleukin 4*. J Biol Chem, 1995. **270**(28): p. 16775-80.
76. Debinski, W., et al., *Receptor for interleukin 13 is abundantly and specifically over-expressed in patients with glioblastoma multiforme*. Int J Oncol, 1999. **15**(3): p. 481-6.
77. Bernard, J., et al., *Expression of interleukin 13 receptor in glioma and renal cell carcinoma: IL13Ralpha2 as a decoy receptor for IL13*. Lab Invest, 2001. **81**(9): p. 1223-31.
78. Ripley, D., et al., *Differential expression of interleukins IL-13 and IL-15 in normal ovarian tissue and ovarian carcinomas*. Gynecol Oncol, 2004. **92**(3): p. 761-8.
79. Castro, M.G., et al., *Gene therapy and targeted toxins for glioma*. Curr Gene Ther, 2011. **11**(3): p. 155-80.
80. Citri, A. and Y. Yarden, *EGF-ERBB signalling: towards the systems level*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(7): p. 505-16.
81. Lo, H.W., *EGFR-targeted therapy in malignant glioma: novel aspects and mechanisms of drug resistance*. Curr Mol Pharmacol, 2010. **3**(1): p. 37-52.
82. Lo, H.W. and M.C. Hung, *Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival*. Br J Cancer, 2006. **94**(2): p. 184-8.
83. Sugawa, N., et al., *Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(21): p. 8602-6.
84. Wong, A.J., et al., *Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(19): p. 6899-903.
85. Martinelli, E., et al., *Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy*. Clin Exp Immunol, 2009. **158**(1): p. 1-9.
86. Sato, J.D., et al., *Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors*. Mol Biol Med, 1983. **1**(5): p. 511-29.
87. Dolk, E., et al., *Induced refolding of a temperature denatured llama heavy-chain antibody fragment by its antigen*. Proteins, 2005. **59**(3): p. 555-64.
88. Holliger, P. and P.J. Hudson, *Engineered antibody fragments and the rise of single domains*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(9): p. 1126-36.
89. Muyldermans, S., *Single domain camel antibodies: current status*. J Biotechnol, 2001. **74**(4): p. 277-302.
90. Vaneycken, I., et al., *Immuno-imaging using nanobodies*. Curr Opin Biotechnol, 2011. **22**(6): p. 877-81.

91. Stijlemans, B., et al., *Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm.* J Biol Chem, 2004. **279**(2): p. 1256-61.
92. Roovers, R.C., et al., *Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies.* Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(3): p. 303-317.
93. Hall, W.A., *Immunotoxin therapy.* Neurosurg Clin N Am, 1996. **7**(3): p. 537-46.
94. Pastan, I., et al., *Immunotoxin therapy of cancer.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(7): p. 559-65.
95. Zovickian, J., V.G. Johnson, and R.J. Youle, *Potent and specific killing of human malignant brain tumor cells by an anti-transferrin receptor antibody-ricin immunotoxin.* J Neurosurg, 1987. **66**(6): p. 850-61.
96. Rand, R.W., et al., *Intratumoral administration of recombinant circularly permuted interleukin-4-Pseudomonas exotoxin in patients with high-grade glioma.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(6): p. 2157-65.
97. Weber, F., et al., *Safety, tolerability, and tumor response of IL4-Pseudomonas exotoxin (NBI-3001) in patients with recurrent malignant glioma.* J Neurooncol, 2003. **64**(1-2): p. 125-37.
98. Weber, F.W., et al., *Local convection enhanced delivery of IL4-Pseudomonas exotoxin (NBI-3001) for treatment of patients with recurrent malignant glioma.* Acta Neurochir Suppl, 2003. **88**: p. 93-103.
99. Vogelbaum, M.A., et al., *Convection-enhanced delivery of cintredekin besudotox (interleukin-13-PE38QQR) followed by radiation therapy with and without temozolomide in newly diagnosed malignant gliomas: phase 1 study of final safety results.* Neurosurgery, 2007. **61**(5): p. 1031-7; discussion 1037-8.
100. Kunwar, S., et al., *Direct intracerebral delivery of cintredekin besudotox (IL13-PE38QQR) in recurrent malignant glioma: a report by the Cintredekin Besudotox Intraparenchymal Study Group.* J Clin Oncol, 2007. **25**(7): p. 837-44.
101. Sampson, J.H., et al., *Intracerebral infusate distribution by convection-enhanced delivery in humans with malignant gliomas: descriptive effects of target anatomy and catheter positioning.* Neurosurgery, 2007. **60**(2 Suppl 1): p. ONS89-98; discussion ONS98-9.
102. Kunwar, S., et al., *Phase III randomized trial of CED of IL13-PE38QQR vs Gliadel wafers for recurrent glioblastoma.* Neuro Oncol, 2010. **12**(8): p. 871-81.
103. Laske, D.W., R.J. Youle, and E.H. Oldfield, *Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors.* Nat Med, 1997. **3**(12): p. 1362-8.
104. Weaver, M. and D.W. Laske, *Transferrin receptor ligand-targeted toxin conjugate (Tf-CRM107) for therapy of malignant gliomas.* J Neurooncol, 2003. **65**(1): p. 3-13.
105. Sampson, J.H., et al., *Tumor-specific immunotherapy targeting the EGFRvIII mutation in patients with malignant glioma.* Semin Immunol, 2008. **20**(5): p. 267-75.
106. Sampson, J.H., et al., *Progress report of a Phase I study of the intracerebral microinfusion of a recombinant chimeric protein composed of transforming growth factor (TGF)-alpha and a mutated form of the Pseudomonas exotoxin*

