



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TENASCİN-C-CRISPR/CAS9 PLASMİDİ TAŞIYAN
OKSİTOSİNLE HEDEFLENDİRİLMİŞ PEGLİ KİTOZAN
NANOPLEKSLERİNİN MEME TÜMÖR MODELİNDE TÜMÖR
BÜYÜMESİ ve YAYILMASINA ETKİSİ**

HALİN BAREKE
DOKTORA TEZİ

FARMASÖTİK BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ SUNA ÖZBAŞ

İSTANBUL-2022

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 çalışması ile elde edilmemiş 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.

Halin BAREKE

İmza

TEŞEKKÜR

Doktora sürecimde beni her zaman destekleyen, rahatlatan ve tezime yön veren çok değerli tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Suna ÖZBAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tanıdığım günden beri yoluma ışık tutan ve bu tez çalışmasına katkıları sayfalara sığamayacak olan, tez izleme komitesi üyesi hocam Sayın Doç. Dr. Emine ŞALVA'ya minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktorada ders aşamasında bilgimin ve algımın sınırlarını genişleten, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım Sayın Prof. Dr. Jülide AKBUĞA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora sürecim boyunca akademik rehberliği ve manevi desteği ile her zaman yanımda olan, ortak tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ayşe Gülten KANTARCI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden Sayın Dr. Süleyman CAN ÖZTÜRK ve Hacettepe Üniversitesi, Kanser Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD'den Sayın Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI'ya in vivo hayvan çalışmalarında verdikleri yeri doldurulamaz destek için minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Sayın Prof. Dr. Levent KABASAKAL'a tez izleme komitemin üyesi olup, tez çalışmasını koyduğu katkıdan dolayı çok teşekkür ederim. Tez çalışmasındaki histopatolojik analizlerdeki büyük desteğinden dolayı İnönü Üniversitesi Tıbbi Patoloji ABD'den Sayın Doç. Dr. Saadet ALAN'a teşekkür ederim. Marmara Üniversitesi Farmasötik Biyoteknoloji ABD Başkanı Sayın Prof. Dr. Ali Demir SEZER'e bu süreçteki destek ve anlayışı için teşekkür ederim.

İn vivo hayvan çalışmalarında ve tanıştığım andan itibaren her problemimde bana destek olan Ege Üniversitesi Farmasötik Toksikoloji ABD'den Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sumru SÖZER KARADAĞLI'ya içtenlikle teşekkür ederim.

Benim için laboratuvarlarının kapılarını sorgusuz sualsiz açan ve hiçbir yardımdan kaçınmayan Doğu Akdeniz Üniversitesi Kimya ABD'den Sayın Doç. Dr. Akeem ADEYEMI OLADIPO'ya, ISCIII-Gen Terapisi Laboratuvar başkanı Sayın Dr. Ignacio Perez de CASTRO'ya ve Salamanca Üniversitesi Kanser Merkezin'den Doç. Dr. Manuel FUENTES'e sonsuz teşekkür ederim.

Doktora sürecimi eğlenceli ve mutlu kılan, her sorunumla ilgilenen çok değerli arkadaşlarım Ceyda EKENTOK ATICI'ya ve farklı ülkelerde olsak da günlük iletişimimizle aynı laboratuvardaymış gibi hissettiğim doktora yol arkadaşım, dert ortağım Tuba ÇANAK-İPEK'e çok teşekkür ederim.

Yıllardır her zaman olduğu gibi bu zorlu süreçte de yanımda olup akıl sağlığını korumamı sağlayan çok değerli arkadaşlarım Duyal ERESEN, Meryem EBEDİ, Çağla DEFTERALI, İbrahim ŞEVKİ, Utku Şükrü KANBUR, Erdil ŞEYTANOĞLU ve Ayşe SEYER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecimde en büyük destekçilerimden olan ve çalışkanlığın, iyiliğin ve sevginin gücünü bana her gün hatırlatan ve yaşatan, Gabriel CASTILLO'ya teşekkür ederim.

Bu hayatta beni en iyi bilen, hayatımın şahidi diyebileceğim her gün her saat bana destek olan, beni güçlü hissettiren ve cesaretlendiren Irmak ÇAVUŞOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Hayatımın kahramanı sevgili abim Harun BAREKE'ye, hep ailem gibi yakın olduğum ve artık aile olduğumuz Refika İNCE'ye ve mutluluk iksiri yeğenlerim Batu URAL BAREKE'ye ve Tan URAL BAREKE'ye etrafımda kurdukları sevgi çemberi için teşekkür ederim.

Hayallerimin, isteklerimin ve mutluluğumun peşinden koşmam için beni her zaman destekleyen hayattaki en büyük şansım annem Zerin BAREKE ve babam Hüseyin Ural BAREKE'ye, en iyi yatırımın insana yapılan yatırım olduğuna inandıkları için ve bir anne babamın yapabileceği tüm fedakarlıkları benim için yaptıkları için sonsuz teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışmasını, dünyadaki en iyi yengeye sahip olmamı sağlayan, insanlığın en iyi halinin vücut bulduğu ve doktora sürecimde aramızdan ayrılan canım yengem Zalihe ÇAVUŞOĞLU'na ithaf ediyorum.

Bu tez çalışması İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından TOA-2019-1543 numaralı öncelikli alan araştırma projesi (ÖNAP) ile desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER	Sayfa No
KISALTMA ve SİMGELER	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xv
RESİM LİSTESİ	xvii
TABLO LİSTESİ	xix
1.ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4.GENEL BİLGİLER	8
4.1.Tümör Mikroçevresi	8
4.1.1.Tümör mikroçevresinin hücresel öğeleri	9
4.1.1.1.Fibroblastlar	10
4.1.1.2. Bağışıklık sistemi hücreleri	11
4.1.1.2.1. Doğal bağışıklık sistemi hücreleri	11
4.1.1.2.2. Edinsel bağışıklık sistemi hücreleri	12
4.1.1.3. Endotel hücreler ve perisitler	14
4.1.1.4. Adipositler	16
4.1.2. Ekstrasellüler matriks	16
4.1.2.1. Kolajen	17
4.1.2.2. Glikoproteinler	18
4.1.2.3. İntegrinler	20
4.1.2.4. Matriks metalloproteinazlar	20
4.2 .Meme Kanseri	21
4.2.1. Hormon reseptörü pozitif meme kanseri	23
4.2.2. Hormon reseptörü negatif meme kanseri	24
4.2.2.1. HER2 pozitif hormon reseptörü negatif meme kanseri	24
4.2.2.2. Üçlü negatif meme kanseri	25
4.2.2.2.1. ÜNМК epidemiyolojisi	25
4.2.2.2.2. ÜNМК’de görülen mutasyonlar	25
4.2.2.2.3. ÜNМК’nin tümör mikroçevresi	27
4.2.2.2.4. Tedavi yaklaşımları	29

4.3.Tenascin-C	31
4.3.1. TN-C geni	31
4.3.2. TN-C'nin yapısı	32
4.3.3. TN-C'nin ekspresyon profili	33
4.3.3.1. Embriyonik dönemde TN-C ekspresyonu	33
4.3.3.2. Doğum sonrası dönemde TN-C ekspresyonu	34
4.3.3.3. Enflamasyonda TN-C ekspresyonu	34
4.3.4. TN-C'nin etkileri	35
4.3.4.1. Hücre adezyonu	36
4.3.4.2. Hücre proliferasyonu	37
4.3.4.3. Anjiyogenez	38
4.3.5. Kanserde TN-C	38
4.3.5.1. Meme kanserinde TN-C	41
4.3.5.1.1. TN-C'nin meme kanseri hücrelerinin çoğalmasındaki rolü	42
4.3.5.1.2. TN-C'nin meme kanseri metastazındaki rolü	43
4.3.5.1.3. TN-C'nin meme kanseri anjiyogenezindeki rolü	45
4.3.5.1.4. TN-C'nin meme kanserinde immün baskılamadaki rolü	45
4.3.5.1.5. TN-C'nin meme kanserinde tedavi direncindeki rolü	46
4.3.5.1.5. Meme kanserinde TN-C hedefli tedaviler	47
4.4 Genom Düzenleme	49
4.4.1 Genom düzenleme mekanizmaları	51
4.4.1.1. DSB onarımı	51
4.4.1.1.1. Homolog olmayan uç birleştirme	51
4.4.1.1.2. Homolog rekombinasyon	52
4.4.1.2. Nükleazlar	53
4.4.1.2.1. Çinko parmak nükleazlar	53
4.4.1.2.2. TALEN	54
4.4.1.2.3. CRISPR/Cas sistemi	55
4.4.2. CRISPR/Cas kullanım alanları	58
4.4.2.1. Enfeksiyon hastalıkları	59
4.4.2.2. Genetik hastalıklar	59
4.4.2.3. Kanser	60

4.5. Gen Terapisinde Taşıyıcı Sistemler	63
4.5.1. Viral vektörler	63
4.5.2. Viral olmayan vektörler	65
4.5.2.1. Kitozan	66
4.5.2.1.1. Kitozanın yapısı	67
4.5.2.1.2. Kitozanın özellikleri	67
4.5.2.1.3. Kitozana yapılan modifikasyonlar	71
4.5.2.1.4. Kitozan temelli CRISPR/Cas taşıyıcı sistemleri	74
4.6. Oksitosin	75
4.6.1. Meme kanseri ve oksitosin	76
5. GEREÇ VE YÖNTEM	78
5.1. Araç ve Gereçler	78
5.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve sarflar	78
5.1.2. Kullanılan cihazlar	82
5.1.3. Besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanışı	84
5.1.3.1. Besiyerleri	84
5.1.3.2. Çözeltiler	85
5.1.4. Kullanılan hücre hatları	87
5.1.5. Kullanılan CRISPR/Cas9 plazmidleri	87
5.1.6. Kullanılan deney hayvanları	90
5.2. Yöntem	90
5.2.1. CRISPR/CAS9 plazmidlerinin çoğaltılması ve yapılan kontroller	90
5.2.1.1. CRISPR/Cas9 plazmidleri	90
5.2.1.2. Plazmidlerle bakteriyel transformasyon	90
5.2.1.3. Plazmid izolasyonu	91
5.2.1.4. Plazmidlerin spektrofotometrik ve elektroforetik kontrolü	92
5.2.2. İn vitro transfeksiyon ve gen susturma çalışmaları	92
5.2.2.1. İn vitro transfeksiyon	92
5.2.2.2. TN-C susturma etkinliğinin incelenmesi	93
5.2.2.2.1. RNA izolasyonu	93
5.2.2.2.2. cDNA sentezi	93
5.2.2.2.3. TN-C susturma etkinliğinin Gerçek Zamanlı (RT)-PCR ile ölçülmesi	94

5.2.2.2.4. Protein izolasyonu	95
5.2.2.2.5. TN-C protein miktarının Western blotla karşılaştırılması	95
5.2.2.3. Azalan TN-C ekspresyonunun hücresel etkilerinin incelenmesi	96
5.2.2.3.1. Apoptozun akım sitometrisi ile değerlendirilmesi	96
5.2.2.3.2. Apoptozun Western blotla değerlendirilmesi	97
5.2.2.3.3. Hücre döngüsünün akım sitometrisi ile değerlendirilmesi	97
5.2.2.3.4. Hücre proliferasyonunun MTT testi ile karşılaştırılması	97
5.2.2.3.5. İn vitro yara iyileşme deneyi ile hücrelerin göç kapasitesinin değerlendirilmesi	98
5.2.2.3.6. Hücrelerin invaziv kapasitesinin değerlendirilmesi	98
5.2.3. Oksitosinle hedeflendirilmiş PEGli kitozan nanoplekslerinin hazırlanması ve karakterizasyonu	99
5.2.3.1. Oksitosin-kitozan taşıyıcı sisteminin hazırlanması ve kontrolü	100
5.2.3.1.1. Kitozanın tiyollenmesi	100
5.2.3.1.2. Tiyollenme miktarının Ellman reaktifi ile tayini	100
5.2.3.1.3. PEG aracılığıyla kitozan-oksitosin konjugasyonun yapılması	101
5.2.3.1.4. Taşıyıcı sistemin Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)	101
5.2.3.2. Plazmid taşıyan nanoplekslerin hazırlanışı ve karakterizasyonu	102
5.2.3.2.1. Nanopleksinin hazırlanması	102
5.2.3.2.2. Kompleks oluşumunun elektroforetik yöntemle kontrolü	102
5.2.3.2.3. Nanoplekslerin partikül boyutu ve zeta potansiyelinin ölçülmesi	102
5.2.3.2.4. Nanoplekslerin taramalı elektron mikroskopuyla yüzey özelliklerinin incelenmesi	102
5.2.3.2.5. Nanoplekslerin serum stabilitesinin incelenmesi	103
5.2.3.2.6. Nanoplekslerle nükleaz (DNAaz I) koruma deneyi	103
5.2.3.2.7. Nanoplekslerin sitotoksik etkisi	103
5.2.4. Nanopleksle in vitro transfeksiyon çalışmaları	104
5.2.4.1. Nanopleksle TN-C CRISPR/Cas9 plazmidlerinin transfeksiyonu	104
5.2.4.2. Oksitosin reseptörü ekspresyonu tayini	104
5.2.4.3. Nanopleksle transfeksiyonun TN-C susturması etkinliğinin RT-PCR ile incelenmesi	105
5.2.5. In vivo çalışmalar	105

5.2.5.1. CD1 Nude farelerde ksenograft meme kanseri modeli oluşturulması	105
5.2.5.2. Histopatolojik değerlendirme	106
5.2.5.3. İn vivo biyodağılımı çalışması	106
5.2.5.4. Nanoplekslerle tedavi uygulanması	107
5.2.6. İstatistiksel değerlendirme	108
6. BULGULAR	109
6.1. CRISPR/Cas9 Plazmidlerinin İzolasyonu ve Kontrolüne Ait Bulgular	109
6.1.1. CRISPR/Cas9 plazmidlerinin izolasyonuna ait bulgular	109
6.1.2. Plazmidlerinin spektrofotometrik kontrolüne ilişkin bulgular	109
6.1.3. CRISPR/Cas9 plazmidlerinin elektroforetik kontrolüne ilişkin bulgular	1
6.2. İn vitro Transfeksiyon ve Gen Susturma Çalışmalarına İlişkin Bulgular	111
6.2.1. Transfeksiyonun GFP ışıması ile kontrolüne ilişkin bulgular	111
6.2.2. TN-C susturma etkinliğinin incelenmesi	111
6.2.2.1. TN-C mRNA seviyelerinin karşılaştırılmasına ilişkin bulgular	111
6.2.2.2. TN-C susturulmasının protein seviyesinde incelemesine ilişkin bulgular	113
6.2.3. TN-C gen düzenlemesinin hücreler üzerindeki etkilerine ilişkin bulgular	114
6.2.3.1. Hücre apoptozundaki değişikliklere ilişkin bulgular	114
6.2.3.2. Hücre döngüsündeki değişikliklere ilişkin bulgular	116
6.2.3.3. Hücre proliferasyonu analizine ait bulgular	116
6.2.3.4. Azalan TN-C ekspresyonunun hücrelerin göç kapasitesine etkisi üzerine bulgular	117
6.2.3.5. Azalan TN-C ekspresyonunun hücrelerin invaziv kapasitesine etkisi üzerine bulgular	118
6.3. Nanopleks Formülasyonu ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular	119
6.3.1. Kitozan-oksitosis taşıyıcı sisteminin hazırlanması ve karakterizasyonuna ait bulgular	119
6.3.1.1. Kitozanın tiyollenmesine ait bulgular	119
6.3.1.2. Oksitosinin PEG'e konjugasyonu ile ilgili bulgular	121
6.3.1.3. Oksitosin-kitozan konjugasyonuna ait bulgular	121
6.3.2. Nanoplekslerin oluşturulması ve karakterizasyonuna ait bulgular	122
6.3.2.1. Nanopleksinin elektroforetik kontrolüne ilişkin bulgular	122
6.3.2.2. Nanoplekslerin partikül boyutu ve zeta potansiyeline ait bulgular	123

6.3.2.3. Nanoplekslerin yüzey morfolojisinin SEM’le incelenmesine ait bulgular	123
6.3.2.4. Nanoplekslerin serum stabilitesine ait bulgular	124
6.3.2.5. Nanopleksin enzime (DNaz I) karşı koruma etkisine ait bulgular	124
6.3.2.6. Nanoplekslerin sitotoksik etkisine ait bulgular	125
6.4. Nanoplekslerle İn Vitro Transfeksiyon ve Gen Susturma Çalışmalarına Ait Bulgular	126
6.4.1. MDA-MB-231’de oksitosin reseptörü ekspresyonuna ait bulgular	126
6.4.2. Transfeksiyonun floresan mikroskopta incelenmesine ait bulgular	126
6.4.3. Transfeksiyon sonrası gen susturma çalışmalarına ilgili bulgular	128
6.5. İn Vivo Çalışmalar	129
6.5.1. CD1 nude farelerde ksenograft meme kanseri modelinin oluşturulmasına ait bulgular	129
6.5.2. Meme kanseri modelinin histopatolojik incelenmesine ait bulgular	129
6.5.3. Nanoplekslerle deneysel meme tümöründeki çalışmalara ait bulgular	130
6.5.3.1. Biyodağılıma ilişkin bulgular	130
6.5.4. Nanoplekslerle uygulanan tedavinin tümör çapına etkisi	132
6.5.5. Meme kanseri modelinde akciğer metastazının incelenmesine ait bulgular	136
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	137
8. KAYNAKLAR	157
9. EKLER	188
10. ÖZGEÇMİŞ	190

KISALTMALAR ve SİMGELER

α - SMA	α -Düz kas aktini (α - Smooth muscle actin)
a/h	Ağırlık/hacim
AAV	Adeno-assosiyé virüs (Adeno associated virüs)
BAX	Bcl-2 ilişkili X (Bcl-2 associated X)
CRISPR	Düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
CTLA-4	Sitotoksik T lenfosit antijen-4 (Cytotoxic T lymphocyte antigen-4)
DMSO	Dimetil sülfoksit (Dimethyl sulfoxide)
DSB	Çifte sarmal kırıkları (Double strand break)
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor)
EMT	Epitel-mezenkimal geçiş (Epithelial mesenchymal transition)
ER	Östrojen Reseptörü
ESM	Ekstrasellüler matriks
FBS	Fetal sığır serumu (Fetal bovine serum)
FGF	Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast growth factor)
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (Fourier transform infrared spectroscopy)
GFP	Yeşil floresan protein (Green fluorescent protein)
GM-CSF	Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (Granulocyte-macrophage colony stimulating factor)
gRNA	Rehber RNA (Guide RNA)
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor)
HIF-1	Hipoksi ile indüklenen faktör-1 (Hypoxia-inducible factor 1)
HIV	İnsan immün yetmezlik virüsü (Human Immunodeficiency Virus)

HPV	İnsan Papilloma virüsü (Human Papilloma Virus)
HR	Homolog rekombinasyon
IFN- γ	İnterferon- γ
IL	İnterleukin
Indel	İnsersiyon ve delesyon
KAR T	Kimerik antijen reseptör T
Kb	Kilobaz
kDa	KiloDalton
KİF	Kanserle ilişkili fibroblast
MAL	Maleimid
MAPK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
miRNA	MikroRNA
MMP	Matriksmetalloproteaz
mRNA	Messenger RNA
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide
N:P	Nitrojen:Fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
ng	Nanogram
NHEJ	Homolog olmayan uç birleştirme (Non homologous end joining)
NHS	N-Hidroksi süksinimid
NK	Doğal öldürücü hücreler (Natural killer cells)
nm	Nanometre
OKS	Oksitosin
OTR	Oksitosin reseptörü
PAM	Protoaralık bitişik motif (Protospacer adjacent motif)

PARP	Poli ADP-riboz polimeraz
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
PD-1	Programlı ölüm-1 (Programmed death-1)
PD-L1	Programlı ölüm-1 ligandı (Programmed death ligand-1)
PDGF	Platelet kaynaklı büyüme faktörü (Platelet-derived growth factor)
PDGFR	Platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü
PEI	Polietilenimin
PI	Propidiyum iyot
PI3K	Fosfatidili inösitöl 3 kinaz (Phosphatidylinositol 3-kinase)
PR	Progesteron Reseptörü
RPM	Dakika başına devir sayısı (revolutions per minute)
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time Polymerase chain reaction)
SF	Serum fizyolojik
siRNA	Küçük interferans RNA (Small Interference RNA)
SOC	Süper optimal broth
TACS signatures)	Tümörle ilişkili kollajen imzaları (Tumor associated collagen signatures)
TALE	Transcription activator-like effector
TALEN	TALE nükleazları
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü- β (Transforming growth factor- β)
TİL	Tümörü infiltre eden lenfositler
TLR	Toll-benzeri reseptörler (Toll- like receptors)
TMÇ	Tümör mikroçevresi
TN-C	Tenascin-C
TNF- α	Tümör nekroz faktörü- α
tracrRNA	Trans-aktive edici CRISPR RNA

Treg	Regülatör T hücreleri
ÜNMK	Üçlü negatif meme kanseri
VEGF factor)	Vasküler- endotel büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor)
ZEB	Çinko- parmak E-kutusu bağlanan (Zinc-finger E-box-binding)



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Tümör mikroçevresinin yapısı.....	8
Şekil 2. Tenascin-C'nin modüler yapısı ve bağlandığı bazı moleküller.....	32
Şekil 3. TN-C ilişkili sinyal yolları.....	36
Şekil 4. TN-C'nin meme kanserindeki rolü.....	42
Şekil 5. Genom düzenlemesi ile yapılan genetik değişiklikler ve kullanım alanları.....	50
Şekil 6. Genom düzenleme mekanizması.....	51
Şekil 7. CRISPR/Cas sisteminin işleyiş mekanizması.....	56
Şekil 8. Kitozanın yapısı.....	67
Şekil 9. Kitozan ve nükleik asitlerin kompleksasyonu.....	69
Şekil 10. Oksitosinin kimyasal yapısı.....	76
Şekil 11. Tekli TN-C (G1) ve GFPsiz scrambled gRNA CRISPR/Cas9 plazmidinin yapısı.....	88
Şekil 12. TN-C'ye özgü iki gRNA taşıyan CRISPR/Cas9 plazmidinin yapısı.....	88
Şekil 13. Scrambled gRNA taşıyan plazmidin yapısı.....	89
Şekil 14. Kitozan-oksitosin taşıyıcı sisteminin hazırlanma basamakları.....	99
Şekil 15. Transfeksiyon sonrası 3. günde TN-C mRNA seviyeleri.....	112
Şekil 16. Transfeksiyon sonrası 8. günde TN-C mRNA seviyeleri.....	113
Şekil 17. Transfeksiyon sonrası 48. saatte akım sitometrisi ile apoptoz analizi.....	115
Şekil 18. Transfeksiyon sonrası 48. saatte hücre döngüsü analizi.....	116
Şekil 19. Deney ve kontrol grupları arasındaki hücre proliferasyonu farkı.....	117
Şekil 20. Tiyoal miktarı için oluşturulan standard eğri.....	120
Şekil 21. PEG bağlayıcının ve oksitosin eklenmiş bağlayıcının FTIR spektrası	121
Şekil 22. Formülasyon ve ara ürünlerin FTIR spektrasının.....	122
Şekil 23. Nanoplekslerin MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığına etkisi	125

Şekil 24. TN-C ye özgü CRISPR/Cas9 taşıyan nanopleksle transfeksiyonun TN-C mRNA seviyesine etkisi.....	128
Şekil 25. Enjeksiyondan 16 saat sonra yakın kızıl ötesinde ortalama floresan yoğunluğu analizi.....	132
Şekil 26. Tedavi boyunca deney gruplarında tümör çapındaki değişim yüzdesi.....	133
Şekil 27. 20. günde tümör çapı değişim yüzdesinin karşılaştırılması	134
Şekil 28. 20. günde her bir farede görülen tümör çapı değişimi yüzdesi.....	134



RESİM LİSTESİ

Resim 1 CRISPR/Cas9 plazmidlerinin agaroz jel görüntüsü.....	110
Resim 2. Restriksiyon kesimi sonrası plazmidlerin jel görüntüsü.....	110
Resim 3. Transfeksiyon sonrası 24. saatte GFP ışıması.....	111
Resim 4. TN-C proteinin Western blot yöntemiyle elde edilen membran görüntüsü	113
Resim 5. Transfeksiyon sonrası 8. günde Bax protein ekspresyonu.....	115
Resim 6. Deney gruplarında yara alanının görüntüsü.....	118
Resim 7. İnvaziv hücrelerin DAPI boyaması sonrası floresan görüntüleri.....	119
Resim 8. Liyofilize tiyollenmiş kitozanın pamuksu görüntüsü.....	120
Resim 9. Farklı N:P oranlarında kompleks oluşumunun agaroz jelde kontrolü.....	123
Resim 10. Nanoplekslerin SEM görüntüsü.....	123
Resim 11. Çıplak plazmidlerin serum stabilitesi.....	124
Resim 12. Nanoplekslerin serum karşısındaki stabilitesinin agaroz jel elektroforezi ile kontrolü.....	124
Resim 13. DNaz koruma deneyine ait agaroz jel fotoğrafı	125
Resim 14. cDNA ile farklı annealing ısılarında yapılan oksitosin reseptörü PCR'ının agaroz jeldeki görüntüsü.....	126
Resim 15. Nanopleksle ve kontrol nanopleks ile transfeksiyon sonrası (t=24 saat) GFP ışıması.....	127
Resim 16. CD1 nude dişi farelerde insan meme kanseri hücreleri enjeksiyonu sonucu oluşan tümör.....	129
Resim 17. Meme tümörlerinin histopatolojik görüntüleri.....	130

Resim 18. İntratümöral enjeksiyon sonrası 16. saatte nanopleksin biyodağılımını gösteren floresan yoğunluğu	131
Resim 19. İntravenöz enjeksiyon sonrası, 16. saatte nanopleksin biyodağılımını gösteren floresan yoğunluğu	131
Resim 20. Deney sonundaki tümör görüntüleri.....	135
Resim 21. Deney gruplarının akciğer görüntüleri.....	136



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Meme kanseri alt tipleri ve moleküler belirteçleri.....	22
Tablo 2. Kullanılan CRISPR/Cas9 plazmid rehber RNA'ları hakkında bilgiler.....	90
Tablo 3. RT-PCR reaksiyonunda kullanılan primerler.....	94
Tablo 4. RT-PCR reaksiyonu için kullanılan parametreler.....	94
Tablo 5. Oksitosin reseptörü için kullanılan PCR parametreleri.....	105
Tablo 6. İn vivo deneylerdeki gruplar ve enjeksiyon planı.....	107
Tablo 7. Miniprep plazmid izolasyondan elde edilen temsili plazmid miktarı ve saflığı.....	109
Tablo 8. Transfeksiyondan 48 saat sonra canlı ve apoptotik hücre yüzdeleri.....	114
Tablo 9. Sayılan alanlardaki ortalama invaziv hücre sayısı.....	119
Tablo 10. Sistin standartları ile elde edilen 412 nm'deki absorbans değerleri.....	120

1. ÖZET

Tezin başlığı: Tenascin-C-CRISPR/Cas9 Plasmidi Taşıyan Oksitosinle Hedeflendirilmiş Pegli Kitozan Nanoplekslerinin Meme Tümör Modelinde Tümör Büyümesi ve Yayılmasına Etkisi

Öğrencinin Adı, Soyadı: Halin BAREKE

Danışmanın Adı, Soyadı: Dr. Öğr. Üyesi Suna ÖZBAŞ

Programın adı: Farmasötik Biyoteknoloji Doktora Programı (OP-Ege Üniversitesi)

Amaç: Üçlü negatif meme kanseri en agresif meme kanseri alt tipidir. Tenascin-C bu kanserde çoğalma, metastaz ve anjiyogenezi destekleyen tümöre özgül bir matriks proteindir. Bu çalışmada, Tenascin-C ekspresyonu CRISPR/Cas9 genom düzenleme sistemi ile üçlü negatif meme kanserinde azaltılmasını etkilerinin *in vitro* ve *in vivo* araştırılması ve güvenli ve etkin *in vivo* uygulama için oksitosinle hedeflendirilmiş yeni bir kitozan taşıyıcı sistemi formüle edilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: İnsan meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 hücreleri, Tenascin-C'yi hedefleyen CRISPR/Cas9 plazmidleri ile transfekte edildikten sonra ekspresyonundaki düşüş incelenmiştir. Azalan ekspresyonunun hücrelerdeki apoptoz, proliferasyon, göç ve invazyon üzerine etkileri *in vitro* analiz edilmiştir. PEG bağlayıcı kullanılarak, oksitosin kitozana bağlanmıştır ve CRISPR/Cas9 plazmidleri ile hazırlanan nanoplekslerin karakterizasyonu yapılmış ve transfeksiyon etkinliği araştırılmıştır. Daha sonra ksenograft meme kanseri fare modelinde biyodağılım ve nanopleksle tedavinin tümöre etkisi analiz edilmiştir.

