



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDA MAMMAGLOBİN
GEN EKSPRESYONUNUN KİTOZAN/shRNA
NANOPLEKSLERİ İLE BASKILANMASINA İLİŞKİN *İN VİTRO*
ÇALIŞMALAR**

AYLİN ÖZKAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi SUNA ÖZBAŞ TURAN

2019 - İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Farmasötik Biyoteknoloji
Tez Sahibi : AYLİN ÖZKAN
Tez Başlığı : Meme Kanseri Hücre Hatlarında Mammaglobin Gen Ekspresyonunun Kitozan/shRNA Nanopleksleri İle Baskılanmasına İlişkin İn Vitro Çalışmalar
Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 28.06.2019

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	Kurumu
Dr. Öğr. Üyesi Suna ÖZBAŞ TURAN	Marmara Üniversitesi
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)	
Prof. Dr. Z. Gülden OMURTAG	Medipol Üniversitesi
Doç. Dr. Ali Demir SEZER	Marmara Üniversitesi

İmza

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 31/07/2019 tarih ve 81 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü 4.

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.

-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

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.

Öğrencinin Adı, Soyadı

Aylin ÖZKAN

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren ve her zaman yanımda olan değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Suna ÖZBAŞ TURAN'a,

Çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, bu çalışmada maddi manevi desteğini esirgemeyen sevgili hocam Sayın Doç. Dr. Emine ŞALVA'ya,

Her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ali Demir SEZER'e,

Yüksek lisans eğitimimde öğretmiş olduğu bilgilerin ışığında ilerlediğim, insani değerleri ile her zaman örnek aldığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Jülide AKBUĞA'ya,

Çalışmalarım boyunca hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen ve her ihtiyaç duyduğumda beni bıkmadan usanmadan dinleyen Arş. Gör. Ceyda EKENTOK ATICI, Arş. Gör. Birnur CÖMEZ ve Arş. Gör. Aysun ÇELİK'e,

Çalışmam süresince beni motive eden ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sevgi KARAKUŞ'a,

Lisans dönemimde tanıdığım ve yüksek lisans eğitimim boyunca da her zaman yanımda olan tez yoldaşım, sevgili arkadaşım Şadiye Burcu ÖZKAVAK'a,

TEM görüntüleme çalışmalarında Öğr. Gör. Dr. Kürşad Osman AY'a,

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan sevgili aileme, desteğini ve katkılarını her zaman gösteren dostlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR	ii
KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xii
RESİMLER LİSTESİ.....	xiii
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Kanser ve Meme Kanserine İlişkin Bilgiler	6
4.2. Sekretogloblinler	8
4.3. Mammaglobin A ve Mammglobin B	10
4.3.1. Mammaglobin'in (Mammaglobin A) yapısı.....	11
4.3.2. Mammaglobin ve meme kanseri.....	14
4.4. Kanserde Gen Tedavisi.....	18
4.5. RNA İnterferans Stratejisi	19
4.5.1. RNAi mekanizması.....	21
4.6. shRNA'ya İlişkin Bilgiler.....	23
4.7. Gen Tedavisinde Taşıyıcı Sistemler	27
4.7.1. Viral vektörler	28
4.7.2. Viral olmayan vektörler	29
4.8. Kitozana İlişkin Bilgiler	32
4.8.1. Kitin	33
4.8.2. Kitozanın yapısı ve elde edilmesi	33
4.9. Kitozan ve shRNA (pDNA)	35
4.10. Meme Kanserinde shRNA ve Kitozan	39

5. GEREÇ VE YÖNTEM	42
5.1. Gereç	42
5.1.1. Kimyasal sarf malzemeleri	42
5.1.2. Kullanılan cihazlar	44
5.1.3. Plazmid siRNA (shRNA) yapısı	46
5.1.4. Kullanılan hücre kültürleri	47
5.1.5. Besiyeri ve çözeltiler	47
5.2. Yöntem	52
5.2.1. shRNA çalışmaları	52
5.2.1.1. shRNA	52
5.2.1.2. shRNA'nın transformasyonu	52
5.2.1.3. shRNA'nın izolasyonu	53
5.2.1.4. shRNA'nın kontrolü	54
5.2.2. Nanoplekslerin hazırlanması ve kontrolleri	56
5.2.2.1. Nanoplekslerinin hazırlanması	56
5.2.2.2. Nanopleks oluşumunun görüntülenmesi	56
5.2.2.3. Nanoplekslerin partikül büyüklüğü değerlerinin ölçümü	56
5.2.2.4. Nanoplekslerin zeta potansiyel değerlerinin ölçümü	56
5.2.2.5. Nanoplekslerin serum stabilitesinin incelenmesi	57
5.2.2.6. Nanoplekslerin geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmesi	57
5.2.3. Hücre kültürü çalışmaları	57
5.2.3.1. Hücre kültürü pasajı ve hücre kültürünün devamlılığının sürdürülmesi çalışmaları	57
5.2.3.2. Transfeksiyon öncesi hücre ekimi ve transfeksiyon	58
5.2.3.3. İn vitro gen inhibisyonun ELISA yöntemi ile tayini	58
5.2.3.4. Sitotoksosite testi	59
5.2.3.5. Proliferasyon testi	59
5.2.3.6. İnvazyon testi	60
5.2.4. İstatistiksel değerlendirme	60
6. BULGULAR	61
6.1. shRNA Çalışmalarına İlişkin Bulgular	61
6.1.1. shRNA izolasyonuna ilişkin bulgular	61

6.1.2. shRNA kontrolüne ilişkin bulgular	61
6.1.2.1. shRNA'nın spektrofotometrik kontrolüne ilişkin bulgular	61
6.1.2.2. shRNA'nın elektroforetik kontrolüne ilişkin bulgular	61
6.2. Nanoplekslerin Hazırlanmasına İlişkin Bulgular	63
6.2.1. Nanopleks oluşumunun elektroforetik kontrolüne ilişkin bulgular	63
6.2.2. Nanoplekslerin partikül büyüklüğü değerlerinin ölçümüne ilişkin bulgular	64
6.2.3. Nanoplekslerin zeta potansiyel değerlerinin ölçümüne ilişkin bulgular...	65
6.2.4. Nanoplekslerin serum stabilitesinin incelenmesine ilişkin bulgular	65
6.2.5. Nanoplekslerin geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmesine ilişkin bulgular	67
6.3. Hücre Kültürü Çalışmalarına İlişkin Bulgular	67
6.3.1. İn vitro gen inhibisyonun ELISA yöntemi ile tayinine ilişkin bulgular ...	67
6.3.2. Sitotoksite testine ilişkin bulgular	70
6.3.3. Proliferasyon testine ilişkin bulgular	71
6.3.4. İnvazyon testine ilişkin bulgular	73
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	75
8. KAYNAKLAR	86
9. EKLER	97
Ek 1. Kongre Bildirisi	97
10. ÖZGEÇMİŞ	98

KISALTMALAR

AAV: Adeno-ilişkili virüsler

a/a: Ağırlık/ağırlık

a/h: Ağırlık/hacim

Alu: *Arthrobacter luteus*

ATP: Adenozin trifosfat

bp: Baz çifti

CaCl₂.2H₂O: Kalsiyum klorür dihidrat

cDNA: Komplementer DNA

CHO K1: Çin hamster ovaryum hücre hattı

chsA: Kalkon sentaz enzimi

Da: Dalton

DD: Deasetilasyon derecesi

DOTAP: 1,2-dioleoil-3-trimetilamonyum-propan

DOTMA: N [1- (2,3-dioleyiloksi) propil] -N, N, N-trimetilamonyum klorür

dsRNA: Çift sarmallı RNA molekülü (Double-stranded RNA)

EDTA: Etilendiamintetraasetikasit

EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

ELISA: Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

ER: Östrojen reseptör

γ-IFN: Gama-İnterferon

HCl: Hidroklorik asit

HEK 293: İnsan embriyonik böbrek hücre hattı

HeLa: İnsan serviks adenokarsinomu hücre hattı

HER2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2

HIV-1: İnsan immün yetmezlik virüsü

hMAM: İnsan mammaglobin

kb: Kilobaz

kDa: Kilo Dalton

KH₂PO₄: Potasyum dihidrojen fosfat

kV: Kilovolt

L929: Fare fibroblast hücre hattı

LB: Luria Bertani Besiyeri

mA: Mili amper

MCF-7: İnsan meme adenokarsinom hücre hattı

MDA-MB-231: İnsan metastatik meme adenokarsinom hücre hattı

MDA-MB-435: İnsan metastatik meme kanseri hücre hattı

miRNA: Mikro RNA

mRNA: Mesajcı RNA

mV: Milivolt

ng/ml: Nanogram/mililitre

Na₂HPO₄: Disodyum hidrojen fosfat

NaCl: Sodyum klorür

NaOH: Sodyum Hidroksit

NCI-DTP: Ulusal Kanser Enstitüsü Gelişimsel Terapötik Program

-NH₂: Amin grubu

NH₄Ac: Amonyum asetat

NH₄OH: Amonyum Hidroksit

nm: Nanometre

OD: Optik Densite

OD260: 260 nm dalga boyundaki optik densite değeri

OD280: 280 nm dalga boyundaki optik densite değeri

OH- : Hidroksil grupları

PBS: Fosfat Buffer Saline (Fosfat sodyum klorür tamponu)

pDNA: Plazmid DNA

PEG: Polietilenglikol

PEI: Poli (etilenimin)

PFS: İlerlemesiz sağ kalım

PLL: Poli (L-lizin)

PO₄- : Fosfat grupları

PR: Progesteron Reseptör

RISC: RNA ile indüklenen gen susturma kompleksi (RNA-induced gene silencing complex)

RNAi: RNA interferans

RT-PCR: Ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu

SCGB: Sekretogloblin

SD: Standart sapma

SDS: Sodyum dodesil sülfat

shRNA: Kısa saç tokası RNA (short hairpin RNA)

siRNA: Küçük interferans RNA (small interfering RNA)

TBE: Tris borikası EDTA

TE: Tris EDTA

TP53: Tümör protein p53

Tris: Trizma, 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol

Tris-HCl: Hidroklorik asit ile pH değeri ayarlanmış Tris çözeltisi

Tris-PO₄: Tris-Fosfat

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

λDNA/HindIII: Hind III restriksiyon endonükleazı ile kesilmiş λ faj DNA'sı

μg: Mikrogram

μg/ml: Mikrogram/mililitre

μl: Mikrolitre

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1: Mammaglobin A ve diğer bazı sekretogloblin aile üyelerinin kromozom üzerindeki lokalizasyonu.....	12
Şekil 2: İnsan mammaglobin geninin restriksiyon haritası (S: Sall; B: BamHI; Sc: SacI; X: XbaI; H: HindIII; P: PstI; N: NcoI restriksiyon enzimleri; CA: Sitozin-adenin dinükleotidi)	12
Şekil 3: Mammaglobin protein kompleksinin 3 boyutlu yapısı	14
Şekil 4: Mammaglobin proteinin yüzey diyagramı	14
Şekil 5: siRNA aracılı gen susturma mekanizması.....	23
Şekil 6: shRNA ve siRNA'nın yapısı (A) siRNA'lar, karakteristik olarak 3' ucunda 2 nükleotitlik çıkıntıya sahip RNA dupleksleridir. (B) shRNA'lar, bir döngü (loop) dizisi ile ayrılan sense ve antisense dizilerinden oluşur. (C) Ekspresyon vektörüne yerleşiminde shRNA yapısı.....	25
Şekil 7: Memelilerde RNAi aracılı gen susturulması	26
Şekil 8: Kitin ve kitozanın yapısı.....	34
Şekil 9: Farklı mekanizmalara dayalı olarak kitozan ve DNA/siRNA formülasyonlarının hazırlanması.....	36
Şekil 10: psiRNA-7SK-gz-hMAM plazmidinin yapısı.....	46
Şekil 11: Mammaglobin standart eğrisi	68
Şekil 12: MDA-MB-435 hücre hattında kitozan/shRNA nanoplekslerinin Mammaglobin baskılanması üzerine etkisi.....	69
Şekil 13: L-929 hücre hattında yapılan sitotoksosite testi	70

Şekil 14: MDA-MB-435 hücre hattında yapılan sitotoksosite testi.....	71
Şekil 15: L-929 hücre hattında yapılan proliferasyon testi.....	72
Şekil 16: MDA-MB-435 hücre hattında yapılan proliferasyon testi	73



TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1: İnsan sekretoglobın proteinleri.....	10
Tablo 2: Viral vektörlerin avantajları ve dezavantajları.....	30
Tablo 3: Nanopleks formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları.....	64
Tablo 4: Nanopleks formülasyonlarına ait zeta potansiyel ölçüm sonuçları.....	65
Tablo 5: Mammaglobin standart eğri çizimine ilişkin değerler	68



RESİMLER LİSTESİ

Sayfa No

Resim 1: shRNA plazmidinin farklı konsantrasyonlardaki agaroz jel fotoğrafı	62
Resim 2: shRNA plazmidinin enzim kesim jel fotoğrafı	62
Resim 3: Kitozan/shRNA nanoplekslerinin agaroz jel fotoğrafı	63
Resim 4: Kitozan/shRNA (2/1) nanopleksinin serum stabilitesi	66
Resim 5: Serbest shRNA plazmidin serum stabilitesi	66
Resim 6: Kitozan/shRNA nanoplekslerinin TEM görüntüsü	67
Resim 7: (A) MDA-MB-435 hücrelerinin invazyonu, (B) MDA-MB-435 hücre hattında serbest shRNA invazyonu, (C) MDA-MB-435 hücre hattında 1/1 kitozan/shRNA invazyonu, (D) MDA-MB-435 hücre hattında 2/1 kitozan/shRNA invazyonu. X10 büyütme.	74

Meme Kanseri Hücre Hatlarında Mammaglobin Gen Ekspresyonunun Kitozan/shRNA Nanopleksleri İle Baskılanmasına İlişkin *In Vitro* Çalışmalar

Öğrencinin Adı : Aylin ÖZKAN

Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Suna ÖZBAŞ TURAN

Anabilim Dalı : Farmasötik Biyoteknoloji

1. ÖZET

Amaç: İnsan mammaglobin (hMAM), genellikle meme ve meme kanseri hücrelerinde eksprese edilen bir glikoproteindir. Meme spesifik hMAM'ın RNA interferans (RNAi) teknolojisi ile kısa saç tokası RNA (shRNA) kullanılarak baskılanması önemli bir gen tedavisi stratejisidir. Nükleaz degradasyonundan korunma ve hücreye giriş etkinliğini arttırmak için viral olmayan gen taşıyıcı sistem olarak kitozan; biyobozunur olması, toksik olmayışı ve katyonik yapısı sebebiyle sıklıkla tercih edilmektedir. Bu çalışmada, hazırlanan kitozan/mammaglobin shRNA nanoplekslerin aracılığıyla hMAM geninin baskılanmasının *in vitro* olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: shRNA'nın spektrofotometrik ve elektroforetik kontrolleri yapılmıştır. Kitozan/shRNA nanoplekslerinin partikül boyutu, zeta potansiyel, jel elektroforez, serum stabilitesi ve TEM görüntüleme analizleri yapılmıştır. Hücre kültüründe; tranfeksiyon sonrası mammaglobin miktarı ELISA ile ölçülmüştür ve MTT sitotoksikite, BrdU proliferasyon ve invazyon testleri yapılmıştır.

Bulgular: Tam nanopleks oluşumu gözlenmiştir, nanopleks boyutlarının ve zeta potansiyel değerlerinin uygun olduğu belirlenmiştir. Nanoplekslerin shRNA'yı degradasyondan koruduğu görülmüştür. MTT sonuçlarına göre sitotoksik etki saptanmamıştır. Mammaglobinin ve invazyonun baskılandığı görülmüştür.

Sonuçlar: Başarılı bir nanopleks yapısının olduğu, kitozanın shRNA için uygun bir taşıyıcı sistem olduğu ve kitozan/shRNA nanoplekslerinin meme kanserinde mammaglobini baskıladığı gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: RNAi, Mammaglobin, Meme kanseri, Kitozan, shRNA

***In vitro* Studies on Inhibition of Mammaglobin Gene Expression with Chitosan/shRNA Nanoplexes in Breast Cancer Cell Lines**

Student's Name : Aylin ÖZKAN

Supervisor : Asst. Prof. Suna ÖZBAŞ TURAN

Department : Pharmaceutical Biotechnology

2. SUMMARY

Aim: Human mammaglobin (hMAM) is a glycoprotein and expression is limited to mammary gland and breast tumor cell lines. Suppression of breast specific hMAM using short hairpin RNA (shRNA) with RNA interference (RNAi) technology is an important gene therapy strategy. Nuclease degradation and poor cellular uptake limit the use of the molecule. Chitosan is one of most popular delivery system due to its biodegradability, non-toxicity and cationic structure. The aim of this study was to investigate the inhibition of hMAM gene *in vitro* conditions with chitosan/mammaglobin shRNA nanoplexes.

Material and Method: Spectrophotometric and electrophoretic controls of shRNA were performed. Particle size, zeta potential, gel electrophoresis, serum stability and TEM imaging analyzes of chitosan/shRNA nanoplexes were carried out. In cell culture; the amount of mammaglobin after transfection was measured by ELISA and MTT cytotoxicity, BrdU proliferation and invasion tests were performed.

Results: Fully nanoplexation at all ratios was observed. Appropriate particle size and zeta potential values of nanoplexes were obtained. Nanoplexes were observed to protect shRNA from degradation No cytotoxic effect was observed according to MTT results. It was observed that mammaglobin and invasion were suppressed.

Conclusions: It has been shown that a successful complex structure is formed, chitosan is the safe and effective delivery system for shRNA and chitosan/shRNA nanoplexes suppress mammaglobin in breast cancer.

Key Words: RNAi, Mammaglobin, Breast cancer, Chitosan, shRNA

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, her yıl dünya genelinde sekiz milyondan fazla ölümle sonuçlanan önemli bir küresel sağlık sorunudur. Kanser, mekanizmasında pek çok faktörün etkili olduğu kompleks yapıda bir hastalıktır (Wirth ve Herttua, 2014). Meme kanseri, tüm kanser vakalarının % 23'ünü ve kanser ölümlerinin % 14'ünü oluşturan kadınlar arasında en sık tanı alan kanser ve kanser ölümünün önde gelen nedenidir (Jemal ve ark., 2011).

Meme kanseri, gelişmiş ülkelerdeki kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türüdür ve son yıllarda bu hastalığın tespit ve teşhisini iyileştirmek için önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu gelişmeler ayrıca, meme kanserine preinvazif öncü olduğu düşünülen lezyonlar dahil olmak üzere invazif olmayan meme hastalıklarının tanınmasını da sağlamıştır. Meme kanseri tedavisinde, hem hastalığın doğal tarihini hem de birçok vakada belirli tedavilere verilen tepkileri tahmin etmeye yardımcı olabilecek belirteçlerin tanınmasında ilerlemeler kaydedilmiştir (Bae ve Gabrielson, 2010).

Meme kanseri ekspresyonu ile ilişkili olan genlerin tanımlanmasının, meme kanserinin başlatılmasından ve ilerlemesinden sorumlu biyolojik yollara ilişkin yeni görüşler sağlaması muhtemeldir. Her2/neu onkogeni meme kanserinde kullanılan bir belirteçtir. Bu biyobelirtece alternatif olarak, Mammaglobin olarak adlandırılan meme ile ilişkili yeni bir gen tanımlanmıştır. Son araştırmalar, tüm meme karsinomlarının yaklaşık % 80'inin mammaglobin transkriptini aşırı seviyede eksprese ettiğini ve mammaglobin ekspresyonunun gizli meme kanseri metastazlarının saptanmasında eşsiz bir belirteç olduğunu göstermektedir (Goedegebuure ve ark., 2004).

Mammaglobin geni, sekretoglobin ailesi ile ilişkili 10 kDa büyüklüğünde bir glikoproteindir. Normal yetişkin dokular arasında, mammaglobin mRNA ekspresyonu sadece meme bezinde tespit edilmiştir ve mammaglobinin meme orijinli metastatik karsinomlarda değerli bir tanı belirteci olduğu gösterilmiştir. Mammaglobin ekspresyon profilleri meme kanseri hücreleri patogenezi ile güçlü bir şekilde birleşmesine rağmen, mammaglobinin kanser süreçlerinde biyolojik önemi

hala açık değildir. (Fleming ve Watson, 2000; Wang ve ark., 2009; Picot ve ark., 2016).

Günümüzde, kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar çoğunlukla yetersiz kalmakta ve hastalar üzerinde ciddi yan etkiler meydana getirmektedir. Gen tedavisi, kanser hücresi ölümüne neden olmak veya tümörün büyümesini yavaşlatmak için hücre içerisine yeni bir genin yerleştirildiği ya da mevcut genin değiştirildiği yeni bir tedavi yöntemidir. Bu konuda farklı yaklaşımlar vardır: gen ekleme tedavisi, viral gen tedavisi, viral olmayan gen tedavisi ve RNA interferans kaynaklı gen tedavisidir (Anaya-Ruiz ve Perez-Santos, 2015).

RNA interferans (RNAi), spesifik bir gen ekspresyonunun, bir hücreye veya organizmaya gen spesifik çift iplikli RNA'nın (dsRNA) eklenmesinden sonra, transkripsiyon sonrası mRNA degradasyonu ile susturulduğu biyolojik bir süreçtir (Dung ve ark., 2019).

Son yıllarda, RNA interferans (RNAi) kullanımı, memeli hücrelerinde gen fonksiyonunun araştırılması için bir araç olarak ortaya çıkmıştır. RNAi mekanizması, hedef sekansa spesifik olan çift sarmallı RNA'nın (dsRNA) sitoplazmik olarak verilmesi yoluyla konakçı mRNA'nın sekansa spesifik degradasyonuna dayanır. Hedef gen ekspresyonunun degradasyonu, endojen olarak RNA indüklenmiş susturma kompleksi (RISC) içeren enzimatik bir yolla sağlanır. siRNA(küçük interferans RNA) dupleksinin bir dizisi (kılavuz dizisi), Argonat (Ago) proteinleri ve çift iplikli RNA bağlayıcı proteinlerin yardımı ile RISC'e yüklenir. RISC daha sonra kılavuz dizisini tamamlayıcı mRNA molekülüne lokalize eder ve mRNA degradasyonuna bağlı olarak gen baskılanması gerçekleşir (Moore ve ark., 2010).

Hücre içerisine ekzojen yolakla dışarıdan verilen siRNA'lar, kanser hücrelerinde geçici olarak baskılama sağladıklarından dolayı devamlılık arz eden anti-kanser siRNA'ların oluşturulması, terapötik etkinin arttırılması konusunda önem teşkil etmektedir. Bu sorunu aşmak için, hedef hücrelerde siRNA'nın stabil ekspresyonunu sağlayan vektör bazlı sistemler geliştirilmiştir. shRNA (kısa saç tokası RNA) kodlayan viral vektör veya plazmid DNA'lar, shRNA sentezini hücre nükleusunda gerçekleştirdiklerinden uzun süren bir baskılama sağlarlar (Leung ve Whittaker,

2005; Paddison ve ark., 2002). Ancak bu siRNA ve shRNA gibi RNAi moleküllerinin gen tedavisinde uygulamasında bazı sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bu sorunlar; nükleazlar ile hızla degradasyon, ilgili genin aktarımında hücre alımının zayıf olması ve hedef dışı etkidir. Bu sebeple gen tedavisinde uygun bir taşıyıcı sistemin seçilmesi önemli bir konudur (Howard ve ark., 2006; Urban-Klein ve ark., 2005). Taşıyıcı sistem olarak viral ve viral olmayan vektörler kullanılmaktadır. Viral vektörler, uzun süreli, stabil ve yüksek seviyede gen ekspresyonu sağlamalarına karşın, tekrar eden uygulamaları sonucu immün yanıt oluşturmaları, mutajen ve karsinojen yapıda olmaları, ayrıca üretim ve saflaştırma basamaklarının zorluğu gibi olumsuz özelliklere sahiptirler. Buna karşın, viral olmayan taşıyıcı sistemler, güvenilir olması, üretim ve saflaştırma adımlarının kolaylığı, stabil olması, kolay uygulanabilirliği ve taşınan genetik materyal boyutunun sınırlandırılmaması açısından, viral taşıyıcı sistemlere kıyasla daha çok tercih edilmektedir. Viral olmayan taşıyıcı sistemler, polikationik polimerler, lipidler ve lipozomlardır (Gascón Rodriguez ve ark., 2013; Phillips, 2001; Kreppel ve Kochanek, 2008; Wolff ve Rozema, 2008).

Kitozan, DNA ile polielektrolit kompleksler oluşturan ucuz, biyo-uyumlu, biyobozunur ve toksik olmayan katyonik bir polimerdir ve kitinin deasetilasyonu ile elde edilir. Kitozan ve kitozan türevleri, gen taşınmasında güvenli ve etkin bir taşıyıcı sistem olarak kullanılmaktadır (Borchard, 2001; Kumar ve ark., 2004).

Tez çalışması kapsamında, doğal katyonik yapıda bir biyopolimer olan ve yapılan çeşitli çalışmalarda gen taşıyıcı sistem olarak başarılı sonuçlar elde edilen kitozanın kullanılmasıyla hazırlanan kitozan/mamaglobin shRNA nanoplekslerinin *in vitro* ortamda meme kanseri hücre hattında mamaglobin gen ekspresyonunun baskılanması üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kanser ve Meme Kanserine İlişkin Bilgiler

Kanser, hücrelerin ve dokuların anormal ve kontrolsüz büyümesidir. Hücre bölünmesi, genetik instabilite, apoptoz, lokal bölgede ve uzak bölgede meydana gelen invazyon ve vücudun immün sisteminin kaçışını içeren bir dizi genetik değişiklik, hücrelerin ve dokuların normal özelliklerinin temel değişikliğine yol açar (Murshed, 2019). Kanser insidansı ve mortalite dünya çapında hızla artmaktadır. GLOBOCAN 2018 verilerine göre her iki cinsiyette de en sık teşhisi koyulan (toplam vakaların %11,6'sı) ve ölümlle sonuçlanan (toplam kanser ölümlerinin %18,4'ü) kanser türü akciğer kanseri iken hemen ardından kadın meme kanseri (11,6%) onu ikinci sırada takip etmektedir (Bray ve ark., 2018). Meme kanseri, kadınlar arasında tüm kanser vakalarının % 23'ünü ve kanser ölümlerinin % 14'ünü oluşturan en sık tanı alan ve ölüme neden olan malignitedir (Jemal ve ark., 2011).

Meme kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'nde kadınlar arasında (cilt kanserinin yanı sıra) en sık tespit edilen kanserdir ve tahmini 266 120 yeni vaka teşhis edilmiştir (tüm yeni kanser vakalarının % 15,3'ünü temsil etmektedir) ve Amerika Birleşik Devletleri'nde 2018'de meme kanserinden ölüm sayısı tahmini 40 920'dir. Metastatik veya Evre IV meme kanserlerinde 5 yıllık sağkalım oranı % 22'dir (Basu ve ark., 2019). Meme kanseri, normal hücrelerin genetik değişimleri ve tümör ile etkileşimde olan vasküler, immün ve stromal hücrelerin epigenetik değişiklikleri sonucu meydana gelmektedir. Meme kanserinde ölümlerin büyük bir bölümü metastaz kaynaklıdır ve metastaz yaygın olarak akciğer, karaciğer, lenf nodları ve kemiklerde görülür. Lenf nodu metastazı meme kanseri için en önemli olumsuz yöndeki prognostik faktörlerden biridir (Osborne ve ark., 2004; Shibata ve ark., 2008).

Meme kanseri, mutasyonlar, DNA'nın kopya sayısı değişiklikleri ve kromozom yapısal düzenlemeleri dahil olmak üzere geniş genomik instabilite kaynaklı heterojenite ile karakterize edilir. Hastalık heterojenitesi, hastalar arasında tedavi cevabı varyasyonunu gösteren çeşitli mutasyonlar, terapötik direnç ve bazı meme kanserlerinde hedeflenen tedavi eksikliği, meme kanserine karşı iyileştirilmiş tedavi stratejisine olan ihtiyacı göstermektedir. Tümör tipine bağlı olarak hastanın tedaviye

olan cevabını belirlemek için, hastalığın alt sınıflarının belirlenmesi çok önemli bir konudur (Basu ve ark., 2019; Duijf ve ark., 2019).

İnfiltratif duktal karsinoma (IDC) en sık görülen meme kanseri türüdür (tüm meme kanserlerinin %75'i) ve sonrasında infiltratif lobüler karsinoma (% 5-10) gelmektedir. Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ile birlikte tümör derecesi, boyutu ve nod tutulumu hasta prognozunda kullanılırken, gen ekspresyon profillemesi meme kanserinin kendine özgü alt tiplerinin belirlenmesini sağlayarak tedavi sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılır. Meme kanserinin beş adet alt tipi belirlenmiştir ve Luminal alt tip A, Luminal alt tip B, HER2-aşırı ekspresyon, bazal benzeri ve normal meme benzeri şeklinde sınıflandırılmaktadır (Basu ve ark., 2019; Bae ve Gabrielson, 2010).

Luminal meme kanseri, meme kanserinin en yaygın alt tipidir ve memenin lüminal epitelyal bileşenini yansıtan bir hormon reseptörünün ekspresyon profili ile karakterize edilir. Bu alt tip, pozitif ER ve PR ekspresyonu gösterir ve ayrıca iki alt gruba ayrılır: Luminal A (tüm meme kanserlerinin% 60'ı) ve Luminal B (tüm vakaların % 15 ila % 20'si). Luminal A alt grubu ER ve/veya PR pozitifliği ile HER2 negatifliğini gösterirken, Luminal B alt grubu ER, PR ve HER2 ekspresyonu için pozitifdir. HER2-aşırı ekspresyon meme kanseri alt tipi, HER2'nin aşırı ekspresyonu ile tanımlanır. HER2, meme kanserinde proliferasyonu arttırarak ve apoptozu inhibe ederek tümör malignitesini uyaran bir onkogendir. HER2'yi aşırı eksprese eden tümörler, tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık % 10-15'ini temsil eder. Bazal benzeri meme kanseri (BLBC), tüm meme kanserlerinin % 10-15'ini oluşturur ve normal meme miyoepitelyal hücre bölümünü anımsatan bir ekspresyon profili ile karakterize edilir: ER, PR ve HER2'nin yokluğu, bazal markerların yüksek ekspresyonu (keratin 5, 6, 14, 17 ve EGFR), yüksek proliferasyon gen ekspresyonu ve TP53 mutasyonu durumunda meydana gelir. Bazal benzeri meme kanseri, üçlü negatif meme kanserinin (TNBC) yaklaşık % 60'ını oluşturur (Basu ve ark., 2019).

4.2. Sekretoglobinler

Sekretoglobinler (SCGB), memelilerde ve keselilerde salgılanan proteinlerin ailesini içerir. Bu ailenin keşfedilen ilk proteini tavşanlarda bulunmuştur ve önce blastokinin daha sonra uteroglobin olarak adlandırılmıştır ve SCGB1A1 olarak ifade edilmektedir. Sekretoglobin terimi, tüm aile üyelerinin ortak özelliklerini belirtmek amacıyla kullanılmaktadır. İsmin başındaki 'sekreto' kısmı, bu proteinlerin salgılandığını belirtmektedir. Globin son eki, sekretoglobinlerin, iki adet dörtlü heliks-sarmal monomerinden oluşan dimerleri oluşturması, hidrofobik bir bağlanma bölgesi oluşturması, globin katlanmasını hatırlatan yapı meydana getirmesi sebebiyle verilmiştir (Jackson ve ark., 2011; Beier, 2000).