- termed PE-38 (TP-38) for the treatment of malignant brain tumors. *J Neurooncol*, 2003. **65**(1): p. 27-35.
107. Sampson, J.H., et al., *Sustained radiographic and clinical response in patient with bifrontal recurrent glioblastoma multiforme with intracerebral infusion of the recombinant targeted toxin TP-38: case study*. *Neuro Oncol*, 2005. **7**(1): p. 90-6.
 108. Sampson, J.H., et al., *Intracerebral infusion of an EGFR-targeted toxin in recurrent malignant brain tumors*. *Neuro Oncol*, 2008. **10**(3): p. 320-9.
 109. Hengartner, M.O., *Programmed cell death in invertebrates*. *Curr Opin Genet Dev*, 1996. **6**(1): p. 34-8.
 110. Ashkenazi, A., *Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists*. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. **7**(12): p. 1001-12.
 111. Hersey, P. and X.D. Zhang, *How melanoma cells evade trail-induced apoptosis*. *Nat Rev Cancer*, 2001. **1**(2): p. 142-50.
 112. Sheridan, J.P., et al., *Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors*. *Science*, 1997. **277**(5327): p. 818-21.
 113. Duebgen, M., et al., *Stem cells loaded with multimechanistic oncolytic herpes simplex virus variants for brain tumor therapy*. *J Natl Cancer Inst*, 2014. **106**(6): p. dju090.
 114. Martinez-Quintanilla, J., et al., *Encapsulated stem cells loaded with hyaluronidase-expressing oncolytic virus for brain tumor therapy*. *Mol Ther*, 2015. **23**(1): p. 108-18.
 115. Attar, R., et al., *TRAIL based therapy: overview of mesenchymal stem cell based delivery and miRNA controlled expression of TRAIL*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014. **15**(16): p. 6495-7.
 116. Du, W., et al., *Targeting c-Met receptor overcomes TRAIL-resistance in brain tumors*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e95490.
 117. Ko, H., et al., *Delphinidin sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis, by inducing DR5 and causing caspase-mediated HDAC3 cleavage*. *Oncotarget*, 2015. **6**(12): p. 9970-84.
 118. Arizono, Y., et al., *A mechanism of resistance to TRAIL/Apo2L-induced apoptosis of newly established glioma cell line and sensitisation to TRAIL by genotoxic agents*. *Br J Cancer*, 2003. **88**(2): p. 298-306.
 119. Bagci-Onder, T., et al., *A dual PI3K/mTOR inhibitor, PI-103, cooperates with stem cell-delivered TRAIL in experimental glioma models*. *Cancer Res*, 2011. **71**(1): p. 154-63.
 120. Kock, N., et al., *Tumor therapy mediated by lentiviral expression of shBcl-2 and S-TRAIL*. *Neoplasia*, 2007. **9**(5): p. 435-42.
 121. Sasportas, L.S., et al., *Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(12): p. 4822-7.
 122. Wakimoto, H., et al., *Human glioblastoma-derived cancer stem cells: establishment of invasive glioma models and treatment with oncolytic herpes simplex virus vectors*. *Cancer Res*, 2009. **69**(8): p. 3472-81.