Bulgular: CRISPR/Cas9 plazmidleri Tenascin-C mRNA ekspresyonunun *in vitro* çalışmada %60 oranında azaltmış ve hücrelerde apoptoz artarken, proliferasyon, göç ve invazyon kapasitesi düşmüştür. Formüle edilen nanopleksler hücreleri başarıyla transfekte etmiştir fakat oksitosinin damar içi uygulamada tümörü hedeflendirmek için yeterli olmadığı görülmüştür. Nanopleksler intratümöral uygulandığında ise, tümör boyutu kontrol gruplarına göre anlamlı derecede küçülmüştür.

Sonuç: Özgün bir kitozan bazlı taşıyıcı sistem formüle edilmiştir ve CRISPR/Cas9 ile Tenascin-C düzenlemesinin ileri çalışmalarda test edilmesi için temel oluşturulmuştur.

Anahtar kelimeler: Tenascin-C, üçlü negatif meme kanseri, CRISPR/Cas9, kitozan, gen tedavisi

2. SUMMARY

Title of Thesis: The effect of nanoplexes carrying the Tenascin-C CRISPR/Cas9 plasmid by PEGylated chitosan that is actively targeted via oxytocin on the tumor growth and spread in a breast cancer tumor model

Student Name, Surname: Halin BAREKE

Supervisor Name: Lecturer Dr. Suna ÖZBAS

Program Name: Pharmaceutical Biotechnology PhD Program (OP-Ege University)

Objective: Triple negative breast cancer is the most aggressive breast cancer subtype. Tenascin-C is a tumor-specific matrix protein that promotes proliferation, metastasis, and angiogenesis in this cancer. In this study, the aims were to investigate the in vitro and in vivo effects of reducing Tenascin-C expression in triple negative breast cancer by the CRISPR/Cas9 genome editing system, and to formulate a new oxytocin-targeted chitosan delivery system for safe and effective in vivo application.

Materials and Methods: The decrease in Tenascin-C expression was investigated after human breast cancer cell line, MDA-MB-231 cells were transfected with CRISPR/Cas 9 plasmids targeting Tenascin-C. The effects of decreased expression on apoptosis, proliferation, migration and invasion in cells were analyzed in vitro. Using a PEG linker, oxytocin was conjugated to chitosan and the nanoplexes prepared with CRISPR/Cas9 plasmids were characterized and transfection efficiency was investigated. Then, biodistribution and the effect of nanoplex treatment on tumor were analyzed in a xenograft breast cancer mouse model.

Results: CRISPR/Cas9 plasmids decreased Tenascin-C mRNA expression by 60% and increased apoptosis in cells, while decreasing proliferation, migration and invasion capacity in vitro. Nanoplexes successfully transfected cells, but oxytocin was not sufficient for active tumor targeting in intravenous administration. When nanoplexes were applied intratumorally, tumor sizes were significantly reduced compared to the control groups.

Conclusion: A new chitosan-based carrier system has been formulated and foundations have been laid for testing Tenascin-C editing by CRISPR/Cas9 in the future studies

Keywords: Tenascin-C, triple negative breast cancer, CRISPR/Cas9, chitosan, gene therapy

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Tanı ve tedavilerdeki ilerlemelere rağmen, meme kanseri hala daha dünyada önemli bir morbidite ve mortalite sebebidir. Meme kanseri, kadınlarda görülen kanserlerin en başında gelmektedir ve Dünya Sağlık Örgütünün epidemiyolojik tahminlerine göre 2060 yılına kadar meme kanseri ilintili ölümler 2,35 kat artacaktır (Mattiuzzi ve Lippi, 2019; Sung ve ark., 2021) Meme kanseri heterojen bir hastalık olup, tanımlanmış 4 alt tipi vardır. Bu alt tipler, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2) ekspresyonuna bakılarak sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırma hem tedavi planlarını şekillendirmek hem de prognoza karar vermek için önemlidir. Bu 4 alt tipin arasında, en kötü prognoza sahip olan ve tüm meme kanseri vakalarının %15-20'ünü oluşturan, bazal üçlü negatif meme kanseridir (ÜNMK). ÜNMK'nin klinik seyri daha agresif olup, diğer alt tiplere nazaran daha yüksek oranda uzak metastazla ilişkilidir (Gonçalves ve ark., 2018). Bu alt türde, 3 reseptörden hiçbiri bulunmamaktadır ve böylece tedavi için hedeflenebilecek moleküller kısıtlı olup, diğer türlerde kullanabilen aromataz inhibitörleri veya HER-2'ye karşı monoklonal antikorlar kullanılamamaktadır. Bundan dolayı da ÜNMK'de temel tedavi yaklaşımı halen cerrahi girişim ve taksan gibi kemoterapötik ajanlardır. Bu nedenle, ÜNMK'nin prognozunu iyileştirmek için gelişen teknolojileri kullanarak tasarlanan yenilikçi terapötik yaklaşımlarla ivedilikle ihtiyaç vardır.

Kanser, onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde çok sayıda genetik ve epigenetik değişikliğin olduğu bir hastalıktır. Bu nedenle de genlere müdahale edebilmek, kanseri meydana getiren kaynağı doğrudan ve kalıcı olarak hedefleyebilmeyi sağlamaktadır. Genom düzenlenmesi ile genomda hedeflenen bölgelerde DNA dizilerinin silinmesini, eklenmesini veya değiştirilmesini mümkün kılmıştır (Hirakawa ve ark., 2020). Genom düzenlemesinde kullanılan üç yöntemden en yenisi ise düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri (CRISPR) CRISPR/Cas9 sistemidir. Bu sistem yüksek etkinliği, düşük üretim maliyeti, seri üretime uygunluğu, esnekliği ve kullanım kolaylığı ile klinik uygulamalar için önemli bir araç olma potansiyeline sahiptir (Porteus, 2016). Bu yeni ve güçlü genom düzenleme teknolojisi potansiyel ÜNMK gen

terapisi yaklaşımlarını genişlemektedir. CRISPR/Cas9 ile genom düzenlenmesinin kalıcı etkilere neden olmasından dolayı, hedef genin kansere özgül olması önemlidir. Kanser biyolojisindeki güncel paradigmlar tümör mikroçevresini (TMÇ) doku ve organ tümörlerini besleyen ‘toprak’ olarak değerlendirmektedir (Langley ve Fidler, 2011). TMÇ, ekstraselüler matriks yapıları, fibroblastlar, lökositler, perisitler, endotel hücreler ve diğer stroma hücrelerinden oluşmaktadır (Hui ve Chen, 2015). Doğrudan tümör hücrelerini hedeflemenin yanı sıra, TMÇ’de bulunan ve kanserli hücrelerin hayatta kalması ve yayılmasına yardımcı olan yapıların da tedavilerde hedeflendirilmesi (örn. anti-anjiyogenik tedaviler) kanser tedavisinde önemli ilerlemelere neden olmuştur.

Tenascin-C (TN-C), meme kanseri hücreleri ve TMÇ tarafından salınan bir ekstraselüler matriks proteindir (Maschler ve ark., 2004). TN-C, dört bölümden oluşan büyük protein yapısı ile integrinlerden büyüme faktörlerine birçok molekülle etkileşime girmektedir (Midwood ve ark., 2011). TN-C ekspresyonu embriyonik dönemde yüksek iken doğum sonrasında ekspresyonu kısıtlıdır. Birçok tümör tipinde ise ekspresyonu artmaktadır ve böylece bir onkofetal protein olarak sınıflandırılmıştır. TN-C normal meme bezinde çok düşük miktarda ya da hiç bulunmamasına rağmen, meme karsinomunda yüksek miktarda bulunmaktadır (Lightner ve ark., 1994; Maschler ve ark., 2004). Meme kanserinde yüksek TN-C ekspresyonu, lenf bezi metastazı, fazla damarlanma ve erken invazyonla ilişkilidir (Hielscher ve ark., 2012). İnsan meme karsinom örneklerinde yapılan bir başka araştırmada ise TN-C, tümör evresi ve lenf bezi metastazıyla pozitif ilişkili bulunmuştur (Yang, Z. ve ark., 2017). Bu proteinin meme kanserinde proliferasyon, tedavi direnci, metastaz (özellikle akciğerlere), anjiyogenez, immün kaçış ve kanser kök hücrelerinin sağkalımını desteklediği de gösterilmiştir (Hongu ve ark., 2022; Naik ve ark., 2018; Oskarsson ve ark., 2011; Spenlé ve ark., 2020; Wawrzyniak ve ark., 2020).

Otofaji açısından defektif ÜNМК hücrelerinde, TN-C yıkımı daha azdır ve böylece TN-C özellikle bu meme kanseri alt tipindeki etkileri daha yüksek seviyededir (Li ve ark., 2020). ÜNМК’de yapılan in vitro deneylerde TN-C’nin proliferasyon, mamosfer oluşumu, apoptozdan kaçış, invazyon ve metastaza yardımcı olduğunu gösterilmiştir (Wawrzyniak ve ark., 2020). Büyüme faktörleri ve transkripsiyon faktörleri gibi diğer kanser tedavisi hedeflerinin aksine, TN-C’nin kansere özgül bir ekspresyonu

olduğundan dolayı CRISPR/Cas9 sistemi için iyi bir hedef moleküldür. ÜNMK’de CRISPR/Cas9 aracılığıyla TN-C susturulması etkinlik potansiyelinin yanı sıra güvenli olma potansiyeli de yüksektir. Ayrıca, TN-C eksprese etmeyen farelerin normal gelişim göstermesi de bu molekülün normal fizyolojide yerine konulamaz bir görevi olmadığını göstermektedir. Bu da olası bir tümör dışı TN-C susturmasının önemli güvenlik problemlerine neden olmayacağına işaret etmektedir. Bilimsel literatüre bakıldığında CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak kanser tedavisi için TN-C susturulması çalışmasına rastlanmamıştır. Böylelikle, yeni tedavi yaklaşımlarına gerek duyulan ve TN-C ekspresyonunun tümör oluşumu ve dağılımında önemi gösterilen ÜNMK’de, TN-C’nin CRISPR/Cas9 sistemi ile susturulmasının etkin bir terapötik yaklaşım olma potansiyeli vardır.

CRISPR/Cas9 sistemi ile sağlık alanında yapılan araştırmalarda hastalık modeli geliştirme, ex vivo hücre terapisi ve/veya tek gen hastalıklarının tedavisi için çalışılmaktadır (Pickar-Oliver ve Gersbach, 2019). Fakat, bu sistemin in vivo kanser tedavisinde kullanımı üzerine çok sınırlı sayıda araştırma vardır. Bunun nedenleri arasında CRISPR/Cas9’un in vivo ortamda taşınması önündeki çoklu engeller ve tümöre hedeflendirme problemleri vardır.

CRISPR/Cas9 sisteminin in vivo uygulanması ancak hücre dışı ve hücre içi bariyerleri geçebilmesi ile mümkün olabilmektedir. Hücre dışı bariyerler arasında serumdaki nükleazlar, proteinler, antikorlar, renal klirens ve retikuloendotelyal sistem tarafından tutulma vardır (Lino ve ark., 2018). Hücresel bariyerlerde ise hücreye giriş, endozomdan kaçış, sitoplazmadaki nükleazlardan korunma ve hücre içi taşınma ile hücre çekirdeğine gitmek vardır. Bu bariyerleri aşmak için kitozan gibi viral olmayan vektörler, viral vektörlere nazaran hem daha güvenli hem de maliyet ve üretim kolaylığı açısından seri üretime daha uygundur. Ayrıca gen tedavisinde sıklıkla kullanılan Adeno-assosiye virüsler (AAV), vektörünün küçük genomundan dolayı (yaklaşık 4.7 kb) CRISPR/Cas9 sistemini güçlü promotörlerin kullanabilmek için yeterli büyüklükte değildir ve genellikle iki AAV vektörü kullanılması gerekmektedir (Yang ve ark., 2016). Bu da maliyet, güvenlik ve etkinlik faktörlerinde optimum düzeyi ulaşmayı zorlaştırmaktadır. Bu dezavantajlar göz önünde bulundurulduğunda, viral olmayan vektörlerle nükleik asit taşınabilmesi için formülasyonlar geliştirilmesinin önemi ortaya çıkmaktadır.

Viral olmayan vektörler arasında lipit bazlı taşıyıcılar, örneğin lipozomlar ve lipit nanopartikülleri etkili vektörler olmalarına rağmen, bu araştırmada kullanılan kitozana kıyasla daha maliyetli ve daha yüksek toksik etkiye sahiptir (Lv ve ark., 2006). Dolayısıyla, özellikle CRISPR/Cas9 bazlı in vivo gen tedavilerin kliniğe geçebilmesi için bu tez çalışmasında kullanılan kitozan gibi biyouyumlu, ucuz ve güvenli vektör ajanların formüle edilmesine ihtiyaç vardır.

Kitozan, ucuz, güvenli, biyouyumlu ve biyoçözünür bir katyonik polimer olarak plazmid gibi nükleik asitlerle kompleks oluşturup, CRISPR/Cas9'un etkin bir şekilde taşınmasında kullanılmak için uygundur (Chuan ve ark., 2019). Kitozanın yapısında bulunan hidroksil ve amin fonksiyonel grupları sayesinde, Kitozana peptit ve polietilen glikol (PEG) gibi moleküller kolayca eklenebilir. Literatürde CRISPR/Cas9'u plazmid taşınması için formüle edilen kitozan temelli taşıyıcı sistemler kitozana PEG, peptit veya aptamer gibi moleküller konjuge edilerek yapılmıştır (Rabiee ve ark., 2021; Zhang, Hairui ve ark., 2021). Kitozana tümörü aktif hedefleyen moleküllerin eklenmesi, kullanılması gereken dozu azaltabileceği gibi, olası hedef dışı yan etkileri de azaltıp, transfeksiyon etkinliğini yükseltebileceği için güvenli ve etkin bir klinik uygulama için temel oluşturabilir.

Oksitosin dokuz peptid uzunluğunda bir hormondur. Oksitosin reseptörünün (OTR) primer meme kanseri hücrelerinin çoğunluğunda (%80) bulunduğu gösterilmiştir (Reversi ve ark., 2005). Ayrıca hem sıçanlarda hem de farelerde miyoepitel hücrelerin de bu reseptörü ekspresse ettiği görülmüştür. Vücutta kan-beyin bariyeri ile korunan beyinin dışında, OTR ekspresyonu genelde hamile ve emzirmekte olan kadınlarda görüldüğü için, OTR meme kanseri hedefleme için de kullanabilecek bir peptit olabilir. Oksitosinin stabil olduğu pH aralığı kitozan çözünür olduğu pH 3-5 arasında olduğu için, beraber formüle edilmek için uygundur (Hawe ve ark., 2009). Bu yüzden de yapılan çalışmada CRISPR/Cas9 plazmidlerinin taşınması için oksitosinle aktif olarak hedeflenen PEGlenmiş kitozan vektörü ilk defa formüle edilmiştir.

Böylece bu tez çalışmasının çoklu amaçlarından biri tümörü destekleyen bir matriks proteini olan TN-C'yi CRISPR/Cas9 sistemi ile susturabilmek ve bu susturmanın insan üçlü negatif meme kanseri hücre hattı proliferasyonu, göç ve invazyon özellikleri üzerindeki etkisini in vitro olarak test etmektir. Diğer bir amaç ise yeni bir viral olmayan taşıyıcı sistem hazırlamak için aktif hedeflendirilmiş oksitosin konjuge

kitozanın formüle edilmesi, fizyokimyasal karakterizasyonlarının yapılması ve CRISPR/Cas9 plazmidleri ile nanopleksler oluşturularak transfeksiyon etkinliğini incelemektir. TN-C'ye özgül CRISPR/Cas9 plazmidleri ve oksitosin-kitozan sistemi ile oluşturulan nanoplekslerin immün yetmezlikli farelerde oluşturulan insan meme kanseri modelinde uygulanmasının terapötik etkinliğinin *in vivo* çalışılması da amaçlanmıştır.

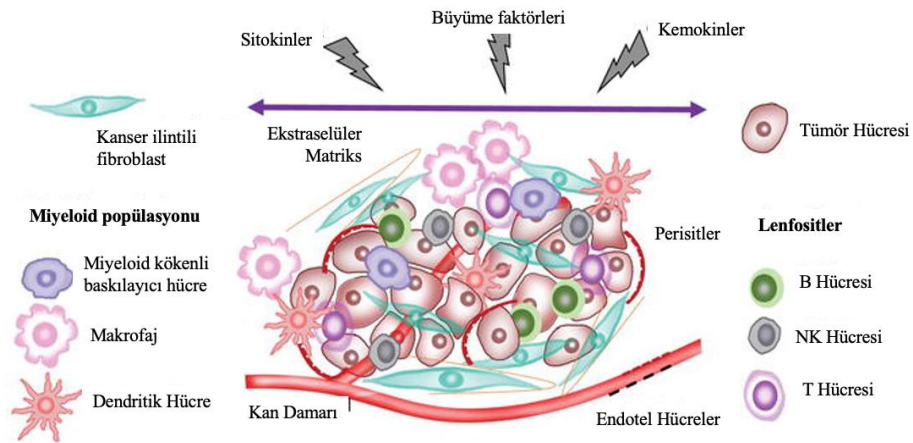
Özet olarak, bu çalışmada güncel ve yeni bir teknik olan CRISPR/Cas9 sistemini kullanarak önemli bir halk sağlığı problemi olan meme kanserine potansiyel yeni bir gen temelli terapötik yaklaşım için hem hedef gen çalışılmış (*TN-C*) hem de *in vivo* uygulama için kitozan-oksitosin bazlı viral olmayan bir vektör formüle edilmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Tümör Mikroçevresi

Kanser oluşumu ve yayılması, sadece kanserli hücrenin genomundaki mutasyon ve epigenetik değişimlere bağlı olmadığı gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan birçok araştırma, tümör mikroçevresinin (TMÇ) tümörün oluşması, büyümesi ve dağılmasını destekleyen moleküler, hücresel ve fiziksel değişimlerin gerçekleşmesini sağladığını göstermiştir (Hui ve Chen, 2015).

Tümör mikroçevresi, tümör hücrelerini çevreleyen ya da onlarla yakın temasta olan hücresel ve moleküler yapıları tanımlar. TMÇ, meme kanserinin de içinde bulunduğu bazı tümör tiplerinde, tümör kütlelerinin %90'ından fazlasını oluşturmaktadır (Öhlund ve ark., 2017). TMÇ'nin yapısı tümör tipleri arasında farklılık gösterse de genel olarak, stroma hücreleri (örn. fibroblastlar), bağışıklık sistemi hücreleri, kan damarları ve ekstrasellüler matristen (ESM) oluşmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. Tümör mikroçevresinin yapısı (Yang, F. ve Yu, 2015'ten değiştirilerek kullanılmıştır)

Kanseri tanımlayan özellikler arasında anjiyogeneze gibi doğrudan TMÇ ile ilgili değişiklikler de yer almaktadır (Hanahan, 2022). TMÇ'deki lenfosit sayısı gibi faktörlerin prognostik öneminin olması da bu karmaşık yapının tümör üzerindeki önemli etkisini göstermektedir (Lotfinejad ve ark., 2020). TMÇ'yi hedefleyen, immünoterapi ve anti-anjiyogenik tedaviler gibi onkoterapi yaklaşımlarının, birçok farklı kanser tipindeki (meme kanseri, kolon kanseri, melanoma vb.) yüksek terapötik etkinliği de TMÇ yapılarının tümördeki öneminin altını çizmektedir (Lee, W. S. ve

ark., 2020). Bu bilgiler ışığında, kanser, tümörlü ve normal yapıların oluşturduğu karmaşık bir organ gibi ele alınmaya başlanmıştır.

Tümör ve çevresi arasında ilişki iki yönlü olup kemokin gibi çözünür faktörler, büyüme faktörleri ve yeniden yapılandırıcı enzimler aracılığıyla birbirlerini etkilemektedirler. TMÇ tümörün hayatta kalım ve yayılmasını desteklemesi dışında, kanser tedavisinde kullanılan terapötik ajanların tümöre ulaşması yolunda, fiziksel bir engel oluşturup tedavi etkinliğini de düşürebilmektedir (Han ve ark., 2016). Örnek olarak meme kanseri üzerinde yapılan bir araştırmada, sert TMÇ'nin kemoterapiye zayıf yanıtla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Falou ve ark., 2013).

Neoplastik hücreler tarafından TMÇ'nin şekillendirilmeye başlamasında hızlı çoğalan hücrelerin yarattığı hipoksik ortam önemli bir rol oynamaktadır. Hipoksi varlığından aktive olan Hipoksi ile indüklenen faktör 1 (HIF-1), vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEGF) gibi büyüme faktörlerinin ekspresyonunu artırır, kanserle ilişkili fibroblastların (KİF) oluşmasını ve ayrıca immün baskılayıcı regülatör T hücrelerinin (Treg) başkalaşmasını destekler (Emami Nejad ve ark., 2021). Kanserle ilintili anjiyogenezde kan damarlarının da tam oluşmamış olması hipoksik ortamın devamlılığını sağlar.

Mikroçevrenin ise tümör oluşumu üzerindeki ilk etkilerinin kronik enflamasyon aracılığıyla olabileceği gösterilmiştir. Kronik enflamasyonda oluşan reaktif oksijen türlerinin genomda yarattığı mutasyonlar ve tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonel inaktivasyonuna neden olan hipermetilasyon gibi epigenetik değişiklikler, kanser oluşumunu destekleyici mikroçevresel faktörler arasındadır (Bareke ve ark., 2021).

Özetle tümör oluşumu ve yayılması, neoplastik hücrelerin mikroçevreyle olan karmaşık etkileşimini aracılığıyla ortaya çıkmaktadır (Orend, 2005).

4.1.1. Tümör mikroçevresinin hücresel öğeleri

Birçok farklı hücre grubu TMÇ'de bulunmaktadır. Bu hücrelerin bazıları tümörlü dokuda hala hazırda bulunurken bazıları ise kan ve lenf damarları aracılığıyla TMÇ'ye gelmektedir. TMÇ'deki hücrelerin başlıcaları KİFler, makrofajlar gibi doğal bağışıklık sistemi hücreleri, T hücreleri gibi edinsel bağışıklık sistemi hücreleri, endotel hücreler, perisitler ve adipositlerdir.

4.1.1.1. Fibroblastlar

Fibroblastlar, TMÇ'deki temel hematopoetik kökenli olmayan stromal hücre tipidir. KİF, vimentin, fibroblast-spesifik protein-1, α -düz kas aktini (α SMA) ve fibroblast aktivasyon proteininin ekspresyonu ile karakterizedir (Turley ve ark., 2015). Bu hücreler, TMÇ'deki kolajeni üreten temel hücre tipidir. KİF, fibroblast büyüme faktörü (FGF), hepatosit büyüme faktörü ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 gibi büyüme faktörleri sağlayarak tümörün hayatta kalmasını ve büyümesini destekler (Kakarla ve ark., 2012).

Normal fibroblastların KİF'e farklılaşması, tümörün etrafındaki enflamatuvar ortam tarafından indüklenebilir. İlk olarak fibroblastlar, stres liflerinin oluşumuna yol açan protomiyofibroblastlara farklılaşır (Kakarla ve ark., 2012) . Yüksek interstisyel basınçla birlikte artan stres, fibroblastların transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) eksprese etmesine ve miyofibroblastlara farklılaşmasına neden olur. α SMA eksprese eden miyofibroblastlara farklılaştıktan sonra, KİF, yara iyileşmesindeki duruma benzer yüksek derecede kontraktıl, miyofibroblastik bir fenotip sergiler. Bu durum kanser ilintili dezmozoplazi oluşmasında temel rol oynar. KİF'lerden gelen artan kolajen ve fibronektin birikimi ile yoğun ve sert dezmozoplazmik bir TMÇ oluşur (Biffi ve Tuveson, 2021).

Sert ESM ise ESM'deki latent TGF- β 'nın salınmasına yol açar (Turley ve ark., 2015). Bu molekül ise kanserli hücrelerin büyümesini desteklemek ve anti-tümör immün yanıtlarını engellemek gibi birçok pleiotropik etkiye sahiptir. Bu yüzden de TGF- β ekspresyonu genel olarak kötü prognoz ile ilişkilidir (Calon ve ark., 2015; Li, Jue ve ark., 2019).

Sert TMÇ yapısı, immünosupresif TGF- β düzeylerini artırmanın yanı sıra, moleküllerin tümöre erişimini ve immün hücrelerin erişimini de kısıtlar. Bu fiziksel bariyer, anti-tümör immün yanıtlarını inhibe etme yollarından biridir.

Bağışıklık yanıtının KİF'ler tarafından engellemesinin bir başka yolu, ise Th2 hücrelerini indükleyen ve dentritik hücre olgunlaşmasını engelleyen timik stromal lenfopoietin, interleukin (IL)-8, CCL5 ve IL-6 gibi moleküllerin salgılanmasıdır (Bozyk ve ark., 2022).

Özetle, KİF'lerin TMÇ'deki etkileri arasında ESM'yi değiştirmek, büyüme faktörleri salgılamak, immün yanıtı baskılamak ve anjiyogenezi tetiklemek vardır. Dolayısı ise

KİF varlığının kötü prognoz, tedavi direnci ve kanser tekrarlaması ile ilişkilidir (Bozyk ve ark., 2022).

4.1.1.2. Bağışıklık sistemi hücreleri

TMÇ'deki ortamın immün baskılayıcı mı yoksa etkin bağışıklık yanıtına uygun mu olduğu genelde tümörün kaderini belirler. Bağışıklık yanıtından kaçabilmek, kanser hücrelerinin hayatta kalabilmesi için gereklidir. TMÇ'de hem doğal bağışıklık hücreleri hem de edinsel bağışıklık hücreleri mevcuttur ve bu hücre gruplarının alt tipleri tümörle-bağışıklık sistemi ilişkisini şekillendirir. TMÇ'deki hücresel bağışıklık yanıtı genelde etkili bir şekilde kanser hücrelerini yok edebilirken, kronik enflamasyon ve immünosupresif yanıtlar tümör büyümesini ve anjiyogenezi desteklemektedir.

4.1.1.2.1. Doğal bağışıklık sistemi hücreleri

TMÇ'de bulunan başlıca doğal bağışıklık sistemi hücreleri ise makrofajlar, dendritik hücreler, miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler ve doğal öldürücü (NK) hücreleridir. Hem dokuda bulunan hem de vücudun diğer bölgelerinden (dalak, kemik iliği vb.) TMÇ'ye çekilen makrofajlar, fagositik hücrelerdir. TMÇ'de, tümör destekleyici tümörle-ilişkili makrofajlara (M2 makrofajlar) dönüşebilirler (Gajewski ve ark., 2013). Bu hücreler, IL-10, VEGF ve TGF- β gibi moleküller salgılayarak anjiyogenezi destekler ve etkili bağışıklık yanıtının oluşmasını engeller.

Bunun tersine, etkili bir immün yanıtla ilişkili Th1 yardımcı T hücreleri tarafından salınan interferon- γ (IFN- γ), makrofajlarda M1 fenotipinin oluşmasını sağlar ve bu makrofajlar sitotoksik T hücrelerinin ve Th1 hücrelerinin tümörlü dokuya çağrılmasını sağlar ve böylece anti-tümör bağışıklık yanıtına yardımcı olur. Makrofaj çeşitliliğinden de anlaşılabilirceği gibi TMÇ'nin değişken ve dinamik ortamı, hücrelerde de fenotipik plastisitenin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu yüzden de her tümörde bulunan hücre alt tipi birbirinden farklılık göstermektedir.

Normalde bakteriye karşı bağışıklık yanıtını ve mukozal immünitinin önemli bir aracısı olan nötrofil granülositleri de tümöre karşı yanıt veren N1 ve tümörü destekleyen N2 olarak ikiye ayrılmaktadır (Gajewski ve ark., 2013). Son yıllarda, nötrofillerin hücre içi protein ve nükleik asitleri hücre dışına bir ağ gibi salgılayabildiği gösterilmiştir ve bu yapılara nötrofil ekstraselüler kapan adı verilmiştir. Bu kapanlar hem tümör destekleyici enflamatuvar ortamın oluşmasında hem de tümör hücrelerini

çevreleyerek metastaz esnasında hayatta kalmalarına yardımcı olmaktadır (Snoderly ve ark., 2019).