Sekretoglobinler, uterin, prostatik, pulmoner, lakrimal ve tükürük bezleri de dahil olmak üzere birçok salgıda yüksek seviyelerde bulunur ve herhangi bir spesifik sekretoglobin, genellikle birden fazla dokuda eksprese edilir. Bazı sekretoglobinlerin fizyolojik ve patofizyolojik fonksiyonları tanımlanmamıştır. Bununla birlikte, sekretoglobinlerin bilinen görevleri arasında akciğer koruması ve onarımı, immün modülasyon ve kemirgenlerdeki eş seçimi yer alır. Mammaglobin gibi bazı sekretoglobin aile üyeleri, epitelyal kanser biyobelirteçleri olarak başarıyla kullanılmıştır. Sekretoglobinler, salgılanmadan önce dimer formdaki küçük (insanlarda 10 kDa) proteinlerdir. Dimerler, proteazlara, ısıya ve pH'a karşı dayanıklıdır. Tavşan ve sıçan uteroglobini de dahil olmak üzere birçok sekretoglobinin kristal yapıları açıklığa kavuşmuştur. Bu proteinler, dört adet α -heliks yapı içerir ve kovalent disülfür bağları ve kovalent olmayan etkileşimlerle bir arada tutulan anti-paralel formda yönlendirilmiş homo veya hetero-dimerler halinde birleşir (Jackson ve ark., 2011; Pilon, 2000).

SCGB1A1 alt ailesi, blastokinin olarak da bilinen uteroglobin (UGB) proteinini içerir ve ailenin ilk üyesidir. Bu nedenle, biyolojisi hakkında diğer sekretoglobinlere göre daha fazla bilgi mevcuttur. İnsanlarda, SCGB1A1 periferik solunum yolu yüzey sıvısında yüksek oranda bulunur; ayrıca uterin endometriyum ve prostatta da eksprese edilir. Solunum yollarında, SCGB1A1 birçok hücre tipinde, özellikle Clara hücrelerinde eksprese edilir ve immünomodülasyonda hücre infiltrasyonunun

düzenlenmesi ve yaralanma sonrası doku onarımında rol oynadığı görülmektedir (Beier, 2000; Wong ve ark., 2009).

SCGB1B alt ailesinde, insan genomu evrimsel olarak fare androjen bağlayıcı proteinleri kodlayan genlerle (Scgb1b ve Scgb2b) kümelenen altı tane gen içerir (Emes, 2004). SCGB1C1 alt ailesi, SCGB1C1 olarak bilinen Bowman'ın koku mukozasındaki bezlerine lokalize olduğu gösterilen proteini içerir (Dear ve ark., 1991).

SCGB1D alt ailesi, SCGB1D1 ve SCGB1D2 sırasıyla lipofilin A ve lipofilin B olarak da bilinen proteinleri içerir. Lipofilinler, daha sonra tetramerler oluşturmak için birleşen SCGB2A proteinleri ile heterodimerler oluşturur (Lehrer ve ark., 2000).

SCGB2A alt ailesinde, SCGB2A1 ayrıca lipofilin C (mammaglobin B) olarak da bilinir. SCGB2A2 ayrıca mammaglobin A olarak da bilinir ve SCGB1D2 ile heterodimerler oluşturarak meme epitelinde dokuya özgü bir şekilde eksprese edilir (Goedegebuure ve ark., 2004).

Sekretoglobin süper ailesinin üye sayısı son birkaç yılda giderek artmaktadır. Mevcut durumda, bu aile 10 insan sekretoglobin geni ve 5 psödogen içermektedir (**Tablo 1**) (Ghersevich ve Ceballos, 2014).

Tablo 1: İnsan sekretoglobın proteinleri (Ghersevich ve Ceballos, 2014)

Protein İsimleri	Sembolü	Diğer isimleri
Uteroglobın	SCGB1A1	Clara hücresi 16-kDa protein (CC16)
Mammaglobin A	SCGB2A2	Mammaglobin 1, hMAM, Mammaglobin
Mammaglobin B	SCGB2A1	Mammaglobin 2, MGB2, Lipofilin C
Lipofilin A	SCGB1D1	-
Lipofilin B	SCGB1D2	BU101
Gama interferon tarafından indüklenabilen sekretoglobın	SCGB1D4	IFN-gama kaynaklı SCGB
Ligand bağlayıcı protein RYD5	SCGB1C1	RYD5
Pnömo salgı proteini	SCGB3A2	Uteroglobın-ilişkili protein 1
Normal-1'de yüksek sitokin	SCGB3A1	Pnömo salgı proteini 2
Sekretoglobın benzeri protein	SCGB2B2	SCGBL

4.3. Mammaglobin A ve Mammaglobin B

Meme kanserinde, kanserin başlangıcı ve ilerleyişinden sorumlu biyolojik yollara yeni bakış açıları sağlamak, meme kanseri gen ekspresyonunun tanımlanması ile ilişkilidir. Bu bağlamda yapılan araştırmalar sıklıkla; tümör prognozu, meme kanserinin tedavisi ve erken teşhisi için klinik açıdan kullanılabilir olan epidermal büyüme faktörü (EGF) ve Her2/neu gibi genetik işaretleyiciler ile ilgilidir. Son yıllarda ise, meme ile ilişkili, izole edilen yeni bir gen olarak mammaglobin refere edilmektedir. Yapılan araştırmalar, tüm meme karsinomlarının %80'inde mammaglobin transkriptinin aşırı eksprese edildiğini göstermektedir. Periferik kök hücre ürünlerinde ve lenf bezlerinde gizli meme kanseri metastazlarının tespit edilmesinde, mammaglobin ekspresyonu doku spesifikliği ile göreceli benzersiz bir biyobelirteç olarak kullanılabilir. Mammaglobinin klinik olarak en

faydalı özellikleri, meme spesifik ekspresyonu ve salgılanan yapıda oluşudur (Goedegebuure ve ark., 2004).

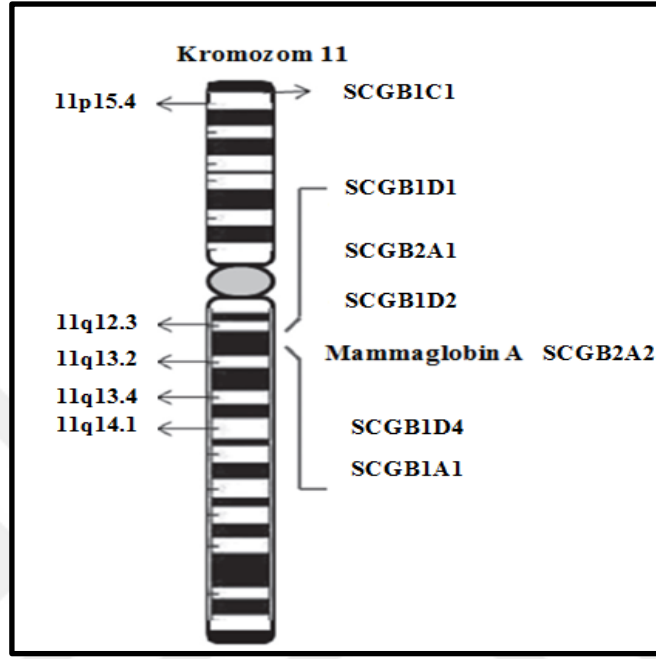
Human mammaglobin (hMAM) 1996 yılında yeni bir cDNA geni olarak izole edilmiştir. hMAM geni kromozomun 11q12.3–13.1 bölümüne lokalizedir ve 10,5 kDa (93 aminoasit içerir) büyüklüğünde bir glikoproteindir. Mammaglobin A ya da Mammaglobin-1 olarak da isimlendirilir. Mammaglobin, sekretoglobin süper ailesine ait bir proteindir. hMAM'ın amino asit sekansı uteroglobin gen ailesi homolojisi ile tanımlanmaktadır. Çoğu meme kanserinden elde edilen hücrelerde oldukça spesifik bir ekspresyona sahiptir ve dolaşımda olan veya yayılmış tümör hücrelerini tespit etmek için kullanılmaktadır. Ek olarak, Mammaglobin A meme kanserini hedef alan immünoterapiler için potansiyel bir terapötik hedef olarak araştırılmaktadır (Suchy ve ark., 2000; Fleming ve Watson, 2000; Ghersevich ve Ceballos, 2014).

Mammaglobin B geni ilk olarak 1998'de Becker tarafından izole edilmiştir. MGB2 (Mammaglobin-2) şeklinde gösterilen, Mammaglobin B genine ayrıca SCGB2A1 (sekretoglobin, 2A ailesi, üye 1) veya lipofilin C veya lakriglobin de denir ve 11q12.2 kromozomuna lokalizedir. Mammaglobin B, gen ekspresyon profillemesi ile seröz papiller yumurtalık kanserinde oldukça farklı şekilde eksprese edilen bir uteroglobin gen ailesi üyesidir. Mammaglobin B (MGB2) gen sekansı, meme dokusunda eksprese edilen ve meme kanserinde upregüle bir gen olan Mammaglobin A (MGB1) ile oldukça homolog bir yapı göstermektedir. Yumurtalık ve endometrium gibi kanser türlerinde Mammaglobin B'nin biyobelirteç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Tassi ve ark., 2007; Tassi ve ark., 2009).

4.3.1. Mammaglobin'in (Mammaglobin A) yapısı

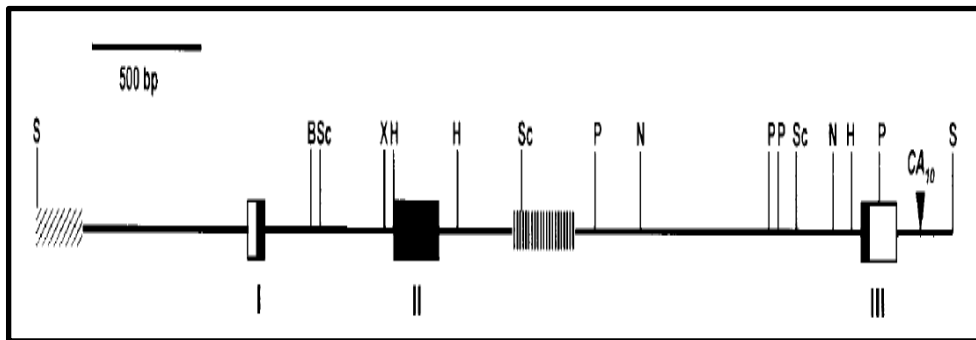
Sekretoglobin aile üyeleri homodimer veya heterodimer olarak mevcuttur. Mammaglobin 65. pozisyon hizasında sistein rezidüelerinin korunmasından ötürü heterodimer olarak tanımlanmıştır. Mammaglobin A geni, üç ekzon (119 bp, 188 bp ve 199 bp) ve iki introndan (603 bp ve 1888 bp) oluşur. Bu ekzon ve intron düzenlemesi ve karşılık gelen bağlantı yerleri sekretoglobin ailesi üyeleri arasında iyi korunmuştur. Mammaglobin A geninin dizilemesi, 5' ucundaki proteine çevrilmemiş insana özgü alu tekrar motifini içeren sekansın birkaç tekrarı sonucu açıklığa kavuşmuştur. Mammaglobin A'yı kodlayan genler ve insan sekretoglobin süper

ailesinin diğer üyelerinin çoğu, 11q12.3-13.1 kromozomunda kümelenmiş halde bulunur. Yapıları itibariyle ortak atadan gelen bir sekanstan türetilmiş multigen ailesi oluştururlar (**Şekil 1**) ve bu bölge genellikle meme kanserinde çoğalır (Goedegebuure ve ark., 2004; Ghersevich ve Ceballos, 2014; Watson ve ark., 1998).



Şekil 1: Mammaglobin A ve diğer bazı sekretoglobulin aile üyelerinin kromozom üzerindeki lokalizasyonu (Ghersevich ve Ceballos, 2014)

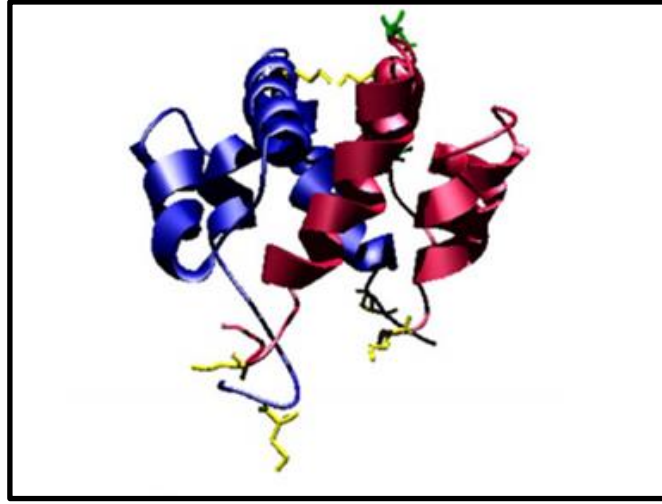
Mammaglobin geninin restriksiyon haritası **Şekil 2**'de verilmiştir. Proteine çevrilmemiş ekzon dizisi içi boş beyaz kutularla belirtilirken proteine çevrilmiş dizi ise içi dolu siyah kutularla gösterilmiştir. Gölgele kısımlar ise transkribe olmayan bölgeyi ifade eder (Watson ve ark., 1998).



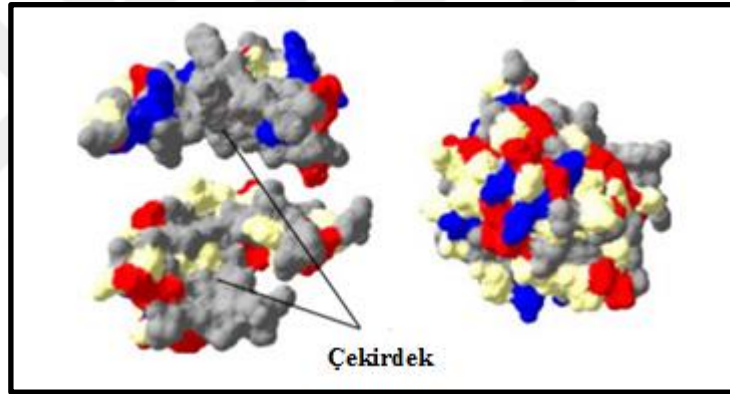
Şekil 2: İnsan mammaglobin geninin restriksiyon haritası (S: SalI; B: BamHI; Sc: SacI; X: XbaI; H: HindIII; P: PstI; N: NcoI restriksiyon enzimleri; CA: Sitozin-adenin dinükleotidi) (Watson ve ark., 1998)

Mammaglobin A, molekül ağırlığı 10,5 kDa olan bir glikoproteindir. İlk 19 rezidüsü 8,5 kDa büyüklüğündeki olgun proteinin salgılanması sırasında ayrılan hidrofobik bir sinyal peptidine karşılık gelir. Meme dokusunda, Mammaglobin A glikozillenir ve iki molekül arasında üç disülfid köprüsünün oluşmasına izin vererek antiparalel formda heterodimer olarak lipofilin B'ye kovalent bağlanır. Aynı zamanda, 45 kDa'lık bir heterotetramer olarak iki heterodimerin kovalent olmayan bağı ile oluşturulabilir. Mammaglobin A'nın birincil dizisinde iki tane N-bağlı glikozilasyon bölgesi vardır ve her bölge kendisine bağlanmış şekilde yaklaşık 3500 Da büyüklüğünde şekere sahiptir. Normal meme ve meme kanseri dokularında farklı Mammaglobin A formları (18kDa ve 25 kDa) tespit edilmiştir. 25kDa olan tamamen glikozile edilmiş Mammaglobin A - Lipofilin B kompleksi iken 18kDa büyüklüğünde olan ise kısmen glikozile edilmiş bir Mammaglobin A - Lipofilin kompleksidir (Ghersevich ve Ceballos, 2014).

Mammaglobin protein kompleksinin 3 boyutlu yapısı **Şekil 3**'de verilmiştir. Mammaglobin kırmızı, lipofilin B ise mavi renktedir. Altı tane sistein yapısının birbiriyle yaklaşmasını sağlamak için düzgün biçimde istiflenen her bir protein için dört tane alfa heliks yapısının düzenlenmesi görülür (sarı çubuk modelleri). Ayrıca, bağlı şekerlerin solvent içerisinde zıt kutuplara yerleşmeleri için mammaglobinin üç adet heliks yapısının başlangıcında ve sonunda iki tane N-bağlı glikozilasyon bölgesi (yeşil çubuklar) gösterilmektedir. **Şekil 4**'te ise amino asit polaritesi ile renklendirilmiş mammaglobin yüzey diyagramı gösterilmektedir. Yüzey diyagramında, kırmızı renkli bölge asidik rezidüleri, mavi renkli bölge bazik rezidüleri ve sarı renkli bölge polar kısımları göstermektedir. Hidrofobik rezidüler ise gri renktedir. Sağdaki görüntü, katlanmış proteinin dış kısmının polar yapısını gösterir. Zincirler tek tek birbirinden ayrılır ve döndürülürse, proteinin içinde bir hidrofobik cep görülebilir (soldaki görüntü) (Zehentner ve Carter, 2004).



Şekil 3: Mammaglobin protein kompleksinin 3 boyutlu yapısı (Zehentner ve Carter, 2004)



Şekil 4: Mammaglobin proteinin yüzey diyagramı (Zehentner ve Carter, 2004)

4.3.2. Mammaglobin ve meme kanseri

Watson ve arkadaşları, hMAM'ın ekspresyonun meme bezi ve meme tümörü hücre hatları ile sınırlı olduğunu bildirmiştir (Watson ve Fleming, 1996). Mammaglobinin, meme tümörü oluşum sürecindeki fonksiyonel önemi halen açık olmasa da, mammaglobin ekspresyonunun meme kanseri biyolojisi ile ilişkili olduğunu öne süren iki özellik mevcuttur. İlk olarak, hem Northern blot analizi hem de 15 farklı yetişkin insan dokusunun daha hassas ve kapsamlı bir RT-PCR analizi, mammaglobin ekspresyonunun meme beziyle sınırlı olduğunu göstermiştir. İkincisi

ise, mammaglobin insan meme tümör hücre hatlarında ve kötü huylu olmayan meme dokusuna oranla primer meme tümörlerinde çoğunlukla yüksek miktarlarda eksprese edilir. Bir ön araştırmada, 10 meme karsinoma hücre hattının 5'inin (%50), 35 primer insan meme tümörünün 8'inin (%23) ve 21 metastatik meme tümörünün 13'ünün (%62) yüksek düzeyde mammaglobin mRNA ekspresyonu gösterdiği bildirilmiştir. Meme tümörü biyopsileri analizinde hMAM mRNA seviyeleri vakaların % 23'ünde artmıştır. Meme kanserli hastaların periferik kanında yapılan çalışmalarda hMAM mRNA'nın sıklıkla upregüle olduğu raporlanmıştır. Meme tümörleri arasında mammaglobin ekspresyonunun; tümör derecesi, histolojik tipi, tümör evresi veya hormon reseptör durumu ile ilişkisi gösterilememiştir (Watson ve ark., 1998; Suchy ve ark., 2000; Zach ve ark., 1999).

Mammaglobin ekspresyonu, insan uterus, akciğer, yumurtalık ve plasentada tespit edilememiştir. Bu bulgu, mammaglobin eksprese eden hücrelerin, sadece spesifik birkaç dokuda eksprese olan ve metastaz yapan tümör hücrelerinin bir alt sınıfı olduğu görüşünü desteklemektedir. Ayrıca, bazı çalışmalar metastatik meme kanserli hastalardan gelen lenf nodlarında tespit edilebilir mammaglobin mRNA içerdiğini, normal lenf nodlarında ise hMAM ekspresyonunun tespit edilemediğini bildirmiştir (Suchy ve ark., 2000). Normal, in situ ve invazif primer tümör elementlerini içerecek şekilde seçilen 13 meme tümöründe gerçekleştirilen ve çoğu durumda aksiller lenf nodu metastazlarını içeren in situ hibridizasyon ile yapılan ileri araştırmalar, mammaglobin ekspresyonunun tüm elementlerde meydana geldiğini, epitel hücrelerinde sınırlı olduğunu ve normal hücrelere kıyasla tümör hücrelerinde önemli ölçüde arttığını göstermiştir. Bağımsız 20 adet primer meme tümörü ve bunlara karşılık gelen aksiller lenf nodları içindeki mammaglobin ekspresyonunun analizinde 13 lenf nodunun hepsinin pozitif olduğunu ve metastatik meme karsinomu için negatif olan yedi nodun hiçbirinin mammaglobin pozitif olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar, mammaglobinin, aksiller lenf nodu meme metastazlarının bir belirtici olabileceğini göstermektedir (Leygue ve ark., 1999). Mammaglobin 1 (MGB1), meme epitel dokularında eksprese edilen bir proteindir ve çoğu meme karsinomunda aşırı eksprese edilir. Dokuya spesifik ekspresyon profili nedeniyle, MGB1 dolaşımdaki meme kanseri hücrelerinin tespiti için önde gelen bir biyobelirteç olarak kabul edilir. Buna istinaden, MGB1 0,2 mm²'den büyük meme kanseri metastazlarını

tespit etmek için klinik bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. MGB1 ekspresyon profillerinin meme kanseri hücresi patogenezi ile güçlü bir şekilde birleşmesine rağmen, MGB1'in kanser süreçlerinde biyolojik önemi hala tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (Picot ve ark., 2016).

MGB1 ekspresyonunu kanser davranışı ve hastalık sonucu ile ilişkilendiren birçok çelişkili çalışmalar vardır. Bazı çalışmalar, meme kanserinde daha iyi prognostik değer ve daha az agresif fenotipler için yüksek MGB1 ekspresyon seviyelerini ilişkilendirmiştir. Bu bulgular, yüksek MGB1 ekspresyon seviyelerine sahip primer tümörlerin düşük tümör dereceleri, hormon reseptörlerinin baskılanmış ekspresyonu, nükleer diploid içeriği ve nodal invazyonun bulunmadığı durumlar ile desteklenir. Ayrıca primer tümörlerde artmış MGB1 seviyelerinin daha uzun süreli nüksetmeyen sağkalım süresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Öte yandan, bazı çalışmalar MGB1 ekspresyonunun kötü prognostik sonuçlarla ilişkili olduğunu bildirmektedir. Son yapılan çalışmalar, meme kanseri hastalarının periferik kanındaki yüksek MGB1 seviyelerinin, daha büyük tümör büyüklüğü ve daha fazla metastaz gelişme riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir. MGB1 ekspresyonu olan agresif bir meme kanseri hücre modelinin kullanılmasıyla, MGB1 ekspresyonunun kaybının daha az agresif bir kanser fenotipi ile sonuçlandığı gözlemlenmiştir ve bu durum MGB1'in meme kanseri malignitesi ve ilerlemesinde rol oynadığını gösteren bir değerlendirmedir (Picot ve ark., 2016). Yapılan başka bir çalışmada, primer ve metastatik meme tümörlerinde ve periferik dolaşımda bulunan meme tümörü hücrelerinde mammaglobin ekspresyonunun saptanma sıklığı araştırılmıştır. İncelenen 100 primer insan meme tümörünün 81'i mammaglobin proteini için kuvvetli derecede immünopozitif sonuç vermiştir. Boyama, tümör derecesinden ve histolojik tipten bağımsız olarak gerçekleştirilmiştir. Metastatik meme kanserli hastalardan elde edilen 11 lenf nodundan 10 tanesinde mammaglobin mRNA'sı tespit edilmiştir ve metastatik olmayan lenf nodlarında mammaglobin ekspresyonu saptanmamıştır. Ayrıca, RT-PCR analizi kullanılarak yapılan çalışmada, mammaglobin mRNA'sının otolog kök hücre nakli için kullanılan 15 ürünün 9'unda tespit edildiği bildirilmiştir. Bu sonuçlar, meme kanseri hasta yönetimi için bir araç olarak mammaglobinin klinik çalışmalarda kullanılabileceğini göstermektedir (Watson ve ark., 1999; Douglas-Jones ve Woods, 2009).

Meme kanseri hastalarında dolaşımdaki tümör hücrelerinin erken tespiti ölüm oranını azaltmak için çok önemlidir. Mammaglobin, meme kanseri hücrelerinin yüzeyi ile ilişkilidir ve bu nedenle meme kanserinde başarılı bir şekilde hedeflenmiş ilaç taşınması için faydalı bir moleküler belirteç olarak önerilmiştir. Her ne kadar birçok rapor, mammaglobin proteinin meme kanseri için faydalı bir belirteç olduğunu öne sürmesine rağmen, mammaglobinin meme kanseri hücreleri üzerinde biyolojik rolü yeterince anlaşılamamıştır. Yapılan çalışmaların çoğu, mammaglobinin meme kanserindeki biyolojik rolünü bilmeden, dolaşımdaki tümör hücrelerini tanımlamak için tespit yöntemleri geliştirmeye odaklanmıştır. Meme kanserinde yüksek mammaglobin ekspresyon seviyeleri, mammaglobinin proliferasyon, migrasyon ve invazyon gibi tümörijenезi ile ilişkili fonksiyonlarla ilgili olabileceğini düşündürmektedir ve meme kanserinde gen tedavisi için çok önemli bir hedef olma potansiyelindedir. Mammaglobinin, kanser teşhisinde ve meme kanserinin prognozunu öngörmeye ek bir belirteç olarak yararlı olduğunu öne sürülmekle beraber hormon reseptörleri ve Her2 ile kombinasyonu meme kanserinin başarılı tedavisi için faydalı olacaktır (Koh ve ark., 2014; Hassan ve ark., 2017).

Mammaglobin, normal meme dokusunda düşük seviyelerde görülebilmeye rağmen, meme kanserinde ekspresyonu belirgin şekilde artar ve kanserin daha yüksek derecesiyle ilişkilendirilir. Kan ve vücut sıvılarındaki tespiti, kanser metastazı ve prognoz seviyesi ile de ilişkilidir. Bu durum, özellikle meme kanseri olma riski yüksek bireylerde erken teşhis için önem arz etmektedir. Mammoglobin ayrıca meme kanseri hücrelerinin immünoterapötik hedeflemesi için de kullanılmaktadır (Al-Joudi, 2014; Wang ve ark., 2009).

Mammaglobin, primer meme kanserlerinde % 40 ila % 80 oranında aşırı eksprese edilir. MAM-A DNA aşısının güvenliğini ve biyolojik etkinliğini değerlendirmek için Faz I klinik çalışmaları başlatılmıştır. Çalışmalar sonucunda, MAM-A DNA aşısının güvenli olduğu belirtilmiştir ve ön kanıtlar, ilerlemesiz sağ kalımın (PFS) iyileştirildiğini göstermiştir. MAM-A DNA aşısının meme kanserinin önlenmesinde ve tedavisindeki potansiyelini tanımlamak için ek çalışmalar gerekmektedir (Tiriveedhi ve ark., 2014). Meme kanseri hastalarında dolaşımdaki tümör hücrelerinin erken tespitinde aptamerlerle çalışılmıştır ve dolaşımdaki tümör

hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen MGB1 ve MGB2 protein biyobelirteçlerini saptamada aptamerlerin büyük bir potansiyel olduğu gösterilmiştir (Hassan ve ark., 2017).

4.4. Kanserde Gen Tedavisi

Gen tedavisi, mevcut bir anormalliğin düzeltilerek veya hücrelere yeni bir fonksiyon sağlayarak terapötik bir etki üretmek için hücrelerin genetik modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır. Gen tedavisi genel olarak iki ana bileşen gerektirir. Birincisi, terapötik bir gen ve ikincisi, bu genin uygun hücrelere verilmesine izin veren bir vektör. Hedef hücrelerde terapötik genin istenen dokuya güvenli bir şekilde verilmesi ve terapötik etkinliğinin devamlılığını sağlamak için belirli stratejiler de gereklidir (Amor, 2001).

Avrupa İlaç Ajansı (EMA), bir gen tedavisi tıbbi ürününün, aşağıdaki iki özelliği yerine getiren biyolojik bir tıbbi ürün olduğunu tanımlar: (a) insanda kullanılan veya insana uygulanan bir rekombinant nükleik asidi içeren veya bunlardan oluşan aktif bir madde içermesi, genetik bir sekansın düzenlenmesi, onarılması, değiştirilmesi, eklenmesi veya silinmesi; (b) terapötik, profilaktik veya teşhis edici etkisi, doğrudan içerdiği rekombinant nükleik asit dizisi veya bu dizinin genetik ifadesinin ürünü ile ilgilidir. ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), gen tedavisini, nükleik asitler, virüsler veya genetik mühendislik mikroorganizmaları ile konak genomuna entegre olarak etkilerini transfer edilen genetik materyalin transkripsiyonu ve / veya translasyonu şeklinde gösteren ürünler olarak tanımlar (Wirth ve ark., 2013).

Genel olarak, gen tedavisi iki kategoride sınıflandırılmaktadır. Bunlar, eşey hücre gen tedavisi ve somatik gen tedavisidir. Bu iki yaklaşım arasındaki fark, somatik gen tedavisi bazı hedef hücrelere genetik materyalin sokulmasıdır ancak bu değişiklik yeni nesillere aktarılmaz. Eşey hücre gen tedavisinde ise, terapötik veya modifiye edilmiş gen gelecek nesillere aktarılır. Bu fark önemlidir, çünkü mevcut yasalar yalnızca somatik hücrelerde gen tedavisine izin vermektedir ancak FDA Amerika Birleşik Devletleri'nde eşey hücre gen tedavisine izin vermiştir (Wirth ve ark., 2013; Ibraheem ve ark., 2014).

Kanser, her yıl, dünya genelinde sekiz milyondan fazla ölümle sonuçlanan önemli bir küresel sağlık sorunudur. Kanser, genomdaki konakçı ve çevresel etkileşimler tarafından düzenlenen değişiklikleri içeren karmaşık yapıda ve pek çok faktörün etkili olduğu bir hastalıktır. Kanser bu şekilde nitelendirilmesine sebep olan özellikleri, büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık, doku invazyonu ve metastaz yeteneği, sınırsız çoğalma potansiyeli, aralıksız devam eden anjiyogenezi ve apoptoztan kaçışıdır. Ekstraselüler matriksinin yanı sıra, çeşitli düzenleyici proteinleri eksprese eden çeşitli malign olmayan hücrelerden oluşan tümör mikro ortamı, kanserin başlatılmasında ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Gen tedavisi, genetik materyali hedef hücrelere veya dokuya ileterek terapötik bir etki elde etmek için onu eksprese etmeyi amaçlar. Lokal olarak uygulanabilmesi nedeniyle geleneksel tedavilere kıyasla avantaj sağlamaktadır. Bu sebeple, sistemik yan etki riski oluşturmada yüksek bir terapötik doz sağlar. Ayrıca, çoğu gen tedavisi tek seferlik uygulama olduğundan, uzun vadede maliyet açısından da etkili olabilir. Bugüne kadar kanser, gen tedavisi ile tedavi edilen en yaygın hastalıktır. Dünyada devam etmekte olan tüm klinik gen tedavisi denemelerinin %60'ından fazlasını kanser oluştururken onu ardından monogenetik ve kardiyovasküler hastalıklar takip etmektedir (Wirth ve Ylä-Herttuala, 2014; Wirth ve ark., 2013).

Gen tedavisi, kanser hücresinin ölümüne neden olmak veya tümörün büyümesini yavaşlatmak için yeni genin hedef hücreye sokulduğu ya da mevcut genin manipüle edildiği yeni bir tedavi yöntemidir. Bu alanda farklı yaklaşımlar mevcuttur ve gen ekleme tedavisi, viral gen tedavisi, viral olmayan gen tedavisi ve RNA interferans-temelli gen tedavisini içerir (Anaya-Ruiz ve Perez-Santos, 2015).