123. Corsten, M.F. and K. Shah, *Therapeutic stem-cells for cancer treatment: hopes and hurdles in tactical warfare*. Lancet Oncol, 2008. **9**(4): p. 376-84.
124. Aboody, K.S., J. Najbauer, and M.K. Danks, *Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy*. Gene Ther, 2008. **15**(10): p. 739-52.
125. Stuckey, D.W. and K. Shah, *Stem cell-based therapies for cancer treatment: separating hope from hype*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(10): p. 683-91.
126. Ahmed, A.U., N.G. Alexiades, and M.S. Lesniak, *The use of neural stem cells in cancer gene therapy: predicting the path to the clinic*. Curr Opin Mol Ther, 2010. **12**(5): p. 546-52.
127. Kohno, K. and T. Uchida, *Highly frequent single amino acid substitution in mammalian elongation factor 2 (EF-2) results in expression of resistance to EF-2-ADP-ribosylating toxins*. J Biol Chem, 1987. **262**(25): p. 12298-305.
128. Foley, B.T., J.M. Moehring, and T.J. Moehring, *Mutations in the elongation factor 2 gene which confer resistance to diphtheria toxin and Pseudomonas exotoxin A. Genetic and biochemical analyses*. J Biol Chem, 1995. **270**(39): p. 23218-25.
129. Shulga-Morskoy, S. and B.E. Rich, *Bioactive IL7-diphtheria fusion toxin secreted by mammalian cells*. Protein Eng Des Sel, 2005. **18**(1): p. 25-31.
130. Asthagiri, A.R., et al., *Advances in brain tumor surgery*. Neurol Clin, 2007. **25**(4): p. 975-1003, viii-ix.
131. Lacroix, M., et al., *A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival*. J Neurosurg, 2001. **95**(2): p. 190-8.
132. Altaner, C., et al., *Complete regression of glioblastoma by mesenchymal stem cells mediated prodrug gene therapy simulating clinical therapeutic scenario*. Int J Cancer, 2014. **134**(6): p. 1458-65.
133. Okada, H., et al., *Expression of glioma-associated antigens in pediatric brain stem and non-brain stem gliomas*. J Neurooncol, 2008. **88**(3): p. 245-50.
134. Wykosky, J., et al., *Interleukin-13 receptor alpha 2, EphA2, and Fos-related antigen 1 as molecular denominators of high-grade astrocytomas and specific targets for combinatorial therapy*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(1): p. 199-208.
135. Jarboe, J.S., et al., *Expression of interleukin-13 receptor alpha2 in glioblastoma multiforme: implications for targeted therapies*. Cancer Res, 2007. **67**(17): p. 7983-6.
136. Debinski, W., et al., *Expression of a restrictive receptor for interleukin 13 is associated with glial transformation*. J Neurooncol, 2000. **48**(2): p. 103-11.
137. Huang, P.H., A.M. Xu, and F.M. White, *Oncogenic EGFR signaling networks in glioma*. Sci Signal, 2009. **2**(87): p. re6.
138. Herbst, R.S., *Review of epidermal growth factor receptor biology*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **59**(2 Suppl): p. 21-6.
139. Jacobs, V.L., et al., *Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model*. ASN Neuro, 2011. **3**(3): p. e00063.
140. Fujisawa, T., B.H. Joshi, and R.K. Puri, *Histone modification enhances the effectiveness of IL-13 receptor targeted immunotoxin in murine models of human pancreatic cancer*. J Transl Med, 2011. **9**: p. 37.

141. Horita, H., et al., *EGFR-targeted diphtheria toxin stimulates TRAIL killing of glioblastoma cells by depleting anti-apoptotic proteins*. J Neurooncol, 2009. **95**(2): p. 175-84.
142. Wiezorek, J., P. Holland, and J. Graves, *Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(6): p. 1701-8.
143. Zhang, X.D., et al., *The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate: a potential sensitizer of melanoma to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**(8): p. 1537-45.
144. Yoon, J.Y., et al., *Novel TRAIL sensitizer Taraxacum officinale F.H. Wigg enhances TRAIL-induced apoptosis in Huh7 cells*. Mol Carcinog, 2015.

ETIK KURUL KARARI

Subcommittee on Research Animal Care
 Massachusetts General Hospital
 149 13th Street
 Charlestown, MA 02129
 Tel: (617) 726-3495
 Fax: (617) 724-2475

**Notification of IACUC Review
 Protocol #: 2005N000337 / 15**

Date: March 23, 2012
 To: Khalid Shah, Ph.D
 MGH, MGH Imaging
 149

From: Diane McCabe, IACUC Manager
 Research Management
 Title of Protocol: Stem Cell Tracking in Brain Tumors
 Sponsor: Internal Funding
 Species / Number: Mice / 722
 Amendment # / ID: 12 / 73396
 Amendment Approval Date: 03/22/2012
 Effective Date: 03/23/2012
 Expiration Date: 02/15/2015
 Annual Report Due: 02/15/2013

This Amendment has been reviewed and approved by the MGH Subcommittee on Research Animal Care (SRAC) – OLAW Assurance # A3596-01. The protocol as submitted and reviewed conforms to the USDA Animal Welfare Act, PHS Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, the “ILAR Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” and other applicable laws and regulations. The protocol is approved for a three-year period, subject to submission of annual reports.