TMÇ’de bulunan doğal bağışıklık sistemi lenfositleri NK hücreleridir NK anti-tümör etkiye sahiptir. Bu hücreler sitotoksik olup IFN- γ ve granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) gibi moleküller salgılayarak etkin bir anti-tümör immün yanıt için hem doğrudan hem de diğer bağışıklık sistemi öğelerini tetikleyerek dolaylı yoldan etki gösterir (Guillerey, 2020). NK hücreleri tarafından salınan IFN- γ , en önemli antijen sunucu hücre tipi olan dendritik hücrelerin olgunlaşmasını ve IL-12 üretmesini sağlar. Olgunlaşmış dendritik hücreler daha önce antijenle karşılaşmamış T hücrelerini aktive edebilen tek antijen sunucu hücre tipidir. T lenfositlerinin aktivasyonu için gereken her iki sinyali de olgunlaşmış dendritik hücreler sağlayabilmektedir (Fu ve Jiang, 2018). Bu iki sinyal ise T hücre reseptörünün MHC moleküllerine bağlanması ve kostimülatör moleküllerin T hücrelerdeki CD28 e bağlanmasıdır. Meme kanserinde olgunlaşmış dendritik hücrelerin bulunması daha az metastaz ve iyi prognozla ilişkilidir (Bożyk ve ark., 2022). Bu tip dendritik hücreler Th1 polarizasyonuna yardımcı olur ve sitotoksik T hücrelerini antijen sunarak onları aktive eder. Bunların tersine olgunlaşmamış dendritik hücreler immün baskılayıcı bir etki göstererek T hücrelerin kanser hücrelerine karşı aktive olmasını engeller ve kanser hücrelerine karşı immün toleransı destekler (Fu ve Jiang, 2018).

Miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler ise olgunlaşmamış olan, miyeloid markeri CD33 yüzeyinde bulunduran, arginazları ekspresse eden ve T hücre yanıtını çok etkili bir şekilde baskılayabilen bir grup hücredir (Gabrilovich, 2017). Bu hücreler genelde tümör kaynaklı sitokinler aracılığıyla başkalaşırlar ve IL-4 gibi sitokinler ve arginazlarla bağışıklık yanıtını baskılar. Örneğin, Arginaz 1, ortamdan L-arginini yok ederek, T hücre aktivasyonunu engeller (Grzywa ve ark., 2020). L-arginin yokluğunda T hücre reseptörü aracılı aktivasyon sinyalleri engellenir ve böylece T hücre aktivasyonunu ilk adımdan baskılanır.

4.1.1.2.2. Edinsel bağışıklık sistemi hücreleri

TMÇ’de bulunan başlıca edinsel bağışıklık sistemi hücreleri T lenfositleridir. Bu hücre grubu tümörü infiltre eden lenfositlerin (TİL) çoğunluğunu oluşturur. TMÇ’de bulunan T hücre alt tipleri, bağışıklık sisteminin tümöre karşı yanıtını şekillendirir. Etkin bir anti-kanser bağışıklık yanıtı CD8⁺ sitotoksik T hücreleri ve CD4⁺ Th1

hücrelerinin TMÇ'de bulunması ile gerçekleşmektedir. CD8+ sitotoksik T hücreleri, perforin aracılığıyla kanser hücrelerinin zarında olduğu deliklerden hücre içine granzimler salgılar (Fu ve Jiang, 2018). Granzimler serin proteazlar olup, hücredeki proteinleri parçalayarak, kanser hücresinin ölmesine neden olur.

CD4+ Th1 hücreleri ise yardımcı T hücreleri olup, IFN- γ aracılığıyla makrofajları aktive eder. CD4+ Th2 hücreleri ise bunun tam aksine anjiyogenez ve tümör destekleyici enflamasyon yanıtını tetikleyerek, TMÇ'de çoğunlukta oldukları zaman tümör destekleyici bir etkiye sahiptir (Turley ve ark., 2015).

TMÇ'deki temel immün baskılayıcı bağışıklık sistemi hücreleri ise Treglerdir. Tregler genelde CD4, CD25 (yüksek) ve FoxP3 proteinlerini ekspresse eden (CD4+CD25+FoxP3+) hücre popülasyonudur (Wing ve ark., 2019). Normal fizyolojik koşullarda, T hücreleri otoimmüniteyi önler ve aynı zamanda dokuları bağışıklık sistemi yanıtı aracılığıyla oluşacak hasardan korur. Bu hücreler TMÇ'de bulunduğunda, T hücre aktivasyonunu engeller ve antijene yanıt vermeyen T hücrelerinin (T hücre anejisi) oluşmasını sağlar (Arce-Sillas ve ark., 2016). Bu baskılamayı IL-10 gibi sitokinler ve adenoazin salgılayarak, ya da T hücrelerin ölümüne neden olarak (örn., ölüm reseptörlerini aktive ederek) sağlar (Arce-Sillas ve ark., 2016). TMÇ'deki Tregler, TMÇ'de hala hazırda bulunan T hücrelerinin kanser hücreleri tarafından salınan sitokinler aracılığıyla Treg'e başkalaşması aracılığıyla oluşabileceği gibi, vücudun diğer yerlerindeki TMÇ'ye kemoçekimi sonucunda da ortamda bulunabilir. Bağışıklık yanıtının güçlü baskılayıcı olan bu hücre tipinin TMÇ'deki varlığı önemli bir prognostik belirteçtir. İnvaziv ve metastatik kanserleri olan hastalarda, kanda ve TMÇ'deki Treg sayısının arttığı gözlenmiştir Treg sayısında artış, kanserde kötü prognozla ilişkilidir (Shang ve ark., 2015).

T lenfositlere nazaran tümörü infiltre eden B lenfositleri daha az araştırılmıştır. Etkili bir anti-tümör immün yanıt, hücre bazlı yanıtların (CD8+ T lenfositleri ve Th1 lenfositleri) aracılık ettiği var sayılmaktadır. B hücreleri ise sitokinler veya antijen sunumu ile T efektör fonksiyonunu destekleyebilir. Ayrıca, B hücreleri tarafından üretilen antikorlar, tümör hücresi üzerindeki antijene bağlanarak, o molekülün işlevini değiştirebilir, artırabilir veya bloke edebilir (Wouters ve Nelson, 2018). Ayrıca antikorlar fagositozu kolaylaştıran opsonin görevi görebilir, klasik kompleman yolunu aktive edebilir veya antikora bağımlı hücrel sitotoksisiteyi indükleyebilirler

(Wouters ve Nelson, 2018). B hücreleri ayrıca Treg'leri destekleyerek, veya IL10 veya TGF- β gibi immünomodülatör sitokinleri salgılayarak T hücre yanıtını baskılayabilir (Garaud ve ark., 2018). 19 kanseri içeren bir meta-analiz, CD20+ B hücrelerinin çoğunlukla iyi bir prognozla ilişkili olduğunu bulmuştur, ancak bu verilere daha fazla ışık tutmak için B hücrelerinin farklı alt tipleri için spesifik belirteçler gereklidir (Tsou ve ark., 2016).

TMÇ'deki bağışıklık sistemi öğelerinin, kanser üzerindeki büyük etkisi, kanser immünoterapisinin klinikteki başarısı ile de kanıtlanmıştır. Kanser immünoterapisi, bağışıklık sistemi hücrelerini kansere karşı aktive etmek ve onların üzerinde kurulan baskıyı kaldırarak, tümörlü hücelere karşı immün yanıt aracılığıyla tümörlerin yok edilmesi hedefler. Bu yaklaşım özellikle son on yılda kanser tedavisi alanında hızla yayılmıştır ve cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapiye ek olarak standart kanser tedavileri arasında yeri almıştır. İmmünoterapötik yaklaşımlar arasında, immün kontrol noktası inhibitörleri tarafından, sitotoksik T lenfosit antijen-4 (CTLA-4) ve Programlı ölüm-1 (PD-1)/ Programlı ölüm-1 ligandı (PD-L1) bloke edip anti-tümör bağışıklık yanıtı üzerindeki 'frenleri' kaldırmak en yüksek etkinliği olan yaklaşım olmuştur (Li, B. ve ark., 2019). CTLA-4, T hücre aktivasyonu için gerekli olan kostimülatör moleküllerin CD28'e bağlanmasını engellerken, PD-1/PD-L1 eksenini ise anti-tümör yanıtı sağlayan T lenfositlerin ölmesini tetiklemektedir. Bağışıklık sistemi yanıtın organizmaya ve çevre dokulara zarar vermesini önleyen bu mekanizmalar, TMÇ'de immün kaçıışı desteklemektedir. Bu moleküllerin bloke edilmesi, özellikle CD8+ T hücrelerinin tümörlü hücelere karşı etkin bir yanıt vermesini sağlamaktadır. İki yönlü TMÇ-tümör ilişkisinde kanserli hücreler de TMÇ'de bulunan bağışıklık sistemi öğelerinin türünü sitokinler (örn., IL-4), kemokinler (örn. CXCL12) ve reseptörler (örn., PD-1) aracılığıyla etkilemektedir.

Özetle, TMÇ'deki bağışıklık sistemi öğeleri tümör tipine, enflamatuvar çevre ve tümörün antijenik yapısına göre farklılık gösterir.

4.1.1.3. Endotel hücreler ve perisitler

Anjiyogenez, vücutta hala hazırda bulunan kan damarlarından yeni kan damarları oluşmasına verilen isimdir. Anjiyogenez çoklu basamaktan oluşan ve perisit ve endotel hücrelerinin aktivitelerinin sıkıca kontrol edildiği bir süreçtir. Anjiyogenez, kanserli hücrelerin beslenmesi ve böylece hayatta kalması için gerekli bir prosestir. Tümörleri

besleyen kan damarları genellikle organize bir yapıda değildir ve normal dokulardaki benzerlerinden belirgin farklılıklar gösterir (Bergers ve Song, 2005). Bu farklılıklardan en önemlisi, kan damarlarının sızıntılı olup, geçirgenliğinin yüksek olmasıdır. Bu geçirgenlik ise tümörde interstisyel basıncın artmasına neden olur ve tümörlere ilaçların ulaşmasını engelleyen önemli etkenler arasında yer alır. Buna ek olarak, anjiyogeneze oluşan geçirgen kan damarları kanserde en çok ölüme neden olan metastaza, yani kanserli hücrelerin olduğu bölgeden vücudun diğer bölgelerine yayılmasına da olanak sağlar (Maishi ve Hida, 2017). Sızdıran kılcal damarların olası nedenlerinden biri, perisitlerin damar sistemine yetersiz bağlanması olabilir. Perisitler (Rouget hücreleri, "duvar" hücreleri) normalde mikrodamarların bazal membranında bulunur ve kılcal damarların yüzeyini kaplar. Perisitler, endotel hücreleri ile yakın ilişki içindedirler ve vasküler gelişim, stabilizasyon ve yeniden şekillenmede önemli rol oynarlar (Ribeiro ve Okamoto, 2015). Tümörle ilintili perisitlerde normalde embriyonik dönemde ekspresse olan endosialin veya CD248 ekspresyonu sıklıkla görülmektedir, bu da tümördeki perisitlerin fenotipik olarak da normal kan damarlarında bulunan perisitlerden farklı olabileceğini ortaya koymaktadır (Bagley ve ark., 2008)

Endoteller ise kan damarlarında lümeni çevreleyen en iç tabakadır. Bir sıra hücreden oluşan bu kan damarı katmanı, hücreler arası bağlar ve perisitlerin organizasyonu ile kılcal damarların geçirgenliğini düzenler. Tümördeki hipoksik ortam vasküler endotel hücrelerin aktive olmasına ve ortamda artan VEGF ekspresyonu ile anjiyogeneze oluşumunu tetikler (Roma-Rodrigues ve ark., 2019). Endotelyal katman eskiden sadece geçirgenliği kontrol eden pasif bir yapı olarak görülse de artık damar genişliğinden, hücre göçüne birçok fizyolojik olguyu kontrol ettiği bilinmektedir. Bu hücreler VEGF reseptörleri de ekspresse ederek, özellikle tümör tarafından salgılanan VEGFA ya bağlanarak anjiyogenezi tetikleyebilmektedir. Endotel hücre-perisit arasındaki etkileşimde Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi faktörler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Endotel hücreler tarafından salınan parakrin PDGF, perisitlerdeki PDGF Reseptörü- β (PDGFR)'ya bağlanarak perisitlerin yeni oluşan damara göçünü tetikler (Viallard ve Larrivée, 2017). Endotel hücreler ve perisitler tarafından salgılanan heparine-bağlanan epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri büyüme faktörü ise EGF reseptörünü aktive ederek anjiyogenezi destekler (Sun, R. ve

ark., 2021). Metastatik kanserlerde endotel hücrelerde biglikan adı verilen bir proteoglikanın daha çok ekspresse olduğu gösterilmiştir ve bu molekülün doğal bağışıklık yanıtın reseptörleri olan Toll-benzeri reseptörlere (TLR) bağlanarak metastaza destekleyici, NF- κ B ve ERK sinyal yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (Maishi ve Hida, 2017). Böylece TMÇ’de bulun endotel hücreler ve perisitler hem anjiyogenezin sürekliliğinden hem de kanser hücrelerinin vücudun geri kalanına dağılmasına aracı olur.

Lenf damarları da metastazda önemli rol oynayan yapılardır. Lenf bezlerinde sıklıkla metastaz görülmesinin nedenlerinden biri de bu damarların kan damarlarından daha geçirgen olmasıdır. Lenfatik sistemdeki endotel hücrelerin de kan damarlarındaki endotel hücrelerinden farklı olduğu ve PDGF-BB gibi lenfanjiyokrin faktörleri salgılayarak metastazı destekleyebileceği gösterilmiştir (Lee, E. ve ark., 2015).

4.1.1.4. Adipositler

Adipositler yağ dokusunu oluşturan temel hücreler olup, enerji depolamada görev alırlar. . Adipositlerin ayrıca birçok farklı moleküller salgılayarak aktif bir sekretomu olduğu ortaya çıkmıştır. Bu moleküllerin arasında özellikle adipokin adı verilen adipositlerin salgıladığı sitokinler, düşük dereceli kronik enflamatuvar yanıtı neden olabilmektedir. Kanserler arasında farklılık gösterse de örneğin meme kanserinin TMÇ’sinde bulunan temel hücre tipi adipositlerdir (Bożyk ve ark., 2022).TMÇ’de adipositler, leptin ve hepatosit büyüme faktörü gibi adipokinler salgılayarak tümör destekleyici enflamatuvar yanıtın oluşmasını destekler (Bożyk ve ark., 2022). Ayrıca, TMÇ’de bulunan adipositler normal adipositlerden daha küçüktür. Bu hücreler, IL-6, IL-8 ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ekspresse ederek, TMÇ’ye makrofaj gibi bağışıklık sistemi hücrelerinin gelmesini sağlar ve kronik enflamasyonu desteklerler (Bożyk ve ark., 2022).

Meme kanserinde ise ayrıca adipositlerin KİF’lere dönüşebileceği ve ESM oluşumuna katkıda bulunabileceği de gösterilmiştir (Cox, 2021).

4.1.2. Ekstrasellüler matriks

Hücresel yapıların yanı sıra, ESM de önemli bir TMÇ yapısıdır. ESM, TMÇ’nin fiziksel temelini oluşturur ve tüm yapılar bu matriks tarafından çevrelenmiştir. ESM, hücre içermeyen ve çapraz bağlanmış kolajen, proteoglikan, polisakkarit ve glikoprotein gibi makro moleküllerden oluşan bir yapıdır. ESM’nin, kanser büyümesi

ve metastazı için gerekli olan hem fiziksel hem de kimyasal sinyalleri sağladığı gösterilmiştir (Nallanthighal ve ark., 2019). Böylece ESM sadece mekanik bir destek ve koruma sağlamak yerine, büyüme faktörlerinin önemli bir rezervuarı olmak gibi önemli fizyolojik faktörler bulundurmaktadır (Cox, 2021)

ESM'nin kanserdeki etki mekanizmaları arasında, hücre adezyonunu değiştirmek, büyüme faktörleri için (örn. Kök hücre faktörü) rezervuar görevi yapmak, bağışıklık sistemini hücrelerinin ulaşımını engellemek, kanser kök hücreleri için yer (niş) oluşturmak ve hücre farklılaşmasını etkilemek vardır (Nallanthighal ve ark., 2019). Normal ESM'den daha sert ve yoğun olan tümör-ilintili ESM, anti-kanser ilaçlarının tümöre ulaşmasını karşısında da fiziksel bir engel teşkil ederek, kanser tedavisinde en önemli problemlerden biri olan tedavi direncine katkıda bulunmaktadır (Hui ve Chen, 2015).

4.1.2.1. Kolajen

Kolajen insan vücudunda en çok bulunan proteindir. ESM'nin yapısında da en yüksek miktarda bulunan proteindir. Kolajen, yapısal bir protein olup, hücrelere hem mekanik destek sağlar hem de hücre adezyonunu ve göçünü etkileyen hücre tutunması için bir ortam oluşturur (Xu ve ark., 2019). Kolajenin 28'den fazla tipi olmasına rağmen, tip 1 fibriller kolajen insan vücudunda en çok bulunan alt tipidir. Tip1 kolajen genelde deri, tendon ve kemiklerde bulunur ve basınca karşı dayanıklılık sağlar. Tip 4 kolajen ise fibriller bir yapıda olmayıp, kolajen moleküllerinin birbirine çapraz bağlarla bağlanmasıyla oluşur ve mekanik bir destek sağlarken aynı zamanda kolajen molekülleri arasından geçişe de izin veren daha yumuşak bir yapı oluşturur (Xu ve ark., 2019).

Kolajen genelde fibroblastlar tarafından üretilir. TGF- β ve FGF gibi büyüme faktörleri kolajen üretimini tetikler. Kolajen biyosentezi esnasında, 3 adet α zincirinden oluşan heliks (sarmal) şeklindeki prokolajen hücre dışına salınır. ESM'de ise proteolitik kesimlerden sonra diğer kolajen moleküllerle bağlar oluşturup süpra moleküler bir yapı haline gelir, ve hücre ve dokulara fiziksel destek sağlar. Kolajen moleküllerinin birbiri ile olan intermoleküler bağlantıları gücü (örn., kovalent bağlar, glikolizasyon bağları vb.) oluşan kolajen yapısının mekanik dayanıklılığını etkiler (Xu ve ark., 2019). ESM'de kolajen yıkımı ise farklı matriksmetalloproteazları (MMP) tarafından gerçekleştirilir.

TMÇ'deki kolajen de çoğunlukla KİF'ler tarafından üretilir. Fibriller kolajenin TMÇ'de birikmesi genelde fibrin ve fibronektin gibi matriks glikoproteinleri tarafından kontrol edilir. Fibronektin kolajen fibrillerinin oluşması için gerekli moleküler desteği ve bağlanma bölgelerini sağlayarak, kolajen aracılı kanser fibrozuna yardımcı olur (Cox, 2021). ESM'deki kolajen yapılarının organizasyonunun özellikle meme kanserinde prognostik öneme sahip olduğu gösterilmiştir. Meme kanseri ilerledikçe TMÇ'deki kollajen organizasyonundaki değişikliklere tümörle ilişkili kollajen imzaları (Tumor associated collagen signatures; TACS) adı verilmektedir. 1'den 3'e kadar sınıflandırılan TACS'larda, düz kolajen fiberlerinin tümör sınırına diklemesine aranje olduğu TACS 3, kötü prognozla ilişkilidir (Tomko ve ark., 2018). Kolajen, TMÇ'de doku sertliğini artıran, bağışıklık sistemi hücrelerinin doku infiltrasyonunu etkileyen ve metastazı destekleyen etkilere sahiptir. Kolajenin tümör hücreleri üzerindeki doğrudan etkisi genelde integrin gibi reseptörler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Örneğin, kolajenin $\alpha2\beta1$ integrinine bağlanması, kanser hücrelerine kök hücre benzeri özellikler kazandıran Hedhehog sinyal yolağının aktive olmasını sağlar (Nallanthighal ve ark., 2019). Tümör etrafında bulunan sert kolajen yapısının da sitotoksik T hücrelerinin tümöre ulaşmasını engellerken, Treg farklılaşmasını da desteklediği gösterilmiştir (Kuczek ve ark., 2019).

4.1.2.2. Glikoproteinler

Glikoproteinler, proteine bağlanmış karbohidrat zincirlerinden oluşan yapılardır. Glikoproteinlere bağlı olan sakkaritler genelde kısa ve dallanmış oligosakkaritlerdir (Bozyk ve ark., 2022). Bu proteinler interstisyel alanda sakkaritlerden gelen viskoz yapıları sayesinde fiziksel stresse karşı koruyucu etki gösterirler. Tümör ESM'sinde bulunan glikoproteinler normal dokulardakinden farklılık gösterir. Örneğin, Tenascin-C (TN-C) ve fibronektinin bazı izoformları genelde sadece TMÇ'de bulunur. TMÇ'de bulunan diğer glikoproteinlere örnek ise fibulin, periostin, ve musindir (Nallanthighal ve ark., 2019). Bu glikoproteinler hem KİF'ler hem de tümör hücreleri tarafından üretilip, ESM'ye salgılanabilmektedir.

TMÇ'deki glikoproteinler adezyon, hücre hareketi, epitel-mezenkimal geçiş (EMT), proliferasyon ve metastaz gibi birçok önemli proseste rol alır. Bu etkilerini integrin veya diğer tip reseptörlere bağlanarak gösterirler. Örneğin, fibronektinin belirli integrinlere bağlanması, tümör invazyonuna yardımcı olmaktadır (Rick ve ark., 2019).

Bu etkinin özellikle ESM'yi yıkan MMP-1'nin aktive olması aracılığıyla olmaktadır. Fibronektinin belirli ekstrasellüler bölgeleri, genellikle sadece embriyonik ve tümörle ilintili ESM'de bulunduğu için onkofetal fibronektin olarak da adlandırılmaktadır. Buna ek olarak bu onkofetal fibronektinler, ESM'de latent durumda olan TGF- β da salınmasına ve KİF başkalaşımına yardımcı olur (Eble ve Niland, 2019). Tümör metastazı için ESM'de yolu açmanın yanı sıra, metastatik bölgeye kan dolaşımı aracılığıyla giden tümör hücrelerini çevreleyerek, fibronektin onları hemodinamik stres gibi faktörlerden korur ve böylece dolaşımda da hayatta kalmalarına yardımcı olur (Cox, 2021).

Kanserle ilintili ESM'de bulunan glikoproteinlerden bir diğeri ise TN-C. TN-C'nin kanserlerde, epitel-mezenkimal geçişte, anjiyogeneze, metastaz ve immün baskılamada önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. TN-C ekspresyonu, meme kanseri, pankreas kanseri, glioblastoma multiforme, ve mesane kanserlerinde kötü prognozla ilişkilidir (Ming ve ark., 2019). TN-C'nin kanserlerdeki rolü Bölüm 4.3.5.'de detaylı olarak ele alınmıştır.

TMÇ'de, özellikle glioblastoma ve meme kanseri ESM'sinde, periostinin aşırı ekspresyonu görülmektedir. Periostin de integrinlere bağlanarak, özellikle kanser kök hücrelerinin hayatta kalmasını ve M2 makrofajların bölgeye çekilerek tümör destekleyici moleküllerin salgılanmasına yardımcı olur (Nallanthighal ve ark., 2019). Proteoglikanlar, glikoproteinlerin bir alt tipi olarak da sınıflandırabilmelerine rağmen, protein ve polisakkarit aranjmanı glikoproteinlerden farklılık gösterir. Proteoglikanlar, proteine bağlı genellikle az sayıda uzun, dallanmamış, negatif yüklü sülfatlı glikozaminoglikanlardan oluşur. Diğer glikoproteinlere nazaran, proteoglikanlar çok daha fazla karbohidrat grubu içerir. ESM'de bulunan bazı proteoglikanlar ise kondrotin sülfat, glipican-3 ve sindekan-1 dir (Nallanthighal ve ark., 2019). Glikozaminoglikan zincirleri aracılığıyla büyüme faktörü ve sitokinlere bağlanır ve ESM'nin bu moleküller için bir rezervuar görevi yapmasına yardımcı olur.

Aynı zamanda proteoglikanlar, ko-reseptör görevi de yapar, böylece hem ligand hem de reseptörlerle etkileşime girip hücre büyümesi, metastaz ve anjiyogeneze gibi birçok tümör destekleyici değişimlerde görev alırlar (Nallanthighal ve ark., 2019).

4.1.2.3. İntegrinler

İntegrinler α ve β zincirinden oluşan ve 24'ten fazla tipi olan heterodimerlerdir. α ve β zincirleri farklı kombinasyonlar oluşturarak, integrinin farklı tiplerini ortaya çıkarır. İntegrinler transmembran reseptörler olup özellikle hücrelerin ESM'ye tutunması, hücre göçü, hücre iletişimi ve hücre-ESM etkileşiminde önemli bir rol oynar. Başka bir ifadeyle, bu moleküller, hücre-ESM iletişimine aracılık ederler. İntegrinlere ligand bağlanması hücre içinde fokal adezyon kompleksi ve Src kinaz ailesi öğelerini aktive ederek, hücreyel değişikliklere neden olur (Eble ve Niland, 2019).

TMÇ'de integrinlere bağlanan moleküller arasında TN-C, kolajen ve fibronektin vardır. TMÇ'de ekspresse olan integrin tipleri ve miktarları da normal dokulardakinden farklılık göstermektedir. Örneğin $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 1$ ve $\alpha 6 \beta 4$ TMÇ'de overeksprese olmaktadır (Cox, 2021). Farklı integrin tipleri aynı liganda bağlanabilmektedir. Fibronektinin de $\alpha 5 \beta 1$ integrini yerine $\alpha v \beta 3$ 'e bağlanması meme kanseri hücrelerinin hayatta kalımını artırmaktadır (Young ve ark., 2020). TMÇ'de, integrinler metastaz, kanser kök hücresi hayatta kalımı ve anjiyogenez gibi olayları etkilemektedir. Örneğin perisitlerde bulunan $\alpha 6 \beta 1$ integrini de laminin a bağlanıp, TMÇ'deki anjiyogenezi şekillendirir (Su ve ark., 2020). KİF'lerin fibroblastlardan başkalaşması ve normal fibroblastların KİF'e dönüşmek üzere TMÇ'ye çekilmesinde de tümör hücreleri üzerinde bulunan integrinlerin rolü vardır (Su ve ark., 2020).

Hücrenin, ESM ile ilişkisini etkileyen integrinler, özellikle ESM ve hücre iskeleti arasında bir bağ kurarak metastazı önemli ölçüde etkiler. Örneğin, ESM'deki TN-C'nin, $\alpha 9 \beta 1$ bağlanması, hem glioblastoma hem de osteosarkoma hücrelerinin göç kapasitesini artırmıştır (Sun, Z. ve ark., 2018). İlginç olarak, kanser hücreler göç ettikleri organda ekzosomlar aracılığıyla integrin salgılayarak pre-metastatik nişin oluşmasını da sağlarlar (Su ve ark., 2020).

Tümörde artan integrin ekspresyonu hem terapötik bir hedeftir hem de aktif hedeflendirme için kullanılmaktadır. Özellikle αv integrinlerine bağlanan RGD (arginin-glisin-aspartik asit) peptidi tümöre ilaç ve gen terapi ajanlarının aktif hedeflendirmesi için kullanılmaktadır (Li, M. ve ark., 2021).

4.1.2.4. Matriks metalloproteinazlar

MMP'ler ESM'yi yıkabilen proteinazlar ailesidir. İnsanlarda 23 MMP bulunur ve bu enzimler proenzim olarak salınıp, aktive edilince katalitik işlemlerini yapmaktadırlar. TMÇ'de MMP'ler, matriks proteinlerini (örn. kolajenler) parçalayarak, yüzeye bağlı

TGF- β gibi faktörleri serbest bırakıp aktive edere ve metastaz için ESM'de hücrelerin göç edebileceği yollar açarak tümörlere yardımcı olur. MMP1, 9, 10, 11 ve 13 birçok kanser türünde ekspresyonu artmaktadır (Cox, 2021). TMC'de MMP'ler tümör hücreleri, KİF'ler ve bağışıklık sistemi hücreleri gibi birçok hücre tipi tarafından salgılanmaktadır. TMC'nin dinamik bir yapı olup, tümör hücresinin değişen ihtiyaçlarına göre tekrardan yapılanmaktadır ve bu yeniden yapılandırma için yıkım MMP'ler tarafından yapılmaktadır (Gobin ve ark., 2019).