4.5. RNA İnterferans Stratejisi

Mesajcı RNA (mRNA) seviyesindeki protein ekspresyonunun RNA aracılı susturulması, hastalığın üstesinden gelmek için yeni bir terapötik strateji sunmaktadır. Hedefe özgün olan bu yöntem gen tedavisine yeni bir boyut kazandırmıştır. RNA interferans (RNAi), omurgasız hayvanlarda ve bitkilerde gen fonksiyonunun analizi için güçlü ve yaygın olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (Howard ve ark., 2006; Yu ve ark., 2002). RNAi teknolojisi, sekansa

spesifik gen inhibisyonu sağlamaktadır. Proteinlerin fonksiyonlarının ve aktivitelerinin, baskılanarak ya da durdurularak temel mekanizmaların araştırılması moleküler biyoloji alanında çalışılan güncel bir konudur (Agrawal ve ark., 2003).

RNAi, transkripsiyonu baskılayarak (transkripsiyonel gen susturma, TGS) veya sekansa spesifik RNA degradasyonunu aktive ederek (post-transkripsiyonel gen susturma, PTGS veya RNA interferans) transkript seviyesini sınırlayan yeni bir gen düzenleme mekanizmasıdır. RNAi'nin meydana gelmesi sırasında, indükleyici molekülleri önce daha küçük parçalara ayıran ve sonunda hücresel veya viral mRNA moleküllerini (hedef olarak adlandırılır) tahrip eden çift sarmallı RNA molekülleri (dsRNA) bu hücrenin indükleyicileri veya aktivatörleri olarak görev alır (Agrawal ve ark., 2003).

RNAi teknolojisi bitkilerde, daha mor olması beklenen transgenik petunya çiçeklerinin araştırması sırasında ortaya çıkmıştır. 1990 yılında, Napoli ve arkadaşları antosiyanin pigmentlerinin üretiminde rol alan bir enzim olan kalkon sentaz (chsA) aktivitesini arttırmak istemiştir. Şaşırtıcı bir şekilde, chsA kodlama bölgesini barındıran transgenik petunya bitkilerinin bazıları, hem endojen hem de transgen kalkoli sentaz aktivitesini kaybetmiş ve bu nedenle çiçeklerin çoğu alacalı veya beyaz renkte görünmüştür. Baskılama terimi mRNA'ların kaybını tanımlamak için kullanılmıştır (Napoli, 1990).

RNAi olayı, ilk olarak, Fire ve arkadaşları tarafından saflaştırılmış uzun çift iplikli RNA (dsRNA)'yı doğrudan *Caenorhabditis elegans* solucanının vücuduna entegre etmek suretiyle gen susturma içindeki indükleyicilerin biyokimyasal doğasını açıkça ortaya koyarak tanımlanan bir antisense yaklaşımıdır. RNAi ilk olarak 1980'lerin sonlarında bitki biyologları tarafından gözlenmiştir ancak nematod türü olan *Caenorhabditis elegans* üzerindeki çalışmaların RNAi'nin evrimsel olarak korunmuş bir gen susturma mekanizması olduğunu göstermesi ile 1990'ların sonlarına kadar belirsiz kalan moleküler mekanizma bu çalışma ile aydınlanmıştır. Çift sarmallı RNA tarafından sekansa spesifik post transkripsiyonel gen susturma, bir dizi organizmada korunur, bu organizmalar ise bitkiler, *Neurospora*, *Drosophila*, *C. elegans* ve memelilerdir. Bu süreç virüslere karşı normal savunma ve transpoze

edilebilir genetik elementlerin mobilizasyonu ile ilgilidir (Fire ve ark., 1998; Leung ve Whittaker, 2005).

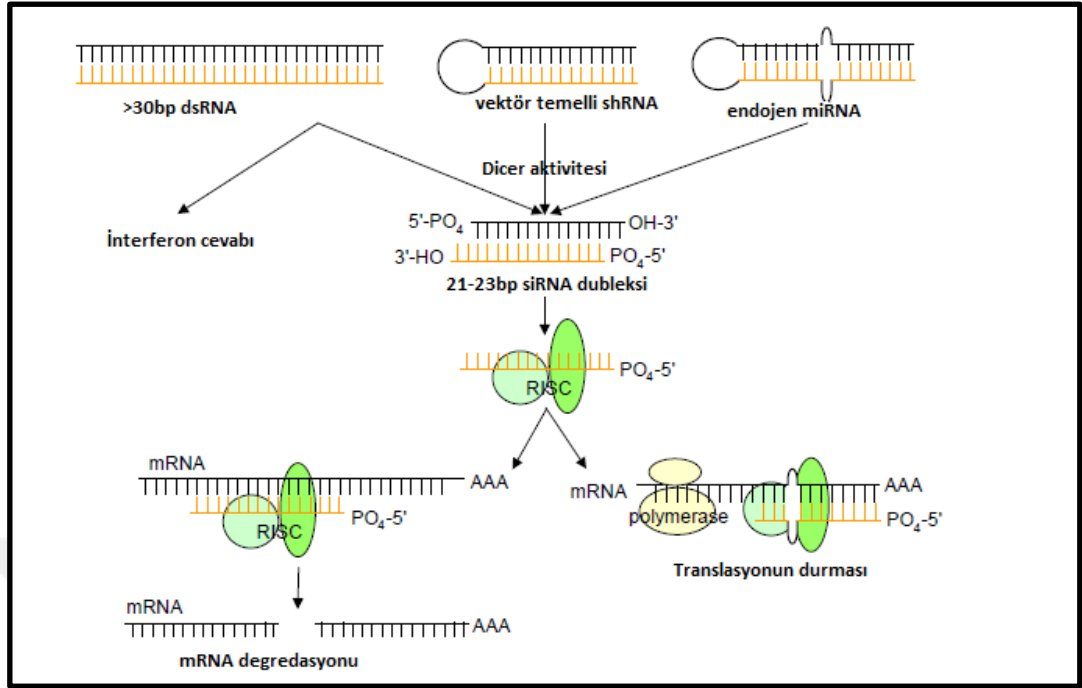
4.5.1. RNAi mekanizması

RNAi, virüs gibi yabancı patojenlere karşı koruma mekanizması olarak spesifik, tamamlayıcı mRNA sekanslarının degradasyonunu katalize etmek için RNA moleküllerini kullanan ökaryotik hücrelerdeki endojen bir gen regülasyon mekanizmasıdır ve çift sarmallı RNA molekülü bu mekanizmanın temelini oluşturmaktadır. RNAi başlatma basamağı olarak adlandırılan ilk adım, RNA nükleazlarının büyük bir dsRNA'ya bağlanmasını ve daha sonrasında bunun yaklaşık 21 ila 25 nükleotitlik RNA fragmentlerine ayrılmasını içerir. dsRNA hücrelere verildiğinde, Dicer olarak bilinen RNAazIII ailesinin, 200 kDa büyüklüğündeki nükleaz enzimi, RNA'yı yaklaşık 21-23 nükleotit uzunluğundaki daha kısa parçalara keser. İkinci aşamada, bu fragmentler veya diğer bir adıyla küçük interferans RNA (small interfering RNA, siRNA) daha sonra birçok farklı protein içeren kompleks yapıda olan RNA ile indüklenen gen susturma kompleksi (RISC) ile bağlanır. Bu proteinlerden biri siRNA'nın çözülmesinden ve sense veya passenger zincirinin degradasyonundan sorumlu olan Argonat 2'dir (Ago2). Tek zincirli antisense zincir daha sonra RISC kompleksinin siRNA'nın antisense zincirinin tamamlayıcısı olan mRNA'yı aktif olarak arayıp bulmasını sağlar. mRNA, siRNA'nın antisense zincirine bağlandıktan sonra, Ago2 proteini mRNA'nın antisense zincirinin 5' ucundan başlayarak 10. ve 11. nükleotitler arasında degradasyonuna aracılık eder (Agrawal ve ark., 2003; Leung ve ark., 2014).

Terapötik olarak, RNAi, mikroRNA (miRNA) mimikleri, küçük interferans RNA'lar (siRNA), kısa saç tokası RNA'ları (shRNA) ve Dicer substrat RNA'ları (dsRNA'lar) dahil olmak üzere küçük RNA duplekslerinin verilmesiyle çalışır. shRNA yolağı en fazla basamak gerektirir ve ön işlemler nükleusta gerçekleşir. Onu hemen ardından Dicer işlemesi gerektiren dsRNA takip eder. siRNA ve miRNA mimik yolları, taşınmasından RISC yüklemesine kadar en doğrudan olanıdır. Aradaki fark, miRNA'ların hedef dizilere % 100 tamamlayıcı olmamasıdır. Bu fark susturma sonucunu etkiler: miRNA'lar transkripsiyonel baskılamayı indüklerken, siRNA'lar Argonat 2 aracılı degradasyonu indükler (Bobbin ve Rossi, 2016).

Entegre edilmiş transpozonlar, replike eden virüsler veya yeni tanımlanmış protein kodlamayan ekspresyon düzenleyici mikroRNA (miRNA) moleküllerinin birisi tarafından üretilen dsRNA'lar kısa dsRNA'lara proses edilir. Bu kısa RNA'lar, Dicer olarak bilinen bir sitoplazmik ribonükleaz III (RNAaz III) benzeri proteini içeren bir biyokimyasal olay zincirini tetikler ve sonrasında RNA ile indüklenmiş susturma kompleksi (RISC) olarak bilinen kısmen karakterize edilmiş bir çoklu protein kompleksi oluşur ve son aşamada bu kompleks mRNA'ların degradasyonuna neden olur ve bu işlem posttranskripsiyonel gen susturmadır (Leung ve Whittaker, 2005).

Doğal olarak oluşan miRNA'lar nükleusta büyük prekürsör(öncü) formlarında sentezlenir. Drosha olarak bilinen bir enzim primer miRNA transkriptlerinin pre-miRNA'lara prosesini sağlar ve pre-miRNA'lar daha sonra Eksportin5 aracılığıyla sitoplazmaya verilir. Sitoplazmada, Dicer enzimi, endojen miRNA'ların çift sarmallı molekül yapısının ayrılmasından sorumludur ve 19-25 baz çifti (bp) uzunlukta fragmentlerin ayırılmasına kadar bu işlemi yapar. siRNA, RISC kompleksi içine dahil olarak dupleks bir yapı oluşturur. siRNA'nın 5' ucunda fosfat grupları, 3' ucunda hidroksil grupları yer alır ve 3' uçları 5' ucuna kıyasla 2-3 nükleotid kadar daha uzundur, bu sebeple 3'ucu çıkıntı (overhang) şeklindedir. Dupleks yapının oluşumundan sonra, ATP bağımlı helikaz enzimi, iki zincirden birinin mRNA'ları bağımsız olarak tanımasını sağlayarak dupleksi çözer. Tamamlayıcı zincir ile hedef mRNA arasındaki tamamlayıcılığın derecesi, mRNA susturma işleminin, siRNA-mRNA dupleks bölgesinde ya da miRNA benzeri bir translasyonel baskı mekanizması bölgesindeki mesajın alana özgü bölünmesi yoluyla elde edilip edilmediğini belirler. Endojen yolla hücrenin kendi yapısında bulunan miRNA görev alırken, eksojen yolla ise hücreye dışarıdan verilen uzun çift sarmallı dsRNA molekülleri ve vektörle taşınan kısa, saç tokası (U şeklinde) RNA'lar (short hairpin RNA, shRNA) yer alır. Bu yapılar hücreye girdikten sonra endojen RNAi mekanizması ile benzer bir yolla üzerinden proses edilir. Sonuç olarak, RNAi mekanizması, hedef mRNA üzerinde siRNA'nın tamamlayıcısı olduğu bölgeye bağlanarak mRNA'nın kesilerek degradasyonuna yol açar. Böylece ilgili gen inaktif hale getirilmiş olur. siRNA aracılı gen susturma mekanizması **Şekil 5'**te verilmiştir (Leung ve Whittaker, 2005; Liu ve ark., 2007).



Şekil 5: siRNA aracılı gen susturma mekanizması (Leung ve Whittaker, 2005)

dsRNA'lar (>30 bp), γ -IFN (gama-interferon) yolağını tetikler. İnterferon yolağı, viral enfeksiyonlarda ortak bir replikatif ara ürün olan kısmen dsRNA tarafından tetiklenen doğal bağışıklık sisteminin bir parçasıdır. Bu nedenle dsRNA'lar yerine kimyasal sentez, enzimatik bölünme veya ekspresyon sistemleri tarafından oluşturulan 21-23 bp uzunluğunda çift sarmallı siRNA'lar kullanılmalıdır. Bu moleküller Dicer ürünlerini taklit ederek ve doğrudan sitoplazmada RNAi yolağına girerek stres cevabından kaçır. siRNA dupleksleri, lipid bazlı formülasyonlar, elektroporasyon veya peptitlere bağlanma gibi yöntemlerle memeli hücrelerine transfekte edilmektedir. siRNA, memeli hücre hatlarına, primer hücrelere ve embriyonik kök hücrelere başarıyla uygulanmıştır (Leung ve Whittaker, 2005; Corey, 2007).

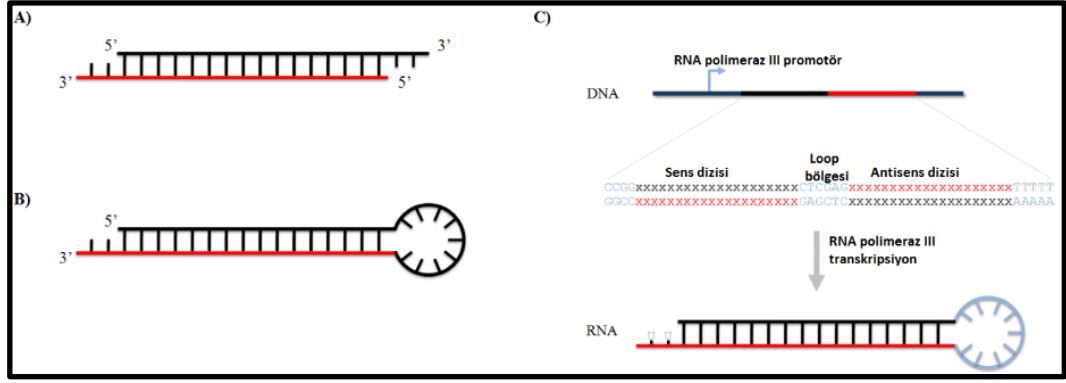
4.6. shRNA'ya İlişkin Bilgiler

Hücre içerisine ekzojen yolla dışarıdan verilen siRNA'lar, kanser hücrelerinde geçici olarak baskılama sağladıklarından dolayı devamlılık arz eden anti-kanser siRNA'ların oluşturulması, terapötik etkinin artırılması konusunda önem teşkil etmektedir. Memeli hücrelerinde siRNA aktivitesinin kalıcılığı, hücrelerin

proliferatif statüsüne göre değişir, öyle ki siRNA aktivitesi proliferatif hücrelerde 3-7 gün sürer, ancak nöronlar gibi terminal olarak farklılaşmış hücrelerde 3 hafta veya daha fazla sürebilir. Bazı uygulamalar için bu süre yeterli gelebilir ancak uzun yarılanma süresine sahip proteinler ile gerçekleştirilen araştırmalarda siRNA'nın hücre içerisine tek seferde uygulanan transfeksiyonu işlevsel bozukluğun onarımı için yeterli gelmemektedir. Bu sorunu aşmak için, hedef hücrelerde siRNA'nın stabil ekspresyonunu sağlayan vektör bazlı sistemler geliştirilmiştir (Omi ve ark., 2004; Tuschl, 2002).

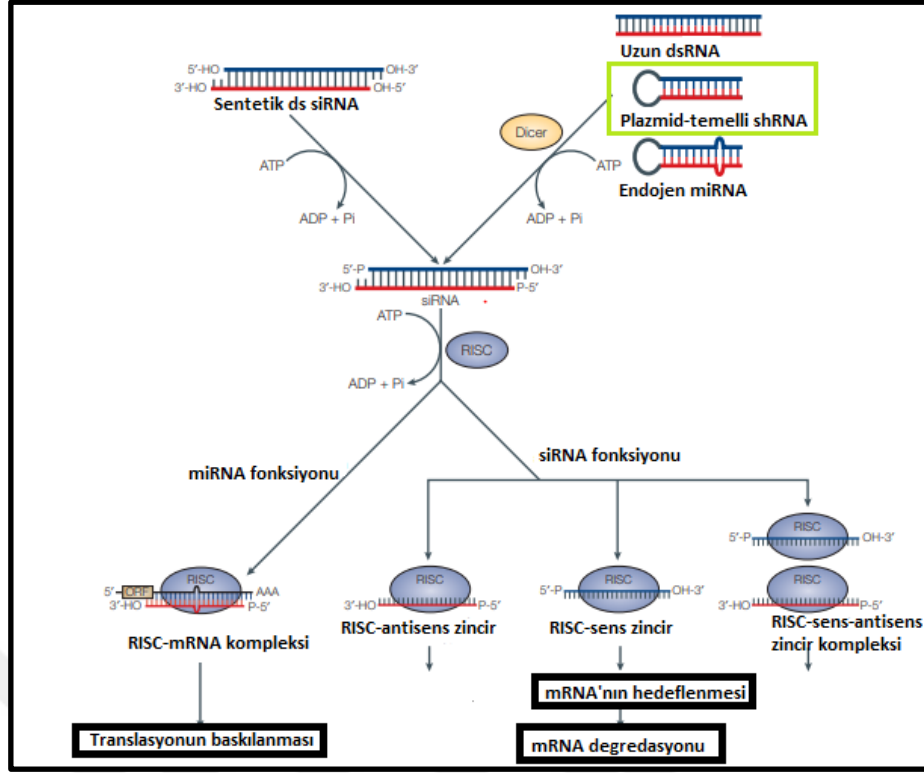
Bu vektörler, ayrı promotörlerden sense ve antisense zincirlerini eksprese eden veya siRNA üretmek için Dicer tarafından parçalanan kısa saç tokası RNA'ları (shRNA'ları) eksprese eden RNA polimeraz III promotörlerini içerir. shRNA, RNA polimeraz III enzimi ile transkripte olan 19-22 bp kısa saç tokası yapısına ve 4-10 nükleotidlik ilmek şeklindeki döngüsel yapıya sahiptir. shRNA'nın 19-22 bp uzunluğundaki döngüsel bölgesi daha sonra hücre içinde siRNA'lara bölünecek şekilde dizayn edilir (Moore ve ark., 2010). shRNA, hücre içerisine bir plazmid veya viral vektör aracılığıyla verilir. Bu tür vektör sistemleri, memeli hücrelerinde hedef genlerin etkin ve stabil bir şekilde degradasyonunda başarıyla kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, shRNA'ların siRNA'ya oranla RNAi indüklenmesinde daha kuvvetli bir etki gösterdiğini bildirmiştir. shRNA kodlanmasında görevli viral veya plazmid DNA (pDNA) vektörleri, shRNA üretimini hücre nükleusunda sentezlediği için uzun süreli bir baskılama gerçekleştirirler (Mittal, 2004; Siolas ve ark., 2005; Harborth ve ark., 2003).

shRNA ve siRNA'nın yapısal olarak birbirinden farklılığı ve shRNA'nın ekspresyon vektörüne yerleşimine ilişkin yapısı **Şekil 6**'da verilmiştir (O'Keefe, 2013).



Şekil 6: shRNA ve siRNA'nın yapısı (A) siRNA'lar, karakteristik olarak 3' ucunda 2 nükleotitlik çıkıntıya sahip RNA dupleksleridir. (B) shRNA'lar, bir döngü (loop) dizisi ile ayrılan sense ve antisense dizilerinden oluşur. (C) Ekspresyon vektörüne yerleşiminde shRNA yapısı (O'Keefe, 2013)

Uzun dsRNA'ların, miRNA'ların veya shRNA'ların Dicer tarafından işlenmesi, 21-23 nükleotid uzunluğunda siRNA'ların oluşumuna yol açar. Bu siRNA'lar daha sonra RISC kompleksi ile bağlanarak mRNA yıkımına neden olur. Ekzojen olarak sağlanan sentetik siRNA'lar, adenosin trifosfat (ATP) varlığında 5' ucundaki fosfat grupları endojen kinaz ile aktif fonksiyonel siRNA'lara dönüştürülür ve RISC bağlanması ile devam eden yolak gerçekleşir. shRNA ile gen susturulmasına ilişkin yolak **Şekil 7**'de verilmiştir (Mittal, 2004).



Şekil 7: Memelilerde RNAi aracılı gen susturulması (Mittal, 2004)

Paddison ve arkadaşları, RNAi mekanizması ile gen susturma yöntemini inceleyerek, bu mekanizmanın hedeflenen genler için de uygulanabilirliği düşüncesiyle, hücre içerisine ekzojen yoldan siRNA verilmesine benzer bir biçimde shRNA verilmesi ya da hücrede shRNA sentezinin gerçekleşmesi ile hedeflenen genlerin baskılanabildiğini göstererek uzun süreli devamlılık teşkil eden gen baskılaması sağlamışlardır (Paddison ve ark., 2002).

shRNA'nın yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar vermesini takiben, daha fazla umut vaat eden bir uygulama içermesi ve gen keşfinin kritik bir bileşeni olmaya devam etmesi gen tedavisinde büyük oranda önem arz etmektedir (Moore ve ark., 2010; Salazar ve ark., 2014).

4.7. Gen Tedavisinde Taşıyıcı Sistemler

siRNA ve shRNA gibi RNAi moleküllerinin gen tedavisinde kullanımı sınırlayan birtakım zorluklar vardır; bunlar, nükleaz degradasyonu, transfeksiyon sonrası sınırlı stabilite süresi, zayıf hücresel alım ve hedef-dışı etkinin görülmesidir. Bu gibi sorunların önüne geçerek hedeflenen terapötik etkinin sağlanabilmesi için uygun bir taşıyıcı sistemin seçilmesi gen tedavisinde önemli bir konudur. Gen tedavisinde çift sarmallı DNA (dsDNA), tek sarmallı DNA (ssDNA), plazmid DNA (pDNA) ve anti- sense oligonükleotitleri (ASON) gibi farklı tipte genetik materyaller kullanılmaktadır. Gen tedavisinin başarısı esas olarak, terapötik genin, herhangi bir biyolojik degradasyona uğramadan hedeflenen hücreye girişini sağlamaya bağlıdır. Bununla birlikte, DNA'nın biyolojik ortamdaki nükleazlara duyarlılığı, DNA makromolekülünün hidrofilik poli anyonik doğası ve büyüklüğü, hücre zarından pasif olarak nüfuz etmesini önler. Bu nedenle DNA, terapötik geni hedeflenen hücreye taşıyan, onu nükleazların degradasyonundan koruyan ve hücre içinde kopyalandığından emin olunmasını sağlayan taşıyıcı sistem veya vektör ile ilişkilendirilmelidir. Vektör adı verilen ideal bir taşıyıcı sistem aşağıda belirtilen kriterlere sahip olmalıdır:

- Güçlü bir şekilde immün sistem yanıtı oluşturmamalıdır.
- Nükleik asitleri, boyutları ne olursa olsun taşıyabilecek kapasitede olmalıdır.
- Hücre içerisine taşınan genetik materyalin sürekli ve düzenli ekspresyonunu sağlamalıdır.
- Vektör, hedef geni, özellikle hedef hücreler vücutta dağıldıklarında veya heterojen bir popülasyonun parçası olduklarında, yalnızca belirli hücrelere vermelidir.
- Hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebilmelidir.
- Ticari olarak yüksek konsantrasyonlarda ulaşılabilir olmalı, ucuz olmalı ve kolaylıkla hazırlanabilmelidir.

- Epizomal konumda kalmalı ya da genomun belirli bir bölgesine entegre olmalı ancak genoma rastgele bir şekilde entegre olmamalıdır.

Gen taşıyıcı sistemler (vektörler) iki türe ayrılır: bunlar viral vektörler ve viral olmayan vektörlerdir (İbraheem ve ark., 2014).

4.7.1. Viral vektörler

Virüsler, konak hücrenin nükleusuna nüfuz edebilen ve kendi genetik materyalini eksprese edip çoğaltabilen ve daha sonra diğer hücrelere yayılıp hücrel mekanizmaları kullanan biyolojik bir varlıktır. Araştırmacılar tarafından, terapötik genleri hücre nükleusuna vermek ve virüs yaşam döngüsünden yararlanmak için farklı virüsler kullanılmıştır. Viral vektörle bir geni transfer etmek için virüsün genetik mühendisliği tarafından modifiye edilmesi gerekmektedir. Genlerinin patojenik kısmı uzaklaştırılmıştır ve terapötik gen ile yer değiştirmiştir. Aynı zamanda virüs, hücreyi enfekte eden patojenik olmayan yapılarını (zarf proteinleri, füzojenik proteinler vb.) muhafaza eder. Sonuç olarak patojenik olmayan forma ulaşan virüsler, terapötik geni taşıyan viral vektör olarak adlandırılır. Bugüne kadar, viral vektörler, sakıncalarına rağmen, in vivo olarak yüksek transfeksiyon verimliliği nedeniyle, gen transferinde en sık kullanılan vektörlerden biridir. Virüslerinin kullanımı sınırlayan zorluklar; uyarılma sonucu akut immün cevabın ölümle sonuçlanan viral vektörlerin varlığı, büyük miktarlarda üretimlerinin çok zor ve çok pahalı oluşu ve virüslerin sınırlı boyutlarda genleri taşıyabilmesidir (İbraheem ve ark., 2014).

Taşıyıcı vektörler olarak en çok kullanılan virüsler retrovirüsler, adenovirüsler, adeno-ilişkili virüsler (AAV) ve herpes simplex virüsüdür (İbraheem ve ark., 2014). Retroviral vektörler, murin kök hücre virüsü veya Moloney murin lösemi virüsüne dayanır ve shRNA'nın bölünen hücrelere stabil şekilde girmesine izin verir. Kök hücrelerdeki gen ekspresyonunu ve bu hücrelerden türetilmiş rekonstitüye organları baskılamak için kullanılmıştır. Lentiviral vektörler, insan immün yetmezlik virüsü (HIV)-1'den türetilir ve hem bölünebilen hem de bölünemeyen postmitotik hücreleri (örneğin, nöronları) enfekte edebilirler ve transgenik hayvanları üretmek için kullanılmaktadır. Adeno-ilişkili virüslere (AAV) dayalı adenoviral vektörler, hem

bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebilir ve spesifik olarak kromozom 19'un bölgesine entegre oldukları için, retroviral veya lentiviral vektörlerden daha güvenlidir, mutajenez riski daha düşüktür (Leung ve Whittaker, 2005). Gen taşınmasında kullanılan viral vektörlerin avantajları ve dezavantajları **Tablo 2**'de verilmiştir.

4.7.2. Viral olmayan vektörler

Viral vektörlerin dezavantajları, özellikle de şiddetli immün cevap, araştırmacıları daha güvenli alternatifler bulmaya itmiştir. Viral olmayan vektörler virüslere nispeten daha güvenlidir, genellikle düşük immün yanıt oluşturur, kolaylıkla, düşük maliyetle ve büyük miktarlarda hazırlanabilirler. Bunlara ek olarak, farklı ve büyük transgenleri aktarabilirler ve stabiliteleri nedeniyle uzun süre saklanabilirler. Bu avantajlarının yanısıra, düşük transfeksiyon etkinliği kullanımlarını büyük ölçüde sınırlamaktadır. Viral olmayan taşıyıcı sistemler yöntemsel olarak iki gruba ayrılır:

- a.** Fiziksel yöntemler: Bu yöntemde, hücreye fiziksel bir kuvvet uygulanır ve uygulanan kuvvet sonucunda membran hücreleri zayıflatılarak membran daha geçirgen hale getirilir. DNA, herhangi bir taşıyıcı kullanılmadan hedefine iletilir.
- b.** Kimyasal yöntemler: DNA, çeşitli tipte kimyasal reaksiyonlarla hazırlanabilen bir taşıyıcı ile nükleusa taşınır (Ibraheem ve ark., 2014).

Tablo 2: Viral vektörlerin avantajları ve dezavantajları (Ratko ve ark., 2003)

Vektör	Avantajları	Dezavantajları
Adenovirüs	Ex vivo ve in vivo yüksek seviyede transdüksiyon etkinliği	Epizomal kalış
	Birçok hücre tipine transdüksiyon yeteneği	Geçici ekspresyon
	Proliferatif ve proliferatif olmayan hücre tiplerinde transdüksiyonu	Tekrarlanan uygulama ile immün toksisite oluşturmaması
	Yüksek titrelerde kolaylıkla üretilmesi	Hedeflemenin olmaması
Adeno-ilişkili virüsler	Gizli enfeksiyon oluşturmak için insan kromozom 19'a entegrasyon	Sınırlı taşıma boyutu: 4-5 kb
	Uzun süreli ekspresyon	İyi tanımlanmamış
	Transdüksiyonu hücre bölünmesi gerektirmez	Hedefleme yok
	Küçük genom, viral gen bulunmaz	Potansiyel mutajenez
Herpes simplex virüs	Büyük taşıma boyutu: 40–50 kb	Yüksek titrelerle çıkabilir ancak üretimi zor
	Nöronal tropizm	Sınırlı taşıma boyutu: 5 kb
	Gizli ekspresyon	Sitotoksik
	İn vivoda verimli transdüksiyon	Hedefleme yok
	Replike eden vektörler mevcut	Geçici ekspresyon, genoma entegre olmaz
Lentivirüs	Proliferatif ve proliferatif olmayan hücrelerde transdüksiyon	Orta seviyede üretim
	Hematopoetik kök hücrelerde transdüksiyon	Güvenli değil
	Uzun süreli ekspresyon	Üretilmesi ve depolanması zor
	Nispeten yüksek titreler	Sınırlı taşıma boyutu: 8 kb
Retrovirüs	Hücrel genoma entegrasyon	Sınırlı klinik deneyim
	Geniş alanda hücre tropizmi	Etkili olmayan transdüksiyon
	Uzun süreli stabil ekspresyon	Mutajenez riski
	Transdüksiyon için hücre bölünmesi gerektirir	Transfeksiyon için hücre bölünmesi gerektirir
	Nispeten yüksek titreler	Hedefleme yok
Retrovirüs	Daha büyük taşıma boyutu: 9-12 kb	

a. Fiziksel yöntemler

Fiziksel gen taşıma sistemlerinin prensibi, hücre üzerinde geçici hasarlar veya kusurlar oluşturarak DNA'nın difüzyon yaparak hücre içerisine girişine izin vermesidir. Bu geçişi sağlamak için hedef hücrenin membran yapısı daha zayıf hale getirilir. Elektroporasyon, gen tabancası, ultrason, hidrodinamik enjeksiyon veya lazer bazlı enerji kullanımı bu alandaki yöntemler arasındadır (Ibraheem ve ark., 2014).

b. Kimyasal yöntemler

Kimyasal vektörler, fiziksel yöntemlerin dezavantajlarının üstesinden gelmek için viral vektörlere kıyasla umut verici alternatifler olarak önerilmiştir. Bu vektörlerin hücre çekirdeğine gen transferinin geliştirilmesi için 3 tane amaç üzerinde durmuşlardır. Bunlar: (1) DNA'nın negatif yüklerini maskelemek, (2) DNA molekülünü daha küçük hale getirmek için sıkıştırmak ve (3) hücre içi nükleaz degradasyonundan korumak. Bu hedeflere, anyonik DNA ve polikasyonlar arasındaki elektrostatik etkileşimle ya da DNA'nın biyobozunur polimerlerle enkapsülasyonu veya adsorbe edilmesi yoluyla ulaşılabilir. (Ibraheem ve ark., 2014). Bu grubun içerisinde; katyonik polimerler, katyonik peptidler ve katyonik lipidler yer alır (El-Aneed, 2004).