Please note that if a SRAC member had a conflict of interest with regard to the review of this protocol, that member left the room during the discussion and the vote on this project.

As Principal Investigator you are responsible for the following:

1. Compliance with MGH SRAC/CCM Policies governing the care and use of animals.
2. Submission in writing of changes to this project for SRAC review and approval prior to initiation of the change.
3. Submission of annual progress reports to the SRAC for review and approval.
4. Submission of a copy of this approval to CCM when ordering animals.
5. Adherence to safety requirements for the use of the following hazardous agents:

BIOLOGICAL AGENTS

TISSUE TESTING

Contact the Safety Office and the CCM Facility Manager when animals are ordered to begin the protocol.

Subcommittee on Research Animal Care
 Massachusetts General Hospital
 149 13th Street
 Charlestown, MA 02129
 Tel: (617) 726-3495
 Fax: (617) 724-2475

NOTE: Sung Hugh Choi, Wanlu Du and Nihal Karakas were added; Aayush Agarwal, Matthias Duebgen, Timo Kauer, Rajiv Khajuria, Sindhura Sevala, Kaoru Tamura, Jeroen Vandewater and Simone Wannigen deleted.

The SRAC can and will terminate projects that are not in compliance with these requirements. Direct questions, correspondence and forms to Diane McCabe, the IACUC Manager, Tel: (617) 724-9718, Fax: (617) 724-2475.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Nihal	Soyadı	Karakaş
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	21.06.1982
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	41608791938
Email	karakasnihal@gmail.com	Tel	05356111313

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi, DETAE, Sinirbilim	2015
Yük.Lis.	Fatih Üniversitesi, Moleküler Biyoloji Bölümü	2009
Lisans	İstanbul Üniversitesi, Fen Bilgisi Öğretmenliği	2006
Lise	Pertevniyal Lisesi	2000

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırmacı,	Harvard Tıp Fakültesi	3 yıl-
2.	Erasmus Stajyeri	Edinburgh Üniversitesi	4 ay
3.			

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		
Almanca	Orta	Orta	Orta		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	-	-	-
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Word	Çok iyi
Microsoft Power Point	Çok iyi
Microsoft Excell	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınlar:

Karakas N, Stuckey DW, Shah K. “ Arming stem cells with targeted toxins breaks resistance and potentiates TRAIL killing of brain tumors” (hazırlık aşamasında)

Karakas N, Shah K. “Stem Cell Delivery of Targeted Toxins for Glioblastoma Multiform Therapy (Review)” (hazırlık aşamasında)

Karakas N, Zaim M, Kunduraci T, Atak BH, Isik S. “ Neural Differentiation Dynamics of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow Aspirates” (gönderim aşamasında)

Stuckey DW*, Hingtgen S*, **Karakas N**, Rich B, Shah K. “Engineering toxin-resistant therapeutic stem cells to treat brain tumors”, *Stem Cells*, (Oct. 2014) *authors equally contributed.

Isik S, Zaim M, Yildiz MT, Negis Y, Kunduraci T, **Karakas N**, Arikan G, Cetin G. “DNA topoisomerase II β as a molecular switch in neural differentiation of mesenchymal stem cells”, *Annals of Hematology*, Sept. 2014

Mammadov B, **Karakas N**, Isik S. "Comparison of Long-term Retinoic Acid Based Neural Induction Methods of Bone Marrow Human Mesenchymal Stem Cells", *In vitro Cellular & Developmental Biology* , May 2011

Kamaci N, Emnacar T, **Karakas N**, Arikan G, Tsutsui K, Isik. "Selective silencing of DNA topoisomerase II β in human mesenchymal stem cells by small interfering RNAs (siRNAs)", *Cell Biology International Reports*, March 2011

Bildiri ve Posterler

Nihal Karakaş, Büşra Gürdoğan, Sevim Işık, "Cell surface localization and expression of cell-surface receptor alpha5/beta1 integrin during proliferation and neural differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells (hMSC)", Antalya-Türkiye, Mar. 2008, 5. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi, Konuşma Metinleri ve Bildiri Kitabı, pp. 207-208