Tümörde, TMC'nin yapılanmasında önemli bir rol oynayan TGF- β , hem tümör destekleyici hem de tümör baskılayıcı özelliklere sahiptir. İlerlemiş kanserlerde, TGF- β , genelde tümör destekleyici görev yapıp, KİF'lerin farklılaşmasındaki kilit moleküldür. ESM'de TGF- β inaktive halde ESM'ye bağlı şekilde bulunmaktadır ve MMP-2 ve 9 gibi MMPler tarafından proteolitik kesimle aktifleşen TGF- β ortama salınmaktadır (Krstic ve Santibanez, 2014). Aktif TGF- β ise, lökositler gibi hücre gruplarının MMP üretmesini sağlayarak pozitif bir döngü yaratabilir.

4.2. Meme Kanseri

Gelişen tanı ve tedavi yöntemlerine rağmen, meme kanseri, günümüzde hala daha önemli bir halk sağlığı problemidir. Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir ve tüm dünyada kansere bağlı kadın ölümlerin birincil nedenidir (Sung ve ark., 2021). Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan epidemiyolojik tahminlere göre, Meme kanseri ile ilişkili mortalitenin 2060 yılına kadar 2,35 kat artacağını öngörmektedir (Mattiuzzi ve Lippi, 2019).

Meme kanseri , immünohistolojik belirteçlere dayalı olarak tanımlanmış dört alt tipi olan heterojen bir hastalıktır. Bu immünohistolojik tiplendirme, hormon reseptörlerinin (yani, Östrojen Reseptörü (ER) ve Progesteron Reseptörü (PR)) ve İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörünün (HER2) (Tablo 1) ekspresyonu ile yapılır (Bouchal ve ark., 2019). Bu sınıflandırma, tedavi planlarını şekillendirmek için kullanılır ve önemli prognostik değere sahiptir.

Tablo 1. Meme kanseri alt tipleri ve moleküler belirteçleri.

Meme kanseri alt tipi	Moleküler belirteçler
Luminal A-benzeri	ER+ PR+ HER2 negatif Ki-67 düşük
Luminal B benzeri	ER+ ve/veya PR+ HER2 negatif Ki-67 yüksek
HER2 yüksek ekspresyonu	ER+ ve/veya PR+ HER2 +
Üçlü negatif	ER negatif PR negatif HER2 negatif

Meme kanserinde tedavi genelde alt tipin yanı sıra, kanserin derecesi ve evresi, hastanın menopoz durumu, yaşı ve genel sağlığı gibi birçok faktörün değerlendirilmesi ile planlanır. Tedavi seçenekleri arasında cerrahi girişim, radyasyon tedavisi, endokrin tedavilerini de içeren kemoterapi ve immünoterapi gibi hedefe yönelik tedaviler yer alır. Mastektomi (radikal, parsiyel vb.) veya lumpektomiye içerebilen cerrahi girişimlerin en etkili olduğu durumlar erken aşamalıdır (Goldhirsch ve ark., 2013). Sistemik olarak uygulanan kemoterapötik ajanlar, spesifik olarak tümör bölünmesini hedef almadıklarından, vücudun sağlıklı bölünen hücrelerinde de ciddi toksisite gösterebilir. İmmünoterapi gibi daha yeni yaklaşımlar, tümör heterojenliği ve immün kaçış mekanizmaları nedeniyle her zaman etkili değildir (Yin ve ark., 2020). Ayrıca, var olan ve/veya edinilmiş tedavi direnci, meme kanseri tedavisi için önemli bir engel olmaya devam etmektedir.

2011-2017 yılları arasındaki kanser verilerine bakıldığında meme kanseri erken evrelerde ve lokalize halde tanı konulduğunda, 5 yıllık sağkalım oranı %99'dur (<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-survival-rates.html>, Erişim tarihi: 01.07.2022). Ancak meme kanserinin sonraki aşamalarında bu sayı hızla düşmektedir. Meme kanseri ile ilişkili mortalitenin %90'ından fazlası metastaz dolayısıyladır. Meme kanserinin en sıklıkla metastaz yaptığı yapılar sırasıyla %30-60 olarak kemikler, %21-32 ile akciğerler, %15-32 ile karaciğer ve %4-10 ile beyindir (Medeiros ve Allan, 2019).

4.2.1. Hormon reseptörü pozitif meme kanseri

Hormon reseptörü (ER+ PR+) pozitif meme kanseri, tüm meme kanseri tanılarının %70'ini oluşturur. Bu kanserler, genellikle hormon reseptörü açısından negatif meme kanserinden daha iyi bir prognoza sahiptirler (Onitilo ve ark., 2009). Özellikle, luminal A alt tipi en az metastazın görüldüğü ve böylece en iyi prognoza sahip olan meme kanseri türüdür. Ki-67, ribozomal RNA sentezinde yer alan bir nükleer korteks proteinidir ve meme kanserlerinde proliferatif kapasite için bir belirteç olarak kullanılır. Proliferasyon markeri olan Ki-67'nin de düşük olması bu alt tipteki daha az agresif klinik tabloyu destekler.

Luminal-B alt tipi, ise yüksek Ki-67 ekspresyonu veya yüksek HER2 ekspresyonu ile karakterizedir. ER+ meme kanseri alt tipleri arasında, luminal-B alt tipi daha kötü bir prognoza, daha yüksek proliferatif hıza ve daha yüksek tedavi direncine sahip olması, tümörün ilerlemesinde proliferasyonun önemini vurgulamaktadır (Penault-Llorca ve Radosevic-Robin, 2017). Östrojen, ER+ meme kanserlerinde çoğalmayı sağlayan en önemli moleküldür. ER'ye ligand bağlanması üzerine, dimer oluşturur ve hücre döngüsü, apoptoz ve hücre bölünmesinde yer alan birçok genin transkripsiyonunu tetikler (Brufsky ve Dickler, 2018). Östrojen bağlanması, siklin D1'in aktivasyonu ile hücre döngüsünde G1/S geçişini de kolaylaştırır. Siklin D1'in östrojen tarafından aktive edilmesinin yanı sıra, bu proteini kodlayan gen, birçok meme kanseri vakasında amplifikasyon mutasyonuna uğramıştır ve bu amplifikasyonun luminal-A'ya göre luminal-B kanserlerinde daha sık görülmektedir (Brufsky ve Dickler, 2018).

ER+ meme kanserindeki ana terapötik hedef de ER'dir. Terapötik strateji ise bu reseptör aracılığıyla tetiklenen hücre içi sinyalleme azaltmaktır. Bu tip endokrin tedavisinde, reseptörün yıkımı (örn., fulvestrant), aromataz inhibitörleri (örn., letrozol) yoluyla östradiol üretiminin inhibisyonu ve ER'nin seçici modülasyonu (örn. tamoksifen) ile ER'in tümör üstündeki etkisi azaltılır (Zhang, J. ve ark., 2020). Ancak, erken meme kanseri vakalarının yaklaşık %30'u ve ileri vakaların neredeyse tamamı endokrin tedavisine direnç geliştirir (BeLow ve Osipo, 2020). Direnç mekanizması tam açıklanamamakla beraber, meme kanseri hücrelerinin hızlı büyümesi, ile oluşan yüksek mutasyon oranı ve heterojen hücre popülasyonundaki içsel direnç (de novo direnç) veya ilacın seçici baskısı altında oluşan mutasyonlarla kazanılan direnç mekanizmaları sayılabilir.

HER2 eksprese eden meme kanserinde, bu reseptörün trastuzumab gibi HER2'ye bağlanan monoklonal antikorlarla hedeflendirilmesi de önemli terapötik etkinlik göstermiştir.

4.2.2. Hormon reseptörü negatif meme kanseri

Bu tip meme kanserleri HER-2 pozitifliğine göre ikiye ayrılır ve birbirinden prognoz ve tedavi yaklaşımları açısından farklılık gösterir.

4.2.2.1. HER2 pozitif hormon reseptörü negatif meme kanseri

Bu meme kanseri alt tipi de bazı luminal B tipinde olduğu gibi HER2 büyüme faktörü reseptörü ekspresyonu artmıştır. Ancak luminal B'den farklı olarak ER ve PR hormon reseptörleri eksprese edilmemektedir (ER-,PR-, HER2+). Tüm meme kanseri vakalarının %20-25'ini oluşturur (Kumar, P. ve Aggarwal, 2016). Luminal tiplere nazaran, bu alt tip genelde daha ileri kanser evresiyle ilişkilidir (Krishnamurti ve Silverman, 2014).

HER2 onkogeni insan EGF reseptörü ailesinden olan HER2 reseptörünü kodlar. Bu reseptör, hücre zarına bağlı bir tirozin kinazdır. Bu alt türde, gen amplifikasyonu sonucu, *HER2* geninden 50 kopyaya kadar bulunabilmektedir. Bunun sonucunda kanserli hücrede, normal HER2 protein miktarının 100 katından fazlası bulunabilmektedir (Krishnamurti ve Silverman, 2014).

HER2'ye ligand bağlandığı zaman, dimer oluşturur ve içinde önemli onkolojik sinyal yollarının bulunduğu Ras/Mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) ve fosfolipaz C gibi sinyal mekanizmalarını aktive ederek hücre proliferasyonunu, hayatta kalımı ve hücre adezyonunu etkiler.

HER2'yi hedefleyen terapiler monoklonal antikorlar ve küçük molekül ilaçlardan tirozin kinaz inhibitörlerini içermektedir. İnsanlaştırılmış monoklonal antikor olan trastuzumab, HER2 reseptörünü bloke ederek ve/veya hücre aracılı sitotoksiteyi aktive ederek meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve hayatta kalımını azaltır (Kunte ve ark., 2020). Trastuzumab dışında, HER2 ilintili sinyal yollarının aktivasyonu için gerekli olan dimerizasyonu engelleyen pertuzumab gibi monoklonal antikorlar da tedaviye eklenmiştir.

HER2'ye özgül tirozin kinaz inhibitörü olarak lapatinib kullanılmakta olmasına rağmen, 2020 yılında neratinib gibi diğer inhibitörler de onay almıştır (Kunte ve ark.,

2020). Lapatinib, hem HER2 hem de EGF reseptöründe, ligand bağlanmasını takiben hücre içi sinyal yollarının aktive olmasını engeller.

4.2.2.2. Üçlü negatif meme kanseri

Üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK) olarak bilinen alttürde hem hormon reseptörleri ekspresyonu yoktur hem de *HER2* amplifikasyonu ve/veya yüksek *HER2* ekspresyonu yoktur (ER-,PR-, *HER2*-). ÜNMK, tüm meme kanseri vakalarının %10-20'sini oluşturmaktadır (Kumar, P. ve Aggarwal, 2016). Bu reseptör negatifliği, hedeflendirilmiş kanser tedavisi için aday molekül bulmayı zorlaştırmaktadır. Bu yüzden de diğer meme kanseri tiplerine nazaran, bu tipte monoklonal antikorlar gibi yenilikçi tedaviler geliştirilememiştir. ÜNMK meme kanseri türleri arasında en agresif ve en kötü prognoza sahip olanıdır. 5-yıllık hayatta kalım genelde diğer meme kanseri türlerine göre daha düşük olup, %60 civarındadır (Fan ve He, 2022). Tanı alındıktan özellikle ilk 3 sene içerisinde tekrarlama riski çok yüksektir (Fan ve He, 2022). Aksiller lenf bezlere sıklıkla metastaz yapmasına rağmen, tümör hacmi ve lenf nodu metastazı arasında bir korelasyon yoktur (Kumar, P. ve Aggarwal, 2016). Kemiklere diğer türlere nazaran daha az metastaz yapsa da genelde kan yoluyla metastaz yaparak, özellikle akciğerler ve beyine metastaz sıklıkla görülür (Kumar, P. ve Aggarwal, 2016).

4.2.2.2.1. ÜNMK epidemiyolojisi

ÜNMK tanısı almış meme kanseri hastaların ortalama yaşları diğer meme kanseri türlerindeki nazaran daha düşüktür ve böylece ÜNMK genç yaştaki meme kanserleri ile ilişkilidir (Kumar, P. ve Aggarwal, 2016). Bununla birlikte menopoza öncesi dönemde olan kadınlarda daha sık görülmektedir. ÜNMK, Afrika-Amerika kökenli bireylerde daha sık görülüp, genelde bu etkin kökende prognoz daha kötüdür (Kumar, P. ve Aggarwal, 2016).

Obezite ve meme kanseri riski arasındaki ilişki net olarak henüz tanımlanmasa bile, yapılan bir çalışmada insülin direnci ve obeziteyle karakterize olan metabolik sendromlu insanlarda ÜNMK'nin daha sık görüldüğü saptanmıştır (Avgerinos ve ark., 2019).

4.2.2.2.2. ÜNMK'de görülen mutasyonlar

Meme kanserlerinin yaklaşık %10'u kalıtsal faktörlerden dolayı ortaya çıkmaktadır ((Baretta ve ark., 2016). Bu genetik faktörler genelde *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki germ hattı mutasyonlarıdır. Bu genlerin tek alelinde mutasyon taşıyan bir kadının, 80

yaşına kadar meme kanseri olma riski %72'dir (Venkitaraman, 2019). BRCA1 mutasyonu taşıyan meme kanseri hastalarında hayatta kalımının daha kısa olduğu ve daha agresif hastalığa sahip oldukları gösterilmiştir (Wang, Y. A. ve ark., 2018).

BRCA1 mutasyonlarından dolayı gelişen meme kanserlerinin büyük çoğunluğu (%60-80) ÜNMK'dir (Kumar, P. ve Aggarwal, 2016). *BRCA1*'deki mutasyonların çoğu, proteinin normal boyutundan daha küçük olmasına ve işlevsiz hale gelmesine neden olur (Venkitaraman, 2019). Normal fizyolojide BRCA1, DNA hasarı onarımında ve hücre döngüsü kontrol noktalarında yer alır (Yoshida ve Miki, 2004). Bu nedenle, BRCA1 işlevinin kaybı, kanseri destekleyen kromozom instabilitesi ve mutasyonları teşvik edebilir.

ÜNMK'de ise en çok mutasyona uğrayan gen, bir tümör baskılayıcı gen olan TP53'tür (prevalans %80) (Derakhshan ve Reis-Filho, 2022). TP53 DNA hasarının tanınması ve hücre bölünmesinin durdurulmasında yer alır. Böylece bu protein, DNA hasarı olan hücrelerin çoğalmasını engelleyerek, genom bütünlüğünü korur. ÜNMK'de olduğu gibi bu tümör baskılayıcı genin inaktive olduğu mutasyonlarda, genetik değişimler kolaylıkla gerçekleşebilmektedir. Böylece kanserin oluşumu, gelişmesi ve kanserli hücrelerin uygulanan tedavinin de içinde olduğu değişen fizyolojik ortama adapte olmasını ve direnç geliştirebilmesini için gerekli genetik temel oluşturulur.

TP53 mutasyon sıklığını *PIK3CA* genindeki aktive edici mutasyonlar izlemektedir (Derakhshan ve Reis-Filho, 2022). Bu gen önemli bir sinyal yolağının kilit enzimlerinden olan fosfotidil inositol 3 kinazın bir alt birimi kodlar. Bu sinyal yolağının normal seviyenin üstünde aktivasyonu hücre bölünmesi ve yayılmasını desteklemektedir.

ÜNMK'de, *p53* ve *BRCA* gen mutasyonları dışında DNA hasarı ve genom bütünlüğü için önemli rol oynayan diğer genlerde de mutasyon görülmektedir. Bunlar arasında RAD51 ve BRIP1 gibi homolog rekombinasyon (HR) aracılı DNA hasarı onarımında görev yapan proteinleri vardır. Bundan dolayı da DNA onarımının homolog rekombinasyon gibi hata oranı düşük bir mekanizma ile değil de hata oranı yüksek ve böylece mutasyona neden olabilecek homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ile gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu da hücrelerin mutasyon hızını artırarak tedaviye direnç gelişmesini desteklediğini gösterilmiştir (Wiegman ve ark., 2021). Başka bir çalışmada ise ÜNMK'de genomik instabilite ile ilişkili 11 genin ekspresyon bir panel

olarak değerlendirildiğinde kötü ve iyi prognozlu hastaların ayrıştırılabileceği gösterilmiştir (Guo ve Wang, 2021).

4.2.2.2.3. ÜNMK'nin tümör mikroçevresi

Diğer kanser türlerinde olduğu gibi, ÜNMK hücreleri mikroçevreleriyle birbirlerini şekillendirici yakın bir etkileşim içindedir. KİF'ler ÜNMK'yi TGF- β yi aktive ederek desteklemektedir (Fan ve He, 2022). ÜNMK ve fibroblastlarla yapılan kokültür deneylerinde, IL-6, 8 ve TGF- β salınımı artmıştır ve miyeloid hücreler gibi diğer hücre tiplerinin TMÇ'ye çekilmesine ve başkalaşmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir (Allaoui ve ark., 2016). Başka bir çalışmada ise KİF'lerin otofaji bağımlı bir mekanizma ile ÜNMK hücrelerinin vimentin ve epitel mezenkimal geçişte önemli rol oynayan N-cadherinin ekspresyonunun artmasına neden olduğu ve tümörlerin çoğalması ve kök hücre benzeri özelliklerini devam ettirebilmesi için gerekli olan Wnt/ β -katenin yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (Wang, M. ve ark., 2017).

ÜNMK'nin TMÇ'sinde klinik ve prognostik anlamda en önemli faktör CD8⁺ TIL sayısıdır (Derakhshan ve Reis-Filho, 2022). Yüksek sayıda CD8 hücre barındıran tümörlerde, ya tam bir infiltrasyonla hem kanser hücrelerini etrafında hem de stromada ya da sadece stromada bu lenfositleri bulunur. Eğer ne stroma ne de kanserli hücrelerde TIL yoksa, immün 'çölü' bir TMÇ ortaya çıkar. Kanser tedavisinde yeni bir çıkış açan immünoterapi ajanları, özellikle immün kontrol noktası inhibitörleri, meme kanserinde önemli tedavi etkinliğine neden olmamıştır. Bunun başlıca sebeplerinden biri PD-1/PD-L1'in çoğu zaman meme kanserinde eksprese olmamasıdır ('soğuk' kanserler) (Liu ve Sun, 2021). Fakat diğer meme kanseri türlerine göre bu moleküller, ÜNMK'nin TMÇ'sinde daha sıklıkla bulunmaktadır. PD-L1 ekspresyonunun ER pozitifliği ile negatif ilişkili olduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 2016). PD-L1 ekspresyonuna ('sıcak kanserler'), ÜNMK'deki yüksek mutasyon yükü de eklendiğinde, ÜNMK en immünojenik meme kanseri alt tipidir.

ÜNMK TMÇ'sinde en çok bulunan tümör destekleyici lökosit ise tümör ilintili M2 makrofajlarıdır. Bu makrofaj grubu EMT ve KİF oluşumu ile ilişkilidir. TMÇ'deki yüksek M2 miktarının daha kısa hastalıklı sağ kalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Zheng ve ark., 2021). Kanser hücreleri tarafından TMÇ'ye salgılanan IL-2, IL-10 ve TGF- β gibi sitokinlerin ve GM-CSF gibi M2 polarizasyonu desteklemektedir. M2 makrofajlar ayrıca MMP-7 gibi MMPleri salgılayarak anjiyogenezi destekler (Fan ve

He, 2022). MMP-7, VEGF yolağını değiştirerek ve VEGF reseptörü 'i yıkarak anjiyogenezi destekler.

ÜNMK'nin TMÇsinde normal seviyenin yukarısında bulunan bir başka MMP ise MMP1 dir. MMP-1 ekspresyonun diğer meme kanseri tiplerine nazaran ÜNMK'de daha çok olduğu gösterilmiştir (Wang, Q. ve ark., 2018). MMP1 ise VEGF reseptörü ekspresyonunu ve endotel hücre proliferasyonunu destekleyerek anjiyogeneze yardımcı olur.

Adipositler normal meme kanseri mikroçevresinde yüksek miktarda bulunurlar. TMÇ'de bulunan adipositler ise normal dokuda bulunanlardan farklılık gösterip kanser ilintili adipositler diye adlandırılmaktadır. ÜNMK'de, adipositler tümör hücrelerine yakın mesafede bulunur ve adipokini, MMP ve enflamatuvar faktörleri daha fazla ekspresse ederler. Bunlara ek olarak daha Ayrıca hücrelerin içindeki yağ miktarı daha az olup, daha küçük bir boyuta sahiptirler (Lepucki ve ark., 2022). Fenotipik olarak da fibroblastlara benzerlik gösterirler ve özellikle obez bireylerde yaşlanmış hücre özellikleri gösterirler.

ÜNMK TMÇ'sindeki proteinler ele alındığında, yumuşak bir yapıya sahip olan kolajen IV normal mikroçevreye nazaran daha az bulunmaktadır (Lepucki ve ark., 2022). Kolajen çapraz bağlanmasını sağlayan enzimin normalden fazla ekspresyonu ise fibriller kolajen miktarını artırmaktadır ve hücrelerin göçü için bir yol görevi yapabilmektedir.

Normal meme tümör mikroçevresinde de hemen hemen hiç bulunmayan osteonektin de ÜNMK'de yüksek miktarda eksprese olmaktadır. Artan ekspresyonun $\beta 4$ integrini aracılığıyla olduğu ve bu matriks proteinin ÜNMK hücrelerinin invaziv kapasitesini artırdığı gösterilmiştir (Lepucki ve ark., 2022). Periostin ise akciğer metastazını desteklemektedir. ve periostinin antikorlarla nötralize edilmesi akciğer metastazını azaltmıştır (Lepucki ve ark., 2022).

Akciğer metastazı ve diğer birçok tümör destekleyici etkiye sahip olan TMÇ'ye özgül bir başka matriks proteini ise TN-C'dir. Bu proteinin tümörlerde proliferasyon, metastaz, anjiyogeneze, immün kaçış ve kanser kök hücrelerinin sağkalımını desteklediği ortaya çıkmıştır (Naik ve ark., 2018). Bölüm 4.3.5.1.'de TN-C'nin meme kanserindeki rolü detaylı olarak tartışılmıştır.

Fibronektin de ÜNМК, ТМÇ'sinde bulunmaktadır ve özellikle metastaz için gerekli olan EMT tetiklemektedir.

4.2.2.2.4. Tedavi yaklaşımları

ÜNМК, endokrin ve HER2 hedefli tedavilere yanıt vermemektedir. Ancak, erken evrede yakalandığında diğer meme kanseri türlerine göre kemoterapiye daha çok yanıt vermektedir (Kumar, P. ve Aggarwal, 2016). Kansere karşı geliştirilen biyoteknolojik ilaçlar ve küçük moleküler ilaçlardaki hızlı gelişmelere rağmen, ÜNМК standart kemoterapi kürlerine eklenebilecek etkili ilaçlarda önemli bir artış görülmemiştir. ÜNМК'deki ilaç bazlı tedaviler antrasiklinler, taksan ve platinyum temelli kemoterapötikler gibi klasik ajanlarla yapılmaktadır.

Erken ÜNМК'de, eğer kemoterapi direnci yoksa, iyi bir terapötik yanıt alınabilmektedir. Ancak, ilerlemiş hastalığı olan ve tekrarlayan kanserlerde maalesef iyi bir yanıt alınamamakta ya da alınsa bile hastalık hızlıca ilerlemektedir.

ÜNМК agresif bir meme kanseri türü olduğundan dolayı genellikle rutin mamografi taramaları yapan bireylerde iki mamografi taraması arasında çıkmaktadır ve bu da erken tanıyı zorlaştırmaktadır. Böylece, çoğunlukla ilerlemiş evrede tanı konulan bu kanser türünde yenilikçi tedavi yaklaşımlarına ivedilikle ihtiyaç vardır.

ÜNМК'nin lokal tedavisinde tüm memenin alınması veya meme koruyucu cerrahi yaklaşımlar gerçekleştirilmektedir. Meme koruyucu cerrahi yaklaşımlar sonrası radyoterapi ile bölgede kalmış olabilen kanser hücreleri hedeflendirilmektedir. Klinik rehberler, meme koruyucu cerrahi tümör boyutunun 4 cm in altında olduğunda yapılmasını önermektedir (Kumar, P. ve Aggarwal, 2016). Neoadjuvan kemoterapi, cerrahi girişim öncesi tümör boyutunu küçültmeye yönelik olan ilaç tedavisidir. Tümör boyutu daha büyük olan durumlarda neoadjuvan kemoterapi ile tümör boyutu meme koruyucu cerrahiye olası kılan boyutlara getirilmeye çalışılmaktadır.

Radyoterapi de ÜNМК'deki lokal tedavinin bir parçasıdır. Radyoterapide amaç, iyonize edici radyasyon aracılığıyla hücrelerde geri dönülemez DNA hasarı yaratıp, hücre ölümünü tetiklemektir. Radyoterapi, özellikle meme koruyucu cerrahi sonrası, standart tedavinin bir parçasıdır. Total mastektomi sonrasında radyoterapi uygulanması tümörün evresine ve lenf bezi metastazının sayısını bağlıdır. Evre üç kanserler veya 4'ten fazla lenf bezi pozitifliğinde total mastektomi sonrası radyoterapi

uygulanmaktadır (He ve ark., 2018). ÜNМК’de radyoterapiye karşı gelişen ve/veya var olan direnç bu yaklaşımın terapötik etkinliğini önemli ölçüde azaltmaktadır.

ÜNМК kemoterapiye diğer meme kanseri türlerine kıyasla daha iyi yanıt verdiği görülmüştür (Bergin ve Loi, 2019). Kemoterapi yaklaşımları genelde art arda kullanılan antrasiklinler ve taksan kürlerinden oluşur (Bergin ve Loi, 2019). Doksorubisin ve epirubisin gibi antrasiklinler, hücrede DNA sarmallarının arasına girerek ve topoizomeraз II enziminin DNA çift sarmal kırıklarının tekrardan birleştirmesini engelleyerek DNA hasarına yol açar. Bu hasar sonucunda ise hücre ölümü tetiklenir.

Paklitaksel gibi taksanlar ise, hücre bölünmesinde kromozomların ayrışması için gerekli olan mikrotübül oluşumunu engelleyerek, mitozun gerçekleşmesini engeller ve mitotoksik etkiyle hücre ölümüne neden olur.

BRCA-1 mutasyonu taşıyan ÜNМК vakalarında sisplatin ve karboplatin gibi platinyum bazlı ajanlar da kullanılmaktadır. Platinyum tuzları DNA’ya bağlanarak çift sarmal kırıklarına yol açmaktadır ve BRCA-1 mutasyonunda DNA onarım mekanizmaları hatalı olduğu için kanserli hücre DNA hasarını onaramamakta ve böylece apoptoza gitmektedir (Kumar, P. ve Aggarwal, 2016). Yapılan bir çalışmada BRCA-1 mutasyonu taşıyan hastalarda sisplatinin kullanıldığında %70’inden fazlasında tam patolojik yanıt görülmüştür (Sikov ve ark., 2009).

Tekrarlayan ÜNМК’de maalesef terapötik başarı çok düşük olup, tedavi direnci sıklıkla görülmektedir. Bu gibi durumlarda genelde hedef hayatta kalım süresini uzatmak ve palyatif girişimler yapmaktır. Tekrarlayan ÜNМК’nin diğer meme kanseri türlerine göre prognozu daha maalesef daha kötüdür.

ÜNМК’de kullanılan hedefli terapiler anjiyogenezi, DNA onarım yollarını, büyüme faktörlerini ve histon deasetilazları hedefleyebilir (Medina ve ark., 2020). Anjiyogenezi VEGF’i bloklayan bevacizumab gibi monoklonal antikorlarla hedeflenebilmektedir. Metastatik ÜNМК’si hastalarda yapılan bir klinik deneyde hastalık ilerlemeden sağ kalımı bevacizumab önemli derecede artırdığı gösterilmiştir (Brufsky ve ark., 2012)

Metastatik ÜNМК’ye karşı kemoterapötik ajanların en yenisi ise Olaparib gibi poli (ADP-riboз) polimeraz (PARP) inhibitörleridir (Bergin ve Loi, 2019). PARP’lar tek sarmal DNA kırıklarını onarma da görev yapar. Bu inhibitörler, hücreleri hataya açık

DNA hasarı onarımına (NHEJ) yönlendirerek hücrede ölümcül mutasyonlar oluşturur (Patel ve ark., 2011).