Katyonik polimerler gen taşıyıcı grubu, hedef hücrelere gen aktarma yeteneğine sahip olan partiküllü bir kompleks oluşturmak üzere DNA ile birleştirilebilen katyonik polimerleri içerir. Bu tür gen taşıma sistemi, anyonik DNA ve katyonik bir polimer arasındaki elektrostatik etkileşim sonucu polipleks olarak bilinen pozitif bir kompleks ortaya çıkar. Sentetik yapıda ve doğal yapıda katyonik polimerler mevcuttur. Sentetik katyonik polimerler üzerinde, moleküler ağırlık ve ligand eki yönünden birçok modifikasyon kolayca yapılabilir. Gen tedavisi için en çok çalışılan sentetik polimerler arasında, poli (L-lizin) (PLL) ve poli (etilenimin) (PEI) yer alır. Farklı moleküler ağırlıklara sahip birçok PLL polimeri gen transferi için değerlendirilmiştir. DNA kondensasyonu ve transfeksiyon verimliliğinin, istenmeyen yüksek toksisite ile ilişkili olarak yüksek moleküler ağırlıklı PLL ile arttığı gösterilmiştir. Hem polietilenglikol (PEG) hem de palmitoil gruplarının PLL

polimerine bağlanmasıyla amfifilik PLL'nin oluşturulması, gen taşınması verimliliğinden ödün vermeden toksisiteyi azaltmıştır (El-Aneed, 2004).

Kitozanlar (biyobozunur lineer aminopolisakaritler) ve dendrimerler (çok fazla sayıda dallanmış yapıda poliamidoamin) gibi diğer birçok katyonik polimer, gen aktarımı için test edilmiştir. Bu katyonik polimerlerin, çeşitli kanser hücre hatlarında PLL'ye kıyasla daha etkili transfeksiyon verdiği gözlemlenmiştir. Bu vektörlerin, gen taşınmasını kolaylaştıracağı ve sitotoksisiteyi azaltacağı düşünülmüştür (El-Aneed, 2004).

Gen aktarımı için kullanılan katyonik peptitler, endozomal / lizozomal yollardan kaçarak, asidik ortamlarda konformasyonel değişikliklere uğrayabilen amfifilik peptitlerdir. Pozitif yüklü amino asitleri (histidin, lizin ve arjinin) içerir ve DNA'yı etkili bir şekilde kondense edebilirler (El-Aneed, 2004).

Katyonik lipidler grubunda lipozomlar yer alır. 1987'de gen taşıyıcıları olarak kullanılmalarından bu yana, lipozomlar en çok çalışılan viral olmayan vektörlerden biri haline gelmiştir. Fizyolojik pH'da bir grup pozitif yüklü lipid içerir. Diğer viral olmayan vektörler gibi, elektrostatik atraksiyon yoluyla negatif yüklü DNA ile etkileşime girerler. Katyonik lipidler, esasen lipozomlar şeklinde kullanılmıştır. Bununla birlikte, daha yakın zamanlarda katyonik lipid emülsiyonları viral olmayan gen taşıyıcıları olarak tanımlanmış ve değerlendirilmiştir. Bunlar, 1,2-dioleoil-3-trimetilamonyum-propan (DOTAP) ve N [1-(2,3-dioleyiloksi)propil]-N, N, N-trimetilamonyum klorür (DOTMA)'dır (El-Aneed, 2004).

4.8. Kitozana İlişkin Bilgiler

Etkin bir gen taşınmasında, plazmid DNA hedef hücrelere verilir, kopyalanır ve sonuç olarak genetik bilgi ilgili proteine çevrilir. Bu hedefe ulaşmak için gen taşınma sisteminde bir takım engellerin aşılması gerekmektedir. Gen taşınmasında, viral vektörler, geniş bir hedeflenmiş hücre aralığında yüksek transfeksiyon etkinliği vermesine rağmen, enflamatuvar cevap ve onkogenik etki gibi majör boyutta dezavantajla sahiptirler. Bu sebeple, gen taşınmasında viral olmayan vektörlerin kullanımı önemlidir (Borchard, 2001).

Kitozan, DNA ile polielektrolit kompleksleri oluşturan ucuz, biyo-uyumlu, biyobozunur ve toksik olmayan bir katyonik polimerdir. Bu nedenle, kitozan ve kitozan türevleri, gen taşınmasında güvenli ve etkin bir taşıyıcı sistem olarak kullanılır (Borchard, 2001; Kumar ve ark., 2004).

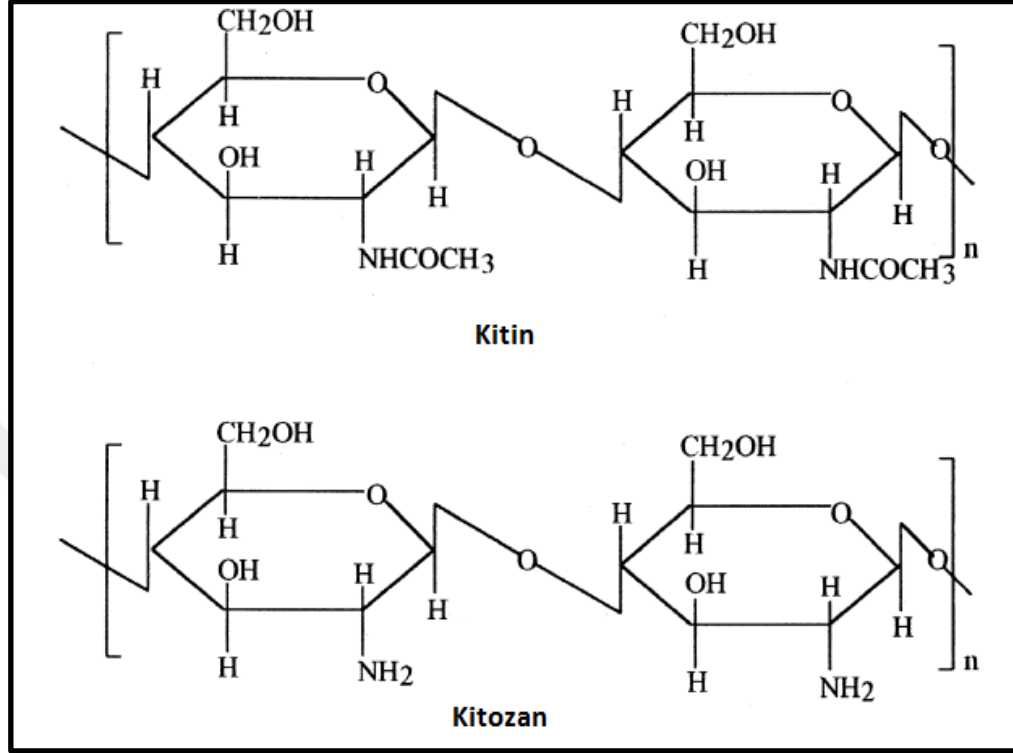
4.8.1. Kitin

Kitin, poli (b-(1-4)-N-asetil-D-glukozamin), ilk olarak 1884'te tanımlanmış, çok önemli bir doğal polisakkarittir. Bu biyopolimer, çok sayıda canlı organizma tarafından sentezlenir. Dünyada her yıl üretilen kitin miktarı göz önüne alınırsa selülozdan sonra en bol bulunan polimerdir. Kitin, doğada, eklem bacaklıların dış iskeletinde veya mantar ve maya hücre duvarlarında kristal mikrofibril formda yapısal bileşenler oluşturan bir biyopolimerdir. Kitinin pek çok canlıda keşfine rağmen, ticari kaynakları yengeç ve karides kabukları olmuştur. Endüstriyel proseste, kalsiyum karbonatın çözülmesi için kitin asit muamelesi ile kabuklulardan, ardından proteinlerin çözündürülmesi için alkaline ekstraksiyonu ile ekstre edilir. Ek olarak, pigmentleri uzaklaştırmak ve renksiz bir ürün elde etmek için genellikle bir renk açma adımı eklenir. Elde edilen kitinin saflık ve renk bakımından derecelendirilmesi gerekir, çünkü kalan protein ve pigment, özellikle biyomedikal ürünler için sorunlara neden olabilir. Alkali koşullar altında kısmi deasetilasyon ile, uygulama açısından en önemli kitin türevi olan kitozan elde edilir (Rinaudo, 2006).

4.8.2. Kitozanın yapısı ve elde edilmesi

Kitinin deasetilasyon derecesi (polimerin kökenine bağlı olarak) yaklaşık %50'ye ulaştığında, sulu asitli ortamlarda çözünür hale gelir ve kitozan olarak adlandırılır. Çözünme prosesi, D-glukozamin tekrar ünitesinin C-2 pozisyonunda -NH₂ (amin grubu) fonksiyonunun protonlanması ile gerçekleşir, polisakkarit asidik ortamda bir polielektrolite dönüştürülür. Kitozan tek psödonatural katyonik polimerdir ve bu nedenle kendine özgü karakterini takip eden birçok uygulama mevcuttur. Sulu çözeltilerde çözünür olduğu için, jeller veya filmler ve fiberler olarak pek çok farklı uygulamada kullanılır. Kitozanın karakterizasyonunda ilk adım, numuneyi saflaştırmaktır: aşırı asit içinde eritilir ve gözenekli membranlar üzerinde süzülür (0,45 mm'ye kadar farklı gözenek çapları). Çözeltinin pH'sının NaOH veya NH₄OH eklenerek 7,5'a ayarlanması, deprotonasyondan ve polimerin nötr pH'ta

çözünmezliğinden dolayı topaklanmaya neden olur. Polimer daha sonra suyla yıkanır ve kurutulur (Rinaudo, 2006). Kitin ve kitozanın yapısı **Şekil 8**'de verilmiştir.



Şekil 8: Kitin ve kitozanın yapısı (Kumar, 2004).

HPLC kullanılarak kitozan moleküler ağırlık dağılımları elde edilmiştir. Kitin ve kitozanın ortalama moleküler ağırlığı (M_w), ışık saçılımı ile belirlenmiştir. Viskozimetre, moleküler ağırlığın belirlenmesi için basit ve hızlı bir yöntemdir. Kitinin kitozana dönüştürülmesi, moleküler ağırlığı düşürür, deasetilasyon derecesini değiştirir ve böylece topaklanmayı etkileyen yük dağılımını değiştirir. Katı halde, kitozan yarı kristal formdadır. Kitozan omurgasında yer alan glukozamin birimleri, yüksek bir amino grup yoğunluğunu gösterir ve çözünür olması için pH 6'nın altındaki pH değerleri gerektirir. Fizyolojik pH'da, amino gruplarının tamamı protonlanmış değildir. Bu nedenle komplekslerdeki kitozan / DNA oranları, DNA yapısındaki fosfatın (P) kitozan yapısındaki azot (N) sayısına oranı, N / P olarak ifade edilir (Kumar ve ark., 2004; Borchard, 2001).

Kitozanın çözünürlük özellikleri sadece ortalama deasetilasyon derecesine bağlı değil aynı zamanda moleküler ağırlığı ve asetil gruplarının ana zincir boyunca

dağılımına da bağlıdır. Genellikle katı halde yapılan deasetilasyon, polimerin yarı kristalli karakterinden dolayı düzensiz bir yapı verir. Asetik asit ve hidroklorik asit mevcudiyetinde kitozan protonasyonunun çözünürlükteki rolünün incelemesi, iyonlaşma derecesinin asitin pH'sına ve asit iyonlaşma sabitine (pK_a) bağlı olduğunu göstermiştir (Rinaudo, 2006).

Kitozan, moleküler ağırlık, deasetilasyon derecesi, viskozite ve kristallenme derecesi gibi çeşitli fizikokimyasal özellikler ile karakterize edilir. Deasetilasyona uğramış her kitozan alt birimi, pK_a değeri yaklaşık 6,5 olan bir primer amin grubu içerir. Bu nedenle, kitozan asetik asit, sitrik asit, glutamik asit, aspartik asit, hidroklorik asit, laktik asit gibi asitli ortamlarda çözünürken nötr ve alkalik pH değerlerinde çözünmez. pH'a ek olarak, kitozanın çözünürlüğü deasetilasyon derecesi, moleküler ağırlık ve çözeltinin iyonik kuvvetinden büyük ölçüde etkilenir. Fizyolojik ortamda, kitozan, kanda bulunan veya insan bağırsağında normal flora ile üretilen lizozim veya kitinaz tarafından kolayca sindirilebilir. Bu nedenle, ilaç araştırmalarında ilaç taşıyıcısı olarak endüstride yaygın şekilde kullanılmaktadır (Mao ve ark., 2010).

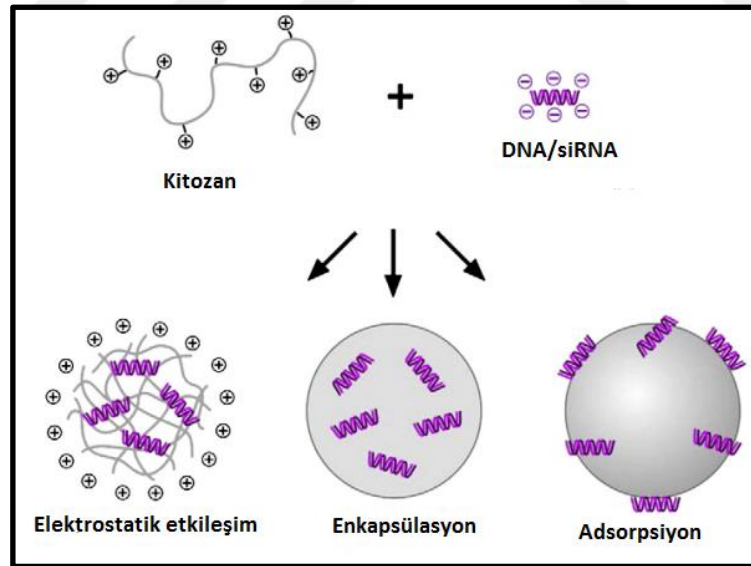
4.9. Kitozan ve shRNA (pDNA)

Mumper ve ark. tarafından polimerik ve oligomerik kitozan/DNA komplekslerinin hazırlanması ilk olarak 1995 yılında ilgili kitozan çözeltisinin plazmid DNA ile karıştırılması şeklinde tanımlanmıştır. Üretilen kompleks boyutlarının (150-500 nm), kullanılan kitozanın moleküler ağırlığına (108-540 kDa) ve kitozan:DNA oranına bağlı olduğu, ancak tampon bileşimine veya şekerlerin varlığına bağlı olmadığı bildirilmiştir (Guang Liu ve De Yao, 2002).

Son yıllarda, kitozan bazlı taşıyıcılar, plazmid DNA (pDNA), oligonükleotitler ve siRNA dahil olmak üzere gen materyalleri için güvenli bir taşıyıcı sistem olarak büyük oranda tercih edilen bir biyopolimer haline gelmiştir. Kitozan, düşük toksisite, düşük immünojeniklik, mükemmel biyouyumluluk ve yüksek pozitif yük yoğunluğu gibi yararlı özelliklere sahiptir. Pozitif yükünden dolayı, elektrostatik etkileşimle negatif yüklü nükleotitlerle kolayca polielektrolit kompleksleri oluşturabilir. Bununla birlikte, kitozanın gen taşıyıcı etkinliği, formülasyonla ilişkili parametrelerden

önemli ölçüde etkilendir. Son zamanlarda, kitozan, gen taşınması için katyonik lipidler gibi diğer viral olmayan vektörlere kıyasla daha güvenli bir alternatif olarak önerilmiştir (Mao ve ark., 2010; Guang Liu ve De Yao, 2002).

Bir gen taşıyıcısı olarak kitozanın potansiyeli, katyonik özelliğine dayanmaktadır. Asidik pH'da, pKa'nın altında, kitozan omurgasındaki primer aminler pozitif olarak yüklenir. Bu protonlanmış aminler, kitozanın, elektrostatik etkileşim yoluyla negatif bir şekilde DNA/siRNA'ya bağlanmasını sağlar. Pozitif yüklü kitozan omurgası ile negatif yüklü DNA/siRNA arasındaki etkileşim, sulu ortamda kendiliğinden nano boyutlu komplekslerin (poliiplekslerin) oluşmasına yol açar (**Şekil 9**). Kitozanın hafif yüklü olduğu nötr veya alkali koşullar altında, jel elektroforezi çalışmaları, hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimler gibi ikincil (elektrostatik olmayan) etkileşimlerin, kitozan ve DNA arasındaki bağlanmadan sorumlu olabileceğini göstermiştir. Yeterli miktarda azot/fosfat (N:P) oranına sahip kitozan/DNA yapısı hücresel alım ile uyumlu boyutlarda kondense olabilirken, nükleazların nükleik asit ilaçlarına erişimini sterik koruma ile etkili bir şekilde önler (Mao ve ark., 2010).



Şekil 9: Farklı mekanizmalara dayalı olarak kitozan ve DNA/siRNA formülasyonlarının hazırlanması (Mao ve ark., 2010)

Diğer birçok polimerik vektörlerde olduğu gibi, kitozan aracılı pDNA taşınması, enzimatik degradasyon, etkili olmayan hücre alım, endo-lizozomlarda kapsülleme, ilaç/polimer dissolüsyonunun başarısızlığı ve nükleer lokalizasyonu içeren bir dizi hücresel engel içerir. Yapılan çalışmalar; kitozanın DNA'ya bağlanma afinitesinin, kitozan/DNA komplekslerinin stabilitesinin ve transfeksiyon verimliliğinin, kitozanın moleküler ağırlığı (Mw), deasetilasyon derecesi (DD), kitozan/DNA kompleksinin sitokiyometrisi, plazmid konsantrasyonu, serum konsantrasyonu, transfeksiyon ortamının pH'sı, hücre tipi gibi çeşitli formülasyon parametrelerine bağlı olduğunu göstermiştir. Bu parametrelerdeki varyasyon, kitozan/DNA kompleksinin büyüklüğünü, yükünü, hücre alımını ve salımını etkileyebilir. Bu nedenle bir gen tedavisi sistemi tasarlarken bu kriterler göz önünde bulundurulmalıdır (Mao ve ark., 2010).

MacLaughlin ve ark. yaptıkları çalışmada kitozanın moleküler ağırlığı azaldıkça komplekslerin boyutunda bir azalma olduğunu göstermiştir (MacLaughlin ve ark., 1998). Benzer şekilde, Huang ve ark. kitozanın moleküler ağırlığı 213kDa'tan 48 kDa'a düştüğünde ortalama partikül boyutunun 181'den 155 nm'ye düştüğünü bildirmiştir (Huang ve ark., 2005). Bu çalışmaların aksine, moleküler ağırlıktaki düşüş önceki görüşleri keskin bir şekilde tersine çevirdi, 17 ve 10 kDa kitozanolardan üretilen nanopartiküllerin ortalama boyutu sırasıyla 269 ve 289 nm olarak ölçülmüştür. Bu veriler, istenen partikül büyüklüğünü elde etmek için uygun moleküler ağırlıkta kitozanın seçilmesi gerektiğini belirtir çünkü katyonik olarak modifiye edilmiş partiküllerin transfeksiyon etkinliği partiküllerin büyüklüğüne bağlıdır (Nafee ve ark., 2007).

Katas ve ark. kitozan-siRNA formülasyonlarının hazırlanma yönteminin susturma etkisinde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Formülasyonlar üç farklı şekilde hazırlamıştır: basit kompleks oluşturma yöntemi, iyonik jelasyon (siRNA hapsetme) ve önceden oluşturulmuş kitozan nanopartiküllerin yüzeyine siRNA'nın adsorpsiyonu. Yüksek bağlanma kapasiteleri ve yükleme etkinliği nedeniyle, iyonik jelasyonla hazırlanan nanopartiküllerin iki tip hücre hattında, CHO K1 ve HEK 293 olmak üzere, kitozan-siRNA komplekslerine kıyasla daha iyi vektörler olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık, basit kompleks yöntemiyle ve

adsorpsiyon yöntemiyle hazırlanan formülasyonlarda düşük bir gen ekspresyon inhibisyonu gözlenmiştir. Bu durum, kitozanın pDNA ile hazırlanan komplekslerinde gözlenmemiştir çünkü pDNA, çok düşük bir kitozan konsantrasyonunda bile, kitozan ile tamamen kondense olur. Bu sonuçlar, siRNA'nın kitozana, pDNA ile gözlenenden daha farklı bir şekilde bağlandığını göstermektedir (Katas ve Alpar, 2006). Mao ve ark. kitozan ve DNA ile yaptıkları çalışmada kitozanın minimal sitotoksositeye sahip çok yönlü bir gen taşıyıcısı olduğunu göstermiştir (Mao ve ark., 2001).

Özbaş-Turan ve ark. kitozan ve pDNA mikropartikülleri hazırlayarak iki farklı gen içeren plazmid DNA formülasyonlarının salım çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Mikrokürelerin içerisine plazmid DNA'lar yüksek oranda enkapsüle olmuştur ve kitozanın ilk patlama etkisinin ardından 50 günlük bir süre boyunca mikropartiküllerden sürekli bir DNA salınımı tespit edilmiştir. Aynı zamanda, *in vivo* çalışmalarda lüsiferaz ve β -galaktozidaz ekspresyonlarının yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir (Özbaş-Turan ve ark., 2003).

Kitozan komplekslerinin transfeksiyon etkinliği kültür ortamının pH'sına büyük ölçüde bağlıdır, çünkü kitozanın yük yoğunluğu pH'ya bağlıdır. pH 5,5-5,7'de, amino gruplarının yaklaşık %90'ı protonlanır. Nötr bir pH'ta protonasyon derecesi azalır. Kitozanın DNA bağlama kapasitesi, pH azaldıkça artar, çünkü kitozanın protonlanmış aminleri negatif yüklü DNA'ya bağlanmasını kolaylaştırır ve küçük ve kararlı yapıda polipeksler oluşur. Zeta potansiyelinin yaklaşık olarak pH 7'de çarpıcı bir şekilde düştüğü ve elektrostatik olarak nötr partiküllerin pH 7,0 ila 7,4'te bulunduğu gösterilmiştir. DNA birleşimi ve ayrışma arasında iyi bir denge sağlamak için 7'den biraz daha düşük bir pH en uygundur (Mao ve ark., 2010). Sato ve ark. A549 hücrelerinin pH 6,9 ile 7,6 arasındaki transfeksiyon etkinliğini karşılaştırma çalışması yapmışlardır. Sonuçlar pH 6,9'daki transfeksiyon verimliliğinin pH 7,6'dan daha yüksek olduğunu göstermiştir çünkü pH 6,9'daki DNA/kitozan kompleksleri pozitif yüklüdür ve elektrostatik etkileşim yoluyla negatif yüklü hücrelerle bağlanır (Sato ve ark., 2001). Ayrıca, Lavertu ve ark. kitozan/DNA ile HEK 293 hücrelerinde yaptıkları çalışmada pH 6,5'teki transfeksiyon verimliliğinin pH 7,1'den yüksek olduğunu bildirmiştir (Lavertu ve ark., 2006).

Polipleks içine dahil edilen DNA miktarı, transfeksiyon işleminin etkinliğinde temel bir rol oynar. Transfeksiyon etkinliği kritik bir noktaya kadar plazmid konsantrasyonu ile artar ve daha sonra, transfeksiyon önemli ölçüde sabit kalır veya azalır. Romøren ve ark. plazmid konsantrasyonunu 0,5 ila 2,5 µg/kuyu şeklinde arttırarak epiteliyoma papulosum cyprini (EPC) hücrelerinde çalışmışlardır. Artan konsantrasyona bağlı olarak hücrelerde lusiferaz ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir (Romøren ve ark., 2003). Zhao ve ark. plazmid dozajının 0 µg/kuyu konsantrasyonundan 8 µg/kuyu konsantrasyonuna arttığında, transfeksiyon etkinliğinin primer kondrositlerde arttığını belirtmişlerdir. Plazmid dozu 16 ve 32 µg/kuyu'a ulaştığında, transfeksiyon etkinliği büyük ölçüde azalmıştır. Bu düşüş, nanopartiküllerin artan miktarlarıyla agregasyonuna bağlanır ve bu da hücresel alımın bozulmasına neden olur (Zhao ve ark., 2006).

Erbacher ve ark. serumun transfeksiyon etkinliği üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Kitozan (70 kDa) / DNA komplekslerinin, % 10 serum varlığından bağımsız olarak HeLa hücrelerinde etkin şekilde transfekte olduğunu, PEI aracılı transfeksiyonun %10 serum varlığında azaldığını bildirmişlerdir (Erbacher ve ark., 1998).

4.10. Meme Kanserinde shRNA ve Kitozan

Şalva ve ark. meme kanserinde VEGF genini baskılamak için kitozan/shRNA kompleksleri ile çalışmışlardır. Bu amaçla; kitozan/shVEGF kompleksleri, 2/1 oranında hazırlanmış ve sıçanlar üzerinde meme tümörüne enjekte edilmiştir. İntratümoral ve intraperitoneal enjeksiyonlar uygulanmış ve bu enjeksiyonlar birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Tümör hacimleri 36 gün boyunca ölçülmüştür. Komplekslerin VEGF ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması için, VEGF, immünohistokimya ve western blotlamama yöntemleri ile analiz edilmiştir. VEGF'in mRNA seviyeleri, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, shRNA uygulamasından sonra tümör hacminin azaldığı gözlenmiştir ve kitozan/shVEGF komplekslerinin, sıçanların meme karsinomu modelinde tümör büyümesini baskılamak için kullanılabileceğini göstermişlerdir. Ayrıca, kitozanın meme kanseri modellerinde VEGF shRNA için etkili bir gen taşıyıcı sistem olduğunu bildirmişlerdir (Şalva ve ark., 2010).

Şalva ve Akbuğa tarafından yapılan diğer bir çalışmada, kitozan/shVEGF nanoplekslerinin MCF-7 ve MDA-MB435 meme kanseri hücre hatlarında VEGF geninin *in vitro* baskılanması incelenmiştir. Nanopleksler farklı konsantrasyonlar kullanılarak hazırlanmış ve morfolojik ve fizikokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. Daha sonra bu formülasyonların susturma aktivitesi *in vitro* olarak incelenmiştir. *In vitro* transfeksiyon çalışmaları sonucunda, MCF-7 hücre hattında ölçülen gen inhibisyonu %60, MDA-MB435 hücre hattında ise %29 olarak belirtilmiştir. Bu çalışma, RNAi mekanizmasının gen taşıma sistemi çalışmalarında başarılı bir şekilde uygulanabileceğini göstermiştir (Şalva ve Akbuğa, 2010).

Pillé ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, agresif meme kanserinde (MDA-MB-231 hücre hattı) kitozan kaplı polizoheksilsiyanoakrilat (PIHCA) nanopartikülleri içerisinde kapsüle edilmiş anti-RhoA siRNA'nın intravenöz olarak toksisitesi ve etkinliği incelenmiştir. siRNA, her 3 günde bir farelere 150 veya 1500 µg/kg vücut ağırlığı dozunda uygulanmıştır. 150 µg grubunda tümörlerin büyümesi % 90 seviyesinde ve 1500 µg grubunda daha da fazla baskılandığını belirtmişlerdir. Çalışmalar sonucunda, anti-RhoA siRNA yapısının agresif meme kanserinde baskılama etkinliği göstermesi ve toksisite oluşturmaması nedeniyle, bu stratejisinin agresif kanserlerin tedavisi için önemli bir vaatte bulunduğunu ileri sürmüşlerdir (Pillé ve ark., 2006).

Mamaglobinin shRNA ile çalışılan yayın sayısı oldukça azdır. Picot ve ark. tarafından yapılan çalışmada, koşullu MGB1 ekspresyonu yapan bir dizi meme kanseri hücre modeli kullanılarak, MGB1'in kanser hücresindeki malign özellikleri incelenmiştir. MGB1 baskılaması sağlamak için, MGB1-yönlendirmeli siRNA ile geçici transfeksiyon ve Lentiviral shRNA'ya klonlanmış shRNA ile stabil transfeksiyon yapılmıştır. MGB1 ekspresyonunun kaybı, meme kanseri hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve invazyon özelliklerinin azalması ile sonuçlanmıştır. Bu bulgular, meme kanseri süreçlerinde MGB1'in moleküler ve hücrel rollerinin ilk tanımlayıcı genel bakışlarından biridir ve meme kanseri hastalarında tedavi edici ve prognostik stratejilerin geliştirilmesine yeni bir bakış açısı getirebilir (Picot ve ark., 2016).