Busra Gurdoğan, **Nihal Karakaş**, Sevim Işık, "The Role of Topo IIb in Neural Transdifferentiation Related Gene Transcription of Human Mesenchymal cells", 5. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi,, Antalya-Türkiye, Mar. 2008, 5. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi, Konuşma Metinleri ve Bildiri Kitabı, pp. 206-207

Nihal Karakaş, Busra Mammadov, Sevim Işık, "Involvement of Integrin $\alpha 5\beta 1$ in Neural Transdifferentiation of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells (hMSCs)", III. International Congress of Molecular Medicine, Istanbul/Turkey, May. 2009, *Journal of IUBMB Life*,

Büşra Mammadov, **Nihal Karakaş**, Sevim Işık, "Emphasis of the Efficient In Vitro Neurogenesis Method For Bone Marrow Derived Human Mesenchymal Stem Cells", III. International Congress of Molecular Medicine, Istanbul/Turkey, May. 2009, **Journal of IUBMB Life**,

Nihal Karakaş, Nebiyyeh Kamacı, Tuba Emnacar, Sevim Işık, "Enriched Cytokine Combinations Mediate In Vitro Neurogenesis of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells", 1. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi', Kapadokya/Turkey, Mar. 2009, 1. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi Kongre Kitabı, pp. 117-118

Nebiyyeh Kamacı, Tuba Emnacar, **Nihal Karakaş**, Gülsüm Arıkan, Sevim Işık, "Efficient Silencing of DNA Topoisomerase IIbeta in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) by siRNA Transfection", The 19th CDB Meeting:RNA Sciences in Cell and Developmental Biology , Kobe, JAPAN, May. 2010, RNA Sciences in Cell and Developmental Biology -Booklet, 16,pp. 114

Nihal Karakas, Gulsum Arıkan, Sevim Isik, “ Neural Marker Expressions of Neuronal Induced Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells”, 8th IBRO World Neuroscience Congress”, July 2011.

Sözlü Sunumlar:

Aralık 2013 *Stem Cell Delivery of Immunotoxins for GBM therapy*, Department of Radiology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School.

Mart 2014 *Targeted Toxins for The Treatment of a Broad Range of Brain Tumors*, Brigham and Woman's Hospital, Harvard Medical School.

Ocak 2015, *Terapötik Kök Hücrelerin Beyin Tümörleri Tedavisinde Kullanılması*, İstanbul Üniversitesi DETAE Genç Araştırmacılar Toplantısı

Şubat 2015, *Therapeutic Stem Cells for the Treatment of Brain Tumors*, İstanbul Medipol Üniversitesi, Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırma Merkezi

Bilimsel Toplantılar:

- 5. Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Kongresi, *Türk Hematoloji Derneği, Antalya, Mart 2008*
- 1. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi', *Kapadokya, Mart 2009*
- III. Uluslararası Moleküler Tıp Kongresi, *Istanbul, Mayıs 2009*
- V. Kök Hücre Sempozyumu, *Ankara, Haziran 2010.*
- Ebiltet Doku Mühendisliği Sempozyumu, *İzmir , Mart 2011*
- 8th IBRO World Neuroscience Congress”, *Floransa/İTALYA, Temmuz 2011*
- DETAE Genç Araştırmacılar Toplantısı, *İstanbul, 2015*

Medyada yer alan çalışmalar:

- Cancer-killing stem cells engineered in lab ([BBC News, October 24, 2014](#))
- Stem cells that can kill cancer have been engineered by scientists ([The Independent, October 27,](#)

2014)

- Toxin-Secreting Stem Cells May Destroy Brain Tumors From Inside Out (Popular Science, October 27, 2014)

Sertifika ve Ödüller:

2009-2014 Yurt İçi Doktora Bursu, TÜBİTAK

July 2011 Seyehat bursu, 8th IBRO Dünya Sinirbilim Kongresi

May 2009 Genç Girişimci Sertifikası, KOSGEB

March 2009 Poster ödülü, Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp derneği

June 2008 Erasmus Bursu (İngiltere)

2006-2008 Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, TUBİTAK

June 2000 Onur öğrencisi, Pertevniyal Lisesi

May 2000, 9.Ulusal Araştırma Projeleri Yarışması, Biyoloji dalında Türkiye 2.liği, MEF okulları

Üyelikler:

American Association for Cancer Research (AACR), Society for Neuroscience (SfN), Boston Turkish Biologists' Colloquium (BTBC), IBRO, International Brain Research Organization, Nautilus Diving Center

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Yeni yerler ve kültürler keşfetmek, doğa sporları, tiyatro, yüzme ve dalış