ÜNMK diğer meme kanseri alt türlerine nazaran PD-1/PD-L1 ekspresyonu daha yüksek seviyededir. Böylelikle Pembrolizumab (PD-1'a karşı) ve atezolizumab (PD-L1'e karşı) gibi immün kontrol noktası inhibitörleri kullanılabilmektedir. Yapılan klinik deneylerde, bu antikorların antrasiklin ve taksanlarla beraber verildiği tedavi planlarında, tam yanıtın erken meme kanserinde %90 lara çıkabildiği gösterilmiştir (Bergin ve Loi, 2019). Tedavisi zor olan metastatik ÜNMK'de ise yapılan çoklu merkezli uluslararası bir klinik çalışmada (IMpassion), nab-paklitaksel atezolizumab kombinasyonunun sadece paklitaksel tedavisine kıyasla ilerleme olmadan hayatta kalımı uzattığı gösterilmiştir (Schmid ve ark., 2018). Bu klinik deneyin sonucunda atezolizumab ilerlemiş ÜNMK tedavisinde yer alması için onay almıştır. Hangi hasta grubunun immünoterapiye yanıt vereceğini tayin edebilmek, bu tedavi yaklaşımının başarısı için anahtardır. Şimdiye kadar yapılan araştırmalar, PD-1/PD-L1 ekspresyonunun ve TIL sayısının kısmen immün kontrol noktası inhibitörlerine karşı yanıtın belirteci olabileceğini göstermektedir (Bergin ve Loi, 2019).

4.3.Tenascin-C

TN-C, embriyonik yaşamda hücre ve doku gelişimi için önemli olan bir matrisellüler glikoproteindir. Bu molekül Tenascin ailesi glikoproteinlerinin ilk keşfedilenidir ve bu ailenin 4 üyesi arasında (Tenascin-R,-X ve W) üzerinde en çok araştırma yapılandır (Yoshida ve ark., 2022). TN-C'nin doğum sonrasında ekspresyonu çok kısıtlıdır. TN-C'nin sağlıklı dokulardaki sınırlı ekspresyonuna rağmen, tümörlerde, romatizmal hastalıklarda, enflamasyonda, doku hasarı ve onu takip eden fibrözde ekspresyonu hızlıca artmaktadır. Meme kanseri de dahil olmak üzere birçok tümörün TMÇ'sinde TN-C ekspresyonu görülmektedir ve bu molekülün immün kaçıştan metastaza birçok tümör destekleyici değişimleri tetiklediği gösterilmiştir.

4.3.1. TN-C geni

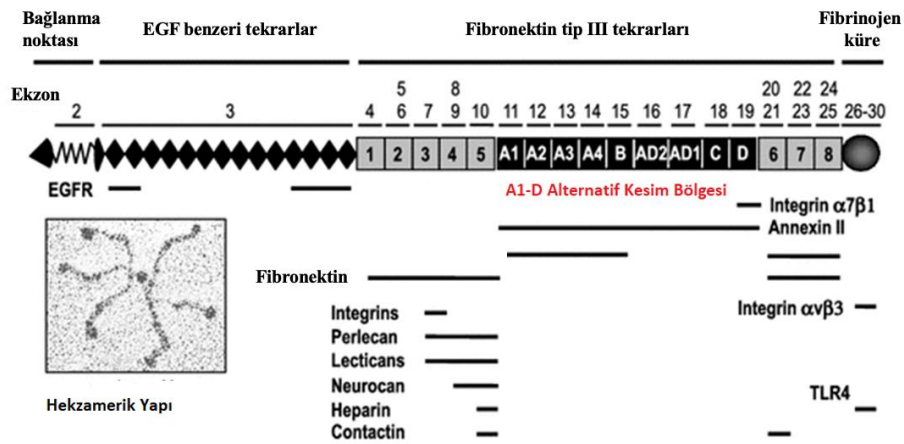
TN-C geni kromozom 9'da bulunan ve 28 ekzondan oluşan büyük bir gendir (Chiovaro ve ark., 2015). Bu gende tek açık okuma çerçevesi vardır. Ekzon 1 transkripsiyonu kontrol eden elementlerin bağlandığı bölge olup, translasyon sonrası oluşan proteinde yer almamaktadır. TN-C'nin gen dizisi türler arasında yüksek oranda homoloji göstermektedir ve fare ve insan TNC geni %99 oranında aynıdır (Orend ve Chiquet-

Ehrismann, 2006). TN-C'nin türler arasında korunması, bu molekülün önemli fizyolojik rolleri olduğuna işaret etmektedir.

TN-C geni ekspresyonu birçok farklı faktör tarafından tetiklenebilmektedir. Bunlar arasında, TGF- β ile indüklenen sinyal yolağıü efektör proteinleri olan SMAD2/3'ün TN-C promotörüne bağlanması vardır. PDGF de reseptörü aracılığıyla fosfatidil inozitol 3 kinaz (PI3K)/Akt sinyal yolağını aktive eder ve promotördeki E-26 transformasyonu spesifik proteini bağlanma noktalarına E-26 transkripsiyon faktörünün bağlanmasını sağlar (Chiovaro ve ark., 2015). Glukokortikoidler ise TN-C ekspresyonunu baskılamaktadır fakat henüz glukokortikoid reseptörlerinin gendeki bağlanma noktası bulunamamıştır.

4.3.2. TN-C'nin yapısı

TN-C, yaklaşık 300kDA ağırlığında büyük bir ESM molekülüdür ve heksamer oluşturarak aktif hale gelir (Orend ve Chiquet-Ehrismann, 2006). TN-C'nin birçok diğer matriks proteini gibi modüler bir yapısı vardır. Bu yapı, 4 bölgeye ayrılır; diğer TN-C molekülleriyle bağlanma noktası bulunan N terminali, 14 adet EGF-benzeri tekrar, fibronektin tip III-benzeri tekrarlar (en az 8 tekrar ve 9 alternatif kesim bölgesi) ve fibrinojen benzeri bir küre bulunan C terminali (Şekil 2). TN-C'nin her bölgesinin farklı moleküllerle bağlanabilmesi, TN-C'nin pleiotropik etkisi olmasını sağlamaktadır (Midwood ve ark., 2011).



Şekil 2. TN-C'nin modüler yapısı ve bağlandığı bazı moleküller (Midwood ve ark., 2011'den değiştirilerek kullanılmıştır)

Amino (N) terminalindeki sarmal motifi (yedili tekrarlardan oluşan), 3 TN-C molekülünün bir araya gelmesini sağlarken (trimerizasyon), bu bölgedeki sistinlerde

iki trimerin bağ oluşturarak hegzamer oluşumunun gerçekleşmesi sağlanır (Tucker ve Degen, 2022).

Fibronektin tip III benzeri bölgede, 5. ve 6. tekrarların arasında, alternatif uç birleştirme bölgeleri vardır ve potansiyel olarak 500'ten fazla, ağırlıkları 220-320kDA arasında değişen izoform oluşmasını imkan vermektedir (Lowy ve Oskarsson, 2015). TN-C'nin izoformları birbirlerinden bağlandıkları moleküller, translasyon sonrası modifikasyonları ve proteolitik bölgeleri açısından farklılık gösterebilir. Örneğin, MMP 2 FNIII A3 bölgesi olan izoformları kesebilir ve MMP2 tarafından yapılan bu proteoliziz, hücre ölümüne karşı direnci ve PDGF' e karşı yanıtı artırır (Lowy ve Oskarsson, 2015). Alternatif uç birleştirme, hücre yayılmasını tetikleyebilen gizli fibronektin ve heparan sülfat bağlanma bölgelerini de ortaya çıkarabilmektedir (Midwood ve ark., 2016).

Fibrinojen benzeri küre alanı içinde de 5 sitrülinsiyon bölgesi vardır ve sitrülinsiyonun, TN-C molekülünün immünojenitesini arttırdığı ve romatoid artritte olduğu gibi otoantikor oluşumu riskini arttırdığı gösterilmiştir (Lepucki ve ark., 2022).

4.3.3. TN-C'nin ekspresyon profili

TN-C ekspresyonu belirtildiği gibi embriyonik dönem ve postnatal dönemde büyük farklılıklar gösterir. Bu farklılıklar içerisinde TN-C miktarı, TN-C'nin eksprese olduğu dokular, TN-C'nin ekspresyon zamanı ve süresi vardır.

4.3.3.1. Embriyonik dönemde TN-C ekspresyonu

Embriyonik dönemde TN-C ekspresyonu oldukça yüksek ve yaygındır (Lepucki ve ark., 2022). Bu dönemde TN-C'nin vasküler, nöronal ve bağ doku morfogenezinde rol aldığı düşünülmektedir (Tucker ve Degen, 2022). TN-C hücre fenotipini büyüme faktörlerine hassasiyeti etkileyerek, hücre hareketini ve adezyonunu integrin gibi reseptörlere bağlanarak değiştirerek, kök hücreler için uygun bir niş oluşmasına aracı olarak ve hücre göçüne yön vererek değiştirdiği düşünülmektedir (Tucker ve Degen, 2022).

TN-C göç eden nöral krest hücrelerinin etrafında, epitel-mezenkimal etkileşimlerinde, merkezi sinir sisteminde gliyal öncül hücrelerin çoğaldığı bölgelerde ve kırık ve kemik gibi oluşmakta olan bağ dokularında eksprese olur (Giblin ve Midwood, 2018). TN-C knockout farelerde de sinir sistemi gelişiminde anormallikler ve yaralanma ve

fizyolojik strese verilen tepkileri azaldığı gösterilmiştir (Chiquet-Ehrismann, Ruth ve ark., 2014).

4.3.3.2. Doğum sonrası dönemde TN-C ekspresyonu

Doğum sonrasında TN-C ekspresyonu hızla düşmektedir. Normal fizyolojide genelde sadece tendon ve bağ dokuları gibi gerilme/tensil güçlere maruz kalan yapılarda ve yüksek miktarda hücre bölünmesi ve ölümü olan lenfoid organlarda (timüs, dalak, kemik iliği vb.) az miktarda bulunur (Tucker ve Degen, 2022). TN-C'nin lenfoid dokularda lökositlerin çoğalması ve farklılaşmasında da rol oynadığı düşünülmektedir. TN-C'nin ayrıca hematopoetik kök hücreler için kemik iliğinde olduğu gibi kök hücre nişinde, hücrelerin kök hücre karakteristiklerini devam ettirmesine olanak sağlayan önemli bir molekül olduğu düşünülmektedir (Chiquet-Ehrismann, Ruth ve ark., 2014). Buna uygun olarak, TN-C knockout farelerde de uzun vadede hematopoez kapasitesinde azalma görülmektedir (Orend ve Chiquet-Ehrismann, 2006).

Doğum sonrası dönemde TN-C ekspresyonun düşmesine GATA-6 transkripsiyon faktörünün yüksek ekspresyonu ile olduğu düşünülmektedir (Ghatnekar ve Trojanowska, 2008). Embriyonik yaşamda endodermal ve mezodermal kökenli yapıların oluşmasında önemli olan bu transkripsiyon faktörü, çoğunlukla embriyoda ektodermal (örn., sinir sistemi) yapılarda eksprese olan TN-C'yi baskılamaktadır.

4.3.3.3. Enflamasyonda TN-C ekspresyonu

Enflamasyon yanıtı vücuda hasar veren yabancı cisimlerden ya da steril enflamasyon denilen patojen kökenli olmayan doku travmalarından (örn. Işık hasarı) dolayı ortaya çıkabilir. Bu yanıt, bağışıklık sisteminin erken ve ilk evre yanıtları. Özellikle doğal bağışıklık hücreleri tarafından, patojen ve doku hasarı ile ilgili molekülleri TLR'lar enflamasyon yanıtının başlamasında önemli bir rol oynar.

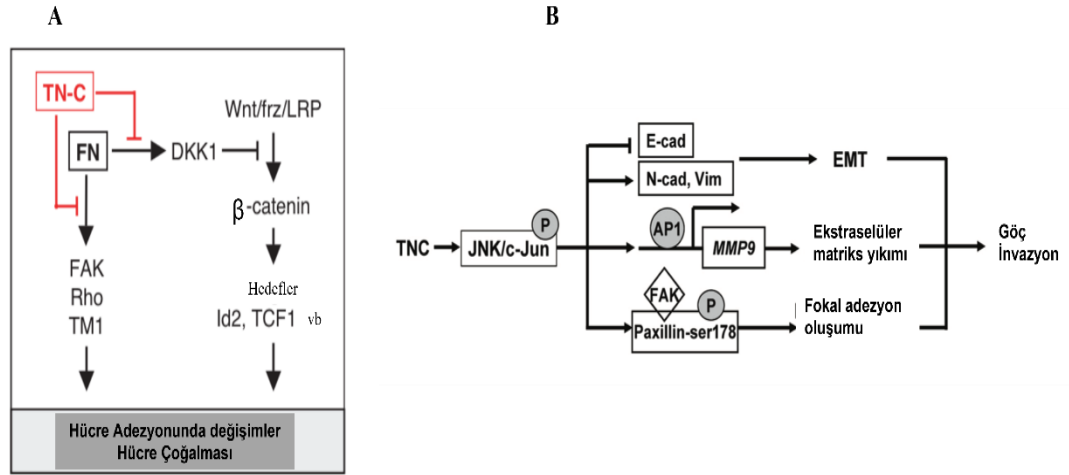
TN-C ekspresyonu da hem patojene bağlı hem de steril enflamasyonda yüksek miktarda artmaktadır (Midwood ve Orend, 2009). Yapılan araştırmalar, TN-C'nin C-terminalindeki küresel motif TLR-4'e bağlanarak, proinflatuar sitokinlerin salgılanmasını tetiklediğini göstermiştir (Tucker ve Degen, 2022). Bundan dolayı da TN-C'nin tehlikeyle ilintili moleküler patern moleküllerinden olabileceği de öne sürülmüştür (Deligne ve Midwood, 2021). Böylece, TN-C'nin enflamasyon yanıtını tetiklediği ortaya çıkmıştır.

Enflamasyon bölgesindeki TN-C ekspresyonu enflamatuvar sitokin TNF- α ve özellikle TGF- β aracılığıyla olabilmektedir. Örneğin, enflamasyonlu eklemlerde, TN-

C'nin ekspresyon paterni, TGF- β 'nin ekspresyon bölgeleriyle birebir örtüşmektedir (Hasegawa ve ark., 2020). Serumdaki TN-C seviyelerinin, sepsis gibi aşırı enflamatuvar yanıtı görülen durumlarda yüksek olduğu gösterilmiştir (Meijer ve ark., 2020). TN-C ekspresyonu kalp hasarını takip eden enflamatuvar yanıtta da görülür ve ekspresyonunun seviyesi kötü prognoz için bir biyobelirteçtir (Bergin ve Loi, 2019; Midwood ve ark., 2011). TN-C'yi aşırı eksprese eden farelerde proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin (örn. IL-1 β , IL6 ve CCL1) ekspresyonunu arttığı, tekrardan modelleme enzimi olan MMP-9'un da daha fazla eksprese edildiği ve bununla birlikte miyokardiyal infarktüs sonrasında akut dönemde ölümün enflamatuvar yanıtta dolayı daha çok olduğu gösterilmiştir (Yonebayashi ve ark., 2021).

4.3.4. TN-C'nin etkileri

TN-C, birçok reseptör ve molekülle bağlanabilmesi geniş spektrumlu etkilere sahip olmasını sağlamaktadır. Tam olarak görevleri ve bunlarla ilişkili mekanizmalara açığa çıkmasa da eksprese olduğu dokularda hücrelerin, ESM ögeleri ile ilişkisini değiştirerek adezyonu, hücre farklılaşmasını, proliferasyonunu ve hücre göçünü etkilediği düşünülmektedir (Şekil 3). TN-C'nin hücreler üzerindeki etkisinin hücre tipine ve mikro çevreye göre değişmektedir (Chiquet-Ehrismann, Ruth ve ark., 2014). TN-C ekspresyonu, enflamasyon, yara ve kanser gibi artan fizyolojik ihtiyaçlar durumlarında artmaktadır. Bundan dolayı ise TN-C fizyolojik strese ortaya çıkan bir proteini olarak görülmektedir (Chiquet-Ehrismann, Ruth ve ark., 2014). Bu sava uyumlu olarak 5-florourasil muamelesi ile indüklenen hematopoetik kök hücre aktivasyonu ve stres tepkisi, TN-C knockout farelerde azalmaktadır (Lowy ve Oskarsson, 2015). Böylece, TN-C yara iyileşmesinde de gerekli olan hücre göçü, hücre çoğalması ve anjiyogenez gibi işlevlerde görev alır.



Şekil 3. TN-C ilişkili sinyal yolları. **A.** TN-C fibronektin (FN)'nin fokal adezyon kinazını aktive etmesini engelleyerek hücre adezyonunu değiştirir. Wnt/β-catenin yolağında, inhibitör Dickkopf-ilişkili protein 1 (DKK1) i inhibe ederek, Wnt/β-catenin yolağının aktif olmasını sağlayarak hücre çoğalmasını tetikler (Orend ve Chiquet-Ehrismann, 2006'den değiştirilerek kullanılmıştır). **B** TN-C JNK/cJun yolağını aktive ederek epitel-mezenkimal geçiş için cadherin değişimini sağlar, MMP'leri aktive ederek matriksin yıkılmasına yardımcı olur ve Paxillini artırarak Fokal adezyon kinazına bağlanmasını ve böylece hücre motilitesine yardımcı olan tipte fokal adezyonun oluşmasını sağlar (Cai, J. ve ark., 2017).

4.3.4.1. Hücre adezyonu

TN-C, hücrelerin ESM'ye olan etkileşimlerini değiştirici özelliğe sahiptir. TN-C'nin en bariz etkilerinden biri ise fibronektin aracılı hücre adezyonunu engellemesidir. Fibronektin, heparan sülfat proteoglikan reseptörü sindekan-4'e bağlanarak hücre-ESM tutunmasını sağlar ve hücre hareketini engeller. TN-C ise fibronektindeki sindekan-4 bağlanma motifine bağlanarak, sindekan-4 ve fibronektin arasındaki ilişkiyi kesmektedir (Huang, W. ve ark., 2001). Böylece fokal adezyon komplekslerine sindekan-4'ün gelmesini engeller. Fokal adezyon kompleksleri, hücre-ESM arasındaki iletişimi sağlayan integrin içeren, mekanik ve kimyasal mesajların iletildiği büyük moleküler komplekslerdir. Sindekan-4'ün fokal adezyon kompleksinde olmaması, hücrelerin nokta bağlarını azaltır, fokal adezyon kinazının, Rho ve tropomiyosinin ekspresyonunu azaltır (Midwood ve Orend, 2009). Rho, fokal adezyon kompleksinin oluşmasında görev alan önemli GTPaz ailesidir. Fokal adezyon kinazı ise hücre yüzeyindeki integrine ligand bağlanması sonucu gelişen hücre içi değişikliklere aracı olur. Böylece TN-C varlığında, ESM-hücre arasındaki bağlantı hem fiziksel hem de biyokimyasal olarak azalır. TN-C sadece hücre adezyonunun azalmasını değil, hücre motilitesinin artmasını da sağlar. Bunu ise tropomiyosin 1'i azaltarak yapar (Tucker

ve Degen, 2022). Hücre iskeletinde böylece aktin miktarını artırarak, motiliteyi destekler.

TN-C ayrıca EMT’de de rol oynar. EMT esnasında hücreler, epitel özelliklerini kaybeder ve daha fazla mezenkimal fenotip kazanır. EMT, E-cadherin kaybı ve N-cadherin ekspresyonunun artması ('cadherin değişimi') ve ayrıca vimentin, fibronektin, α SMA ekspresyonu ve MMP'lerin aktivasyonu ile karakterizedir (anoikisi). EMT embriyogenezde (tip 1) ve doku rejenerasyonunda (tip 2) doğal bir süreçtir. Ancak kanserde invazyon ve metastaz ile ilişkili patolojik EMT programı, EMT tip 3’tür (Singh, M. ve ark., 2018). EMT temel olarak SNAIL, TWIST ve zinc-finger E-box-binding (ZEB) transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir (Singh, M. ve ark., 2018). ZEB de TGF- β yolağında bulunan R-SMAD'a bağlanma bölgeleri içerir. Ayrıca ZEB, her ikisi de TN-C tarafından indüklenebilen Notch ve Wnt proteinleri tarafından aktive edilebilir.

TN-C bulunduğu mikroçevreye ve hücre tipine göre hücre adezyonunu da destekleyebilmektedir. TN-C özellikle yüksek afinite ile bağlandığı α 9 β 1’i ekspresyen hücrelerde ESM ile olan bağları güçlendirmektedir. Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücre nişinde de TN-C’nin kök hücrelerin kemik iliği stromasına bağlanmasını sağladığı gösterilmiştir (Chiquet-Ehrismann, Ruth ve ark., 2014).

4.3.4.2. Hücre proliferasyonu

TN-C hücre proliferasyonu büyüme faktörü miktarını ve onlara olan hassasiyet derecesini değiştirerek tetikleyebilir (De Laporte ve ark., 2013). Ayrıca Wnt/ β -katenin yolağını da aktive ederek kök hücre devamlılığını ve/veya kök hücre oluşmasını destekleyerek de proliferasyonu artırabilir (Tucker ve Degen, 2022).

TN-C ile etkileşimi olan büyüme faktörlerine örnek olarak PDGF verilebilir. Önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi PDGF, TN-C ekspresyonunu tetikleyebilmektedir. İlginç olarak, TN-C’ ise PDGF ekspresyonunu tetikleyerek, pozitif bir döngü oluşmasını sağlamaktadır (Primac ve ark., 2019). TN-C, PDGF reseptörünün α v β 3 ile bağlı kalma süresini uzatarak, bu reseptörden daha uzun süre boyunca sinyal iletilmesini sağlar ve böylece hücrelerin PDGF hassasiyetini artırır (Primac ve ark., 2019). Bu sinyal yolağı ise Ras/MAPK’i aktive ederek hücre proliferasyonu destekler. Wnt/ β -katenin yolağı özellikle kök hücrelerin çoğalması ve kök hücre özelliklerini devam ettirebilmesi için önemli bir yoldur. TN-C’nin Dickkopf-ilişkili protein 1’i

inhibe ederek Wnt- β katenin eksenini aktive eder. Bu aktivasyon ise hücre döngüsünde G1 fazından S fazına geçişte önemli olan siklin D1 ve c-myc i ederek hücre proliferasyonun artmasını sağlar (Midwood ve Orend, 2009).

4.3.4.3. Anjiyogenez

TN-C'nin anjiyogenez destekleyici bir rolü vardır. Bu protein etkisini endotel hücrelerini etkileyerek göstermektedir. TN-C ve anjiyogenez arasındaki mekanizmasal bağlantılardan biri ise TN-C'nin, VEGFA ekspresyonunu $\alpha\beta 3$ 'e bağlanarak dolaylı olarak indüklemesidir (Orend ve Chiquet-Ehrismann, 2006). İnsan umbilikal ven endotel hücreleri ile yapılan bir araştırmada, TN-C'nin bu hücrelerin proliferasyonu, göçünü ve tübül oluşturması üzerinde pozitif bir etkisi olduğunu gösterilmiştir (Wang ve ark., 2019). Hücrelerin içinde oldu besiyerde TN-C miktarının azaltılması, insan umbilikal ven endotel hücrelerinin kılcal damar benzeri yapıların oluşturmasını %60 azaltmıştır (Wang, G. ve ark., 2019). İskemik proliferatif retinopatilerde yapılan bir araştırmada da retinal ayrılma ve körlüğe yol açabilen anjiyogenezin TN-C ve periostin aracılığıyla tetiklendiğini göstermiştir (Kubo ve ark., 2020).

4.3.5. Kanserde TN-C

Kanser, 1986'da Harold F. Dvorak tarafından 'iyileşmeyen' yara' ya benzetmiştir (Dvorak, 1986). Bu tanımla Dvorak, kanser oluşumu ve yayılmasını sağlayan mekanizmaların aslında yara iyileşmesindekilerle (enflamasyon, anjiyogenez, göç ve proliferasyon) benzer olduğunu ve sadece kanserde, bu yanıtın susturulmadan sürekli olarak aktif olduğunu öne sürmüştür. TN-C'de yara iyileşmesinde rol oynayan bir protein olarak, birçok farklı kanser türünde ekspresyonunun arttığı ve tümör destekleyici etki gösterdiği saptanmıştır (Ming ve ark., 2019). Bu proteinin kanserde proliferasyon, EMT, metastaz, anjiyogenez, immün kaçış ve kanser kök hücrelerinin hayatta kalmasını desteklediği gözlemlenmiştir (Naik ve ark., 2018).

TN-C'nin kanserlerde bulunan başlıca izoformu, genelde kesilmemiş uzun izoformudur (Adams ve ark., 2002). Tümörlerdeki TN-C'nin kaynağı hem KİF'ler hem de tümör hücrelerinin kendileri olabilmektedir. Ayrıca endotel hücreleri, patolojik anjiyogenezde TN-C'yi eksprese edebilir. Kanserde TN-C artışı, TNF- α ve interferon gamma (IFN- γ gibi sitokinler ve TGF β ve EGF gibi büyüme faktörleri aracılığıyla gerçekleşebilmektedir (Midwood ve Orend, 2009) Ayrıca, hipoksi ve artan reaktif oksijen türleri de TN-C ekspresyonun indüklemektedir (Midwood ve Orend, 2009).

TN-C ekspresyonunun mekanik stresle de arttığı özellikle kalp üzerinde yapılan araştırmalar da gösterilmiştir (Primac ve ark., 2019). Sertleşen tümörle ilintili ESM de mekanik stres yaratarak, TN-C ekspresyonunu artırmaktadır (Midwood ve Orend, 2009).

TN-C ekspresyonu, meme kanseri, pankreas kanseri ve glioblastoma multiforme, gibi 14 kanser türünde kötü prognozla ilişkilidir (Guan ve ark., 2014; Ming ve ark., 2019).Yapılan bir meta analizde, TN-C ekspresyonun seviyesinin lenf bezi metastazı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ming ve ark., 2019). Hem meme kanserinde hem de melanomada, TN-C ekspresyonunun akciğer metastazına neden olduğu saptanmıştır (Midwood ve ark., 2011; Oskarsson ve ark., 2011) . TN-C'nin metastazdaki rolüne işaret eden bir başka kanıt ise TN-C'nin tümör ve stromada eksprese olduğu bölgedir; meme kanseri, akciğer mezotelyumu, kolanjiyokarsinom ve kolorektal kanserlerde TN-C ekspresyonu invaziv bölgede görülmesidir (Lowy ve Oskarsson, 2015). TN-C, Wnt yolağını aktive etmesi, ZEB'in aktivasyonunu sağlamaktadır (Singh, M. ve ark., 2018) (Singh vd.,2018). ZEB ise bu geçisin önemli işaretçilerinden biri olan cadherin değişimini gerçekleştirerek kanser hücrelerinin yayılmasını desteklemektedir.

TN-C, tümör oluşumu ve dağılmasında önemli rol oynayan anjiyogenezi de indüklemektedir (Orend ve Chiquet-Ehrismann, 2006). TN-C, tümör damarlarında hücre tomurcuklanmasını ve VEGF-A yanıtı desteklemektedir (De Laporte ve ark., 2013; Orend ve Chiquet-Ehrismann, 2006). AngioMatrix imzası; pankreatik nöroendokrin kanserinde anjiyogenezi başlatan matrizom genlerinin tümüne verilen isimdir ve TN-C'de bu grupta yer almaktadır (Gocheva ve ark., 2017). TN-C ve kanser ilişkisi üzerine araştırmaların en ileri seviyede olduğu kanser tipi gliomalardır ve özellikler de glioblastoma multiformedir. Gliomada yapılan bir araştırmada TN-C'nin vaskülojenik taklitte de görev aldığını göstermiştir. Vaskülojenik taklit, kanser hücrelerinin endotel hücrelerden bağımsız olarak damar benzeri yapılar oluşturarak, besin ve oksijen temin etmesine verilen isimdir (Cai, H. ve ark., 2019). Bu taklit, kanserde genelde kötü prognozla ilişkili olup, kanser hücrelerinin bevacizumab gibi anti-anjiyogenik tedavilere yanıt vermeme riskini artırır. TN-C, gliomada vaskülojenik taklitle, Akt forsilasyonunu artırarak ve böylece MMP2 ve 9 ekspresyonunun tetikleyerek destek verdiği gösterilmiştir (Cai, H. ve ark., 2019).

TN-C'nin, kanseri oluşturan ve hayatta tutan esas hücreler olarak görülen kanser kök hücrelerinin de hayatta kalımının ve kök hücre özelliklerini desteklediği gösterilmiştir (Nallanthighal ve ark., 2019; Yang, Z. ve ark., 2020). Glioblastomada, TN-C ekspresyonunun kanser kök hücrelerinin yenilenmesinin devam ettirilmesi ve TN-C'nin baskılanmasının ise hücre plastisitesini düşürdüğü gösterilmiştir (Angel ve ark., 2020). TN-C ekspresyonunun azaltılması ayrıca hücrelerin in vivo tümörijenik potansiyelini de düşürdüğü ortaya çıkmıştır. (Angel ve ark., 2020).