Koh ve ark. tarafından yapılan çalışmada, insan meme kanseri hücrelerinde mammaglobinin migrasyon ve invazyondaki rolü araştırılmıştır. Test edilen insan meme kanseri hücre hatlarında mammaglobin mRNA ekspresyon seviyesinin, invazif olmayan hücrelerde, invazif olan hücelere kıyasla daha yüksek miktarda olduğu gözlenmiştir. Meme kanseri hücrelerinde mammaglobinin aşırı ekspresyonu, migrasyon ve invazyonu azaltırken, mammaglobin yıkımı her ikisini de arttırmıştır. Bu sonuçlar birlikte ele alındığında, meme kanseri metastazının mammaglobin ekspresyon seviyeleri tarafından kontrol edilebileceğini göstermektedir. hMAM plazmid DNA ve siRNA'nın etkinliğini belirlemek için MDA-MB-231 hücre hattına transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyondan sonraki 2. günde, mRNA ekspresyonu yarı kantitatif PCR kullanılarak analiz edilmiştir. Mammaglobin mRNA ekspresyon seviyeleri, mammaglobin aşırı eksprese eden hücrelerde artmıştır ve mammaglobin siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde düşmüştür. Sonuç olarak, bu bulgular artmış hMAM'ın migrasyon ve invazyonu azalttığını ve mammaglobinin meme kanserindeki fonksiyonuna yeni bir bakış açısı getirdiğini göstermektedir (Koh ve ark., 2014).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kimyasal sarf malzemeleri

Agaroz	Sigma (ABD)
Amfoterisin B	Biochrom (Almanya)
Amonyum asetat	Sigma (ABD)
Asetik asit	E. Merck (Almanya)
Bacto agar	Difco (ABD)
Borik asit	Sigma (ABD)
BrdU Test Kiti	Merck Millipore (ABD)
Cla I	MBI Fermentas (Litvanya)
Dimetil sülfoksit	Sigma (ABD)
di-Sodyum hidrojen fosfat	E. Merck (Almanya)
DMEM	Biological Industries (İsrail)
ELISA Test Kiti	Bioassay Technology Laboratory (Çin)
EDTA	Sigma (ABD)
Etanol (absolü)	Riedel de Haen (Almanya)
Etidyum bromür	Sigma (ABD)
Fenol	Sigma (ABD)
Fetal bovin serum	Biological Industries (İsrail)
Formaldehit	E. Merck (Almanya)

Giemsa	J. T. Baker (ABD)
Glasiyal asetik asit	E. Merck (Almanya)
Gliserol	Fluka (Almanya)
Glukoz	Sigma (ABD)
Hidroklorik asit	E. Merck (Almanya)
İzo-propanol	Sigma (ABD)
Kalsiyum klorür dihidrat	Sigma (ABD)
Kitozan	Sigma (ABD)
Kloroform	E. Merck (Almanya)
L-Glutamine	Biochrom (Almanya)
Lizozim	Roche (Almanya)
Luria Bertani besiyeri	Sigma (ABD)
MTT Test Kiti	Roche (Almanya)
PEG 8000	Sigma (ABD)
Penicillin-Streptomycin	Biochrom (Almanya)
Potasyum asetat	Sigma (ABD)
Potasyum di-hidrojen fosfat	E. Merck (Almanya)
Proteinase K	Roche (Almanya)
RNAase A	Roche (Almanya)
Sodyum bikarbonat	E. Merck (Almanya)
Sodyum Dodesil Sülfat	J. T. Baker (ABD)
Sodyum hidroksit	J. T. Baker (ABD)

Sodyum klorür	Sigma (ABD)
Tripsin 1:250	Sigma (ABD)
Trizma base	Roche (Almanya)
Zeocin	Invivogen (ABD)
Xba I	MBI Fermentas (Litvanya)
λ DNA / Hind III marker	Roche (Almanya)

5.1.2. Kullanılan cihazlar

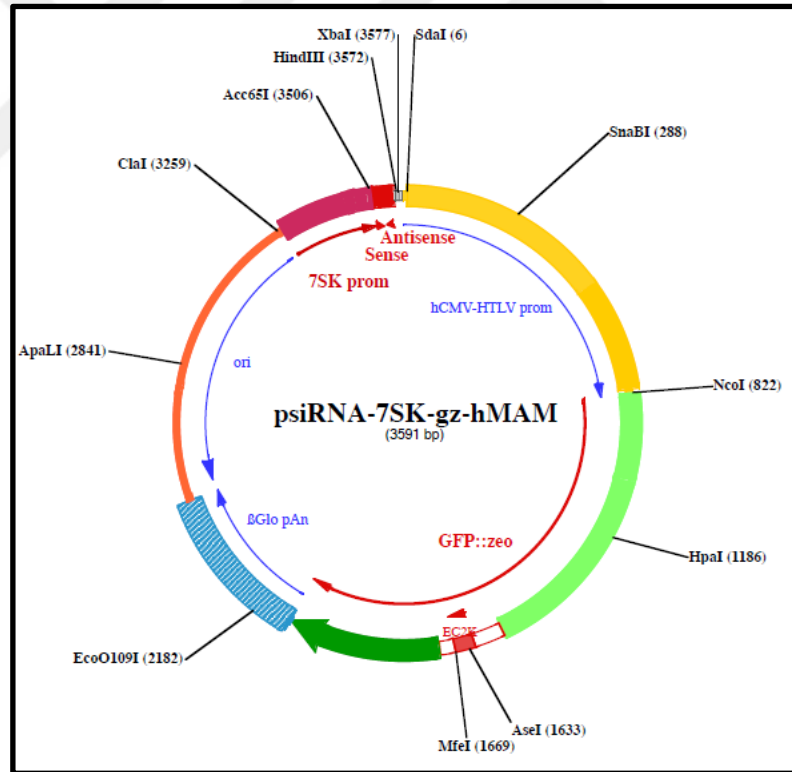
Çalkalayıcı Su banyosu	Nüve ST 30 (Türkiye)
Derin Dondurucu (-20)	Arçelik (Türkiye)
Derin Dondurucu (-80)	Nuar (ABD)
Dijital fotoğraf makinesi	Olympus (Japonya)
Distile Su Cihazı	GFL (Almanya)
Elektroforez Güç Kaynağı	EC-Techne (İngiltere)
ELISA Okuyucu	Bio-Rad (ABD)
Etüv	Heraeus (Almanya)
Etüv	Memmert (Almanya)
Geçirimli Elektron Mikroskopu	Hitachi (Japonya)
Hassas Terazî	Shimadzu (Japonya)
Horizontal Karıştırıcı	Velp Scientifica (İtalya)
Isıtıcı Tabla	Ika-Werk (Almanya)
İnvert Mikroskop	Olympus BH40 (Japonya)
Jel Analiz Sistemi	Kodak 1D Dijital Science (ABD)

JVC Spot Junior Kamera Sistemi	JVC (Japonya)
Karbondioksitli Etüv	Sanyo (Japonya)
Laminar Akışlı Doku Kültürü Kabini	Holten-Safe 2000 (Danimarka)
Manyetik Karıştırıcı	Ika-Werk (Almanya)
Mikropipet seti	Gilson (Fransa)
Mikrosantrifüj	Hettich (Almanya)
Bioküler Mikroskop	Olympus (Japonya)
Mili-Q Su Sistemi	Milipore (ABD)
Otoklav	Kermanlar (Türkiye)
pH metre	Mettler Toledo (ABD)
Santrifüj	Hettich (Almanya)
Soğutmalı Santrifüj	Eppendorf
Spektrofotometre	Shimadzu BioSpec-1601 (Japonya)
Sterilizatör	Heraeus (Almanya)
Terazi	Sartorius (Almanya)
U.V. Transillüminatör	Vilber Lourmat (Fransa)
Vertikal Karıştırıcı	Velp Scientifica (İtalya)
Yatay Jel Elektrophorez Cihazı	Atto (Japonya)
Zeta ve Partikül Ölçüm Cihazı	Malvern HSA 3000 (İngiltere)

5.1.3. Plazmid siRNA (shRNA) yapısı

hMAM Plazmid siRNA (psiRNA-7SK-gz-hMAM, shRNA) InvivoGen (ABD) kullanılmıştır.

Tez çalışmamızda ökaryotik hücrelerde anlatım yapabilen psiRNA-7SK-gz-hMAM (shRNA) vektörü kullanılmıştır. psiRNA-7SK-gz-hMAM, 3591 baz çifti uzunluğunda bir plazmid vektördür. Yapısında E.coli orjini (Ori), 7SK memeli promotörü, CMV-HTLV viral kompozit promotörü, EC2K bakteri promotörü, seleksiyon amaçlı zeosin direnç geni ve yeşil floresan protein (Green Fluoresans Protein, GFP) reporter geni bulunmaktadır. psiRNA-7SK-gz-hMAM plazmidinin ökaryotik hücrelere transfeksiyonu halinde, hücrelerde hMAM proteininin ekspresyonu siRNA ile baskılanabilmektedir. psiRNA-7SK-gz-hMAM plazmid vektörünün haritası **Şekil 10**'da verilmiştir.



Şekil 10: psiRNA-7SK-gz-hMAM plazmidinin yapısı

5.1.4. Kullanılan hücre kültürleri

MDA-MB-435:

MDA-MB-435, 60 insan tümör hücre dizisinin NCI-DTP panelinin bir üyesidir, metastatik insan meme kanserinin bir modeli olarak kullanılmaktadır. Bu hücre dizisi M.D.Anderson'da 31 yaşında meme kanserli bir kadından pleural effüzyondan türevlendirilmiştir. Gen ekspresyon analizleri ile tam olarak karakterize edilmiştir. MDA-MB-435 hücrelerinin gen ekspresyon paternleri meme tümör hücre dizilerinden ziyade melanoma hücre dizilerine benzemektedir (Cailleau ve ark., 1978; Ellison ve ark., 2002).

L929:

Fare fibroblast hücre hattıdır.

5.1.5. Besiyeri ve çözeltiler

- **Luria Bertani (LB)**

Çalışmalarda, ticari olarak satılan hazır toz formunda Luria Bertani (LB) besiyeri kullanılmıştır. 25 g LB bidistile su içerisinde çözündürülerek hacmi 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan LB besiyeri, 1 atmosfer basınçta, 121°C'da 20 dakika otoklavda tutularak sterilize edildi.

- **Luria Bertani Agar (LBA)**

Sıvı LB besiyerine, % 1,5 (a/h) oranında agar eklenerek hazırlandı.

Hazırlanan Luria Bertani Agar besiyeri, 1 atmosfer basınçta, 121°C'da 20 dakika otoklavda tutularak sterilize edildi. Besiyerine, psiRNA-hMAM plazmid vektörünü içeren GT116 bakteri kültürünün ekiminden önce 25µg/ml konsantrasyonda zeosin ilave edildi.

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

- **4 X DMEM Besiyeri Çözeltisi**

DMEM besiyeri 250 ml steril bidistile su içerisinde çözündürüldü ve 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edildi.

- **Sodyum Bikarbonat Çözeltisi (%10)**

100 g sodyum bikarbonat 1 litre steril bidistile su içerisinde çözündürüldü ve 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edildi.

- **1 X DMEM Besiyeri Çözeltisi**

100 mL serum, 250 mL 4X DMEM çözeltisi, 100 IU/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin ve 5 µg/mL amfoterisin üzerine 20 mL %10 (a/h) sodyum bikarbonat çözeltisi eklenerek pH 7,4'e ayarlandı. Çözelti hacmi steril bidistile su ile 1 litreye tamamlandı. Hücre kültürü çalışmalarında doğrudan bu besiyeri çözeltisi kullanıldı.

- **Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) Çözeltisi (0,5 M, pH 8,0)**

186,1 g EDTA 800 mL bidistile suda çözündürüldü. Pellet halinde NaOH eklenerek çözelti pH 8 değerine ayarlandı ve hacmi 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan çözelti otoklavda 121°C'de 1 atmosfer basınç altında 20 dakika sterilize edildi.

- **EDTA Çözeltisi (%5 (a/h))**

5 g EDTA tartılıp 80 mL distile su içerisinde çözündürüldü, hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Çözeltinin pH'sı NaOH ile 7,2'ye ayarlandı. Otoklavda 121°C'de 1 atmosfer basınç altında 20 dakika sterilize edildi.

- **Etidyum Bromür (10 mg/ml)**

0,1 g etidyum bromür 10 mL distile su içerisinde çözündürülerek hazırlandı.

- **Fiksasyon Çözeltisi (%10)**

14 mL formaldehit (%37'lik) PBS içerisine eklenerek son hacim 50 mL'ye tamamlandı ve karıştırıldı. Bu çözelti invazyon deneyinde hücreleri fikse etmek amacıyla kullanıldı.

- **Fenol- Kloroform – İzoamil Alkol (25 / 24 /1)**

Kristal halde fenol, 65°C'de eritildikten sonra, oksidasyonu önlemek için son konsantrasyonu % 0,1 (a/h) olacak şekilde 8-hidroksikinolin eklendi. Fenol, kloroform – izoamil alkol ile karıştırılmadan önce Tris-HCl tamponu ile doyuruldu.

Bunun için fenol üzerine eşit hacimde 0,5 M Tris-HCl tamponu (pH 8,0) eklendi ve kuvvetlice karıştırıldı. Fenol ve tamponun iki faz halinde ayrılması için emülsiyon +4°C'de 60 dakika bekletildi. Üstte oluşan Tris-HCl fazı uzaklaştırıldı. Aynı işlem 0,1 M Tris-HCl tamponu ile fenolün pH değeri 7,8'den büyük olana kadar tekrarlandı. Tris-HCl tamponu ile doyurulan fenol eşit hacimde kloroform – izoamil alkol (24/1) ile karıştırıldı ve üzerine yaklaşık 0,1 hacim 0,1 M Tris-HCl tamponu eklendikten sonra +4°C'de saklandı.

- **Fizyolojik Fosfat Tamponu (PBS pH 7,4)**

2,38 g Na_2HPO_4 , 0,190 g KH_2PO_4 ve 8 g NaCl tartılarak 800 mL bidistile suda çözündürüldü daha sonra hacim 1000 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin pH değeri ölçüldü, asidik ise Na_2HPO_4 ; bazik ise KH_2PO_4 eklenerek pH 7,4'e ayarlandı.

- **Glukoz Çözeltisi (0,5 M)**

9,01 g glukoz bidistile su içerisinde çözündürülerek 100 mL'ye tamamlandı. (Glukoz moleküler ağırlığı = 180,2 g/mol)

- **5 N Hidroklorik asit (HCl) Çözeltisi**

41,44 mL % 37 (a/h) 'lik HCl alınıp 100 mL'ye tamamlandı.

- **Kalsiyum Klorür Çözeltisi (0,1 M)**

1,47 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bidistile su içerisinde çözündürülerek hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C'de 1 atmosfer basınç altında 20 dakika sterilize edildi.

- **Lizozim Çözeltisi**

10 mM Tris-HCl (pH 8,0) çözeltisinin 1 mL'sinde 50 mg lizozim enzimi çözündürüldü. -20°C'de saklandı.

- **Proteinaz K Çözeltisi (20 mg/ml)**

20 mg Proteinaz K enzimi, 1 mL bidistile su içerisinde çözündürüldü, küçük hacimlere bölünerek -20°C'de saklandı.

- **Polietilenglikol (PEG) / NaCl Çözeltisi (%13 / 1,6 M)**

13 g PEG-6000 ve 9,35 g NaCl bidistile su içerisinde çözündürülerek hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

- **RNAaz Çözeltisi (10 mg/ml)**

10 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl çözeltisi bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı ve pH 7,5'a ayarlandı. Bu çözeltinin 1 mL'sinde 10 mg RNAaz enzimi çözündürüldü. Çözelti -20°C'de saklandı.

- **Çözelti I (50 mM Glukoz, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0)**

10 mL 0,5 M glukoz, 2,5 mL M Tris-HCl (pH 8,0) ve 2 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) çözeltisi bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda 121°C'de 1 atmosfer basınç altında 20 dakika sterilize edildi.

- **Çözelti II (0,2 N NaOH, % 1 SDS)**

0,8 g NaOH ve 1 g sodyum dodesil sülfat (SDS) bidistile suda çözündürülerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.

- **Çözelti III**

60 mL 3 M potasyum asetat ve 11,5 mL glasiyal asetik asit, bidistile su ile hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti otoklavda 121°C'de 1 atmosfer basınç altında 20 dakika sterilize edildi.

- **Tripsin Çözeltisi (% 0,25 (a/h))**

2,5 g Tripsin 1 litre steril PBS (pH 7,4) içerisinde çözündürüldü. 0,22 µm'lik filtreden süzülerek sterilize edildi. Hazırlanan bu çözelti -20°C'de saklandı.

- **Tripsin – EDTA Çözeltisi (% 0,05 (a/h) : % 0,05 (a/h))**

10 mL % 5 (a/h) EDTA çözeltisinin üzerine 200 mL % 0,25 tripsin çözeltisi eklendi, steril PBS pH 7,4 ile hacmi 1 litreye tamamlandı.

- **5 X Tris – Borik Asit – EDTA (TBE) Çözeltisi**

54 g Tris ve 27,5 g borik asit 800 mL bidistile su içerisinde çözündürüldü. Çözelti üzerine 20 mL 0,5 M EDTA çözeltisi (pH 8,0) eklendi. Çözeltinin hacmi bidistile su ile 1 litreye tamamlandı. Elektroforez tamponu olarak ve agaroz jelin hazırlanmasında 1/5 oranında seyreltildikten sonra kullanıldı.

- **Tris / EDTA (TE) Tamponu (10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH 8,0)**

10 mL M Tris-HCl tamponu (pH 8,0) ve 2 mL 0,5 M EDTA çözeltisi (pH 8,0) bidistile su ile 1 litreye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti otoklavda 121°C'de 1 atmosfer basınç altında 20 dakika sterilize edildi.

- **Tris-HCl Tamponu (1 M, pH 8,0)**

121,1 g Tris, 800 mL bidistile su içerisinde çözündürüldü. 5 N HCl çözeltisi ile pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra hacmi 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan Tris-HCl tampon çözeltisi otoklavda 121°C'de 1 atmosfer basınç altında 20 dakika sterilize edildi.

5.2. Yöntem

5.2.1. shRNA çalışmaları

5.2.1.1. shRNA

Tez çalışmasında, hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde anlatım yapabilen ticari psiRNA-7SK-gz-hMAM vektörü kullanılmıştır (InvivoGen, USA). psiRNA-7SK-gz-hMAM plazmid vektörü, 3591 baz çifti uzunluğunda, yapısında insan mammaglobin (hMAM) genine spesifik sense ve antisense dizilerini içermektedir. psiRNA-7SK-gz-hMAM plazmidine ilişkin bilgiler bölüm 5.1. Gereç kısmında ‘Plazmid siRNA (Short Hairpin, shRNA) Yapısı’ başlığı altında 5.1.3’de ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

5.2.1.2. shRNA’nın transformasyonu

Ticari olarak satın alınan psiRNA-7SK-gz-hMAM plazmid vektörünün transformasyonunda konak bakteri olarak *Escherichia Coli* GT116 suşu kullanıldı.

Transformasyon öncesi *Escherichia Coli* GT116 suşu CaCl_2 kimyasal metotla kompetent hale getirildi. Rekonstitüsyonu üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak yapıldı. Bu amaçla; liyofilize haldeki *Escherichia Coli* GT116, 1 mL LB sıvı besiyerine içerisinde rekonstitüye edildi. LB besiyeri ilavesinden sonra 5 dakika bekletilerek, 1-2 dakika hafifçe vortekslendi.

Kompetent hücre oluşturmak amacıyla, *Escherichia Coli* GT116 suşundan 1 mL LB besiyerine ekim yapıldı. Ekim yapılan kültür, 37°C’de 200 rpm’de 1 gece boyunca inkübe edildi. Daha sonra, 1 gece boyunca inkübe edilen kültürden 1 mL alınarak 99 mL LB besiyerine (1:100 dilüsyon, zeosin içermeyen) ekim yapıldı ve kültür 37°C’de 200 rpm’de 3-4 saat boyunca optik yoğunluğu 550 nm’de 0,4 OD’ye ulaşınca kadar inkübe edildi. Belirtilen OD değerine ulaşan kültür 20 dakika buzda bekletildi. 20 dakika sonra, +4°C’de 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 20 mL 0,1M CaCl_2 ile süspande edildi. Süspande edilen pellet 30 dakika boyunca buzda bekletildi. 30 dakika sonra, +4°C’de

4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 5 mL 0,1M CaCl₂ ile süspande edildi.

Transformasyon üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak yapıldı. Bu yöntemde; Önceden soğutulan ependorf tüpe, 1 µg shRNA ve 100 µl kompetent hücre ilave edildi. Hafifçe karıştırıldı ve tüpler buzda 30 dakika bekletildi. 42°C’lik su banyosunda tüpler 30 saniye inkübe edildi, daha sonra tüpler 1-2 dakika süreyle buza yerleştirildi. Her bir reaksiyona 900 µl LB besiyeri ilave edildi. Tüpler 250 rpm’de hafifçe çalkalanarak 37°C’de 1,5 saat inkübe edildi. Zeosin içeren LB besiyeri ile hazırlanan agar içeren petriye 100µl LB besiyerinden koyularak bagetle yayıldı. Ekim sonrası petriler bir gece boyunca 37°C’de inkübe edildi. Petrilerde gelişen kolonilerden, gerçekleştirilecek çalışmalarda kullanılmak üzere petri, eğri besiyeri ve gliserine stok alındı. Alınan stoklardan shRNA izolasyonu ve kontrolleri yapıldı.

5.2.1.3. shRNA’nın izolasyonu

Stoğa alınmış shRNA içeren *E.coli* suşlarından plazmid DNA izolasyonu, Birnboim ve Doly’nin modifiye alkali-liziz yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi (Birnboim ve Doly, 1979).

shRNA-hMAM plazmidi ile transforme edilen *E.coli* GT116’nın, 25 µg/ml konsantrasyonda Zeosin içeren 25 ml LB besiyerinde doymuş kültürü hazırlandı. Hazırlanan ön kültürden 1000 ml antibiyotikli LB besiyerine ekim yapıldı ve 37°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı.

Elde edilen doymuş kültürler, +4°C, 10000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktüldü ve besiyeri kalıntılarının uzaklaştırılması amacı ile TE tamponu ilavesi ile hücreler yıkandı. Hücre çöktürüsü, 2,5 mg/ml son konsantrasyonda lizozim içeren 1 hacim Çözelti I içerisinde süspande edildi ve 20 dakika buz içerisinde bekletildi. Hücre süspansiyonu üzerine, taze hazırlanmış 2 hacim Çözelti II ilave edildi ve hafifçe karıştırılarak hücrelerin parçalanması sağlandı. Hücre lizatı üzerine, 1,5 hacim buzda soğutulmuş Çözelti III ilave edildi ve lizat buz içerisinde 30 dakika bekletildi. Bu aşamada hücre artıkları, genomik DNA ve proteinlerin önemli bir kısmının çökmesi sağlandı. Lizat, +4°C, 15000 devir/dakika hızda 15 dakika

santrifüj edildi ve süpernatant hacmi ölçülerek temiz bir tüpe aktarıldı. shRNA'yı içeren süpernatant üzerine 0,6 hacim izopropanol ilave edildi. Oda temperaturünde 30 dakika bekleme süresi sonunda shRNA, +4°C, 15000 devir/dakika hızda 15 dakika santrifüj edilerek çöktüldü. Çökelti, 1 hacim Tris-EDTA (TE, pH 8,0) tamponu ilavesi ile çözündürüldü, 20 µg/ml nihai konsantrasyonda RNAaz A ve ardışık olarak 50 µg/ml nihai konsantrasyonda Proteinaz K ile muamele edildi. Enzimatik olarak kısmen saflaştırılan shRNA'nın üzerine 4 hacim PEG 8000/NaCl (% 13 / 1,6 M) çözeltisi ilave edildi ve karışım 3-4 saat buz içerisinde bekletildi. Sürenin sonunda shRNA, +4°C, 15000 devir/dakika hızda 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. 1 hacim TE tamponu ilave edilerek çözündürülen shRNA, fenol:kloroform:izoamil alkol ekstraksiyonunu takiben amonyum asetat (NH₄Ac)/Etanol uygulaması ile +4°C, 15000 devir/dakika hızda 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Pellet, % 70 etanol ile yıkandı ve uygun hacim TE tamponu ilave edilerek çözündürüldü. Bu şekilde hazırlanan shRNA-hMAM stoklarının kontrolleri yapılarak -20°C'de muhafaza edildi.

5.2.1.4. shRNA'nın kontrolü

Yöntem 5.2.1.3.'de belirtildiği şekilde izole edilen shRNA örneğinin miktar tayini, saflık derecesi ve konformasyonel yapı kontrolleri spektrofotometrik ve elektroforetik olarak yapıldı.

- **shRNA'nın Spektrofotometrik Kontrolü**

shRNA'nın, izolasyon sonrasında, konsantrasyonu ve saflık derecesi spektrofotometrik olarak 260 ve 280 nm dalga boylarındaki ölçüm sonuçlarından yararlanılarak spektrofotometrik olarak tayin edildi. Nükleik asitlerin, 260nm dalga boyundaki absorbans değerleri, nükleik asitlerin miktarının göstergesi olarak kabul edilmektedir. 260 nm dalga boyunda elde edilecek 1 optik dansite değeri (OD); çift iplikli DNA molekülü için 50 µg/ml, tek iplikli DNA molekülü için 37 µg/ml ve tek iplikli RNA molekülü için ise 44 µg/ml'ye eşittir. Bu eşitlikten yararlanılarak, çift zincirli shRNA molekülü için konsantrasyon;

$$\mu\text{g/ml DNA} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{seyreltme oranı}$$

formülüne göre hesaplandı.

shRNA'nın saflık derecesinin belirlenmesinde ise OD₂₆₀ / OD₂₈₀ oranından yararlanıldı. Spektrofotometrik olarak, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerlerinin birbirine oranının 1,8-1,9 arasında olması DNA molekülünün yüksek derecede saf olduğunu; 1,9-2,1 arasında olması ise RNA molekülünün saflığını göstermektedir.

- **shRNA'nın Elektroforetik Kontrolü**

İzole edilen shRNA'nın saflığı, içerdiği formlar, restriksiyon enzim haritasının ve plazmid yapısının doğruluğu agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak kontrol edildi. Bu amaçla, agaroz % 0,7 (a/h) konsantrasyonda Tris-Borik asit-EDTA (TBE, pH 8,0) tamponu içerisinde kaynatılarak çözündürüldü. Çözelti, sıcaklığı 60°C'a kadar soğutulduktan sonra 0,5 µg/ml konsantrasyonda etidyum bromür ilave edilerek yatay agaroz jel kasetlerine döküldü. Hazırlanan agaroz jel kasetleri, jelin donmasını takiben içerisinde pH 8,0 TBE tamponu bulunan yürütme tankına alındı. Elektroforetik analiz için izolasyon sonrası spektrofotometrik kontrolleri yapılmış örnekler, 5:1 (örnek:elektroforez yükleme tamponu) oranında 6x agaroz jel yükleme boyası ile karıştırılarak jele uygulandı ve elektroforez işlemi sabit 80 volt akımda 1,5 saatte tamamlandı. Elektroforez işlemi sonrası, UV transillüminatör üzerinde incelenen jeller, Kodak Digital Science, DC40 Camera ve 1D Image Analysis Software sistemi kullanılarak değerlendirildi. pDNA topolojik form yüzdeleri,

$$(KH, \%) = \frac{KH \text{ DNA Hacmi} - \text{Boş Hacim}}{[(KH \text{ DNA Hacmi} + \text{Doğrusal DNA Hacmi} + AH \text{ DNA Hacmi}) - (3 \times \text{Boş Hacim})]}$$

KH; Kapalı halkasal pDNA, süper sarmal pDNA

AH; Açık halkasal pDNA, gevşek sarmal pDNA

formülü yardımıyla hesaplandı.

Kalitatif kontrolleri yapılan shRNA'ları uygun restriksiyon endonükleazları ile kesildikten sonra, agaroz jel elektroforezinde verdikleri DNA bantları ve boyutları değerlendirilerek doğrulukları kontrol edildi. Bunun için shRNA-hMAM plazmid DNA'sı XbaI ve ClaI restriksiyon endonükleazları ile kesildi. Kesim işlemi 40 µl

reaksiyon ortamında gerçekleştirildi. 1 µg shRNA, 5U enzim, 4 µl reaksiyon tamponu bidistile su ile 40 µl'ye tamamlandı ve 37°C'de su banyosu içerisinde bir gece süreyle kesime bırakıldı. Kesilen shRNA örnekleri % 0,7'lik agaroz jel elektroforezi ile incelendi.

5.2.2. Nanoplekslerin hazırlanması ve kontrolleri

5.2.2.1. Nanoplekslerinin hazırlanması

Kitozanın (Düşük molekül ağırlıklı kitozan; ≈ 70 kDa, %75-85 DD), %0,25 (a/h) konsantrasyonda %1,0 asetik asit içerisindeki sulu çözeltisi hazırlandı. Farklı yük oranlarındaki nanopleks serileri (0,5/1, 1/1, 2/1, 3/1, 4/1, 5/1; kitozan/shRNA; a/a) kitozan ile shRNA solüsyonlarının uygun oranda karıştırılması ve ardışık olarak vortekslenmesiyle elde edildi. Nanopleks oluşumu için oda sıcaklığında 30 dakika beklendi. Nanopleks hazırlanması süresince, shRNA hacmi sabit tutuldu ve kitozan solüsyonunun hacmi teorik yük oranını (+/-) (aminin fosfat gruplarına molar oranı) ayarlamak için değiştirildi.

5.2.2.2. Nanopleks oluşumunun görüntülenmesi

Hazırlanan nanopleksler % 0,7'lik (a/h) konsantrasyondaki agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle incelendi. Nanopleks oluşumu için 30 dakika beklendikten sonra nanoplekslerden yaklaşık 10 µl alınarak % 0,7'lik agaroz jele uygulandı. Elektroforez işlemi 80 volt ve 40 mA sabit akım altında 60 dakikada tamamlandı. shRNA etidyum bromür ile boyanarak UV ışığı altında gözlemlendi. Oluşan jel resmi dijital kamera ile görüntülendi.

5.2.2.3. Nanoplekslerin partikül büyüklüğü değerlerinin ölçümü

Nanoplekslerin partikül büyüklükleri ise Malvern cihazına entegre partikül ölçer birimiyle, pH 7,4 PBS tamponu içerisinde ölçüldü. Ölçüm 25°C'de 90° sabit açıyla tek kullanımlık kapiler kuvvetlerde (disposable capillary cell) yapıldı. Her bir formülasyon için, n=3 olacak şekilde ölçüm alındı.

5.2.2.4. Nanoplekslerin zeta potansiyel değerlerinin ölçümü

Kitozan/shRNA nanoplekslerinin zeta-potansiyel değerleri elektroforetik mobilitelerini ölçen zeta ölçer (Malvern Instruments, UK) cihazda ölçüldü. Bu

cihazda büyüklük ve zeta modülleri entegre biçimde bulunmaktadır. Sonuçlar Malvern PCS versiyon 4.41 (1992) yazılımında hesaplandı. Ölçüm tek kullanımlık kapiler kuvvetlerde (disposable capillary cell), 25°C’de ve PBS pH 7,4 tamponunda yapıldı. Her bir formülasyon için n=3 olacak şekilde ölçüm alındı.

5.2.2.5. Nanoplekslerin serum stabilitesinin incelenmesi

Serbest shRNA ile kitozan/shRNA nanopleksleri üzerine inaktive edilmemiş %10 fetal bovin serum ve 150 mM NaCl çözeltisi eklenerek 37°C’de inkübe edildi. Reaksiyon ortamından 0, 30. dk ve 1, 1,5, 24, 48, 72. saatlerde alınan örnekler elektroforetik olarak incelendi.

5.2.2.6. Nanoplekslerin geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmesi

Nanopleksler, Hitachi (Japonya) marka HT7800 model geçirimli (transmission) elektron mikroskobu (TEM) ile görüntülendi. TEM incelemeleri için, formwar gridler kullanıldı. Formwar grid üzerine incelenecek olan nanopleks formülasyonu damlatıldı ve 1 gün boyunca kuruması beklendi. Hazırlanan gridin TEM incelemesi x100 000 büyütme ölçeğinde 100 kV voltajda gerçekleştirildi.

5.2.3. Hücre kültürü çalışmaları

5.2.3.1. Hücre kültürü pasajı ve hücre kültürünün devamlılığının sürdürülmesi çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları; T-25 cm² hücre kültürü şişeleri ile 12, 24 ve/veya 96 kuyucuklu kültür kapları kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre pasajları ve hücre kültürünün devamlılığının sağlanması çalışmalarında, % 10 fetal bovin serum, 100 mM L-glutamin ve 100 mM antibiyotik çözeltisi içeren 0,22 µm’lik filtre kullanılarak steril edilmiş DMEM doku kültürü besiyeri kullanıldı. Pasajlama işlemi hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak 3-4 günde bir yapıldı. Pasajlama için besiyeri ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra kalan hücre tabakası 2 ml steril PBS (pH 7,4) tamponu ile 2 kez yıkandı. 700 µl tripsin:EDTA (%0,05:% 0,05) çözeltisi ilave edildi ve 37°C’de 2-3 dakika kadar bekletilerek hücre kültür şişesine tutunmuş haldeki hücrelerin tamamen kalkması sağlandı. Hücre tabakasının tamamen dağıldığı invert ışık mikroskobu ile gözlenerek onaylandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 5 ml taze besiyeri ilave edildi ve birkaç kez pipetaj yapılarak hücre kümelerinin ayrılması

sağlandı. Kùltürler % 5 karbondioksit ve % 98 nem içeren 37°C'lik etüvde inkübe edildi.

5.2.3.2. Transfeksiyon öncesi hücre ekimi ve transfeksiyon

Transfeksiyon için hücreler tek tabaka halinde büyütüldü. Hücre ekim işlemi için tripsinize edilen hücrelerin üzerine 5 ml besiyeri eklendi ve 1000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Süpernatant atıldı ve çökelti halindeki hücreler 1 ml besiyeri içerisinde tekrardan dağıtıldı. Steril bir ependorfa 100 µl hücre süspansiyonu, 400 µl besiyeri ve 500 µl % 0,4'lük tripan mavisi çözeltisi kondu. Hücreler Thoma lamının 16 büyük karelik alanının en üst ve en sağ çizgisi dışında kalan alan üzerindeki toplam ölü ve canlı hücre sayısı şeklinde ters fazlı mikroskoptan gözlenerek sayıldı. Bu işlem Thoma lamının diğer 16 büyük karelik bölmesi için de tekrarlandı. Ortalama hücre sayısı hesaplandı. Hücre sayısı için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{Hücre sayısı/ml} = \frac{\text{Ortalama hücre sayısı}}{10^{-4}} \times (\text{dilüsyon faktörü}=10)$$

24 kuyucuklu hücre kültürü plağına her bir kuyucuğı 2x10⁶ tane hücre ekimi yapıldı. Hücreler bir gece 37°C'lik CO₂ inkübatörde inkübe edildi. shRNA ile transfeksiyon işleminden önce hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı, daha sonra serumsuz taze besiyeri ilave edildi. Her bir kuyucuk için ayrı ayrı nanopleksler hazırlandı. Her bir kuyuya 2,5 µg shRNA verilecek şekilde shRNA taşıyan nanopleks formülasyonları serumsuz besiyeri içinde süspande edildi ve daha sonra shRNA taşıyan nanopleks formülasyonları hücrelere verildi. Formülasyonların verilmesinden 4 saat sonra hücrelere serumlu besiyeri ilave edildi ve inkübasyona bırakıldı. 48 saat sonra alınan hücre örneklerinde Mammaglobin tayini ELISA yöntemi ile yapıldı.

5.2.3.3. İn vitro gen inhibisyonun ELISA yöntemi ile tayini

Hücre kültür süspansiyonunun süpernatantında Mammaglobin tayini ELISA yöntemi ile üretici protokolüne uygun olarak yapıldı (Bioassay Technology Laboratory, Çin). Kùltür vasatında biriken Mammaglobin proteini katı faz sandviç ELISA yöntemi kullanılarak analiz edildi. Kùltür süpernatantı (insan Mammaglobin

antijeni), insan Mammaglobin'e spesifik antikor ile kaplı kuyulara koyuldu. Daha sonra kuyuların üzerine biotinlenmiş antikor ve streptavidin-HRP ilave edildi. 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. 1 saat sonra 5 kez yıkama işlemi yapıldı. Kuyuların her birine enzime bağlanarak renk oluşturan Substrat A ve Substrat B solüsyonları eklendi ve 10 dakika karanlıkta 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası reaksiyon durdurucu (stop) solüsyon eklendi. Absorbans 450 nm'de spektrofotometrik okuma ile belirlendi. Kültür süpernatantındaki Mammaglobin miktarı, 0-6 ng/ml arasında değişen Mammaglobin standartlarının absorbansı ile oluşturulan standart eğriden yararlanılarak belirlendi. shRNA transfeksiyonu ile Mammaglobin sekresyonunun inhibisyonu (%), nanoplekslerdeki Mammaglobin konsantrasyonunun kontrolle karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Her bir örnek için n=3 olacak şekilde çalışıldı ve standart sapmaları ($\pm$) hesaplandı.

5.2.3.4. Sitotoksite testi

Kitozan/shRNA nanoplekslerinin, serbest shRNA ve kitozanın sitotoksitesi L-929 ve MDA-MB-435 hücre hatlarında MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolyum bromür) yöntemi kullanılarak araştırıldı. Test, üreticinin talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi. Her bir kuyuya 2,5 µg shRNA verilecek şekilde shRNA taşıyan kitozan/shRNA nanopleksleri 1/1 ve 2/1 oranlarında hazırlandı. Hücreler 96 kuyucuklu plate'e 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi, bir gece inkübasyona bırakıldı. 96 kuyulu plate'de 24 saat inkübe edilmiş hücrelerin üzerine kitozan/shRNA nanopleksleri, serbest shRNA ve kitozan ilave edilerek 24 saat inkübe edildi. 24 saat inkübasyon periyodu sonrası her bir kuyuya 10 µl MTT (0,5 µg/µl) ilave edildi ve plate 4 saat boyunca 37°C'lik CO₂ inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 4 saat sonra kuyulara 100 µl SDS ilavesi yapıldı ve plate 37°C'lik CO₂ inkübatörde 1 gece inkübe edildi. Daha sonra 1 dakika boyunca yatay çalkalayıcıda çalkalanması sağlandı ve örneklerin 550 nm ve 690 nm çift dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbans değerleri ölçüldü ve değerlendirildi.

5.2.3.5. Proliferasyon testi

Hücre proliferasyonuna L-929 ve MDA-MB-435 hücre hatlarında BrdU (5-Bromo-2'-deoksiüridin) yöntemi ile bakıldı. Test, üreticinin protokolüne uygun olarak kit yardımıyla yapıldı. Her bir kuyuya 2,5 µg shRNA verilecek şekilde

shRNA taşıyan kitozan/shRNA nanopleksleri 1/1 ve 2/1 oranlarında hazırlandı. Hücreler 96 kuyucuklu plate'e 2×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi, 1 gece inkübasyona bırakıldı. 96 kuyulu plate'de 24 saat inkübe edilmiş hücrelerin üzerine kitozan/shRNA nanopleksleri ilave edildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübasyonu başlattıktan 4 saat sonra kuyulara 20 µl BrdU eklendi ve tekrardan inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra kuyulardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve her bir kuyuya 200 µl fiksasyon solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. 30 dakika sonra fiksasyon solüsyonu kuyulardan tamamen uzaklaştırıldı ve kuyular 1X yıkama buffer ile 3 kez yıkandı. Daha sonra her bir kuyuya 100 µl anti-BrdU detektör antikoru ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. 1 saat sonra kuyular 1X yıkama buffer ile 3 kez yıkandı. Kuyuların her birine 100 µl Peroksidaz konjugat ilave edildi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Yıkama aşaması tekrarlandı. Her bir kuyuya 100 µl substrat eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Her bir kuyuya 100 µl asit solüsyonu eklendi, sonrasında 450 nm ve 550 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbans değerleri ölçüldü ve değerlendirildi.

5.2.3.6. İnvazyon testi

Yöntem 5.2.3.2.'de belirtilen şekilde yapılan transfeksiyondan 48 saat sonra her bir kuyudaki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine 200 µl tripsin:EDTA ilave edildi. Daha sonra tripsinize olan hücelere serumsuz besiyeri ilave edildi ve 8 µm por filtreye sahip insertlere ekim yapıldı. İnsertin dış kısmına serumlu besiyeri ilave edildi ve 1 gece inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra insertler %10 formaldehit ile 5 dakika fikse edilip, 20 dakika giemsa ile boyanarak, göç etmeyen hücreler kaldırılıp, göç eden hücrelerin invert mikroskopta sayımı yapıldı.

5.2.4. İstatistiksel değerlendirme

Tez kapsamında elde edilen in vitro çalışmalara ilişkin sonuçların değerlendirilmesi ve istatistiksel analizinde, SPSS-12 istatistik programında Student's t-Test kullanıldı, $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. shRNA Çalışmalarına İlişkin Bulgular

6.1.1. shRNA izolasyonuna ilişkin bulgular

Tez çalışmasında kullanılan shRNA-hMAM plazmidinin *Escherichia coli* GT116 bakteri suşuna transformasyonu yöntem 5.2.1.2. ve transformasyon sonrası izolasyonu 5.2.1.3.'de belirtilen şekilde yapılmıştır.

6.1.2. shRNA kontrolüne ilişkin bulgular

İzole edilen shRNA'da yöntem 5.2.1.4.'de ifade edilen spektrofotometrik ve elektroforetik kontroller gerçekleştirilmiştir ve bu kontrollere ilişkin sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

6.1.2.1. shRNA'nın spektrofotometrik kontrolüne ilişkin bulgular

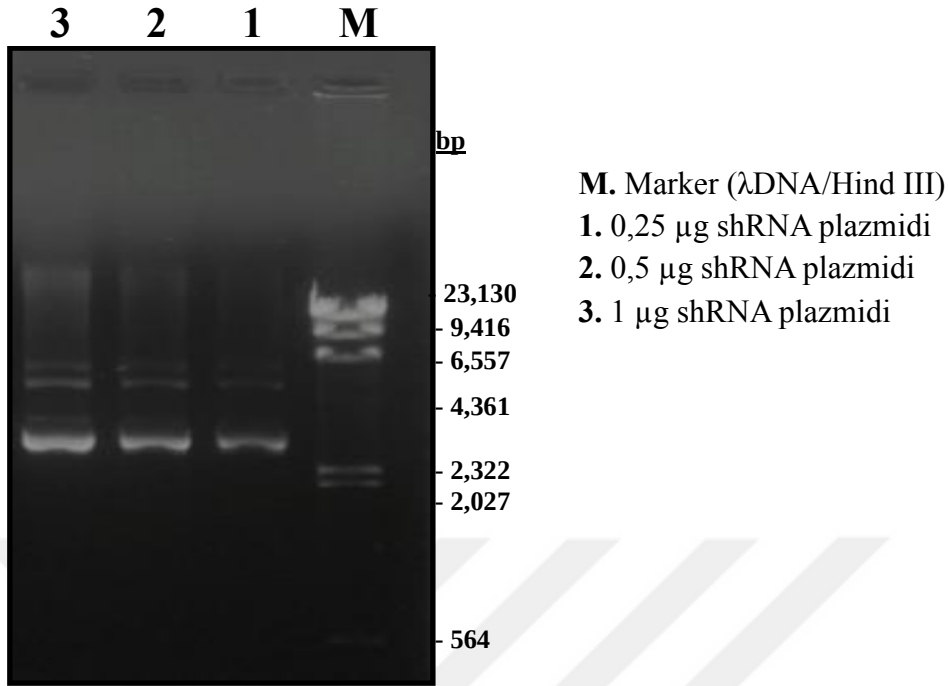
İzole edilen shRNA'nın spektrofotometrik kontrolü yöntem 5.2.1.4.'de belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

shRNA konsantrasyonunun belirlenmesi için; shRNA örneği 1/100 oranında pH 8,0 TE tamponu ile seyreltildi, daha sonra OD 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldü. OD 260 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değeri yöntem 5.2.1.4.'de verilen formülde yerine konuldu ve izole edilen shRNA konsantrasyonu 250 µg/ml olarak hesaplandı.

İzole edilen shRNA örneğinde saflık derecesi başka bir ifadeyle A_{260}/A_{280} oranı 1,93 olarak ölçüldü. Bu saflık değeri, shRNA'nın gen aktarımı çalışmalarında uygun bir molekül olduğunu göstermiştir.

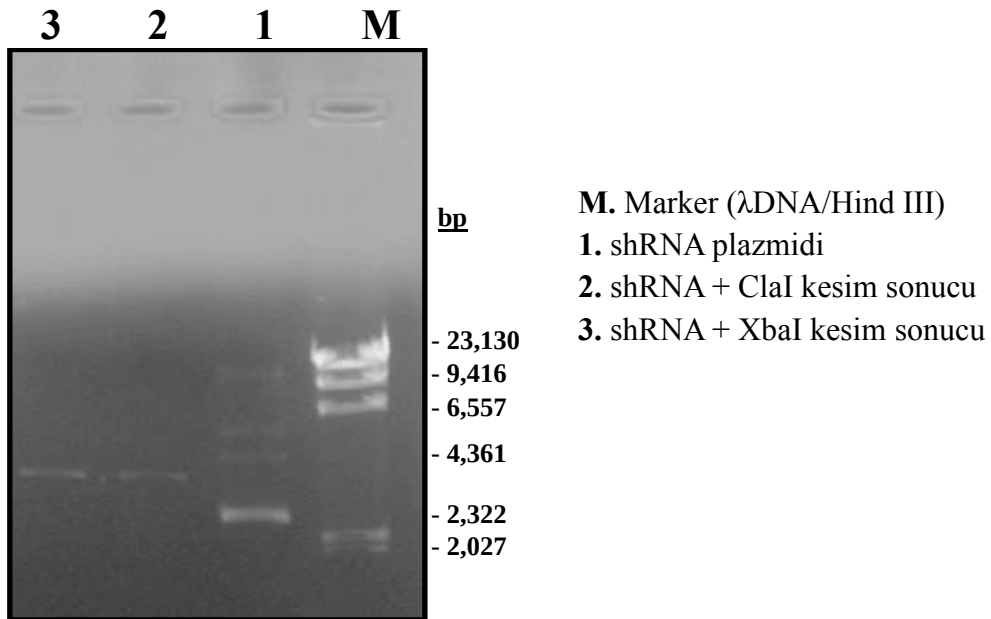
6.1.2.2. shRNA'nın elektroforetik kontrolüne ilişkin bulgular

İzole edilen shRNA; miktar, saflık derecesi, içerdiği yapısal formlar ve restriksiyon enzim haritasının doğruluğu açısından değerlendirilmek üzere agaroz jel elektroforezi yöntemi ile yöntem 5.2.1.4.'de belirtildiği şekilde araştırıldı. shRNA-hMAM plazmidinin izolasyon sonrası, elektroforetik sonucuna ilişkin agaroz jel fotoğrafları **Resim 1 ve Resim 2**'de belirtilmiştir.



Resim 1: shRNA plazmidinin farklı konsantrasyonlardaki agaroz jel fotoğrafı

Agaroz jel elektroforezinde görünen elektroforetik sonuçlara göre; uygulanan yöntem ile yaklaşık %85-90 oranında kapalı halkasal shRNA izole edildi.



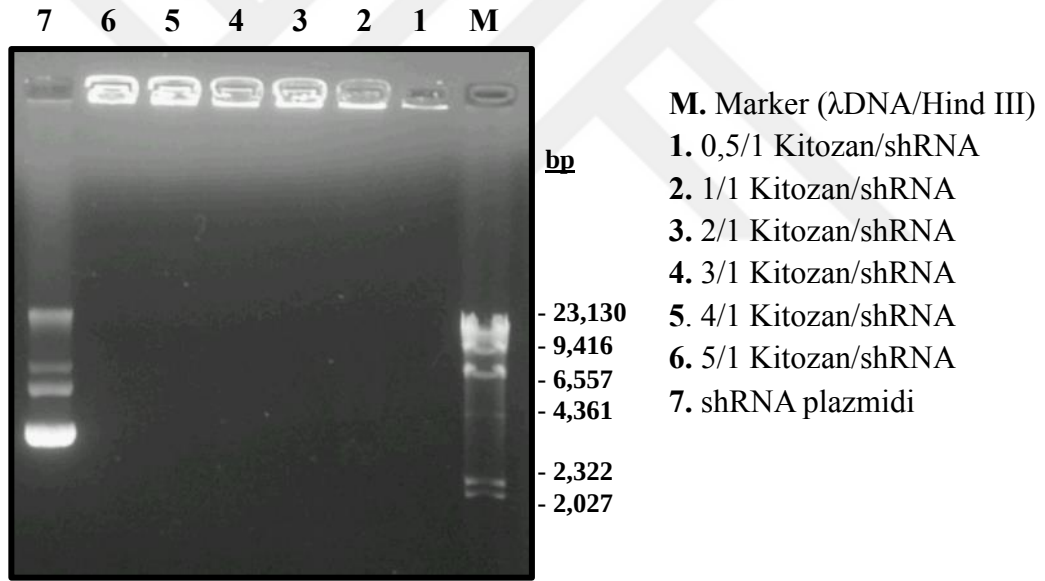
Resim 2: shRNA plazmidinin enzim kesim jel fotoğrafı

Agaroz jel elektroforezi çalışmasının sonuçlarına dayanılarak, shRNA-hMAM plazmidinin restriksiyon enzim haritasında yer alan XbaI ve ClaI restriksiyon enzimleri ile kesilerek doğrusal hale getirilebilirliği ve 3591 baz çifti uzunluğunda bir DNA molekülü olduğu gösterilmiştir.

6.2. Nanoplekslerin Hazırlanmasına İlişkin Bulgular

6.2.1. Nanopleks oluşumunun elektroforetik kontrolüne ilişkin bulgular

Kitozan/shRNA nanopleksleri yöntem 5.2.2.1.'de belirtildiği şekilde 0,5/1, 1/1, 2/1, 3/1, 4/1 ve 5/1 (a/a) nanopleks oranlarında hazırlanmıştır. Kitozan/shRNA nanopleksleri yöntem 5.2.2.2.'de belirtildiği şekilde %0,7 agaroz jelde yürütülerek elektroforetik yöntem ile incelendi. Nanoplekslerin elektroforetik kontrolüne ilişkin agaroz jel görüntüleri **Resim 3**'de belirtilmiştir.



Resim 3: Kitozan/shRNA nanoplekslerinin agaroz jel fotoğrafı

Düşük molekül ağırlıklı kitozan ile 0,5/1, 1/1, 2/1, 3/1, 4/1 ve 5/1 (kitozan/shRNA) oranlarında hazırlanan nanoplekslerin elektroforetik kontrolü agaroz jelde değerlendirildi. Negatif yüklü shRNA ile pozitif yüklü kitozan arasında gerçekleşen elektrostatik etkileşim nedeniyle 0,5/1-5/1 aralığında tam nanopleks oluşumu gözlenmiştir. Nanoplekslerde, kısmi nanopleks oluşumunun göstergesi olan serbest shRNA bandı gözlenmemiştir.

Nanopleks oluşumu sırasında kitozan ve shRNA molekülüne ait polarite değişmektedir ve buna bağlı olarak polarite nötr hale gelmiştir. Polaritede gerçekleşen bu değişim sebebiyle elektroforez esnasında elektriksel alanda hareket meydana gelmemiştir ve jele uygulanan kitozan/shRNA nanopleksleri jelin yükleme kuyularında hareketsiz kalmıştır. Aynı zamanda, shRNA'nın DNA'ya özgü floresan bir boya olan etidyum bromür ile arasındaki bağlanma yeteneği, nanoplekslerin yük oranının artmasına paralel olarak orantılı artış göstermiştir.

6.2.2. Nanoplekslerin partikül büyüklüğü değerlerinin ölçümüne ilişkin bulgular

Kitozan/shRNA nanoplekslerinin partikül büyüklüğü ölçümleri yöntem 5.2.2.3.'de belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Nanoplekslerin partikül büyüklüğüne ilişkin ölçüm sonuçları **Tablo 3**'de verilmiştir.

Tablo 3: Nanopleks formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları

Formülasyonlar (Kitozan/shRNA)	Partikül Büyüklüğü (nm±SD)
0,5/1	436,3± 51,20
1/1	154,6 ± 1,2
2/1	153,2 ± 2,0
3/1	238,2 ± 2,4
4/1	279,7 ± 1,5
5/1	298,6 ± 4,4

Yapılan ölçümlerde kitozan/shRNA nanopleks formülasyonlarının partikül büyüklüğünün $153,2 \pm 2,0$ ile $436,3 \pm 51,20$ nm arasında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, elde edilen nanopleks boyutlarının *in vitro* çalışmalar için uygun boyutlarda olduğu belirlenmiştir.

1/1 ve 2/1 nanoplekslerinin partikül boyutu sonuçları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). 1/1 ve 2/1 dışında kalan formülasyonların partikül boyutu sonuçları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

6.2.3. Nanoplekslerin zeta potansiyel değerlerinin ölçümüne ilişkin bulgular

Kitozan/shRNA nanoplekslerinin zeta potansiyel (yüzey yükü) ölçümleri yöntem 5.2.2.4.'de belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Kitozan/shRNA nanoplekslerinin zeta potansiyel ölçüm sonuçları **Tablo 4**'de verilmiştir.

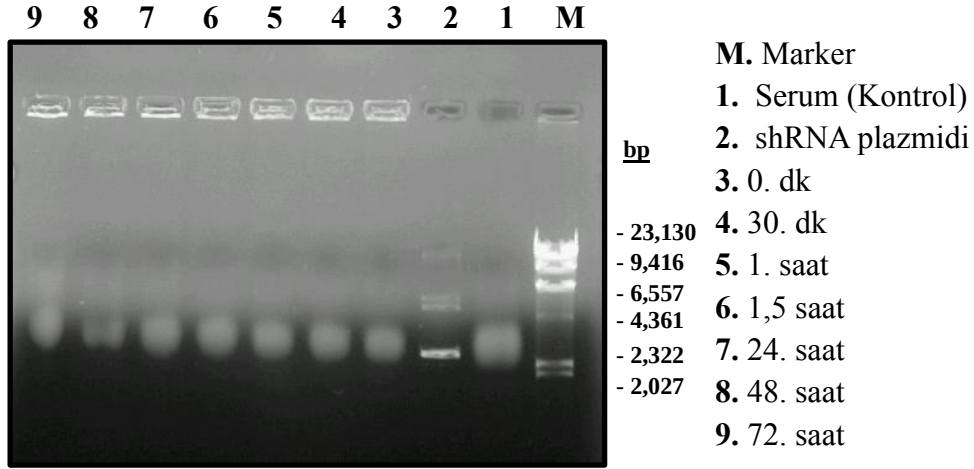
Tablo 4: Nanopleks formülasyonlarına ait zeta potansiyel ölçüm sonuçları

Formülasyonlar (Kitozan/shRNA)	Zeta Potansiyel (mV $\pm$ SD)
0,5/1	0,6 $\pm$ 0,8
1/1	5,7 $\pm$ 0,2
2/1	11,5 $\pm$ 0,4
3/1	16,8 $\pm$ 0,3
4/1	23,1 $\pm$ 0,3
5/1	31,9 $\pm$ 1,0

Hazırlanan nanoplekslerin zeta potansiyel değerlerinin 0,6 $\pm$ 0,8 ile 31,9 $\pm$ 1,0 mV arasında olduğu belirlenmiştir. shRNA'nın negatif yükü kitozan ilavesi sonrası pozitifleşmiştir. Zeta potansiyel değeri formülasyona eklenen kitozan miktarı ile doğru orantılı olarak (+) yönde artış göstermiştir. Zeta potansiyel sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

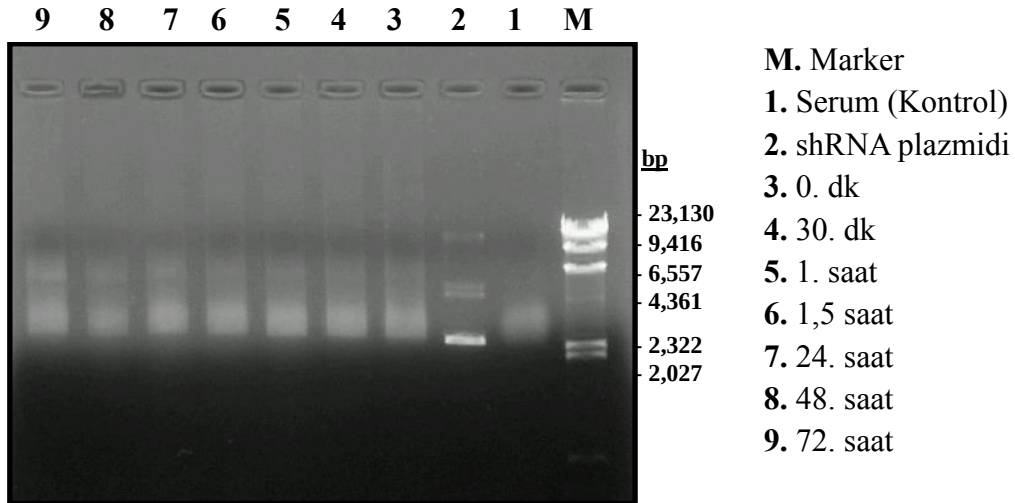
6.2.4. Nanoplekslerin serum stabilitesinin incelenmesine ilişkin bulgular

Kitozan/shRNA (2/1; a/a) ve serbest shRNA'nın serum stabilitesinin değerlendirilmesi yöntem 5.2.2.5.'de belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. İnaktif edilmemiş fetal bovin serum ilavesi sonrası 72 saate kadar nanoplekslerin elektroforetik incelemelerine ilişkin agaroz jel fotoğrafı **Resim 4**'de serbest shRNA'nın ise **Resim 5**'de verilmiştir.



Resim 4: Kitozan/shRNA (2/1) nanopleksinin serum stabilitesi

İnaktive edilmemiş fetal bovin serum ile muamele edilen kitozan nanoplekslerin serum stabilitesi sonuçlarına göre; shRNA'yı serum ve serum bileşenlerinin enzimatik aktivitesinden degradasyona karşı 72 saat boyunca koruduğu görülmüştür. Kontrol olarak inaktive edilmemiş serum da jele yüklenmiştir. Nanoplekslerde kuyunun ilerisinde görülen bandın serum bandı olduğu gözlenmiştir.

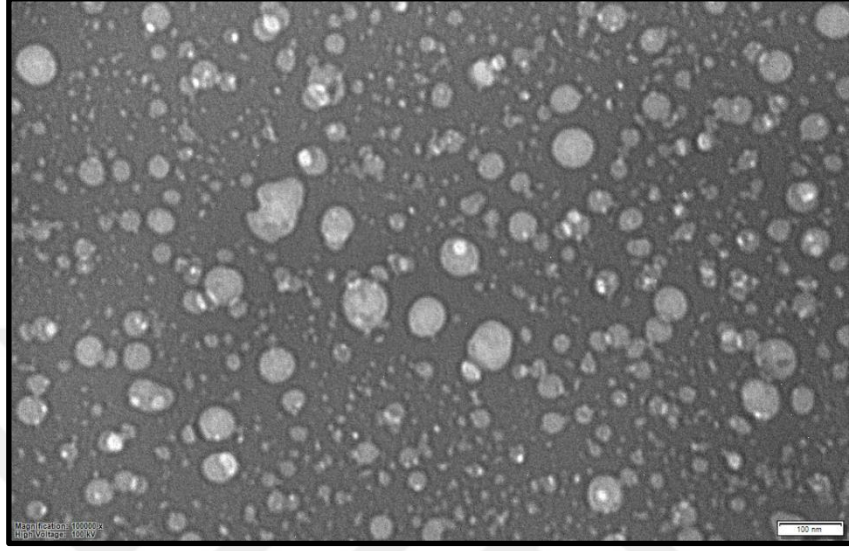


Resim 5: Serbest shRNA plazmidin serum stabilitesi

Serbest shRNA'nın serum stabilitesi sonuçlarına göre; 0.dk'dan itibaren plazmidin degradasyona uğradığı ve serum içerisinde stabil kalmadığı görülmüştür.

6.2.5. Nanoplekslerin geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmesine ilişkin bulgular

Kitozan/shRNA nanoplekslerinin morfolojik özelliklerini belirlemek amacıyla yöntem 5.2.2.6.'da belirtilen şekilde TEM incelemesi gerçekleştirildi.



Resim 6: Kitozan/shRNA nanoplekslerinin TEM görüntüsü

TEM incelemesi sonucunda *in vitro* transfeksiyon çalışmaları açısından uygun boyutlara sahip nanopleks yapılarının oluştuğu görülmüştür.

6.3. Hücre Kültürü Çalışmalarına İlişkin Bulgular

6.3.1. *In vitro* gen inhibisyonun ELISA yöntemi ile tayinine ilişkin bulgular

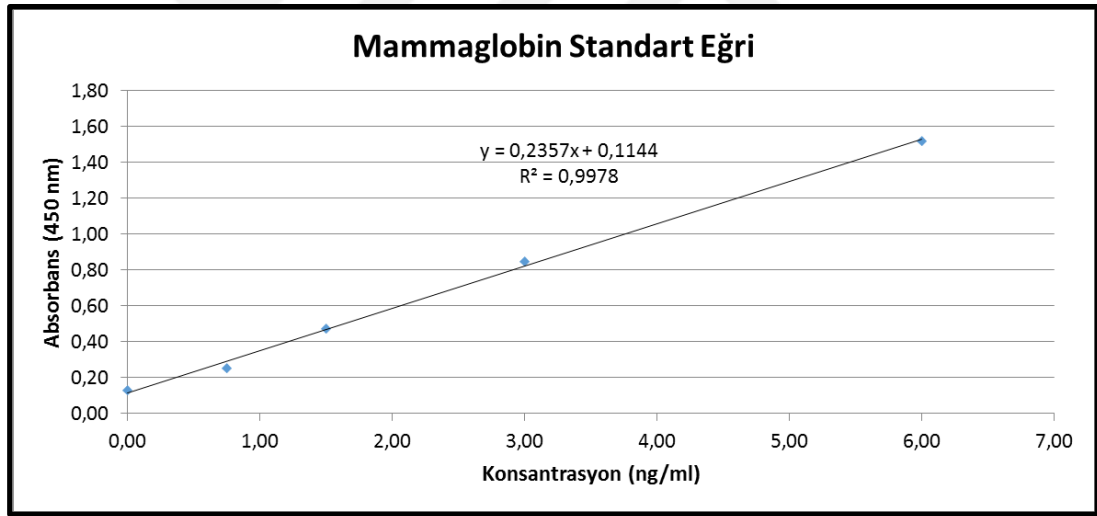
MDA-MB-435 hücre hattında, kitozan/shRNA nanoplekslerinin *in vitro* transfeksiyon çalışmaları ve ELISA testi, yöntem 5.2.3.2. ve 5.2.3.3.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

Kitozan/shRNA nanoplekslerinin *in vitro* transfeksiyon çalışmalarında; Mammaglobin gen ekspresyonunun spektrofotometrik tayininde kullanılmak üzere Mammaglobin standart eğrisi Mammaglobin konsantrasyon değerlerine karşılık gelen 450 nm'deki absorbans değerlerinden yararlanılarak oluşturuldu. Elde edilen grafikte yer alan değerlerin regresyon analizi yapılarak eğrinin kullanılabilirliği ve doğrusallığı saptandı. Elde edilen ng/ml Mammaglobin konsantrasyonlarına karşılık gelen OD 450 nm'deki absorbans değerleri **Tablo 5**'de verilmiştir. **Tablo 5**'de

verilen spektrofotometrik çalışma ve ölçüm sonuçlarına göre çizilen Mammaglobin standart eğri ise **Şekil 11**'de verilmiştir.

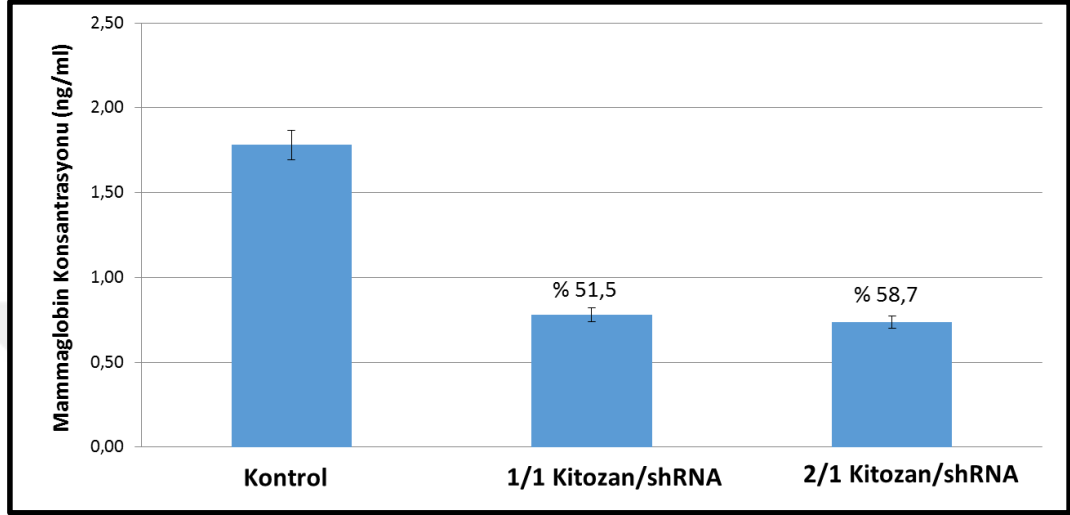
Tablo 5: Mammaglobin standart eğri çizimine ilişkin değerler

Konsantrasyon (ng/ml)	Absorbans (450 nm)
0	0,13 ± 0,014
0,75	0,25 ± 0,011
1,5	0,48 ± 0,029
3	0,85 ± 0,053
6	1,52 ± 0,063



Şekil 11: Mammaglobin standart eğrisi

Hazırlanan Mammaglobin standart eğrisinin; doğru denkleminin $y=0,2357x + 0,1144$ ve R^2 değerinin 0,9978 olduğu belirlenmiştir. Elde edilen standart eğrinin *in vitro* transfeksiyon çalışmalarında Mammaglobin gen ekspresyonunun tayininde kullanılabileceğine karar verilmiştir.