TN-C T hücrelerinin tümöre ulaşmasını, proliferasyonunu ve sitokin salınımını engelleyerek kanserdeki immün baskılanmasına katkıda bulunmaktadır (Puente Navazo ve ark., 2001). Prostat kanserinde, TN-C'nin, yayılan kanser hücrelerini yeni metastatik nişte immün yanıtı koruduğu gösterilerek aynı anda hem immüno-supresyona hem de metastaza katkısı olduğu saptanmıştır (Jachetti ve ark., 2015) Oral skuamöz karsinomada da TN-C'nin immüno-supresif bir stroma oluşumuna regülatör T hücrelerini bölgeye çekerek ve bağışıklık yanıtı baskılayıcı sitokin ve matriks moleküllerini artırarak neden olduğu gösterilmiştir (Spennlé ve ark., 2020). Akciğer kanserinde, TN-C'nin TIL proliferasyonunu ve efektör sitokin sekresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Parekh ve ark., 2005). TN-C izoformları da immün kaçış üzerinde farklı etkiler gösterebilmektedir. Örneğin, FNIII 1-5, T hücrelerinin $\alpha 5\beta 1$ ve $\alpha 4\beta 1$ tarafından fibronektin aracılığıyla bağlanmasını bloke eder, buna karşın FNIII A-D bölgesi ise (sıklıkla tümör stromasında bulunur) T hücre aktivasyonunu durdurur (Orend ve Chiquet-Ehrismann, 2006). Prostat kanserinde, TN-C'nin yayılmış kanser kök hücrelerini yeni metastatik nişte immün yanıtı koruduğu da gösterilmiştir (Jachetti ve ark., 2015).

TN-C'nin ayrıca tedavi direncinde de rolü vardır. Örneğin, glioblastoma hücrelerinin paklitaksel duyarlılığını engellediği gösterilmiştir (Zhang, Q. ve ark., 2021). In vitro glioblastoma hücre hatları üzerinde yapılan bu deneylerde, TN-C'nin kemodirenci PI3K/Akt sinyal yolağını aktive ederek ve apoptozu engelleyerek sağladığı ortaya çıkmıştır.

TN-C böylece kanserin oluşması, çoğalması ve yayılması için birçok mekanizmada doğrudan görev yapmaktadır. TN-C'nin çoklu mekanizmalarla desteklediği kanser türlerinden biri de meme kanseridir.

4.3.5.1. Meme kanserinde TN-C

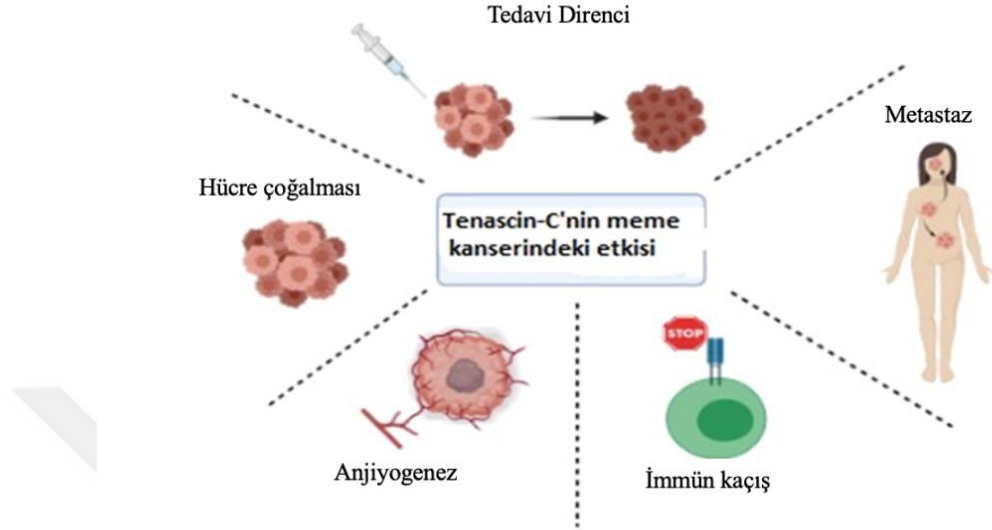
Meme kanserinde sıklıkla ekspresyonu beliren ve/veya artan moleküllerden biri de TN-C'dir. TN-C normal meme bezinde çok düşük miktarda ya da hiç bulunmamasına rağmen, meme karsinomunda hem stroma hem de kanser hücreleri tarafından üretilerek yüksek miktarda bulunmaktadır (Lightner ve ark., 1994; Maschler ve ark., 2004). TN-C, KİF ile ilintili α SMA ekspresyonunu α 5 β 1 integrini aracılığı ile insan meme fibroblastlarında artırmaktadır ve böylece myofibroblastik KİF oluşumunu desteklemektedir (Kato ve ark., 2020). İlginç olarak, TN-C TGF- β sinyal yolağında yer alan ve TN-C salınımı tetikleyen SMAD2/3, bu fibroblastalarda TGF- β olmadan, tek başına aktive edip, daha fazla TN-C salgılanmasını tetiklediği gösterilmiştir.

Otofaji defekti olan ÜNMK'de, TN-C ekspresyonu daha sıklıkla görülmektedir. Otofaji hücre içi yapı ve proteinlerin, lizozomal bazlı yıkımını gerçekleştirerek, hücrel yapıtaşlarının geri dönüşümünü ve aynı zamanda hasarlı organellerin hücreden temizlenmesini sağlar. ÜNMK'de, otofagozom markeri olan LC3B daha az ekspresye olur ve azalan otofaji ile, TN-C yıkımı daha az gerçekleşir ve böylece TN-C etkileri daha çok görülmektedir (Li ve ark., 2020)

TN-C'nin meme kanserinde proliferasyon, metastaz ve anjiyogenez gibi birçok önemli prosesi etkilediğini gösteren çalışmalar vardır (Şekil 4). Meme kanserinde yüksek TN-C ekspresyonu, lenf bezi metastazı, fazla damarlanma ve erken invazyonla ilişkilidir (Hielscher ve ark., 2012). İnsan meme karsinom örneklerinde yapılan bir başka araştırmada ise TN-C, tümör evresi ve lenf bezi metastazıyla pozitif ilişkili bulunmuştur (Yang ve ark., 2017). Primer meme kanseri stromasındaki TN-C ekspresyonunun, tümör büyüklüğü, tümör derecesi ve evresiyle istatistiki olarak anlamlı bir ilişki gösterdiği de ortaya koyulmuştur (Suwihat ve ark., 2004). Bu sonuçları destekleyen birçok diğer araştırma stromadaki TN-C pozitifliğine, kanser hücrelerindeki TN-C pozitifliği de eklendiğinde prognoz daha da kötüleştiğini yönündedir (Ishihara ve ark., 1995; Tókés ve ark., 2000).

Yapılan yeni bir araştırmada, meme kanseri dokularında normal dokudan farklı eksprese olan genlerin gösterildiği mikroyarray verileri biyoinformatik yöntemlerle analiz edilmiştir. Bu analizde TN-C'nin bu proteinlerin başında geldiği ve kanserle ilişkili birçok değişiklikte, diğer proteinlerle etkileşime girerek merkezi bir görev oynadığı gösterilmiştir (Rahimmanesh ve ark., 2022). Bu araştırmada, TN-C'nin etkileşime girdiği proteinlere gen ontolojisi analizi yapıldığında bu proteinlerin hücre

stres yanıtı, ESM düzenlenmesi, PI3K/Akt sinyal yolağı, hücre proliferasyonu ve adezyon modifikasyonunda yer aldığı görülmüştür.



Şekil 4. TN-C'nin meme kanserindeki rolü (BioRender kullanılarak çizilmiştir)

4.3.5.1.1. TN-C'nin meme kanseri hücrelerinin çoğalmasındaki rolü

TN-C'nin meme tümörün gelişmesini ve yayılmasını sağlamak için tümörle ilişkili stromanın yeniden yapılandırılmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Guttery ve ark., 2010). Normal insan meme epitel hücrelerinin üç boyutlu kültürlerine TN-C eklenmesinin, bazal membran bütünlüğünü etkilediği, epitel doku yapısını değiştirdiği ve epitel hücre proliferasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Taraseviciute ve ark., 2010).

TN-C meme kanserinin büyümesinde rol oynayan integrinlerle bağlanmakla kalmayıp, ayrıca EGF reseptörlerinin lokalizasyon ve aktivitesini değiştirerek de etkisini gösterebilmektedir (Maschler ve ark., 2004). TN-C, hücrelerde proliferatif ve anti-apoptotik etkilere, EGF-benzeri bölgesiyle büyüme faktörü reseptörlerine bağlanarak ve ERK/NF- κ B yolağını aktive ederek yol açabilir. TN-C ayrıca siklin D1 ve c-myc ekspresyonunu da artırarak meme epitel hücrelerinde çoğalmaya neden olmaktadır (Jones, 2001). Siklin D1, daha sonra G1/S geçişini sağlamak için E2F'yi retinoblastom proteininden serbest bırakmak için siklin bağımlı kinaz-4 ile kompleks oluşturur ve hücre döngüsünün devamlılığını sağlar (Cai, J. ve ark., 2018). TN-C'nin mitojenik etkisi, bu proteinin invaziv karsinomlarda Ki-67 ile beraber boyanması ile de desteklenmektedir (Vollmer, 1997).

Önceki bölümlerde de belirtildiği gibi Wnt ve Notch yolları üzerindeki etkisi aracılığıyla, TN-C meme kanseri kök hücrelerinin hayatta kalmasına ve çoğalmasına yardımcı olmaktadır ve TN-C'nin nüks riskini artıran moleküler değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir (Lepucki ve ark., 2022).

4.3.5.1.2. TN-C'nin meme kanseri metastazındaki rolü

Metastaz, meme kanseri ilintili ölümlerin %70'ten fazlasına neden olmaktadır (Dillekås ve ark., 2019). Metastaz birden fazla basamaktan oluşup, hücrelerin primer tümör bölgesinden EMT aracılığıyla çevre dokulara invazyon gerçekleştirerek damarlara ulaşması, damarlarda hayatta kalması, metastatik bölgede damardan çıkıp, yeni bölgede hayatta kalarak kolonizasyon gerçekleştirmesi gerekmektedir. Bu zorlu adımlarda, TN-C meme kanserinin hayatta kalması ve motilitesi için yardımcı olmaktadır. İnsan normal meme ve meme kanseri dokuları üzerinde yapılan araştırmada, intradüktal karsinomda metastaz riskiyle ve TACS 3'le ilişkili TMÇ proteinlerinden biri de TN-C'dir (Tomko ve ark., 2018).

TN-C ekspresyonunun pre-invaziv meme lezyonlarında erken invazyonunun belirteci de olduğu gösterilmiştir (Jones, 2001). MCF7 meme kanseri hücre hattı üzerinde yapılan bir araştırma ise, tümör hücreleri tarafından salgılanan TGF- β 'nın fibroblastlar tarafından TN-C üretilmesini sağladığı ve bu TN-C'nin de hücreler arası bağları ve hücre-substrat arasındaki bağların azalmasına neden olduğunu ortaya koyulmuştur (Chiquet-Ehrismann ve ark., 1989). Fare meme bezi hücreleri üzerinde yapılan başka bir çalışma ise, TN-C'nin fibronektine bağlanan küre şeklindeki bölgesinin, latent TGF- β ya bağlanarak, bu molekülü aktive ettiği ve bunun da SMAD 2/3 fosforilasyonuna yani aktivasyonuna neden olduğunu göstermiştir (Aubert ve ark., 2021). Yukarıda da bahsedildiği gibi SMAD2/3 ise EMT'de önemli olan ZEB transkripsiyon faktörünü aktive ederek invazyon için gerekli EMT mekanizmalarının (örn. Cadherin değişimi) gerçekleşmesini sağlamaktadır.

TN-C'nin meme kanserinde EMT'yi etkilediği bir başka mekanizma ise TGF- β tarafından da tümörlerde ekspresyonu artan integrinlere ($\alpha\beta6$ ve $\alpha\beta1$) bağlanmasıdır. Bu integrinleri nötralize edici antikörler kullanıldığında, TN-C aracılı EMT'nin MCF-7 hücrelerinde gerçekleşmemektedir (Katoh, D ve ark., 2013). Fare meme kanseri modelinde de KİF'lerde, PDGF reseptörü- β aracılığıyla aktive olan JNK yolağının TN-

C üretimine neden olmasının tümör invazyonuna yardımcı olduğu görülmüştür (Primac ve ark., 2019).

Klinik verilere de bakıldığında, yüksek TN-C ekspresyonu olan meme kanseri hastalarının akciğer metastazı olmadan hayattan kalımlarının daha az olduğu gösterilmiştir (Insua-Rodríguez ve ark., 2018).

Yayılan meme kanseri hücreleri tarafından otokrin şekilde salgılanan TN-C'nin, akciğer dokusundaki metastatik nişte hücrelerin canlılığını sağladığı ve böylece meme kanserinin akciğere yayılımını mümkün kıldığı gösterilmiştir (Oskarsson ve ark., 2011). Aynı araştırmada, TN-C'nin erken dönemde susturulmasının akciğere yayılımı önlediği rapor edilmiştir (Oskarsson ve ark., 2011). Yeni metastatik nişte KİF'ler oluşana ve TMÇ şekillenene kadar, TN-C'yi otokrin salgılayan kanser hücreleri, bu molekülün sağladığı hayatta kalım mekanizmalarından yararlanabilmektedir. Bu hayatta kalım özellikle Wnt yolağını lösinden zengin tekrar içeren G-proteini ilişkili reseptör LRG5 ekspresyonunu artırarak aktive ederek gerçekleştirmektedir (Urooj ve ark., 2020). TN-C ayrıca, musashi homolog 1'i de JAK2-STAT5 eksenini tarafından inhibe edilmekten korur ve bu da yayılmakta olan meme kanseri hücrelerinin Notch yolağı aracılığıyla hayatta kalımına yardımcı olur (Urooj ve ark., 2020).

Diğer meme kanseri altitplerinde en sık görülen metastaz kemiklerde iken, ÜNMK'de akciğerlerdir. Farelerde yapılan bir araştırmada ÜNMK hücre hattı ile oluşturulan tümörlerde akciğer dokusunda TN-C ekspresyonunun arttığı fakat HER2+ meme kanseri hücreleri ile oluşturulan tümörlerde bu artışın görülmediği saptanmıştır (Medeiros ve ark., 2020). Diğer meme kanseri alt tipleri arasında TN-C ekspresyonunu en çok ÜNMK'de olduğu da ele alınırsa, bu meme kanseri tipinin akciğere metastaz sıklığında TN-C'nin potansiyel bir rolü olması oldukça olasıdır.

Fare spontan meme kanseri modelinde yapılan bir araştırmada ise stromadan gelen TN-C'nin apoptozu azaltıp, akciğer kan damarlarının invazyonu için gerekli hücresel plastisiteye katkıda bulunduğu ve böylece akciğere metastazı desteklediği gösterilmiştir (Sun ve ark., 2019).

MikroRNA'ların (miRNA), mRNA'ların 3' transkripsiyon olmayan bölgelerine bağlanarak, Messenger RNA'ların (mRNA) transkripsiyondan önce yıkımını sağlar. Tek bir miRNA çok sayıda insan geninin ekspresyonunu düzenlemektedir. Çoklu geni aynı anda etkileyebilen miRNA'lar da kanserlerde değişiklik göstermektedir. Yapılan bir

araştırmada da tümör baskılayıcı miRNA-335'in metastaz ve göçü, SOX4 ve TN-C'yi baskılayarak önlediği bulunmuştur (Tavazoie ve ark., 2008). Matriks yıkımında yer alan ve böylece metastatik meme kanseri hücrelerinin göç edebilmesi için 'yolu açan' MMP 9 ve 13'te TN-C tarafından aktive edilmektedir (Lepucki ve ark., 2022).

Böylece, TN-C'nin meme kanseri yayılmasında, özellikle de akciğer metastazında önemli bir rol oynadığı görülmektedir.

4.3.5.1.3. TN-C'nin meme kanseri anjiyogenezindeki rolü

TN-C'nin anjiyogenez üzerindeki etkisi ise, endotel hücre göçünü ve mitogenezini, ve büyüme faktörü-bağımlı endotel-tomurcuğunun oluşup uzamasını destekleyerek ortaya çıktığı gösterilmiştir (Jones, 2001). İnvaziv duktal meme karsinoma örnekleri üzerinde lazer mikro-diseksiyonuyla yapılan bir araştırmada tümör damarlarında TN-C'nin malignant olmayan komşu dokulara nazaran ekspresyonunun yüksek olduğu gösterilmiştir (Midwood ve ark., 2011).

TN-C meme kanserinde akciğer metastazını anjiyogenez ve endotel hücreleri etkileyerek de destekler. TN-C bu konuda özellikle akciğerlerde pro-metastatik damar nişi oluşumuna yardım etmektedir. Farelerde yapılan araştırmada, TN-C'nin fibrinojen benzeri küre bölgesi ile TLR-4'e bağlanmasının, perivasküler makrofajların aktivasyonuna neden olduğu ortaya çıkmıştır (Hongu ve ark., 2022). Aktive olan bu makrofajlar ise, nitrik oksit ve TNF salgılayarak, endotel hücrelerin de meme kanseri hücrelerinin hayatta kalımını ve metastaza verimli damar nişinin oluşumuna katkıda bulunan proteinler salgılamasını sağlarlar (Hongu ve ark., 2022). Endotel hücreler üzerindeki bu etkilerin VEGF'den bağımsız olması VEGF bazlı anti-anjiyogenik tedavilerin terapötik başarısını etkileyebilmektedir. Aynı araştırmada hem makrofaj hem de VEGF aracılı anjiyogenez etkilerinin aynı anda engellenmesinin, akciğer metastazını durdurabildiği gösterilmiştir (Hongu ve ark., 2022).

4.3.5.1.4. TN-C'nin meme kanserinde immün baskılamadaki rolü

TN-C'nin, meme kanserine bağışıklık yanıtını baskılayarak da destek verdiği gösterilmiştir. TN-C miktarı, CD8+ TIL miktarıyla ters orantılıdır (Murdamoothoo ve ark., 2021). Özellikle üçlü negatif meme kanserinde, TN-C'nin T hücre bazlı immünoterapilerin başarısız olmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 2020). Yapılan bir araştırmada, üçlü negatif meme kanserinde otofaji eksikliği aracılı immün baskılamaya aracı olan molekülün TN-C olduğu ortaya çıkmıştır (Li ve ark., 2020). Böylece, TN-C ekspresyonunun azaltılmasının, diğer bazı organ/doku tümörlerde

yüksek etkinlik gösteren immün kontrol noktası inhibitörlerle tedavilerin başarısını artırabileceği de gösterilmiştir.

Fare meme kanseri modelindeki çalışmada TN-C'nin CXCL12 aracılığıyla CD8+ T hücrelerine bağlanarak, T hücrelerinin tümöre ulaşmasını, onları matrikste hareketsiz hale getirerek engellediği görülmüştür (Murdamoothoo ve ark., 2021). TN-C, T hücrelerini hücre iskeletlerini etkileyerek de tümöre ulaşmalarını engelleyebilir. T hücrelerinin yüzeyindeki β integrinlere bağlanan TN-C, Rho GTPazının aktivasyonunu engelleyip, T hücrelerinin tümöre ulaşması için gerekli motiliteyi verecek değişikliklerin hücre iskeletinde (aktin/miyozin ve mikrotübüldeki değişiklikler) engellemektedir (Li ve ark., 2020). TN-C ile muamele edilen T hücrelerinde, aktivasyon için gerekli transkripsiyon faktörlerini inhibe olduğu ve proliferasyonunun önlediği de gösterilmiştir (Hemesath ve ark., 1994).

CD8+ T hücreleri dışında, TN-C'nin makrofajlar üzerinde de etkisi olduğu ve onların immüno-supresif M2 fenotipine dönüşmesini sağladığı da gösterilmiştir (Deligne ve ark., 2020). Ortotopik fare meme kanseri modelinde de yüksek TN-C ekspresyonu, immün kaçışa yardımcı olan tümör ilintili makrofajların tümörde bulunmasıyla pozitif şekilde ilişkilendirilmiştir (Deligne ve ark., 2020).

4.3.5.1.5. TN-C'nin meme kanserinde tedavi direncindeki rolü

TN-C'nin kemoterapi direnci oluşumundaki rolü de doksorubisinin direnci ile ilgili çalışmalarda gösterilmiştir. TN-C'nin, Doksorubisin proliferasyon durdurma etkisini, siklin bağımlı kinaz inhibitörü, p21'i inhibe ederek ortadan kaldırmaktadır (Lowy ve Oskarsson, 2015). Ayrıca TN-C, metastatik meme kanseri hastalarında tamoksifen direnciyle pozitif bir ilişki göstermektedir (Lowy ve Oskarsson, 2015). Fare meme kanseri modelinde ise, TN-C'nin ekspresyonunun küçük interferans (siRNA) aracılığıyla azaltıldığında hem meme kanseri hücrelerinin hem de akciğerdeki metastatik hücrelerin paklitaksel direncini tersine çevrildiği gösterilmiştir (Insua-Rodríguez ve ark., 2018). Bu araştırmada görülen paklitaksel direncinde, kemoterapi uygulaması sonucunda hücrenin stres yanıtından dolayı JNK/c-Jun yolağının aktive olmasının, TN-C ekspresyonunu tetiklediği gösterilmiştir (Insua-Rodríguez ve ark., 2018). Burada da uygulanan kemoterapinin aslında doğrudan direnç mekanizmalarını aktive ettiği görülmektedir.

Meme kanseri hastalarında yapılan araştırmada da neoadjuvan terapi sonrası TN-C seviyesinin yükselmesinin kemoterapi direnciyle ilişkili olduğunu göstermiştir (Wang ve ark., 2016). TN-C eksprese etmeyen MCF-7, HER2+ insan meme kanseri hücre hattına da eksojen TN-C eklendiğinde dosetakselin antiproliferatif etkisinin, $\beta 1$ integrin/mammalian target of rapamycin aracılığıyla ortadan kalkmaktadır (Wang ve ark., 2016).

4.3.5.1.5. Meme kanserinde TN-C hedefli tedaviler

Yeni tedavi yaklaşımlarına gerek duyulan ve TN-C ekspresyonunun tümör oluşumu ve metastazında önemi gösterilen meme kanserinde, TN-C inhibisyonunun etkin bir terapötik yaklaşım olma potansiyeline sahiptir.

TN-C kolajen gibi diğer ESM proteinlere nazaran, normal dokulardaki dağılımı hem çok limitli hem de çok az miktarda olduğundan dolayı, özgül kanser tedavilerinde kullanılmak için iyi bir hedeftir. Klinik deneylerde, radyoimmuno tanıda, RNA interferans ve aptamer-bazlı tedavi stratejilerinde halihazırda glioblastoma multiforme ve lenfomada denenmektedir (Taraseviciute ve ark., 2010). RNA interferans teknolojisi, transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasıyla çalışır. RNA interferans teknolojisinde hedef genin mRNA'sına tamamlayıcı RNA'lar hücreye verilir. Bu nükleik asitler, plazmidde kodlu halde veya RNA şeklinde kullanılabilir. Hücreye verilen RNA'ların, hedef mRNA'ya bağlanması, translasyonu engeller ve oluşan çifte sarmallı RNA'nın hücredeki nükleazlar tarafından kesilmesini sağlar. Böylece, hedef genin ekspresyonu azalır. 46 glioblastoma hastasına postoperatif bölgeye TN-C mRNA'ya özgül antisense-RNA enjekte edildiğinde, grade III glioma hastalarının sağkalımını 18 hafta ve glioblastoma hastalarınınkini ise 10 hafta uzadığı gösterilmiştir (Wyszko ve ark., 2008). 131I-81C6 (Neuradiab™) fare anti-TNC monoklonal antikorudur ve radyoaktif iyodin-131 radyokonjugatıdır. Tekrarlayan beyin kanseri olan hastalarda, doğrudan tümör bölgesine enjekte edildiği faz2 klinik deneyde ortalama hayatta kalımı artırdığı ve kabul edilebilir bir toksisite profili olduğu görülmüştür (Reardon ve ark., 2006).

Kolon kanserinde ise anti-TNC antikorlarının invazyonu engellediği rapor edilmiştir (De Wever ve ark., 2004). Hem fibronektinin onkofetal izoformunu hem de uzun TN-C izoformunu aynı anda hedefleyen bir peptit de tümörü aktif hedeflemek için glioblastoma multiformede çalışılmıştır (Lingasamy ve ark., 2019).

İnvaziv ÜNMK hücre hatlarında ise TN-C ekspresyonu RNA interferans teknoloji ile in vitro ortamda azaltılmıştır. TN-C'nin siRNA aracılığıyla ekspresyon inhibisyonunun hücre proliferasyonu ve hücre invazyonunu büyük ölçüde durdurduğu gösterilmiştir (Alharth ve ark., 2021). Bir başka çalışmada ise yine aynı hücre hattında, TN-C ekspresyonunun ATN-RNA adı verilen ve TN-C mRNAsına bağlanan çift sarmallı RNA ile azaltılmasının, hücre proliferasyonunun azaltırken, apoptozu da indüklediği gösterilmiştir (Wawrzyniak ve ark., 2020). Aynı zamanda yapılan 3 boyutlu kültürde, in vivo tümörjenik kapasiteyi iyi şekilde yansıtan sferoid oluşumuna bakıldığında, sferoid bütünlüğünün TN-C susturulmasında bozulduğu görülmüştür. Ayrıca, EMT'yi gösteren cadherin değişimi gibi değişimleri, susturma derecesine doğru orantılı şekilde azalmıştır. MiRNA-335, meme kanserinde TN-C ekspresyonunu azaltmaktadır, bu miRNA seviyesini artırmakta olası terapötik yaklaşımlar arasında sayılmaktadır (Tucker ve Degen, 2022).

TN-C'yi hedefleyen fare monoklonal antikoru Tenatumomab, I131-etiketli halde meme kanseri de dahil TN-C pozitif kanserlerde faz 1 klinik deneyde (NCT02602067) kullanılmıştır. Monoklonal antikorun tümörlü dokuya ulaşmamasından dolayı bu klinik deney sonlandırılmıştır.

F16, insanlaştırılmış TN-C'nin Fibronektin III bölgesindeki A1'i tanıyan bir antikor fragmanıdır. F16, IL-2 ile konjugat oluşturulup, bu interleukini meme kanserine hedeflemek için kullanıldığında, IL-2'nin etkisini artırdığı görülmüştür. Aynı zamanda da doksorubisin veya paklitaksel ile beraber verildiğinde, terapötik etkinliğin arttığı fare ksenograft meme kanseri modelinde görülmüştür (Mårlind ve ark., 2008). Klinik deneyler de F16-IL2 paklitakselle beraber uygulandığında, meme kanserinin de içinde olduğu tümörlerde hastalığın stabilize olduğu görülmüştür (De Braud ve ark., 2011).