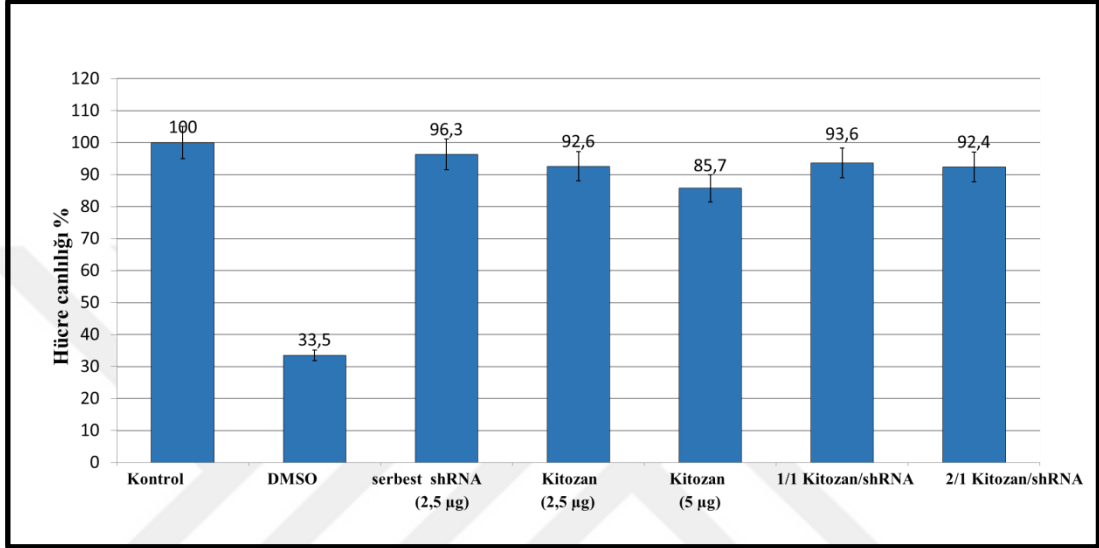


Şekil 12: MDA-MB-435 hücre hattında kitozan/shRNA nanoplekslerinin Mammaglobin baskılanması üzerine etkisi

Transfeksiyon ile Mammaglobin sekresyonunun inhibisyonu (%), nanoplekslerdeki Mammaglobin konsantrasyonunun kontrole karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Yapılan ELISA tayini sonucunda, MDA-MB-435 hücre hattında 1/1 (a/a) kitozan/shRNA nanopleksinin transfeksiyonu sonrası Mammaglobin'i % 51,5 oranında, 2/1 (a/a) kitozan/shRNA nanopleksinin transfeksiyonu sonrası Mammaglobin'i % 58,7 oranında baskıladığı saptanmıştır (Şekil 12).

6.3.2. Sitotoksosite testine ilişkin bulgular

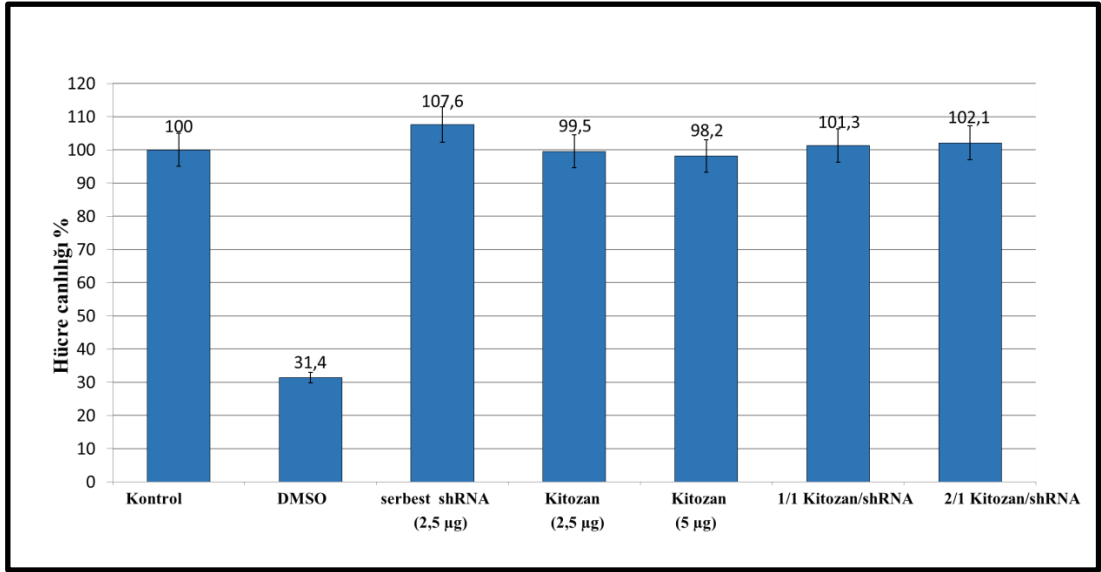
Kitozan/shRNA nanoplekslerinin sitotoksosite testine yönelik MTT çalışması, L-929 fibroblast ve MDA-MB-435 meme kanseri hücre hatlarında yöntem 5.2.3.4.'de belirtilen şekilde yapılmıştır. Sitotoksosite testine ilişkin bulgular sırasıyla **Şekil 13** ve **Şekil 14**'de verilmiştir.



Şekil 13: L-929 hücre hattında yapılan sitotoksosite testi

L-929 fare fibroblast sağlıklı hücre hattında yapılan sitotoksosite çalışmasında DMSO pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Kontrole göre kıyaslandığında; 1/1, 2/1 oranında hazırlanan nanoplekslerde, serbest shRNA ve kitozan örneklerinde hücre canlılığı en az %85'in üzerinde bulunmuştur. Formülasyonların hücre canlılığı üzerinde sitotoksik etkisi gözlenmemiştir. Bu sebeple hazırlanan 1/1 ve 2/1 oranındaki kitozan/shRNA nanopleksleri hücre kültürü çalışmaları için uygun bulunmuştur.

Kontrol grubu ile 1/1 ve 2/1 nanopleks oranları kıyaslandığında elde edilen veriler her iki formülasyon için de istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$).



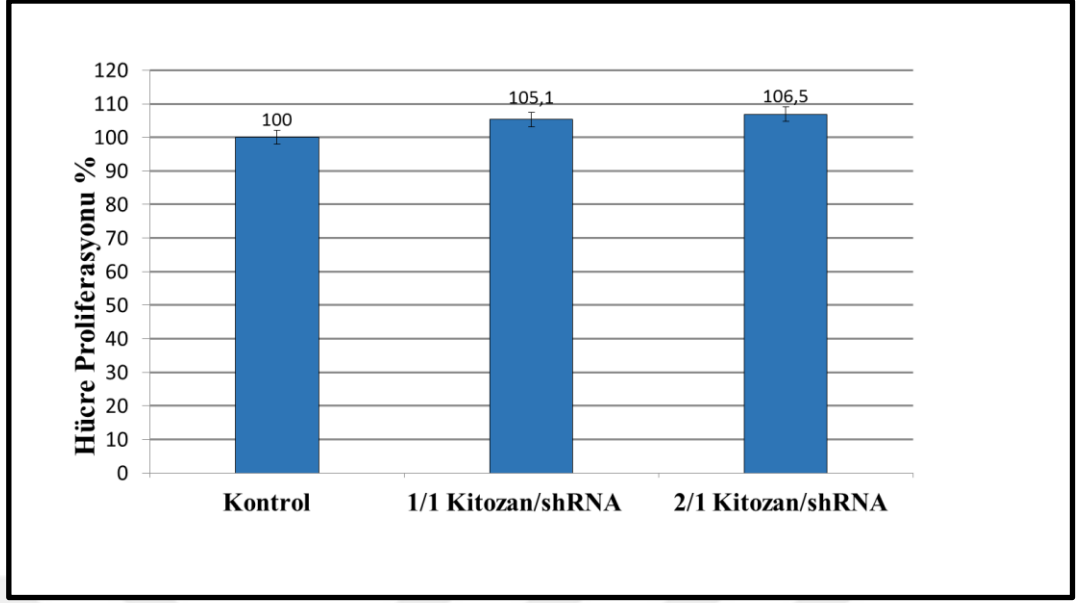
Şekil 14: MDA-MB-435 hücre hattında yapılan sitotoksikite testi

MDA-MB-435 meme kanseri hücre hattında yapılan sitotoksikite çalışmasında DMSO pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Kontrole göre kıyaslandığında; 1/1, 2/1 oranında hazırlanan nanoplekslerde, serbest shRNA ve kitozan örneklerinde hücre canlılığı %98'in üzerinde bulunmuştur. Formülasyonların hücre canlılığı üzerinde sitotoksik etkisi gözlenmemiştir. Bu sebeple hazırlanan 1/1 ve 2/1 oranındaki kitozan/shRNA nanopleksleri hücre kültürü çalışmaları için uygun bulunmuştur.

Kontrol grubu ile 1/1 ve 2/1 nanopleks oranları kıyaslandığında elde edilen veriler her iki formülasyon için de istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$).

6.3.3. Proliferasyon testine ilişkin bulgular

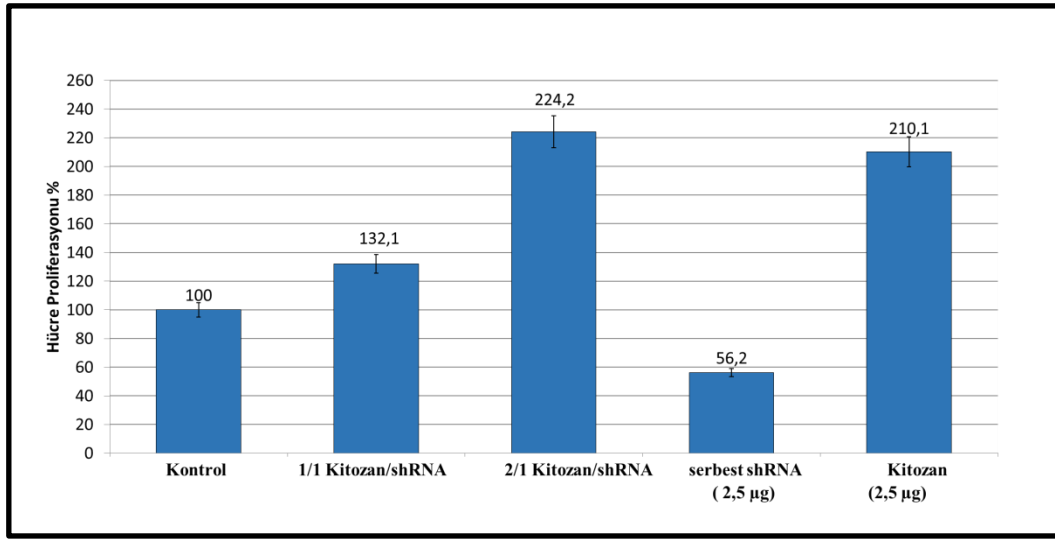
Kitozan/shRNA nanoplekslerinin proliferasyon testine yönelik BrdU çalışması, L-929 fibroblast ve MDA-MB-435 meme kanseri hücre hatlarında yöntem 5.2.3.5.'de belirtilen şekilde yapılmıştır. Proliferasyon testine ilişkin bulgular sırasıyla **Şekil 15** ve **Şekil 16**'de verilmiştir.



Şekil 15: L-929 hücre hattında yapılan proliferasyon testi

L-929 fare fibroblast sağlıklı hücre hattında yapılan proliferasyon çalışmasında kontrole göre kıyaslama yapıldığında; 1/1 ve 2/1 oranında hazırlanan nanoplekslerin, hücre proliferasyonu değerleri sırasıyla %105,1 ve %106,5'tur. Hazırlanan nanoplekslerin hücre proliferasyonunu inhibe etmediği gözlenmiştir. Aynı zamanda, bu veriler MTT testinin sonucunu da doğrulamaktadır.

Kontrol grubu ile 1/1 ve 2/1 nanopleks oranları kıyaslandığında elde edilen veriler her iki formülasyon için de istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$).



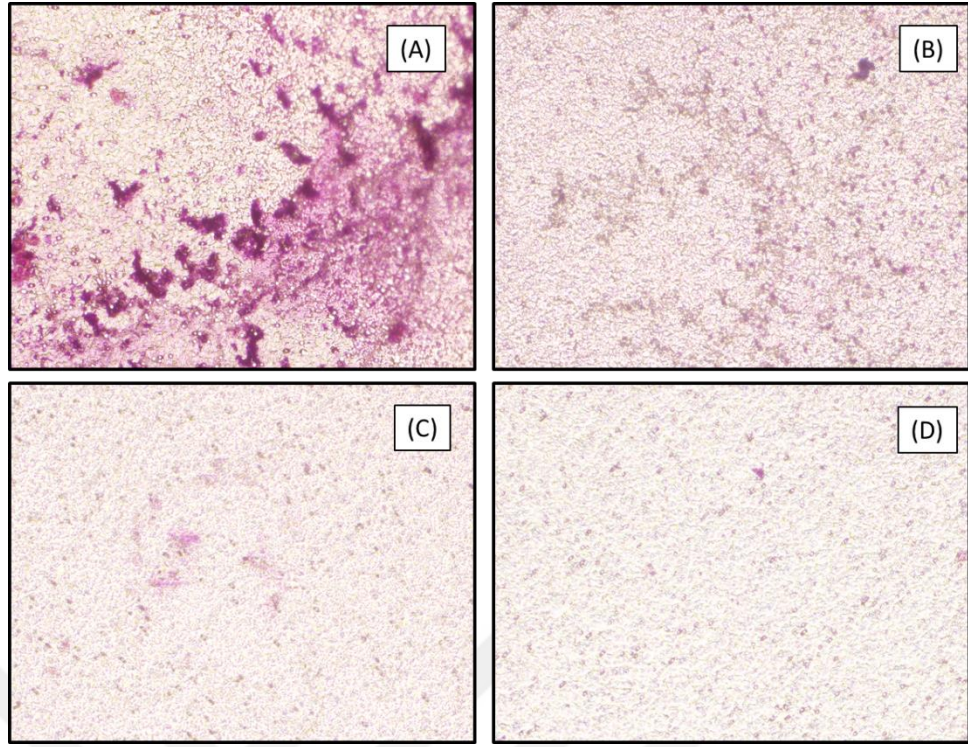
Şekil 16: MDA-MB-435 hücre hattında yapılan proliferasyon testi

Proliferasyon çalışmasına göre, MDA-MB-435 meme kanseri hücre hattında kitozanın proliferasyonu artırıcı etkisi gözlenmiştir. Kitozan içermeyen serbest shRNA'nın ise hücre proliferasyonunu inhibe ettiği (%56,2) gözlenmiştir.

Serbest shRNA uygulaması sonrası elde edilen veriler kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Kontrol grubu ile 1/1 ve 2/1 nanopleks oranları kıyaslandığında elde edilen veriler her iki formülasyon için de istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

6.3.4. İnvazyon testine ilişkin bulgular

MDA-MB-435 meme kanseri hücre hattında invazyon çalışması yöntem 5.2.3.6.'de belirtilen şekilde yapılmıştır. Kanser hücre hattında serbest shRNA, 1/1 ve 2/1 kitozan/shRNA nanoplekslerinin invazyona etkisi **Resim 7**'de verilmiştir.



Resim 7: (A) MDA-MB-435 hücrelerinin invazyonu, (B) MDA-MB-435 hücre hattında serbest shRNA invazyonu, (C) MDA-MB-435 hücre hattında 1/1 kitozan/shRNA invazyonu, (D) MDA-MB-435 hücre hattında 2/1 kitozan/shRNA invazyonu. X10 büyütme.

İnvazyon çalışması değerlendirildiğinde, serbest haldeki shRNA'nın invazyonu azalttığı gözlemlenmiştir. Sonrasında 1/1 ve 2/1 kitozan/shRNA nanoplekslerinin invazyonu serbest shRNA'ya oranla daha fazla azalttığı gözlemlenmiştir. 1/1 ve 2/1 nanopleksleri birbiriyle kıyaslandığında; 2/1 nanopleksinin invazyonu azaltma etkisi, 1/1 nanoplekse göre daha fazladır.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserdir ve dünya çapında ölümlerle sonuçlanan kanser türlerindendir. İnsan meme karsinomları, davranış, sonuç ve tedaviye yanıt olarak çeşitlilik gösteren heterojen bir tümör grubunu temsil eder. Her ne kadar insidansı hala yüksek olsa da, meme kanserine bağlı toplam ölüm oranı, çeşitli tedavilerin erken uygulanmasına bağlı olarak kısmen azalmıştır. Meme kanserinden ölüm oranını daha da azaltmak için, kötü prognoz tümörlerini inceleme ve karakterize etme, biyolojilerini öngörme, yeterli tedaviyi sağlama ve hastaların sonuçlarını iyileştirme hedefi vardır. Ayrıca östrojen reseptörü, progesteron reseptörü veya HER2 gibi bilinen hedefleri eksprese etmeyen tümörlerde, etkili ek sistemik tedavi formlarının geliştirilmesine ihtiyaç vardır (Rakha ve ark., 2007; Rakha ve ark., 2010).

İnsan mammaglobini (hMAM), 1996'da Watson ve Fleming tarafından diferansiyel görüntüleme PCR tekniği kullanılarak tanımlandı. Mammaglobin, sekretoglobiner olarak adlandırılan küçük epitelyal, salgı proteinlerinin ailesine ait olan, 93 aminoasitlik polipeptit yapısına sahip olan ve 10,5 kDa büyüklüğünde bir glikoproteindir. Mammaglobin, meme epitel hücrelerinde bulunur ve meme kanserinde aşırı seviyede eksprese edilir. Memeye özgü ekspresyonu nedeniyle, mammaglobin mRNA ve proteini, meme kanseri teşhisinde biyobelirteç olarak büyük ilgi çekmektedir. 2000 yılından bu yana kullanımıyla ilgili 50'den fazla yayında, meme kanserinde bugüne kadarki en umut verici moleküler belirteç olarak kabul edilmektedir (Zehentner ve Carter, 2004).

Mammaglobin ekspresyonu, ilk olarak 35 meme kanserinde RT-PCR ve Northern blot analizi kullanılarak çalışılmıştır. Belirli bir histolojiyle korelasyon göstermeyen testlerin % 23'ünde mammaglobinin aşırı ekspresyonu bildirilmiştir (Zehentner ve Carter, 2004).

Meme kanserinin erken teşhisi için yapılan hızlı bir tarama testi bu ölümcül hastalığın tedavisinde fayda sağlayacaktır. Mammaglobin mRNA'sının özellikle meme dokusunda eksprese edildiği ve genellikle meme kanserinde aşırı derecede eksprese edildiği gösterilmiştir. Mammaglobin, kolon, akciğer, yumurtalık ve prostat

kanseri gibi diğer kanser türlerinde eksprese edilmez. Mammaglobin proteininin memeye özgü ekspresyonu, immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak gösterilmiştir. Mammaglobin, hem yerleşik meme kanseri hücre dizilerinden hem de birincil meme karsinom hücrelerinden salgılanır. Serumda mammaglobin varlığının izlenmesi için monoklonal antikor bazlı bir test kullanılarak, meme kanserli hastaların serumlarında artmış mammaglobin seviyeleri tespit edilmiştir ancak sağlıklı kadınlarda görülmemiştir. Böylece, meme kanseri hastalarından aşırı eksprese edilen ve salgılanan mammaglobin, meme kanserli hastaların serumlarında tespit edilebilir ve meme kanserinin teşhisi ve yönetimi için hızlı bir tarama testi sağlayabilmektedir (Fanger ve ark., 2002).

Kanserin invazif olması, agresif büyüme profili göstermesi, kanser gelişimi ve yayılımına dahil olan karmaşık mekanizmalar nedeniyle, cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi klasik tedaviler çoğu zaman dirençli tümörlere karşı yeterince etki göstermemektedir. Bu sebeple, kanser tedavisinde yeni antikanser stratejileri önemli bir yere sahiptir. Kanser gelişimi ve büyümesinde rol oynayan genlerin daha iyi anlaşılması, bu hastalığın tedavisinde yeni yaklaşımlar sağlar. Çoğu kanser türlerinde düzgün çalışmayan onkogenler ve tümör baskılayıcı genler, kanser sürecinin başlangıcında ve büyümesinde önemli bir rol oynar. Gen tedavisi yaklaşımı bu hastalığı kaynağında tedavi ederek yok etmek için umut verici bir fırsat sağlar (Morille ve ark., 2008).

RNA interferans (RNAi), sekansa spesifik gen susturma sağlayan posttranskripsiyonel bir mekanizmadır. Sekansa spesifik mRNA degradasyonunun araçları, daha uzun dsRNA'lardan ribonükleaz III kesilmesiyle üretilen 21-22 nükleotit uzunluğundaki siRNA'lardır (Elbashir ve ark., 2001). RNAi, kısa bir RNA dizisinin mRNA hedefi ile eşleştirilmesini içerir. 1998'de Craig Mello ve Andrew Fire tarafından tanımlanan endojen RNAi mekanizması birçok hücresel süreci düzenler. Endojen olarak, çift sarmallı RNA'lar(dsRNA) Dicer enzimi tarafından daha uzun RNA transkriptlerinden kesilir ve Argonat ve birkaç proteinden oluşan RNA indüklenmiş susturma kompleksi (RISC) adı verilen bir kompleksin içine yüklenir. Passenger zincir atılır ve kılavuz zincir, RISC kompleksi vasıtasıyla

tamamlayıcı bir mRNA sekansına eşlenir. Eşleşme sonrası, mRNA'nın degradasyonu gerçekleştirilerek gen susturma sağlanır (Bobbins ve Rossi, 2016).

RNAi uygulamalarına iki molekül tipi aracılık edebilir; kimyasal olarak sentezlenmiş çift sarmallı küçük interferans RNA (siRNA) veya vektör bazlı kısa saç tokası RNA (shRNA). Etkili RNAi başlangıçta sentetik siRNA'nın uygulanmasıyla gösterilmiştir; daha sonra, T7 RNA polimerazı ile in vitro üretilen siRNA'nın aktif olduğu bulunmuştur ve aktif siRNA'nın bir firkete yapısından oluştuğu, bir plazmid yapı üzerinde RNA polimeraz III promotörü ile hücrelerde kopyalanabileceği gösterilmiştir. siRNA ve shRNA benzer fonksiyonel sonuçlar elde etmek için uygulanabilse de, siRNA ve shRNA birbirinden farklı moleküllerdir. Bu nedenle, etki mekanizmaları, RNA interferans yolları, hedef dışı etkileri ve uygulamaları farklılık yaratabilir (Rao ve ark., 2009).

Sentetik siRNA, gen ekspresyonunda geçici baskılama sağlarken, shRNA'nın plazmid bazlı endojen ekspresyonu kalıcı inhibisyona aracılık etmektedir (Jia ve ark., 2007). Sentetik siRNA molekülleri birçok gen araştırmalarında kullanılmaktadır ancak çoğu mono veya multigenik hastalıklarda gen tedavisi için kullanımları sınırlıdır, çünkü sentetik siRNA'ların hücre içerisine taşınması kısa süreli bir gen baskılanmasına yol açar. Bu nedenle, shRNA'yı eksprese eden plazmid ve viral vektörler, siRNA'nın uzun vadede hücresel ekspresyonu için geliştirilmiştir (Mackinnon ve ark., 2006). Ancak zayıf hücresel alım, nükleazlar ile degradasyon gibi dezavantajlar bu moleküllerde uygun taşıyıcı bir sistemin gerekliliğini göstermektedir (Katas ve Alpar, 2006).

Tarihsel olarak, gen taşınmasında uygulanan üç farklı yaklaşım vardır. İlk yaklaşım serbest DNA kullanımıdır. Serbest DNA'nın tümör bölgesine doğrudan enjekte edilmesinin yüksek seviyelerde gen ekspresyonu ürettiği gösterilmiştir. Bu stratejinin, serum nükleaz varlığından dolayı sistemik uygulama için uygun olmadığı belirtilmektedir. İkinci yaklaşım, genetik olarak değiştirilmiş virüslerin kullanımını içerir. Viral vektörler, genetik materyallerini konak hücrelere aktarabilen, doğal olarak geliştirilen virüslerden türetilen biyolojik sistemlerdir. Toksisitelerini ortadan kaldırmak ve çeşitli gen aktarımını yüksek verimde sağlamak üzere modifiye edilmiştir. Bununla birlikte, güvenlik, immünojeniklik, transgen taşıma kapasitesinin

sınırlı olması ve yüksek maliyet açısından viral vektörlerin kullanımı azaltılmıştır. Taşıyıcı sistemler için üçüncü yaklaşım, katyonik nitelikte olan viral olmayan vektörlerdir ve bunlar katyonik polimerler ve katyonik lipidlerdir. Bu yapılar, elektrostatik etkileşim yoluyla negatif yüklü DNA ile etkileşime girer ve sırasıyla polipleksler ve lipopleksler oluşur. Bu tür vektörlerle ilişkili avantajlar, büyük ölçekte üretilebilmeleri, düşük immünojenik yanıt oluşturmaları ve büyük boyutlarda transgen taşıma kapasitelerine sahip olmalarıdır (Morille ve ark., 2008).

Kitozan, kitinin deasetilasyonu ile elde edilen 1-4 bağlı N-asetil-D-glukozamin ve D-glukozamin alt birimlerinden oluşan biyobozunur ve biyo-uyumlu doğrusal yapıda bir aminopolisakarittir. pDNA ile moleküler ağırlık ve deasetilasyon derecesine bağlı olarak kararlı, küçük (20-500 nm) partiküller oluşturabilir. Katyonik polielektrolit yapısı, negatif yüklü mukozal yüzeyler ve DNA gibi diğer makromoleküller ile güçlü elektrostatik etkileşim sağlar. Bu katyonik polimer, PEI polimerine kıyasla DNAaz degradasyonuna karşı koruma sağlar ve önemli ölçüde daha iyi bir biyoyumluluk sergiler (Morille ve ark., 2008).

Tez çalışması kapsamında, meme kanserinde önemli bir rol oynayan mammaglobin geninin kitozan/shRNA nanopleksleri ile baskılanmasına ilişkin *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Meme kanseri hücre hattı olarak MDA-MB-435 hücresi kullanılmıştır. Nerlich ve Bachmeier tarafından yapılan çalışmada, immünohistokimyasal protein düzenini doğrulamak ve çeşitli ortamlarda mammaglobinin mRNA ekspresyonunu belirlemek için kantitatif RT-PCR incelemesi yapılmıştır. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri, mammaglobin ekspresyonunu anlamlı farklılıklar olmadan orta düzeyde ortaya koyarken; MDA-MB-435 hücreleri, hücre yoğunlukları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar ortaya koymuştur. Mammaglobin mRNA seviyesi MDA-MB-435 için, subkonfluent hücrelerde, konfluent hücrelere göre 3 kat daha yüksektir (Nerlich ve Bachmeier, 2013). Narayanan ve arkadaşları tarafından, endojen mammaglobin ekspresyonun çeşitli meme kanseri hücre hatlarında saptanması çalışması yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında endojen mammaglobin ekspresyonu tespit edilememiştir (Narayanan ve ark., 2004). Bu çalışmalar

doğrultusunda, tez çalışmamızda endojen olarak mammaglobini en çok eksprese eden MDA-MB-435 metastatik meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır.

Sentetik siRNA'ların aksine daha stabil bir gen baskılamasını sağlamak için plazmid temelli bir siRNA olan shRNA kullanılmıştır. Mammaglobini baskılamak üzere ticari olarak dizayn edilen shRNA'nın *Escherichia coli* GT116 suşuna transformasyonu ve daha sonrasında izolasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan spektrofotometrik kontrol doğrultusunda plazmid DNA yapısının uygun saflık değerinde olduğu görülmüştür. Spektrofotometrik kontrol sonrası, shRNA'nın elektroforetik kontrol çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elektroforetik sonuçlar incelendiğinde, shRNA bandının yaklaşık %85-90 oranında kapalı halkasal forma sahip olduğu gözlenmiştir (**Resim 1**). Aynı zamanda, yapısında bulunan ClaI ve XbaI restriksiyon enzimleriyle plazmidin kesimi sonucu shRNA yapısının 3591 baz çifti uzunluğunda olduğu gösterilmiştir (**Resim 2**).

İzole edilen shRNA'nın spektrofotometrik ve elektroforetik kontrolleri tamamlandıktan sonra, nanopleks yapısını oluşturmak için biyouyumlu bir polimer olan kitozan kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında düşük molekül ağırlıklı (70 kDa) ve yüksek deasetilasyon derecesine (%75-85) sahip kitozan kullanılmıştır.

Köping-Höggård ve arkadaşlarına göre, hedef hücreleri *in vitro* olarak transfekte eden pDNA ile stabil kompleksler elde etmek için deasetilasyon derecesinin % 65'i aşması gerekmektedir (Köping-Höggård ve ark., 2001). Huang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada deasetilasyon derecesinin % 88'den % 46'ya düşürülmesinin ortalama partikül boyutunu 181'den 239 nm'ye çıkardığı ve zeta potansiyelini de 22,2 mV'den 9,6 mV'ye düşürdüğü gözlenmiştir (Huang ve ark., 2005).

Kitozan için moleküler ağırlık ve deasetilasyon derecesini bir araya getiren Lavertu ve ark., maksimum ekspresyon seviyesinin, moleküler ağırlığı düşürerek ve deasetilasyon derecesini arttırarak veya tam tersi deasetilasyon derecesini düşürerek ve moleküler ağırlığı arttırarak elde edilebileceğini bildirmişlerdir (Lavertu ve ark., 2006).

Düşük moleköl ağırlıktaki kitozanın %0,25 konsantrasyonunda asidik çözeltisi hazırlanmıştır. Bu kitozan çözeltisi kullanılarak shRNA'nın farklı oranlarda kitozan/shRNA (a/a) nanopleskleri hazırlanmıştır.

Weecharangsan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, kitozanın 20, 45 ve 200 kDa moleköl ağırlıktaki formları CHO-K1 hücrelerinde etkili transfeksiyon etkililiğine sahipken, 460 kDa moleköl ağırlıktaki kitozanın hücresel alımı azaltan büyük partiköl boyutuna bağılı olarak transfeksiyon etkinliğini düşürdüğü gözlenmiştir (Weecharangsan ve ark., 2008).

Sato ve arkadaşları, kitozanın moleköl ağırlılığının A549 hücreleri, B16 melanom hücreleri ve Hela hücrelerinde lusiferaz aktivitesi üzerindeki etkisini çalışmışlardır. 15 ve 52 kDa'lık kitozanlar, kullanılan tüm hücre hatları için lusiferaz aktivitesini büyük ölçüde arttırmıştır (Sato ve ark., 2001).

Farklı oranlarda hazırlanan kitozan/shRNA (a/a) nanoplekslerinin nanopleks oluşumu elektroforetik olarak incelenmiştir. Bu amaçla, 0,5/1, 1/1, 2/1, 3/1, 4/1 ve 5/1 oranlarında kitozan/shRNA nanopleksleri ile çalışılmıştır. Kısmi nanopleks oluşumunun göstergesi olan serbest haldeki shRNA'ya rastlanmadığı için tüm nanopleks oranlarında tam nanopleks oluşumu gözlenmiştir (**Resim 3**).

Kitozan/shRNA nanoplekslerinin partiköl büyüklüğü ve yüzey yükü hücre kültürü çalışmalarında, hücresel alımda önemli rol oynamaktadır. Yapılan partiköl büyüklüğü ölçümünde, hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere uygun boyutlarda, $153,2 \pm 2,0$ ile $436,3 \pm 51,20$ nm arasında değışen nanopleks büyüklüğü gözlenmiştir (**Tablo 3**). 0,5/1 nanopleksinde partiköl büyüklüğünün 1/1 nanoplekse göre daha fazla olması 0,5/1 nanopleksinde henüz sıkı kompleks yapısının oluşmaması ile açıklanır. 0,5/1 nanopleksinde shRNA kitozan ile tam olarak kondanse olmamıştır ve buna bağılı olarak gevşek bir yapı oluşmaktadır.

Partiköl büyüklüğü shRNA'nın kitozan ile kompleksleşme yeteneğine bağılıdır ve daha sıkı kompleksleşme partiköl büyüklüğünü azaltır (Erdem-Çakmak ve ark., 2014).

Nanoplekslerin zeta potansiyel değeri $0,6 \pm 0,8$ ile $31,9 \pm 1,0$ mV arasında değişmektedir (**Tablo 4**). Zeta potansiyel (yüzey yükü) ölçüm sonuçlarına göre beklendiği gibi pozitif yüklü kitozanın konsantrasyonunun artışıyla beraber nanoplekslerin yüzey yükü (+) yönde pozitif olarak artış göstermiştir. Nanoplekslerin kitozan etkileşimi ile beraber pozitif yük kazanması, negatif yüklü hücre membranı yapısından geçerken kolaylık sağlamaktadır. Kitozan miktarının yükseltilmesi ile zeta potansiyel değerinin artması literatür sonuçları ile uyumludur (Erdem-Çakmak ve ark., 2014).

Kitozan/DNA komplekslerinin morfolojisi, yük oranına büyük ölçüde bağlıdır. Kompleksin N/P oranı değiştirilerek, farklı topolojik yapılara sahip polipleksler (ortalama boyutları 150-600 nm arasında değişen) gözlenmiştir. *In vitro* ve *in vivo* gen transfeksiyon etkinlikleri, komplekslerin fiziksel şekli ve stabilitesi ile ilgilidir (Mao ve ark., 2010).

Serum stabilitesi çalışması kitozan/shRNA nanoplekslerinin hücre kültürü çalışmasında kullanılan serum içerisindeki enzimlerin degradasyonunun tespitinde önemli bir yere sahiptir. 2/1 kitozan/shRNA (a/a) nanopleksiyle yapılan serum stabilitesi çalışmasında, kitozanın shRNA'yı serumun enzimatik degradasyonundan 72 saate kadar koruduğu görülmüştür (**Resim 4**). Bu durumun aksine serbest shRNA ile yapılan serum stabilitesi çalışmasında serum ilavesinin hemen ardından 0. dakikada shRNA'nın enzimatik degradasyona uğradığı gözlenmiştir (**Resim 5**).

Serumun transfeksiyon etkinliği üzerindeki etkisi birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir ve serumun uygun moleküler ağırlıkta ve N/P oranındaki kitozanların aracılık ettiği gen ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Mao ve ark., 2010).

Erbacher ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, kitozan (70 kDa)/DNA komplekslerinin %10 serum varlığından bağımsız olarak etkin şekilde transfekte edildiğini göstermişlerdir (Erbacher ve ark., 1998).

MacLaughlin ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, % 10 serum varlığında kitozan komplekslerinin degradasyonunun, kitozanın moleküler ağırlık ve yük oranına bağlı olduğu gösterilmiştir. 7 kDa kitozan ile hazırlanan tüm

kompleksler, serum varlığında degrades olmuşlardır. 32-102 kDa aralığında kitozan ile hazırlanan 2/1 kompleksi serumla muamele edildiğinde, sadece 32 kDa kitozan ile formüle edilen kompleks degrades olurken diğer tüm kompleksler stabil kalmıştır (MacLaughlin ve ark., 1998).

Geçirimli elektron mikroskopisi çalışması ile kitozan/shRNA nanoplekslerinin globüler yapıda ve uygun boyutta olduğu görülmüştür (**Resim 6**). TEM verileri kitozanın shRNA ile nanopleks oluşturmaya ilişkin veriler ile uyumluluk göstermektedir.

Hücre kültürü çalışmamızda shRNA miktarı 2,5 µg/kuyu olacak şekilde çalışılmıştır. Romøren ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, plazmid konsantrasyonu 0,5 µg/kuyu miktarından 2,5 µg/kuyu seviyesine arttırıldığında lusiferaz ekspresyonunda bir artış gözlenmiştir. DNA konsantrasyonu 5 µg/kuyu konsantrasyonuna geldiğinde ekspresyon seviyesinde doyumluk meydana gelmektedir (Romøren ve ark., 2003).

MDA-MB-435 meme kanseri hücre hattında transfeksiyon sonrası Mammaglobin miktarı ELISA yöntemiyle tayin edilmiştir. 1/1 ve 2/1 oranlarında hazırlanan kitozan/shRNA nanopleksleri hücreye verildikten 48 saat sonra mammaglobin baskılama (inhibisyon) oranları kontrole kıyasla sırasıyla %51,5 ve %58,7'dir (**Şekil 12**). Kontrol grubu ile 1/1 ve 2/1 nanopleks oranları kıyaslandığında elde edilen veriler her iki formülasyon için de istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). İki formülasyon birbiri ile kıyaslandığında elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamsızdır ($p > 0,05$).

Koh ve ark., tarafından hMAM siRNA kullanılarak mammaglobinin baskılanması üzerine çalışma yapılmıştır. Meme kanseri hücreleri 100 nM siRNA ile transfekte edilmiştir. Gen baskılama etkisi, RT-PCR analizi ile belirlenmiştir. 100 nM siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde, hMAM mRNA seviyesi transfeksiyondan sonra 2. günde yaklaşık % 80 azalmıştır (Koh ve ark., 2014).

Kitozan/shRNA nanoplekslerinin sitotoksitesi hem L-929 fare fibroblast sağlıklı hücre hattı hem de gen baskılama çalışmasının gerçekleştirildiği MDA-MB-

435 metastatik meme kanseri hücre hattında MTT testi ile incelenmiştir. Kitozan/shRNA nanoplekslerinin L-929 fare fibroblast hücre hattında yapılan sitotoksisite testinde hücre canlılığı hazırlanan tüm formülasyonlarda (serbest shRNA; kitozan; 1/1 kitozan/shRNA; 2/1 kitozan/shRNA) %85'in üzerindedir (**Şekil 13**). Hazırlanan 1/1 ve 2/1 kitozan/shRNA (a/a) nanoplekslerinin hücre canlılık değerleri sırasıyla, %93,6 ve %92,4'tür. Bu sonuçlar doğrultusunda hazırlanan formülasyonların hücreler üzerinde sitotoksik etkisi gözlenmemiştir ve formülasyonların hücre kültürü çalışmaları için uygun olduğu belirlenmiştir.

MDA-MB-435 meme kanseri hücre hattında yapılan sitotoksisite çalışmasında, tüm formülasyonlardaki hücre canlılığı %98'in üzerindedir. Bu sonuçlar doğrultusunda hazırlanan 1/1 ve 2/1 (a/a) kitozan/shRNA nanoplekslerinin hücreler üzerinde sitotoksik etkisi gözlenmemiştir (**Şekil 14**).

L-929 ve MDA-MB-435 hücre hatlarında proliferasyon testi BrdU yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. L-929 fare fibroblast hücre hattında yapılan çalışmada 1/1 ve 2/1 (a/a) oranlarında hazırlanan kitozan/shRNA nanoplekslerinin hücre proliferasyonunu inhibe etmediği gözlenmiştir, bu durum MTT testinin sonucunu da doğrulamaktadır (**Şekil 15**).

MDA-MB-435 meme kanseri hücre hattında yapılan proliferasyon çalışmasında, hazırlanan 1/1 ve 2/1 (a/a) kitozan/shRNA nanoplekslerinin hücre proliferasyonunu inhibe etmediği görülmüştür. Kitozanın proliferasyonu artırıcı etkisi gözlemlenirken serbest shRNA'nın proliferasyonu inhibe ettiği görülmüştür. 2/1 nanopleks içerisindeki kitozan miktarının 1/1'den daha fazla olması nedeniyle bu formülasyon daha fazla proliferasyonu artırıcı etki göstermiştir (**Şekil 16**).

Kitozanın fibroblast hücrelerinde yara dokusunun iyileşmesinin proliferasyon aşamasında granülasyon dokusunun meydana gelmesini hızlandırdığı belirtilmiştir (Ueno ve ark., 2001).

Koh ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, mammaglobin ekspresyon seviyesinin hücre proliferasyonuna kıyasla hücre migrasyonu ve invazyonu ile yüksek derecede bağlantılı olduğu bulunmuştur. Mammaglobin degradasyonunun

hücre canlılığında önemli değişiklik yaratmadığı bildirilmiştir. Mammaglobinin hücre proliferasyonundaki rolü, tutarlı veriler göstermediğinden göz önüne alınmamıştır. Mammaglobinin aşırı ekspresyonu hücre canlılığını azaltırken, baskılanması hücre canlılığını etkilememiştir. (Koh ve ark., 2014).

MDA-MB-435 metastatik meme kanseri hücre hattında 8 µm por filtreye sahip insertlerde invazyon testi çalışılmıştır. İnvazyon bulguların ait mikroskop görüntüleri incelendiğinde, hiçbir formülasyonla muamele edilmemiş kontrol hücrelerinin invazif etkisinin yüksek seviyelerde olduğu görülmüştür. Bu durum kanser hücresinin invazif karakterini temsil etmektedir. Serbest shRNA molekülünün invazyonu baskıladığı gözlemlenmiştir. 1/1 ve 2/1 (a/a) oranlarında hazırlanan nanopleksler birbiriyle ve serbest shRNA ile kıyaslandığında; 2/1 kitozan/shRNA formülasyonunun invazyonu en yüksek seviyede baskıladığı görülmüştür, onu ardından 1/1 kitozan/shRNA ve serbest shRNA takip etmektedir (**Resim 7**). Bu sonuç, shRNA nanoplekslerinin mammaglobini baskıladığını ve bu doğrultuda baskılanan mammaglobin seviyesine bağlı olarak meme kanseri hücresinin invazif özelliği kontrole kıyasla düşüş göstermiştir. Elde edilen sonuçlar ELISA testinin sonuçları ile de tutarlıdır. Ayrıca serbest shRNA'nın invazyonu baskılama oranının hazırlanan nanoplekslere göre daha düşük olması kitozanın gen taşınmasında etkin bir rol üstlendiğini göstermektedir.

Picot ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, meme kanseri hücre malignitesindeki mammaglobin fonksiyonunun karakterizasyonu doğrultusunda, endojen mammaglobin ekspresyonunun kaybının, meme kanseri hücre invazyonunu baskıladığı görülmüştür (Picot ve ark., 2016).

Sonuç olarak hazırlanan kitozan/shRNA formülasyonlarının uygun boyut ve yapıda ve uygun zeta potansiyelinde nanopleks oluşumu gösterdiği doğrulanmıştır. Taşıyıcı sistem olarak kullanılan kitozanın shRNA'yı serumda nükleaz degradasyonuna karşı koruduğu, kitozanın güvenli ve etkin bir taşıyıcı sistem olduğu görülmüştür. Hazırlanan nanopleks formülasyonların sitotoksik etki oluşturmadığı saptanmıştır. Nanoplekslerin meme kanseri hücre hattında mammaglobini baskıladığı ELISA testi ile saptanmıştır. Proliferasyon çalışmasında serbest shRNA'nın baskılama etkisi gözlenirken, kitozan/shRNA formülasyonlarında proliferasyonu

arttırıcı etki bulunmuştur. Bu durum, kitozanın proliferasyonu arttırıcı etkisi ve mammaglobinin proliferasyon üzerine etkisinin henüz tam olarak açıklanamaması ile ilişkilendirilmiştir. shRNA ile mammaglobin baskılanması invazyon üzerinde istenen yönde etki göstermiştir. Nanopleksler aracılığıyla mammaglobinin baskılanması sayesinde MDA-MB-435 meme kanseri hücre hattında invazyon gerilemiştir. Bu sonuç, mammaglobinin meme kanseri ile ilişkili bir gen olduğunu göstermektedir. Literatürlerde belirtildiği gibi mammaglobinin meme kanseri üzerindeki biyolojik rolü henüz tam olarak tanımlanamadığından bu alanda yapılacak her çalışma mekanizmasının aydınlanmasına katkı sağlayacak ve meme kanseri hastalığının tedavisinde umut olmaya devam edecektir.



8. KAYNAKLAR

Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67:657-685.

Al Jouidi FS. Human mammaglobin in breast cancer: a brief review of its clinical utility. *Indian J Med Res.* 2014;139:675-685.

Amor, D. Gene therapy. Principles and potential applications. *Aust Fam Physician* 2001;30:953-958.

Anaya-Ruiz M, Perez-Santos M. Innovation Status of Gene Therapy for Breast Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2015;16:4133-4136.

Bae YK, Gabrielson EW. Premalignant and Malignant Breast Pathology. In: Jatoi I, Kaufmann M, eds. *Management of Breast Diseases.* Berlin: Springer; 2010, p:169-179.

Basu A, Ramamoorthi G, Jia Y, Faughn J, Wiener D, Awshah S, Kodumudi K, Czerniecki BJ. Immunotherapy in breast cancer: Current status and future directions. In: Wang XY, Fisher P, eds. *Advances in Cancer Research.* Cambridge: Academic Press; 2019, p:295-349.

Beier HM. The discovery of uteroglobin and its significance for reproductive biology and endocrinology. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;923:9-24.

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979;7:1513-1523.

Bobbin ML, Rossi JJ. RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise?. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2016;56:103-122.

Borchard G. Chitosans for gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;52:145-150.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68:394-424.

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

Corey DR. Chemical modification: the key to clinical application of RNA interference?. *J Clin Invest*. 2007;117:3615-3622.

Dear TN, Boehm T, Keverne EB, Rabbitts TH. Novel genes for potential ligand-binding proteins in subregions of the olfactory mucosa. *EMBO J*. 1991;10:2813-2819.

Douglas-Jones AG, Woods V. Molecular assessment of sentinel lymph node in breast cancer management. *Histopathology*. 2009;55:107-113.

Duijf PHG, Nanayakkara D, Nones K, Srihari S, Kalimutho M, Khanna KK. Mechanisms of Genomic Instability in Breast Cancer. *Trends Mol Med*. 2019;25:595-611.

El-Aneed A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release*. 2004;94:1-14.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-498.

Ellison G, Klinowska T, Westwood RF, Docter E, French T, Fox JC. Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435. *Mol Pathol*. 2002;55:294-299.

Emes RD, Riley MC, Laukaitis CM, Goodstadt L, Karn RC, Ponting CP. Comparative Evolutionary Genomics of Androgen-Binding Protein Genes. *Genome Research*. 2004;14:1516-1529.

Erbacher P, Zou S, Bettinger T, Steffan AM, Remy JS. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm Res*. 1998;15:1332-1339.

Erdem-Çakmak F, Özbaş-Turan S, Şalva E, Akbuğa J. Comparison of VEGF gene silencing efficiencies of chitosan and protamine complexes containing shRNA. *Cell Biol Int*. 2014;38:1260-1270.

Fanger GR, Houghton RL, Retter MW, Hendrickson RC, Babcook J, Dillon DC, Durham MD, Reynolds LD, Johnson JC, Carter D, Fleming TP, Roche PC, Persing DH, Reed SG. Detection of Mammaglobin in the Sera of Patients with Breast Cancer. *Tumour Biol*. 2002;23:212-221.

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

Fleming TP, Watson MA. Mammaglobin, a breast-specific gene, and its utility as a marker for breast cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;923:78-89.

Gascón Rodríguez A, Pozo-Rodríguez AD, Solinís MA. Non-Viral Delivery Systems in Gene Therapy. In: Molina FM. *Gene Therapy - Tools and Potential Applications*. Rijeka: IntechOpen; 2013, p:3-33.

Ghersevich S, Ceballos MP. Mammaglobin A: review and clinical utility. *Advances in Clinical Chemistry*. 2014;241-268.

Goedegebuure PS, Watson MA, Viehl CT, Fleming TP. Mammaglobin-Based Strategies for Treatment of Breast Cancer. *Current Cancer Drug Targets*. 2004;4:531-542.

Guang Liu W, De Yao K. Chitosan and its derivatives--a promising non-viral vector for gene transfection. *J Control Release*. 2002;83:1-11.

Harborth, J, Elbashir SM, Vandeburgh K, Manninga H, Scaringe SA, Weber K, Tuschl T. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 2003;13:83-105.

Hassan EM, Willmore WG, McKay BC, DeRosa MC. In vitro selections of mammaglobin A and mammaglobin B aptamers for the recognition of circulating breast tumor cells. *Sci Rep*. 2017;7:14487.

Howard KA, Rahbek UL, Liu X, Damgaard CK, Glud SZ, Andersen MØ, Hovgaard MB, Schmitz A, Nyengaard JR, Besenbacher F, Kjems J. RNA Interference in Vitro and in Vivo Using a Novel Chitosan/siRNA Nanoparticle System. *Mol Ther*. 2006;14:476-484.

Huang M, Fong CW, Khor E, Lim LY. Transfection efficiency of chitosan vectors: Effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. *J Control Release*. 2005;106:391-406.

Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. *Int J Pharm*. 2014;459:70-83.

Jackson BC, Thompson DC, Wright MW, McAndrews M, Bernard A, Nebert DW, Vasiliou V. Update of the human secretoglobin (SCGB) gene superfamily and an example of 'evolutionary bloom' of androgen-binding protein genes within the mouse Scgb gene superfamily. *Hum Genomics*. 2011;5:691-702.

Jemal A, Bray F, Center MM., Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61:69-90.

Jia F, Zhang YZ, Liu CM. Stable inhibition of hepatitis B virus expression and replication in HepG2.2.15 cells by RNA interference based on retrovirus delivery. *Journal of Biotechnology*. 2007;128:32-40.

Katas H, Alpar HO. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *J Control Release*. 2006;115:216-225.

Koh EH, Cho YW, Mun YJ, Ryu JH, Kim EJ, Choi DS, Maeng KY, Han J, Kang D. Upregulation of Human Mammaglobin Reduces Migration and Invasion of Breast Cancer Cells. *Cancer Invest*. 2014;32:22-29.

Köping-Höggård M, Tubulekas I, Guan H, Edwards K, Nilsson M, Vårum KM, Artursson P. Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure–property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Ther.* 2001;8:1108-1121.

Kreppel F, Kochanek S. Modification of Adenovirus Gene Transfer Vectors With Synthetic Polymers: A Scientific Review and Technical Guide. *Molecular Therapy.* 2008;16:16-29.

Kumar MNVR, Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical Reviews.* 2004;104:6017-6084.

Lavertu M, Méthot S, Tran-Khanh N, Buschmann MD. High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials.* 2006;27:4815-4824.

Lehrer RI, Nguyen T, Zhao C, Ha CX, Glasgow BJ. Secretory lipophilins: a tale of two species. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;923:59-67.

Leung AKK, Tam YYC, Cullis PR. Lipid Nanoparticles for Short Interfering RNA Delivery. *Adv Genet.* 2014;88:71-110.

Leung RKM, Whittaker PA. RNA interference: From gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther.* 2005;107:222-239.

Leygue E, Snell L, Dotzlaw H, Hole K, Troup S, Hiller-Hitchcock T, Murphy LC, Watson PH. Mammaglobin, a potential marker of breast cancer nodal metastasis. *J Pathol.* 1999;189:28-33.

Liu G, Wong-Staal F, Li QX. Development of new RNAi therapeutics. *Histol Histopathol.* 2007;22:211-217.

MacLaughlin FC, Mumper RJ, Wang J, Tagliaferri JM., Gill I, Hinchcliffe M, Rolland AP. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *Journal of Controlled Release.* 1998;56:259-272.

Mäkinen PI, Koponen JK, Kärkkäinen AM, Malm TM, Pulkkinen KH, Koistinaho J, Turunen MP, Ylä-Herttuala S. Stable RNA interference: comparison of U6 and H1 promoters in endothelial cells and in mouse brain. *The Journal of Gene Medicine*. 2006;8:433-441.

Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang Y, August JT, Leong KW. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Control Release*. 2001;70:399-421.

Mao S, Sun W, Kissel T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010;62:12-27.

Mittal V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nature Reviews Genetics*. 2004;5:355-365.

Moore CB, Guthrie EH, Huang MT, Taxman DJ. Short Hairpin RNA (shRNA): Design, Delivery, and Assessment of Gene Knockdown. *Methods Mol Biol*. 2010;629:141-158.

Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit JP. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials*. 2008;29:3477-3496.

Murshed H. *Molecular Cancer Biology. Fundamentals of Radiation Oncology*. 3rd ed. Elsevier; 2019, p:89-104.

Nafee N, Taetz S, Schneider M, Schaefer UF, Lehr CM. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. *Nanomedicine*. 2007;3:173-183.

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 1990;2:279-289.

Narayanan K, Jaramillo A, Benshoff ND, Campbell LG, Fleming TP, Dietz JR, Mohanakumar T. Response of Established Human Breast Tumors to Vaccination with Mammaglobin-A cDNA. JNCI Journal of the National Cancer Institute. 2004;96:1388-1396.

Nerlich AG, Bachmeier BE. Density-dependent lineage instability of MDA-MB-435 breast cancer cells. Oncology Letters. 2013;5:1370-1374.

O'Keefe EP. siRNAs and shRNAs: Tools for Protein Knockdown by Gene Silencing. Materials and Methods. 2013;3:197.

Omi K, Tokunaga K, Hohjoh H. Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. FEBS Letters. 2004;558:89-95.

Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. Oncologist. 2004;9:361-377.

Özbaş-Turan S, Aral C, Kabasakal L, Keyer-Uysal M, Akbuğa J. Co-encapsulation of two plasmids in chitosan microspheres as a non-viral gene delivery vehicle. J Pharm Pharm Sci. 2003;6:27-32.

Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. Genes Dev. 2002;16:948-958.

Phillips AJ. The challenge of gene therapy and DNA delivery. J Pharm Pharmacol. 2001;53:1169-1174.

Picot N, Guerrette R, Beauregard AP, Jean S, Michaud P, Harquail J, Benzina S, Robichaud GA. Mammaglobin 1 promotes breast cancer malignancy and confers sensitivity to anticancer drugs. Molecular Carcinogenesis. 2016;55:1150-1162.

Pille JY, Li H, Blot E, Bertrand JR, Pritchard LL, Opolon P, Maksimenko A, Lu H, Vannier JP, Soria J, Malvy C, Soria C. Intravenous delivery of anti-RhoA small interfering RNA loaded in nanoparticles of chitosan in mice: safety and efficacy in xenografted aggressive breast cancer. Hum Gene Ther. 2006;17:1019-1026.

Pilon AL. Rationale for the development of recombinant human CC10 as a therapeutic for inflammatory and fibrotic disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;923:280-299.

Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AHS, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer.* 2007;109:25-32.

Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Richardson AL, Schnitt SJ, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Badve S, Ellis IO. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.* 2010;12:207.

Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: Similarities and differences. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2009;61:746-759.

Ratko TA, Cummings JP, Blebea J, Matuszewski KA. Clinical gene therapy for nonmalignant disease. *The American Journal of Medicine.* 2003;115:560-569.

Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science.* 2006;31:603-632.

Romøren K, Pedersen S, Smistad G, Evensen Ø, Thu BJ. The influence of formulation variables on in vitro transfection efficiency and physicochemical properties of chitosan-based polyplexes. *International Journal of Pharmaceutics.* 2003;261:115-127.

Salazar N, Muñoz D, Hoy J, Lokeshwar BL. Use of shRNA for Stable Suppression of Chemokine Receptor Expression and Function in Human Cancer Cell Lines. *Methods Mol Biol.* 2014;1172:209-218.

Sato T, Ishii T, Okahata Y. In vitro gene delivery mediated by chitosan. effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials.* 2001;22:2075-2080.

Shibata MA, Morimoto J, Shibata E, Otsuki Y. Combination therapy with short interfering RNA vectors against VEGF-C and VEGF-A suppresses lymph node and lung metastasis in a mouse immunocompetent mammary cancer model. *Cancer Gene Therapy*. 2008;15:776-786.

Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ, Hannon GJ, Cleary MA. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nature Biotechnology*. 2005;23:227-231.

Suchy B, Austrup F, Driesel G, Eder C, Kusiak I, Uciechowski P, Grill HJ, Giesing M. Detection of mammaglobin expressing cells in blood of breast cancer patients. *Cancer Lett*. 2000;158:171-178.

Şalva E, Akbuğa J. In vitro silencing effect of chitosan nanoplexes containing siRNA expressing vector targeting VEGF in breast cancer cell lines. *Pharmazie*. 2010;65:896-902.

Şalva E, Kabasakal L, Eren F, Çakalağaoğlu F, Özkan N, Akbuğa J. Chitosan/Short Hairpin RNA Complexes for Vascular Endothelial Growth Factor Suppression Invasive Breast Carcinoma. *Oligonucleotides*. 2010;20:183-190.

Tassi RA, Bignotti E, Rossi E, Falchetti M, Donzelli C, Calza S, Ravaggi A, Bandiera E, Pecorelli S, Santin AD. Overexpression of mammaglobin B in epithelial ovarian carcinomas. *Gynecologic Oncology*. 2007;105:578-585.

Tassi RA, Calza S, Ravaggi A, Bignotti E, Odicino FE, Tognon G, Donzelli C, Falchetti M, Rossi E, Todeschini P, Romani C, Bandiera E, Zanotti L, Pecorelli S, Santin AD. Mammaglobin B is an independent prognostic marker in epithelial ovarian cancer and its expression is associated with reduced risk of disease recurrence. *BMC Cancer*. 2009;9:253.

Tiriveedhi V, Tucker N, Herndon J, Li L, Sturmoski M, Ellis M, Ma C, Naughton M, Lockhart AC, Gao F, Fleming T, Goedegebuure P, Mohanakumar T, Gillanders WE. Safety and Preliminary Evidence of Biologic Efficacy of a Mammaglobin-A DNA Vaccine in Patients with Stable Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2014;20:5964-5975.

Tuschl T. Expanding small RNA interference. *Nature Biotechnology*. 2002;20:446-448.

Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;52:105-115.

Urban-Klein B, Werth S, Abuharbeid S, Czubyko F, Aigner A. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Ther*. 2005;12:461-466.

Viet Dung N, Christiaens O, Le Van Bao D, De Vos S, MacRae T. H, Smagghe G, Bossier P. Identification of RNAi-related genes and transgenerational efficiency of RNAi in *Artemia franciscana*. *Aquaculture*. 2019;501:285-292.

Wang Z, Spaulding B, Sienko A, Liang Y, Li H, Nielsen G, Yub Gong G, Ro JY, Jim Zhai Q. Mammaglobin, a valuable diagnostic marker for metastatic breast carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009;2:384-389.

Watson MA, Darrow C, Zimonjic DB, Popescu NC, Fleming TP. Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13. *Oncogene*. 1998;16:817-824.

Watson MA, Dintzis S, C. Darrow M, Voss LE, DiPersio J, Jensen R, Fleming TP. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. *Cancer Res*. 1999;59:3028-3031.

Weecharangsan W, Opanasopit P, Ngawhirunpat T, Apirakaramwong A, Rojanarata T, Ruktanonchai U, Lee R. Evaluation of chitosan salts as non-viral gene vectors in CHO-K1 cells. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;348:161-168.

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

Wirth T, Ylä-Herttuala S. Gene Therapy Used in Cancer Treatment. *Biomedicines*. 2014;2:149-162.

Wolff JA, Rozema DB. Breaking the Bonds: Non-viral Vectors Become Chemically Dynamic. *Molecular Therapy*. 2008;16:8-15.

Wong AP, Keating A, Waddell TK. Airway regeneration: the role of the Clara cell secretory protein and the cells that express it. *Cytotherapy*. 2009;11:676-687.

Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:6047-6052.

Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikofsky M, Lutz D. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. *J Clin Oncol*. 1999;17:2015-2019.

Zehentner BK, Carter D. Mammaglobin: a candidate diagnostic marker for breast cancer. *Clinical Biochemistry*. 2004;37:249-257.

Zhao X, Yu SB, Wu FL, Mao ZB, Yu CL. Transfection of primary chondrocytes using chitosan-pEGFP nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2006;112:223-228.

9. EKLER

Ek 1. Kongre Bildirisi

Poster sunumu: Uluslararası İVEK BİO Kongresi, 26-28 Kasım 2018, İstanbul.



26-28 Kasım
26-28 November 2018
Etiler • Beşiktaş (Marmara) • İstanbul • Osmangazi (Inönü) • Bursa

POSTERLER / POSTERS

P-022

In Vitro Studies on Inhibition of Mammaglobin Gene Expression with Chitosan/shRNA Nanoplexes in Breast Cancer Cell lines

Aylin Ozkan¹, Ceyda Ekentok¹, Emine Şalva², Suna Ozbas Turan¹

¹Department of Pharmaceutical Biotechnology, Marmara University, Istanbul, Turkey

²Department of Pharmaceutical Technology, Inönü University, Malatya, Turkey

Abstract

Cancer deaths are in second place in developed societies due to the complex nature of cancer despite of the new treatment approaches. Breast cancer is one of the most common malignant tumors in the world. Human mammaglobin (hMAM) is associated with the family of epithelial secretory proteins, limited to mammary gland and breast tumor cell lines. It is shown that hMAM mRNA is frequently upregulated in the peripheral blood of breast cancer patients. Inhibition of gene expression can be accomplished by RNA interference (RNAi) technology which provides sequence-specific post-translational gene inhibition. Short hairpin RNA (shRNA) selected in this study as gene silencing agent due to its longer suppression property. This target-specific method provided a new perspective for gene therapy. Delivery system is also important for successful gene therapy. Chitosan is one of most popular delivery system due to its biodegradable, non-toxic and cationic properties.

In this study, chitosan/mammaglobin shRNA nanoplexes were prepared to silence hMAM gene. For this purpose, plasmid containing hMAM shRNA was transformed to competent *Escherichia coli* (GT116 strain) made by CaCl₂ method. Thereafter, plasmid DNA was isolated from selected single colony and then spectrophotometric and electrophoretic controls were carried out. The nanoplexes were prepared via the electrostatic interaction of the plasmid and chitosan with different chitosan/shRNA ratios (w/w) (0.5/1, 1/1, 2/1, 3/1, 4/1, 5/1). Fully nanoplexation at all ratios was observed according to electrophoresis result. Particle size, zeta potential, gel electrophoresis and serum stability analyses of these nanoplexes were performed. The average size of the nanoplexes were between 153.2 nm and 436.3 nm depending on the N/P ratio. The surface charge of nanoplexes was positive with zeta potential of +0.6 to +31.9 mV. According to serum stability studies results, nanoplexes protect the shRNA during 72 hours. Cytotoxicity of nanoplexes is investigated with MTT and BrdU, and no cytotoxic effect was observed. The transfection efficiency and silencing effect of these nanoplexes on mammaglobin gene expression will be investigated in breast cancer cell lines.

These studies can benefit that delivery of shRNA targeted to hMAM using chitosan nanoplexes are promising for the therapy of breast cancer.

Keywords

RNAi, shRNA, mammaglobin, chitosan, breast cancer

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	AYLİN	Soyadı	ÖZKAN
Doğum Yeri	ŞİŞLİ	Doğum Tarihi	24.09.1992
Uyruğu	T.C.	Tel	0533 703 82 42
E-mail	aylinozkn@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı	2019
Lisans	Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	2014
Lise	Kandilli Kız Lisesi	2010

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
	AR-GE Uzman Yardımcısı	İLKO İLAÇ	2017-...

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	Orta	İyi

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.