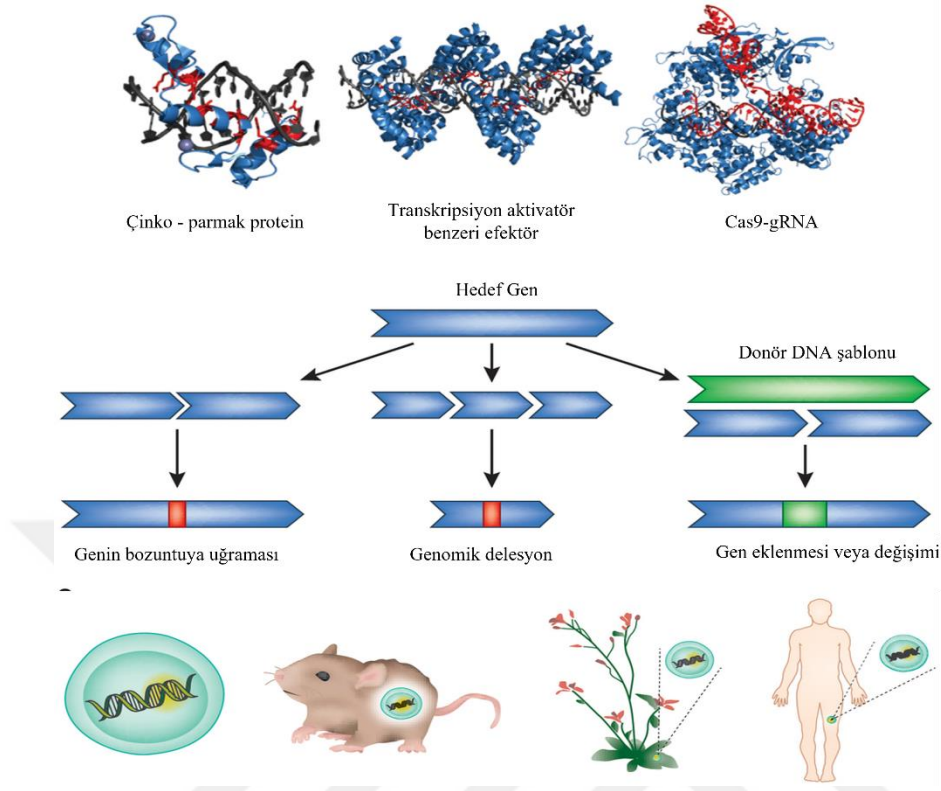
Nanokorlar, hem hafifi hem de ağır zinciri bulunan antikorların tersine sadece ağır zincire sahiptir. Lamalarda ve develerde doğal olarak bulunan bu yapılar, rekombinant DNA teknolojisiyle insanlaştırılmış şekilde de üretilmektedir. Nanokorlar, antikora nazaran daha küçük olup, stabiliteyi yüksektir ve dokuya geçişleri daha kolaydır. Yapılan bir araştırmada, TN-C'ye karşı iki nanokor geliştirilmiş ve bu nanokorların TN-C aracılı invaziv etkiyi ve lökositleri matrikste hareketsizleştirme etkilerini azalttığı gösterilmiştir (Dhaouadi ve ark., 2021).

TN-C kanserde RNA ve protein seviyesinde farklı yollarla susturulmaya çalışılmış olsa da , TN-C'yi DNA seviyesinde genom düzenleme ajanları ile susturmaya dahil bir araştırma literatürde görülmemiştir.

4.4 Genom Düzenleme

Proteinler, vücudun işlevsel ve yapısal yapıtaşlarıdır. Enzimlerden, reseptörlere, sinyal yolağında yer alan moleküllerden transkripsiyonu kontrol eden transkripsiyon faktörlerine birçok önemli molekül genelde protein makromolekölüdür. Böylece, hastalıklarda ilgili proteinlerin yapısını, miktarını ve/veya işlevini değiştirmek önemli bir terapötik yaklaşımdır. Küçük molekülü ilaçlar, protein işlevini değiştirmeye yönelik iken RNA-bazlı yaklaşımlar ise ekspresyon seviyesini değiştirebilmektedir. Gen mühendisliği alanındaki gelişmeler, DNA dizilerinin silinmesini veya değiştirilmesini hem in vitro hem de in vivo ortamda mümkün kılmıştır (Zhang ve ark., 2021). Bu teknolojilerden ortaya çıkan genom düzenlemesi terimi, genomun nükleotid sekansını istenilen yerde ve istenilen şekilde değiştirilmesini tanımlar. Böylece, isteğe bağlı olarak hem proteinlerin yapısı hem de ekspresyon seviyesi DNA'dan değiştirilebilmektedir.

Genom düzenlemenin genlerde yapabileceği değişiklikler arasında belirlenen genlerin ekspresyonunu durdurmak için, insersiyon ve delesyon (indel) aracılığıyla fonksiyonel olmamalarının (gen knockoutu) sağlanması vardır. Genom düzenleme aracılığıyla ayrıca yeni genler eklenebilir ya da genler ve onları kontrol eden genomik elementler istenilen şekilde değiştirebilir (Şekil 5).

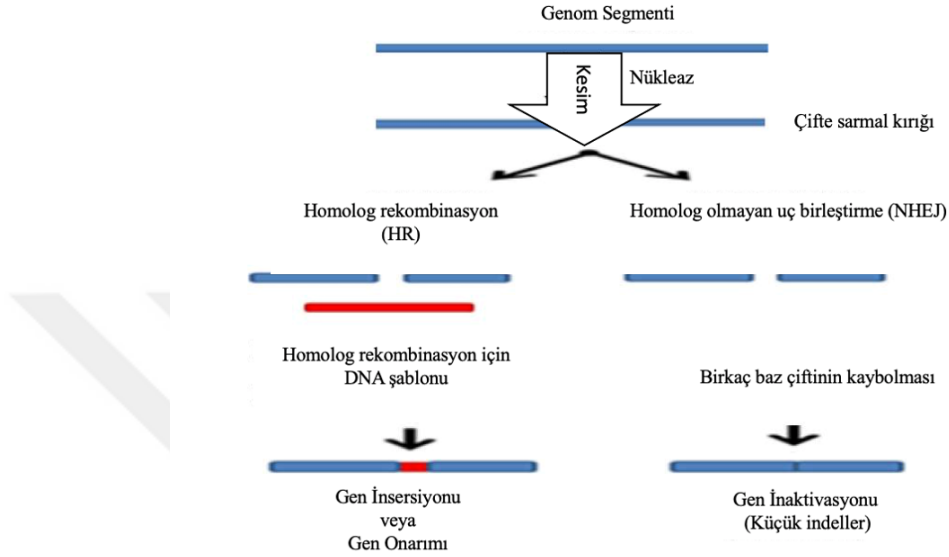


Şekil 5. Genom düzenlemesi ile yapılan genetik değişiklikler ve kullanım alanları (Gersbach, 2014'den değiştirilerek kullanılmıştır)

Genom düzenlenmesinin avantajları arasında; genomda doğrudan yapılan değişiklikler aracılığıyla kalıcı etki yaratması, genin kendi lokusunda gen değişimi yapıldığında fizyolojik/normal düzeyinde ekspresyonunun sağlanması, genom bölgesinin hedeflenmesi aracılığıyla mutagenез riskinin az olması ve viral vektörler aracılığıyla dahil taşınamayacak kadar büyük olan genleri değiştirme şansı vermesi sayılabilmektedir.

4.4.1 Genom düzenleme mekanizmaları

Genom düzenlenmesi, belirlenen bölgede dışardan verilen nükleazlar tarafından çift sarmal kırıklarının (double strand break; DSB) oluşturulması ve daha sonra da hücrenin mevcut DSB onarım mekanizmaları aracılığıyla kesilen bölgenin onarılmasını içerir (Şekil 6).



Şekil 6. Genom düzenleme mekanizması (Khalil, 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır)

Genom düzenlenmesinde gen ve/veya protein mühendisliğiyle üretilen nükleazlar kullanılır. Bu nükleazlar DNA'nın belirli bir bölgesini tanıyan DNA bağlanma domaini (spesifiteyi veren bölge) ve DNA'yı belli bir yerden kesen nükleazdan (DSB oluşumunu sağlayan bölge oluşur (Carroll, 2017).

Genom düzenlemesini sağlayan hücrenin endojen DSB onarım mekanizmaları, homolog olmayan uç birleştirme ve homolog rekombinasyon (HR) olarak ikiye ayrılır.

4.4.1.1. DSB onarımı

4.4.1.1.1. Homolog olmayan uç birleştirme

NHEJ hataya açık DNA onarım mekanizmasıdır. NHEJ'de DSB onarımı sırasında hata oluşup genlerde indele neden olur. NHEJ bazlı DSB onarımında, kesilen yer için 'doğru' bilgileri taşıyan ve şablon olarak kullanılabilecek bir başka DNA molekülü bulunmamaktadır. NHEJ'de, ilk basamakta uçlara DSB'yi algılayan, Ku70-Ku80 heterodimer proteinleri kesilen uçlara bağlanır. Ku proteinlerinin bağlanması, ligaz, nükleaz ve polimerazın, o bölgeye bağlanabilmesi için bir platform oluşturur (Lieber, 2010). DNA-PKcs bilinen en büyük protein kinaz olup (469kDa), bir serine/treonin

kinazıdır. DNA-PKcs, Ku heterodimerine bağlandıktan sonra, aktive olur ve otofosforilasyon gerçekleştirir. DNA-PKcs, Artemis adındaki nükleazla bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin 5' ve 3' endonükleaz aktivitesi vardır ve DSB'den dolayı oluşan, tek sarmallı uçlar, bu kompleks tarafından kesilir (Lieber, 2010).

Polimerazlardan μ ve λ iki ucun bağlanabilmesi için, nükleotidler ekler. μ polimeraz şablon olmadan, nükleotid ekleyebilen önemli bir polimerazdır. Bu onarımın en son basamağında ise DNA ligaz IV, iki ucu birbirine bağlar (Lieber, 2010). Görülebileceği gibi özellikle Artemis aracılığıyla, NHEJ sırasında nükleotid kaybı (delesyon) olur ve polimerazlar aracılığıyla da insersiyon delesyon ve baz çifti değişikliği gerçekleşebilir. DNA replikasyonunda yer alan polimerazların tersine bu tip onarımda yer alan polimerazlar, nükleotid eşleşmesini kontrol edici ekzonükleaz aktiviteye sahip değildir ve nükleotid seçiciliği daha azdır. Böylece, nükleotid eşleşmesi sırasında yapılan hatalar, DNA replikasyonunda her 10000-100,000 bazda bir hata iken, bu polimerazlarda yapılan NHEJ'de bu oran her 100 bazda bire yükselir (Kunkel, 2009). Onarım sonrasında genom, orijinal genomdan farklılık gösterir. NHEJ mekanizmasını indüklendiği genom düzenleme çalışmalarında, oluşan indeller sayesinde geni sürdürmek mümkündür.

4.4.1.1.2. Homolog rekombinasyon

HR mekanizmasının aktive olabilmesi için kardeş kromatit ya da eksojen DNA şablonu varlığını gerekir. HR hücre döngüsünün sadece S ve G2 evrelerinde gerçekleşebilir (Toh ve Ngeow, 2021). HR mekanizması 'kopyala' ve 'yapıştır' olarak tabir edilebilir. HR'da DSB'nin, Mre11-Rad50-Nbs1 kompleksi tarafından algılanmasıyla başlar (Toh ve Ngeow, 2021). MRN kompleksi ise, ATM'in DSB bölgesine gelmesini sağlar. Nükleazlar daha sonra kırığın her iki tarafın da 3' bağlanmamış tek sarmallar oluşturur ve uçları erozyondan korur. Tek sarmallardan bir tanesi, kardeş kromatite RAD51 gibi proteinler aracılığıyla gider, helikaz aktivitesiyle kardeş kromatit açılır ve tek sarmallı DNA'nın sentezi için bir şablon oluşturur. Bu sentez yüksek fideliteli (hata oranı az) DNA polimeraz tarafından gerçekleştirilir.

HR sonucunda onarılan genom, DSB öncesi olan orijinal genomla aynı olur HR'nin, eksojen bir DNA'yı da şablon olarak kullanılabileceğinin gösterilmesi, bu mekanizmanın genom düzenlemesinde de kullanılmasının yolunu açmıştır. Bu

mekanizma ile özellikle gen değiştirme ve/veya gen ekleme terapileri yapılmasının yolu açılmıştır.

4.4.1.2. Nükleazlar

Genom düzenlemesi doğal olarak yapabilen meganükleaz isimli deoksiribonükleazlar vardır. Meganükleazlar 12-40 baz çiftini hedefleyebilen ve özgülükleri yüksek enzimlerdir (Lanigan ve ark., 2020). Bu meganükleazların genomun farklı bölgelerini de hedefleyebilmek için protein mühendisliğine DNA tanımlarının değiştirilmeye ihtiyaç vardır. Fakat bu yaklaşım hem pahalı hem de uzun bir süreç olduğu için, genom düzenlemesinde genelde modüler yapıdaki, DNA tanıma ve kesme bölgeleri kolayca değiştirilebilen sentetik yapılar kullanılır.

Genom düzenlemesinde DSB oluşturmak için kullanılan ve eksojen olarak verilen üç tasarlanmış nükleazlar çinko parmak nükleazları transkript aktivatör benzeri efektör nükleazlar (transcription activator-like effector nucleases; TALEN) ve prokaryotik tip II düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (clustered regularly interspaced short palindromic repeats; CRISPR)-Cas9 sistemidir.

4.4.1.2.1. Çinko parmak nükleazlar

Çinko parmak nükleazlar, modüler yapıda iki bölgeden (DNAya bağlanan+nükleaz) oluşan sentetik proteinlerdir. DNA'nın kesileceği bölge protein aracılığıyla tanınır. Bu proteinler çinko parmak proteinleridir. Çinko parmak proteinleri transkripsiyon faktörlerinde sıklıkla bulunmakta olup, taşıdıkları en yaygın motif iki sistin iki histidindi. Bu amino asitler aracılığıyla, yapısının merkezinde çinko elementini tutulmaktadır. Çinko parmak proteinleri iki β yaprağı ve 1 α -sarmalına sahiptir. Çinko parmak proteinleri ikincil yapılarındaki α -sarmaldaki amino asitler aracılığıyla DNA'nın küçük oluğundaki 3-4 baza bağlanır (Gaj ve ark., 2013). 3-6 çinko parmak proteini birbirine bağlayarak tek sarmalda 9-18 bazlık bir tanıma bölgesi yaratılabilir. Tanıma bölgesinin uzunluğu spesifite için anahtardır ve kısa bazlı tanıma bölgeleri hedef bölge dışındaki lokuslara da bağlanmaya neden olmaktadır.

DNA bölgesini tanıma çinko parmak proteinleri aracılığıyla gerçekleştirilirken, DSB ise Fok I isimli tip IIS restriksiyon endonükleazı tarafından gerçekleştirilir. Fok I, gram negatif, basil tipindeki *Flavobacterium okeanoites* adındaki bir bakteriden izole edilir (Porteus, 2016). Doğal Fok I endonükleazının, DNA'ya bağlanan bölgesinin ve endonükleaz bölgesinin birbirinden ayrılabilmesi, genom düzenleme için kullanılabilmesine imkan sağlamıştır. Çinko parmak nükleazlarında, Fok I'in sadece

nükleaz bölgesi kullanılmaktadır. Tip IIS endonükleazı olarak, Fok I, bir sarmalda tanıma motifinden 9 nükleotid uzaklıkta, diğer sarmal da ise tanıma motifinin 12 nükleotid uzağından kesim yapar. Fok I, dimer olarak işlevsel olduğundan, her iki sarmalı tanıyan çinko parmak nükleazlar tasarlanmalıdır.

Genom düzenlemede kullanılan nükleazların, istenilen hedef dışında başka bir bölgeyi kesmelerine ‘hedef-dışı’ etki denir. Bu etki, yarattığı sitotoksiste ve kontrolsüz mutasyon yüzünden, nükleazların klinikte kullanılmaları önünde duran en büyük engellerdendir. FokI’ın çalışabilmesi için dimer oluşturması gerektirmesi özgülüğü artırırken, homodimer oluşturabilmesi de hedef-dışı riskini artırmaktadır (Gaj ve ark., 2013).

Buna ek olarak çinko parmak nükleazlarının üretimleri karmaşık, çoklu çinko parmak nükleaz kullanımı zorlu ve yüksek maliyetleli olduğu için yaygın kullanıma henüz uygun değildir. Yine de çinko parmak nükleaz, 2003’ten beri insan hücreleri üstünde denenmekte olup, genom düzenlenmesi üzerine olan klinik deneylerde test edilmektedir (FazI/II). Mukopolisakkaridoz tip I ender bir genetik hastalıktır. Mukopolisakkaridoz tip 1 lizozomal depolama hastalıklarından biri olup, *IDUA* genindeki mutasyonlardan dolayı lizozomlarda iduronidaz enzim eksikliğinden kaynaklanır. Bu hastalıkta, genom düzenleme için çinko parmak nükleazlar klinik deneylerdedir. Yapılan klinik deneylerde, bu genin düzeltilmiş kopyasını hepatosit genomuna viral vektörlerle taşınan çinko parmak nükleazları aracılığıyla eklenmesi hedeflenmiştir (Ou ve ark., 2020). Bu klinik deneyler şu an hastaların uzun dönemli izlenmesi aşamasındadır.

4.4.1.2.2. TALEN

TALEN’ler yapısındaki bölgeler olarak çinko parmak nükleazlarına benzemektedir. Kesim yapılacak DNA bölgesinin tanınması çinko parmak nükleazlarında olduğu gibi protein aracılığıyla gerçekleşir. Bu bağlanma, DNA-bağlanma bölgesine sahip transcription activator-like effectors (TALEs) aracılığıyla yapılır TALE’ler bir bitki patojeni olan *Xanthomonas spp. Bacterium*dan izole edilmektedir (Gaj ve ark., 2013). TALE tekrarları 33-35 amino asit uzunluğundadır.

TALE tekrarları birbirilerine yüksek derecede benzerlik gösterirken, 12. ve 13. sıradaki amino asitler yönünden farklıdır. TALE’nin hangi nükleotide bağlanacağına, bu iki adet hipervariable amino asit karar verilir. Örneğin, bu amino

asitler histidin ve aspartat olduğundan, DNA'daki sitozin bazı tanınır. TALE'ler de çinko parmak nükleazlar gibi, DNA'nın büyük oluşuna bağlanır. TALE nükleazları (TALEN) hedeflenen bölgeye uygun TALE tekrarlarının birbirilerine bağlanması sonucunda spesifite kazanır. TALEN'ler aracılığıyla 24-38 baz çifti hedeflenebilir (Porteus, 2016). TALEN, çinko parmak nükleazlarına nazaran daha yüksek bir spesifite sağlamaktadır. TALEN'ler bağlanabilmeleri için 5'T bazı bulunması gerekliliği vardır ve bu da TALEN tarafından hedeflenebilecek bölge çeşitliliğini azaltmaktadır.

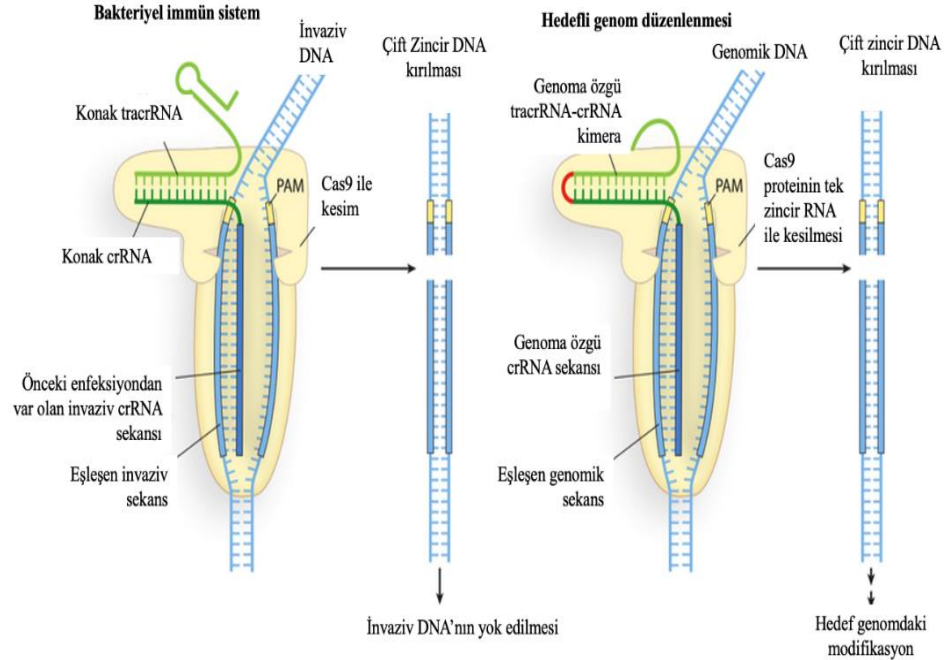
Çoklu TALE'lerin uzun bir yapı oluşturmaları bu yapıların in vivo taşınmaları açısından sorun yaratmaktadır. Bununla birlikte ex vivo genetik düzenleme de kullanılmaktadır. Örneğin, kimerik antijen reseptör (KAR) T hücrelerinin ex vivo üretilmesi sırasındaki genom düzenlenmesi ajanı olarak TALEN kullanılabilmektedir. Sitotoksik etkisi olan CS-1 proteinine özgül KAR T hücre üretiminde TALEN kullanılmıştır ve tekrarlayan multipl miyelomu olan hastalarda Faz 1 doz artırma klinik deneylerindedir (NCT04142619).

4.4.1.2.3. CRISPR/Cas sistemi

Çinko parmak nükleazlar ve TALEN, lokusu protein aracılığıyla tanırken, CRISPR-Cas9 RNA aracılığıyla tanımaktadır. CRISPR/Cas sisteminde kullanılan nükleaz da Cas adı verilen ve bakteriden izole edilen bir endonükleazdır.

Doğada CRISPR-Cas9 sistemi, bakterilerin antiviral , adaptif immün sistemi yanıtının ve immün belleğin bir parçasıdır (Hirakawa ve ark., 2020). Bakteriofajlar, enfekte eden virüslerdir. Bakteriofajlar, viral çoğalmayı sağlamak için genomunu bakteri hücresinin içine salar. Bakterinin anti-viral yanıtında ise bu invazif nükleik materyalden yaklaşık 30 nükleotid büyüklüğünde bir parça, bakteriyel genomun CRISPR bölgesine yeni bir aralayıcı (protospacer) olarak orada bulunan tekrarlar arasına eklenir: Bu genomik bölge bir bütün olarak, RNA polimeraz tarafından transkripte edilir ve pre-CRISPR-RNA oluşur. Post transkripsiyonel modifikasyonla pre-CRISPR RNA kesilir ve tek aralayıcıdan oluşan CRISPR RNA olur. Daha sonra, CRISPR RNA taşıdığı sekansa tamamlayıcı genom lokusu olan bir bakteriofaj bakteriyi tekrardan enfekte ederse, ona bağlanır. Transacting CRISPR RNA (tracrRNA), hem crRNA hem de Cas nükleazına

bağlanabilmesi aracılığıyla Cas viral genoma bağlanır ve keser. Bu yolla da virüs etkisiz hale gelir (Şekil 7).



Şekil 7. CRISPR/Cas sisteminin işleyiş mekanizması. Sol: Bakteri anti viral immün yanıtında CRISPR/Cas9, Sağ: Genom düzenleme uygulamalarında CRISPR/Cas9 (Jinek ve ark., 2012 den değiştirilerek kullanılmıştır)

Genom düzenlenmesinde ise, bakteriofaj genleri yerine, üstünde değişiklik yapmak istenilen gene özgül RNA sentezlenir (Şekil 7). Genom düzenleme çalışmalarında crRNA ve tracrRNA birleştirilerek rehber RNA oluşturulmuştur (gRNA). gRNA sentezi, diğer sentetik genom düzenleme ajanlarında DNA'yı tanıyan proteini sentezlemekten daha az maliyetli ve daha kolaydır (Sánchez-Rivera ve Jacks, 2015). Bu yüzden de yaygın kullanıma daha uygun bir yapıdır.

CRISPR/Cas tipleri bulundukları mikroorganizmadaki CRISPR/Cas lokusunda bulunan özgül genlere ve o lokusun genomik organizasyonuna göre birbirinden ayrıştırılır (Makarova ve Koonin, 2015). Bu sistemin en geniş sınıflandırmasında sınıf 1 ve 2 diye ayrılır. Sınıf 1'de nükleaz aktivitesi çoklu Cas kompleksi tarafından gerçekleştirilirken, sınıf 2'de ise tek bir Cas enzimi DNA kesimini gerçekleştirir. Bu sınıflar kendi içlerinde alt tiplere de ayrılmaktadır. Örneğin Sınıf 2, Tip II de *cas9* geni

vardır ve sınıf 2 tip V'de ise *cas12* geni vardır (Collias ve Beisel, 2021). Bu tipler arasında Tip 6'da olduğu gibi RNA'yı da düzenleyen Cas (Cas13) de bulunmaktadır. Cas9 Tip II CRISPR/Cas sisteminin bir parçasıdır. Genom düzenleme çalışmalarında en çok kullanılan nükleaz Cas9'dur. Cas9 *Streptococcus pyogenes* den elde edilen ve iki adet katalitik domaini (RuvC ve HNH) olan bir nükleazdır (Collias ve Beisel, 2021). Cas9'un ayrıca helikaz ve tracrRNA'ya bağlanma özelliği vardır. Cas9'un kesim yapacağı bölgede bazı nükleotid sekansları bulunması gerekmektedir. Cas9'un hedefe bağlanabilmesi için 3 bazlık NGG, protoaralık bitişik motif (protospacer adapter motif, PAM) sekansına ihtiyacı vardır. Böylece Cas9'un bağlaması tracrCRISPR ve PAM aracılığıyla gerçekleşir.

Bu sistemin genomda hedefleyebileceği bölgeler PAM sekansının bulunup bulunmamasıyla sınırlandırılmıştır. gRNA 20 nükleotidlik bir bölgeyi tanımlar, böylece CRISPR/Cas9 sisteminin hedefi 5'-x20NGG-3' yapıdadır. CRISPR/Cas9 için PAM dışında 5' guanin bulunması gerekmektedir. Cas9 PAM sekansının 3-4 baz çifti öncesinde nükleotidlerden kesim yapar.

Cas9 da bulunan nükleaz domainlerinden, HNH nükleaz domain gRNA dizisine komplementer olan DNA dizisini keser, RuvC ise gRNA'nın komplementer olmadığı, karşı DNA dizisini keser ve böylece DSB oluşturulur.

Cas 12'nin bulunduğu mikroorganizmalara örnek olarak ise *Acidaminococcus sp.* ve *Lachnospiraceae bacterium* verilebilir. Cas 12 enzimleri Cas9'enzimlerine göre daha çok çeşitlilik gösterir ve çoklu alt tipi bulunur (Collias ve Beisel, 2021). Bu enzimle genom çalışmalarında genelde Cas12a tipi kullanılmaktadır.

Cas9'un tersine, Cas12a tracrRNA'ya ihtiyaç duymaz ve yapısında hem ribonükleaz ve endonükleaz aktivitesiyle, pre-crRNA işlenmesini gerçekleştirir. Böylece Cas12a, Cas9a kıyasla daha küçük bir sistemdir, bu da hücreye taşınmasını kolaylaştırır. Cas12, yine Cas9'un tersine tek bir katalitik bölgeye sahiptir (RuvC). Bu enzimin yaptığı DNA kesimlerinde, tek sarmallı uçlar kalıp, yapışkan uçlu bir kesim yapmaktadır. Bu tarz bir kesim, HR tipi DSB onarım şansını artırmakta ve özellikle gen değiştirme ve ekleme çalışmaları genom düzenleme çalışmaları için önemli bir avantaj sağlamaktadır (Pickar-Oliver ve Gersbach, 2019). Cas12a tanıdığı PAM sekansı da farklıdır ve genelde 5'-TTTV-3' tir. Bu da genomda Cas9 tarafından hedeflenemeyen bazı bölgelerin, Cas12 tarafından hedeflenebilmesini sağlamaktadır.

Cas enzimlerinin protein mühendisliğiyle yapılması istenilen uygulamaya uygun şekilde değiştirilmiş çeşitleri vardır. Bu tasarlanmış enzimler genelde Cas9 kökenlidir. Sıklıkla kullanılan tasarlanmış Cas enzimleri, yüksek fideliteli Cas9 enzimi ve Cas9 nikazlarıdır (Pickar-Oliver ve Gersbach, 2019). Aynı zamanda genomda daha çok bölgeyi hedefleyebilmek için farklı PAM bölgelerini tanıyan Cas9 enzimi tasarlama çalışmaları vardır.

Cas9 enzimini değiştirme yönündeki çabaların birçoğu hedef-dışı etkiyi azaltmak içindir. Güçlü bir teknik olan CRISPR/Cas ile genom düzenlemesi, kalıcı etkiler yaptığı için hedef bölge dışında yaptığı kesimler önemli bir güvenlik sorunu teşkil etmektedir. Bu yüzden de DSB değil de DNA’da tek bir sarmalı kesen yani iki katalitik bölgesinden sadece biri aktif olan Cas9 nikazlar üretilmiştir. Böylece genom düzenlenmesi için iki Cas9 nikazı o bölgede farklı sekanslara bağlanması gerekmektedir ve bu da hedef-dışı etki riskini azaltmaktadır.

Cas9 nikazların oldukça yeni bir kullanım şekli de prime editledir. Bu yaklaşımda, kesilen DNA’da istenilen değişim, Cas9 nikaza eklenen revers transkriptaz ve eklenen RNA şablonu aracılığıyla gerçekleştirilir (Anzalone ve ark., 2020).

Cas9’un her iki katalitik bölgesinin de etkisiz hale getirildiği, ‘ölü’ Cas9 enzimleri de vardır. Bu enzimler, DSB gerçekleştiremez ama hücrede olduğu sürece hedef DNA sekansına bağlanıp, transkripsiyon için gerekli proteinlerin bağlanmasını engelleyerek, geçici bir gen susturma etkisi sağlayabilir. Ölü Cas9’a transkripsiyon aktive edici proteinler bağlanıp, promotörler hedeflendiğinde, genin aktivasyonunu da sağlayabilir. Ölü Cas9’un bir başka kullanım alanı ise baz düzenlemedir. Bu yaklaşımda, ölü Cas9’a nükleobaz deaminaz enzimi eklenir ve böylece hedef DNA bölgesinde istenilen baz değişikliği yapılır (Anzalone ve ark., 2020).

Yüksek fideliteli Cas9’larda ise enzimde genellikle nokta mutasyonları yaratarak, hedef DNA’ya bağlanma etkinliğini düşürmeden, kısmi PAM sekansları olan diğer bölgelere bağlanıp, hedef-dışı etki yaratmasını azaltmak hedeflenir (Vakulskas ve ark., 2018).

4.4.2. CRISPR/Cas kullanım alanları

CRISPR/Cas sisteminin modüler yapısı, üretim ve uygulama kolaylığı, esnekliği, etkinliği ve uzun dönem etkisinden dolayı birçok tedavi alanında hızlıca kullanılmaya başlanmasını sağlamıştır. Özellikle Mendel kalıtımı gösteren, tek gen hastalıklarını

tedavisi ve kanser terapisinde CRISPR/Cas sistemi ile klinik deneylerde de test edilen birçok yaklaşım vardır (Zhang, Huimin ve ark., 2021). Çalışma prensipleri CRISPR/Cas sistemi bazlı tanı kitleri de hızla geliştirilmektedir. CRISPR/Cas'ın kullanım alanları içinde sağlık alanı dışında tarım ve hayvancılık gibi alanlar da vardır. Buna rağmen CRISPR/Cas sistemi günümüzde kanser başta olmak üzere en çok sağlık alanında kullanılması için çalışmalar yapılmaktadır.

4.4.2.1. Enfeksiyon hastalıkları

Enfeksiyon hastalıklarında patojenlerin hücreye girişlerini veya vücutta kalabilmelerini engellemek için CRISPR/Cas9 test edilmektedir. Örnek olarak insan immün yetmezlik virüsü (HIV) terapisi için CD4+T hücrelerindeki HIV reseptörü, CCR5 gen knockoutu verilebilir (Hirakawa ve ark., 2020). Belirlenen gen bölgelerinin genomdan tamamen silinmesi için de bu sistem kullanılabilir. HIV ve insan papilloma virüsü (HPV) gibi virüslerin insan genoma entegre olan genetik materyali bu yolla çıkartılabilir.

Gözdeki dirençli Herpes simpleks virüsü kaynaklı keratit körlüğe neden olmaktadır. HSV'yi gözdeki genomdan temizlemek için korneaya enjekte edilen CRISPR/Cas9 sistemi faz1/2 klinik deneylerde test edilmektedir (NCT04560790).

4.4.2.2. Genetik hastalıklar

Mendel kalıtımı gösteren tek gen hastalıklarında, CRISPR/Cas sistemi ile patolojik mutasyonlar düzeltilebilir ya da etkisiz hale getirebilir. Yapılan ilk in vivo CRISPR/Cas klinik deneyi, kalıtsal bir körlük türündeki mutasyonu düzeltmek için başlatılmıştır.

Vücuttaki en büyük gen olan distrofin geni, genin boyutundan dolayı gen terapisi çalışmalarında taşınması zorlu bir hedeftir. CRISPR/Cas sistemi ile hastalığa neden olan çerçeve kayması mutasyonlar (frameshift mutasyonlarını) indel aracılığıyla düzeltilebilmektedir.

Gen ekleme veya değiştirmede ise (gen knock-in) patojenik mutasyonlara uğramış genleri, mutasyonsuz sekanslarla değiştirmek ya da mutasyonu olmayan sekansları genoma eklemek için kullanılabilir. Hemoglobinin β zincirini kodlayan gendeki mutasyonlar, hemoglobinde yapısal bozukluklara neden olarak β -talasemi (Akdeniz anemisi) hastalığına neden olur. Bu β zincirini kodlayan mutasyonlu *HBB* geni, mutasyon taşımayan kopya ile genom düzenleme yöntemleri ile değiştirebilir veya CRISPR/Cas9 sistemifetal globin zincirinin ekspresyonunun baskılayan genin

susturulması için kullanılabilir (Frangoul ve ark., 2021). Otolog CD34+ hematopoetik kök hücrelerde ex vivo ortamda *HBB* geninin CRISPR/Cas9 ile düzenlenip, β -talasemi hastalarına nakledilmesi klinik deneylerde faz 3 aşamasındadır (NCT03655678). Bu örnekte de görüldüğü gibi, tüm kan hücrelerinin üretilmesini sağlayan hematopoetik kök hücrelerde mutasyonların düzenlenmesi, terapötik etkinlik açısından şansı yükseltmektedir ve β -talasemi dışında, orak hücre anemisi gibi tek gen kaynaklı hematolojik hastalıklarda da klinik deneylerde çalışılmaktadır.

4.4.2.3. Kanser

Kanser insidansı değişen yaşam stili, artan ortalama yaşam süresi ve çevresel faktörler gibi sebeplerden dolayı artmaya devam etmektedir. Kanser, 2030'da 13 milyon ölümden sorumlu olacağı öngörülmektedir (Gidwani ve Vyas, 2015).

Kanser, onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde çok sayıda genetik ve epigenetik değişikliğin olduğu bir hastalıktır. Bu nedenle de genlere müdahale ederek hem kanserin modellenip tümörögenizde rol oynayan birçok genin incelenmesi hem de tedaviye yönelik genetik değişiklikler yaratarak terapötik yaklaşımlar geliştirmek için kritik bir öneme sahiptir.

CRISPR/Cas9, kanserde baskılı olan tümör baskılayıcı genleri ya da hiperaktif olan onkogenlerin, ekspresyonlarını normalize etmek için kullanılabilir. Kanseri araştırmalarında, CRISPR/Cas9 sistemi model organizma elde etmek için embriyonik kök hücre mühendisliğinde, genetik mutasyon taramasında, tedavi direnci genlerinin tanımlanmasında ve somatik hücre gen mühendisliğinde kullanılmaktadır.

CRISPR/Cas sisteminin özellikle terapötik kullanımı ile ilgili çalışmalardan en ileri seviyede olanları genellikle kanser alanındadır. Örneğin, kolon kanserinde protein kinaz C genini etkisizleştiren mutasyonlardan dolayı hücre canlılığı artmaktadır ve bu mutasyonların CRISPR/Cas sistemi ile düzeltilmesinin, kolon kanseri hücre hatlarında hayatta kalımını azalttığını göstermiştir (Chen ve ark., 2019). CRISPR/Cas9 sisteminin de, gRNA ve Cas ekspresyonunun insan telomeraz alt birimi gibi tümöre özgül promotörlerle yaparak, tümör hücreleri hedeflenebilmektedir.

Karsinojenik virüs enfeksiyonlarına yol açan insan hepatit B ve C virüsü ve HBV gibi virüslerin, tümöröjenik etki yapan genomik materyallerinin genomdan çıkarılması üzerine de çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin, invaziv kansere dönüşme riski yüksek olan HPV+ servikal intraepitel neoplazisi olan kadınlarda, tümör destekleyici

değişimlere neden olan HPV 16 ve 18 alt tipine ait E6/E7 sekansları, CRISPR/Cas sistemi ile genomdan çıkartmayı deneyen faz 1 klinik deney planlanmıştır (NCT03057912).

Tümör stroması hücreleri de bu sistemle, anti-tümörjenik etki için değiştirebilir. Stroma hücrelerinin, kanser hücrelerine nazaran daha az heterojen ve daha stabil olmasından dolayı TMC’de genom düzenlemesi yapıldığında direnç gelişme riski daha azdır. Örneğin, fibroblastlarda CRISPR/Cas aracılığıyla glutamin sentaz enzimini kodlayan genin susturulması, ortotopik yumurtalık kanseri fare modelinde, tümör büyümesini önemli ölçüde azaltmıştır (Yang, L. ve ark., 2016).

Önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi tümör stromasını hedefleyen kanser tedavilerinin en etkilisi kanser immünoterapidir. Bunlar arasında hematolojik kanserlerde KAR T hücreleri ve organ/doku kanserleri için ise immün kontrol noktası inhibitörleridir. CRISPR/Cas9 sistemi her iki yaklaşım üstüne olan çalışma ve klinik deneylerde hızla yerini almıştır. Yeni antijen bağlanma özelliği kazandırılan KAR T hücrelerinin şimdiki klinik kullanımında otolog kaynaklıdır. Fakat kemik ilikleri kemoterapi ajanları tarafından baskılanmış hastalardan, yeterli sayıda sağlıklı T hücresi elde etmek yaygın klinik kullanım karşısında önemli bir sorundur. Bu yüzden de allojenik T hücrelerin kullanılabilmesi için, T hücrelerine genetik mühendislik aracılığıyla, konağa saldıramayacağı değişiklikler yaratmak denenmektedir. İmmünolojik tanınma ve tanımaya neden olan insan lökosit antijeninin ve T hücre reseptörünün CRISPR/Cas9 sistemi ile T hücrelerden çıkartılmasının, allojenik reaksiyonu azalttığı gösterilmiştir (Depil ve ark., 2020). CD19’a özgül, CRISPR/Cas9 ile T hücre lokusu düzenlenmiş allojenik KAR hücreleri, CD19+ B hücre lösemi tedavisi için faz 1 klinik deneylerde test edilmektedir (NCT04557436). KAR T hücrelerinin hematolojik kanserlerde gösterdiği başarının aynısı doku/organ kanserlerinde görülmemiştir ve henüz bu tip kanserler için onaylanmış bir KAR T hücre terapisi yoktur. Fakat bu tür kanserlerde, KAR T hücrelerinde immün kontrol molekülü PD-1’in susturulmasının etkinliği artırdığı gösterilmiştir (McGowan ve ark., 2020). Mezotelin eksprese eden doku kanserlerinde, T hücre reseptörü ve PD-1’nin CRISPR/Cas sistemi ile susturulduğu anti-mezotelin KAR hücreleri faz 1 klinik deney seviyesindedir (NCT03545815).

Kanserle ilgili mekanizmaları ortaya çıkarmayı hedefleyen temel bilimsel araştırmalar için de CRISPR/Cas9 önemli bir araçtır. CRISPR gRNA'dan oluşan kütüphaneler ile hızlı ve etkin bir şekilde gen mutasyonları yaratıp, tümörijenik ve anti tümör etkileri analiz etmek mümkün hala gelmiştir. Böylelikle, CRISPR/Cas hem kansere yol açan hücrel mekanizmaları hem de yeni ilaç geliştirmek için hedef protein/gen tayin etmek için önemli bir yaklaşım katmıştır. Buna ek olarak, ilaç direnci gelişmesinde rol oynayan gen/proteinlerinde bulunup, ilaç direnç mekanizmalarının farmakolojik olarak hedeflendirmesini ve ilaç adaylarının test edilmesini mümkün kılmıştır.

CRISPR/Cas sistemi ayrıca embriyonik hücrelerde de genetik düzenlemede kullanılmaktadır. Döllenmiş yumurtalarda CRISPR/Cas sistemi ile yapılan genetik değişimler sonucunda, taşıyıcı anneye yerleştirilen zigotlar istenilen değişiklikleri taşıyan yavrular doğurur. Bu yolla, model organizma üretmek hem hızlanmış hem de kolaylaşmıştır ve artık rutin yapılabilecek bir iş haline gelmiştir. Model organizmalar hem tedavi yaklaşımlarını test etmek hem de kanser mekanizmalarını test etmek için önemli bir platformdur.

CRISPR/Cas uygulamalarında bu yapılar hücrelere viral veya viral olmayan yöntemlerle ulaştırılabilir. Ex vivo uygulamalarda Cas9 ve gRNA sekansları plazmid veya ribonükleoprotein (Cas9 proteini ile komplekse olmuş gRNA) olarak taşınabilir. CRISPR/Cas plazmidleri daha geç etki ama daha uzun süreli etki göstermektedir, ribonükleoproteinler ise daha hızlı ama daha kısa süreli etkilere sahiptir. Uygulama amacına göre, hedef-dışı etki riskine ve hedef gene göre bu iki uygulama formundan biri kullanılabilir.

CRISPR/Cas ajanları, elektroporasyon gibi elektrik akımı ile hücre zarında geçici delikler açan fiziksel yöntemlerle taşınabilir. Bu yöntemin önemli dezavantajı ise hücrelerde toksisiteye neden olabilmesidir. CRISPR/Cas viral olmayan lipid ve polimer bazlı vektörler tarafından hücrelere verilebilir.

CRISPR/Cas sistemleri hem ex vivo hem de in vivo uygulamada ayrıca lentiviral vektörler gibi viral vektörlerle de hücreye verilebilmektedir. CRISPR/Cas'ın özellikle in vivo uygulama için düşük maliyetli, etkin ve güvenli bir taşıyıcı sistemin geliştirilmesi, bu sistemin potansiyelinin klinikte yaygın olarak kullanılabilmesi için en önemli şartlardan biridir.

4.5. Gen Terapisinde Taşıyıcı Sistemler

CRISPR/Cas sisteminin de içinde bulunduğu tüm genom düzenleme ve diğer gen terapisi uygulamalarında, etkin maddelerin (RNA, DNA veya protein) sitozol ya da hücre çekirdeği gibi hücrede doğru yere, yeterli miktarda ve işlevini kaybetmeden ulaşması en kritik basamaklardır.

Gen terapisi sistemlerinin etkin ve güvenli bir şekilde hücre çekirdeğine ulaşması önünde çoklu fizyolojik ve fiziksel bariyerler vardır (Lino ve ark., 2018)(65). Bunlardan bazıları kan dolaşımındaki endonükleazlar, serum proteinlerine bağlanma, renal klirens ve retiküloendotelyal sistem tarafından vücuttan atılma ve taşınan sisteme karşı oluşabilecek immün yanıttır. Hücresel bariyerler ele alındığında ise anyonik CRISPR/Cas9 gibi nükleik asit sistemlerinin negatif yüklü hücre zarından girişi, sistemin endozomdan çıkışı, sitozoldeki nükleazlar tarafından kırılma ve hücre çekirdeğine giriş sıralanabilir.

Kanser gen tedavisine özgül bazı bariyerler ise, tümörü çevreleyen sert TMC'de tümöre geçişin azalması ve yüksek interstisyel basınç ve hızlı çoğalan kanser hücrelerine yeterli miktarda gen tedavisi ajanı girdikten sonra hücre bölünmesi ile dilüe olmadan etkin miktarda kalabilmesidir.

Dolayısıyla, bu bariyerleri başarılı bir şekilde aşmak için gen taşıyıcı vektörler kullanılması gerekmektedir. Bu vektörler viral ve non viral vektörler olarak ikiye ayrılmaktadır. Bu iki vektör kategorisi güvenlik, taşıma etkinliği ve üretim maliyeti açısından birbirinden büyük farklılıklar göstermektedir. Şu anda klinikte onay almış gen terapisi ajanlarının çoğu viral vektörler tarafından taşınmaktadır fakat kolayca değiştirilebilen fizyokimyasal özellikleri ile non viral vektörlerde de hızlıca önemli ilerlemler kaydedilmektedir.

4.5.1. Viral vektörler

Virüsler, çoğalabilmek için başka bir hücreye ihtiyaç duydukları için, hücre içerisine genetik materyallerini ulaştırmak biyolojik özellikleri arasındadır. Dolayısıyla aslında bir gen taşıyıcı sistemde olması gereken mekanizmalar, virüslerde doğal olarak bulunur. Bundan dolayı da viral vektörler etkin gen taşıyıcı sistemlerdir. Fakat bu vektörlerin uygulamalarında güvenlik açısından aşılması gereken problemler vardır. Gen taşıma için kullanılan viral vektörler, taşıyabilecekleri kargo boyutu, bölünmeyen hücrelere transdüksiyon kabiliyeti ve genoma entegre olup olmaması açısından

birbirinden farklılık gösterirler. Gen taşıyıcı sistem olarak klinikte en sık kullanılan viral vektörler adeno-assosiye virüs (AAV) adenovirüsler ve lentivirüslerdir.

AAV'ler küçük, tek sarmallı DNA virüsler olup, insanlarda tek başlarına hastalık oluşturma yetisine sahip değildirler. AAV bazlı vektörler, diğer viral gen vektörleriyle karşılaştırıldığı zaman patojenik olmayan yapıları ve düşük immünojeniteleri açısından avantaj sağlarlar (Tse ve ark., 2015)(1). Ayrıca AAV vektörlerinin birçok farklı hücre tipini transdükte edebilme özelliği, genoma entegre olmadıkları için entegresyondan olan mutagenез riski taşımamaları, ve genoma entegre olmamalarına rağmen taşıdıkları transgen ekspresyonu transdükte olan hücrelerde uzun süre devam etmesi, bu vektör türünün gen terapisi için uygun ve güçlü bir vektör adayı yapmaktadır (Hareendran ve ark., 2013). AAV alt türleri arasında en çok AAV-2 kullanılsa da özgül hücre tropizması olan AAV alt tipleri de belli organları yönelik gen tedavisinde denenmektedir. Örneğin, spinal kas atrofisi tip I hastaları için onaylanan gen tedavisinde iskelet kası ve kalbe tropizma gösteren AAV9 kullanılmaktadır (Zincarelli ve ark., 2008). AAV taşıyabileceği gen boyutu 4.7 kilobaz (kb) ile sınırlıdır. Özellikle CRISPR/Cas9 bazlı gen terapilerinde AAV vektörlerinde güçlü promotörlerin kullanabilmek için yeterli yer yoktur ve genellikle iki AAV vektörü kullanılması gerekmektedir (Yang ve ark., 2016). Bu da maliyet, güvenlik ve etkinlik faktörlerini optimum düzeyde tutmayı zorlaştırmaktadır.

Adenovirüsler AAV'lere nazaran daha büyük genler (36 kb ye kadar) taşıyabilirler. İyi çalışılmış virüs biyolojisinden dolayı, istenilen şekilde değiştirilmeleri daha kolaydır ve genoma entegre olmadıkları için mutagenез riskleri düşüktür (Wold ve Toth, 2013). Adenovirüsler sıklıkla karşılaşılan insan virüslerinden olduklarından dolayı, daha önce karşılaşılmış adenovirüslerden dolayı vektöre karşı var olan immün yanıt, vektörlerin hızlıca vücuttan temizlenmesine neden olmaktadır. Bu ise terapötik etkinliği ve tekrarlayan doz uygulamayı zorlaştırmaktadır.

Lentivirüsler ise retrovirus familyasından, HIV'i de içine alan RNA virüsleridir. LV vektörler, bölünmeyen hücreleri transdükte edebildikleri, taşıma kapasitelerinin yüksek olduğu için ve genoma entegre olabildikleri için, uzun süreli transgen ekspresyonu ve geniş hedef hücre spektrumlarıyla, diğer birçok gen terapi vektörlerine nazaran avantajları yüksek gen vektörüdürler. Lentiviral vektörlerinin, gen tedavisinde başarılı klinik uygulama sergilemesi için önlerinde duran en büyük

engellerden biri ise lentivirüse karşı konakta oluşan immün yanıttır. Oluşan immün yanıt, vektörlerin ve/veya vektörlerin transdükte ettikleri hücrelerin vücuttan temizlenmesine yol açarak, lentiviral vektörlerinin gen tedavisindeki etkinliğini düşürmektedir (Follenzi ve ark., 2007)

Viral vektörlerin önemli dezavantajları arasında genoma kontrolsüz entegrasyon riski vardır. Daha önce klinik deneyinde de görüldüğü gibi bu kontrolsüz entegrasyon hücre bölünmesine ve kanser aktive edici değişimlere neden olabilmektedir (Ferrua ve Aiuti, 2017). Virüslere karşı oluşan veya hala hazırda var olan immün yanıt da viral vektörlerin işlevlerini yapamadan vücut tarafından temizlenmesine neden olmaktadır. Viral vektörlerin, yüksek üretim maliyetleriyle yaygın kullanılmalarını önleyen bir diğer faktördür. Örneğin, 2019 yılında spinal müsküler atrofi gen tedavisi için onay alan AAV9-bazlı Zolgensma (onasemnogene abeparvovec-xioi)'nın dünyanın en pahalı ilacı konumundadır (yaklaşık 2.125 milyon dolar), ve bu yüksek maliyet SMA'lı bireylerin tedaviye ulaşması önünde büyük bir engeldir.

4.5.2. Viral olmayan vektörler

Viral olmayan vektörler lipozomlardan, polisakkaritlere büyük bir çeşitlilik gösterir. Viral vektörlerin tersine, taşınacak nükleik asit için bir boyut kısıtlaması yoktur, üretimleri ucuz ve kolaydır, modifikasyonlara açıktırlar, mutagenез ve genotoksitesite riski taşımazlar. Ayrıca özellikle biyouyumlu polimerle oluşturulan taşıyıcı sistemlerin, toksisitesidir düşüktür. Böylece viral vektörlere nazaran güvenlik, taşınabilir kargonun büyüklüğü ve maliyet açısından önemli avantajları vardır.

Viral olmayan vektörlerin en büyük dezavantajı genellikle transfeksiyon etkinliğinin virüslerdeki kadar yüksek olmamasıdır. Buna rağmen, viral olmayan vektörlerde yapılan kimyasal ve fiziksel değişikliklerle hem transfeksiyon etkinliği hem de hücre hedeflendirme kapasiteleri artırılmaktadır. Ayrıca, bu vektörler başka moleküllerle de kompleks oluşturup, özellikleri değiştirilebilmektedir (Chuan ve ark., 2019). Örneğin hem hedefleme hem de transfeksiyon ve taşıma etkinliğini artırmak için kitozonlar demir oksit ve altın nanopartikülleri ile beraber formüle edilerek kompozit vektörler oluşturulmuştur. Bunlara ek olarak hem nükleik asit hem de terapötik küçük moleküler ilaçların aynı anda taşınmasında da bu vektörlerle mümkündür (Nandgude ve Pagar, 2021). En yaygın olarak kullanılan viral olmayan gen taşıyıcı sistemler lipit veya polimer bazlıdır.

Negatif yüklü nükleik asitlerle kompleks oluşturan katyonik lipidler, fosfolipitlerden oluşan hücre membranından geçerek gen kargoyu hücre içine taşıyabilir. Aynı zamanda, bu lipidler nükleik asitleri çevreleyerek, nanopartikül olarak da taşıma yapabilir. Lipitleri oluşturulan nötral lipid (genellikle Dioleoylfosfatidilethanolami) ve katyonik lipid (örn.[1-(2,3-dioleyloksi)propil]-N,N,N-trimetilammonium chlorid) oranları sentez esnasında değiştirilerek, katyonik lipidlerin yüzey yükü gibi özellikleri kolayca değiştirebilmektedir. Katyonik lipidlerde bazen oluşan sitotoksiten dolayı, nötral lipidlerde formüle edilmektedir (Zhdanov ve ark., 2002). Bu sistemlerin düşük çözünürlüğü, olası sitotoksik etkisi ve üretim maliyetinin nispeten yüksek olması önemli dezavantajları arasındadır.

Polimerler de önemli viral olmayan gen taşıyıcı vektörler arasındadır. Polietilenimin (PEI) yüksek pozitif yük yoğunluğu olan ve lineer ya da dallanmış şekilde bulunabilen polimerlerdir. Nükleik asitler PEI ile kolaylıkla polielektrolit kompleksi oluşturmaktadır. PEI-bazlı vektörler hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda yüksek transfeksiyon etkinliği göstermiştir (Videira ve ark., 2014). PEI'nin yüksek transfeksiyon etkinliği, hücre zarını destabilize etme potansiyeline, protonlanabilen amino gruplarından dolayı yüksek yük yoğunluğuna, endozomal pHı tamponlamasına ve nükleik asitleri enzimatik degradasyondan koruyabilme özelliklerinden gelmektedir (Videira ve ark., 2014). PEI'in yüksek katyonik yük yoğunluğu, PEI'in yan etkileri olmasına ve sitotoksik etkiye yol açmaktadır. PEI, agregatlar oluşturma yanı sıra, apoptoz aracılı hücre ölümüne, kan hücreleriyle bağlanmaya ve kompleman sisteminin aktivasyonuna yol açabilir (Videira ve ark., 2014).

Gen taşıyıcı sistem olarak önemli avantajlara sahip olan bir diğer polimer ise kitozandır.

4.5.2.1. Kitozan

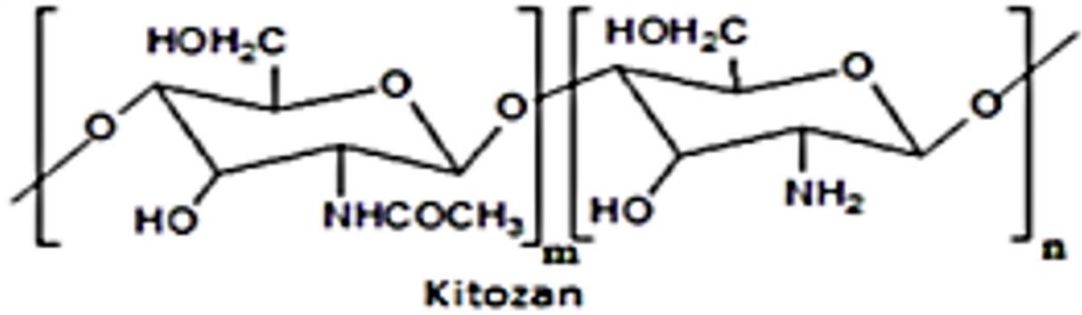
Kitozan gen terapisinde sıklıkla kullanılan viral olmayan vektörler arasındadır. Bir polimer olan kitozanın taşıyıcı sistem olarak önemli avantajları arasında üretiminin ucuz ve kolay olması ve biyouyumlu ve biyoçözünür bir polimer olarak uygulanmasının güvenli olması vardır.

Kitozanın katyonik yapısı, mukoadesif (mukoz membranlara bağlanma) özelliği ve yüzey modifikasyonlarına açık yapısı sayesinde gen taşıyıcı sistemlere ek olarak hem ilaç taşıyıcı sistem hem de doğrudan aktif madde olarak kullanım alanları vardır.

Örneğin, çözünürlüğü düşük ibuprofen gibi ilaçları taşımakta kullanılmaktadır . (Hassani Najafabadi ve ark., 2014).

4.5.2.1.1. Kitozanın yapısı

Kolajenden sonra dünyada en çok bulunan polisakkarit olan kitin, yengeç ve istakoz gibi kabukluların dış iskeletini oluşturan temel moleküldür (Chuan ve ark., 2019). Kitin, tekrarlayan β 1-4 glikozidik bağlarla bağlı N-asetilglukozamin monomerlerinden oluşan doğrusal (dallanmamış) bir polisakkarittir. Kitozan, ise kitinin, deasetile edilmesiyle oluşan β (1-4) N-asetilglukozamin ve D-glukozaminden oluşan bir heteropolimerdir (Şekil 8). Kitozanda bulunan N-asetilglukozamin'in D-glukozamine oranı deasetilasyon derecesine göre farklılık gösterir.



Şekil 8. Kitozanın yapısı (m=N-asetilglukozmin tekrar sayısı, n= D-glukozamin tekrar sayısı) ChemDraw kullanılarak çizilmiştir).

Kitinden N-asetil gruplarını uzaklaştırmak için en sık kullanılan yöntem alkaline hidrolizdir fakat bu deasetilasyon kitin deasetilazlarla da deasetilasyon derecesini daha sıkı kontrol edebilecek şekilde yapılabilir (Kaczmarek ve ark., 2019).

Kitozanın deasetile alt birimlerinde primer amin grup bulunmaktadır. pKa'sı 6.5 olan bu amin gruplar, asidik ortamda protone haldedir ve böylece kitozana pozitif bir yük verilir. Böylece, kitozan doğal katyonik bir polimerdir ve deasetilasyon derecesi arttıkça, pozitif yükü de artmaktadır.

4.5.2.1.2. Kitozanın özellikleri

Kitozan biyoyumlu ve biyoçözünür bir katyonik polimerdir. Amerika Bileşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi tarafından genellikle güvenli kabul edilen madde statüsündedir (Gagliardi ve ark., 2021). Sağlıklı bireylerde oral olarak günlük 6,75 gram kitozan alındığında, bir yan etki görülmemiştir (Guang Liu ve De Yao, 2002).

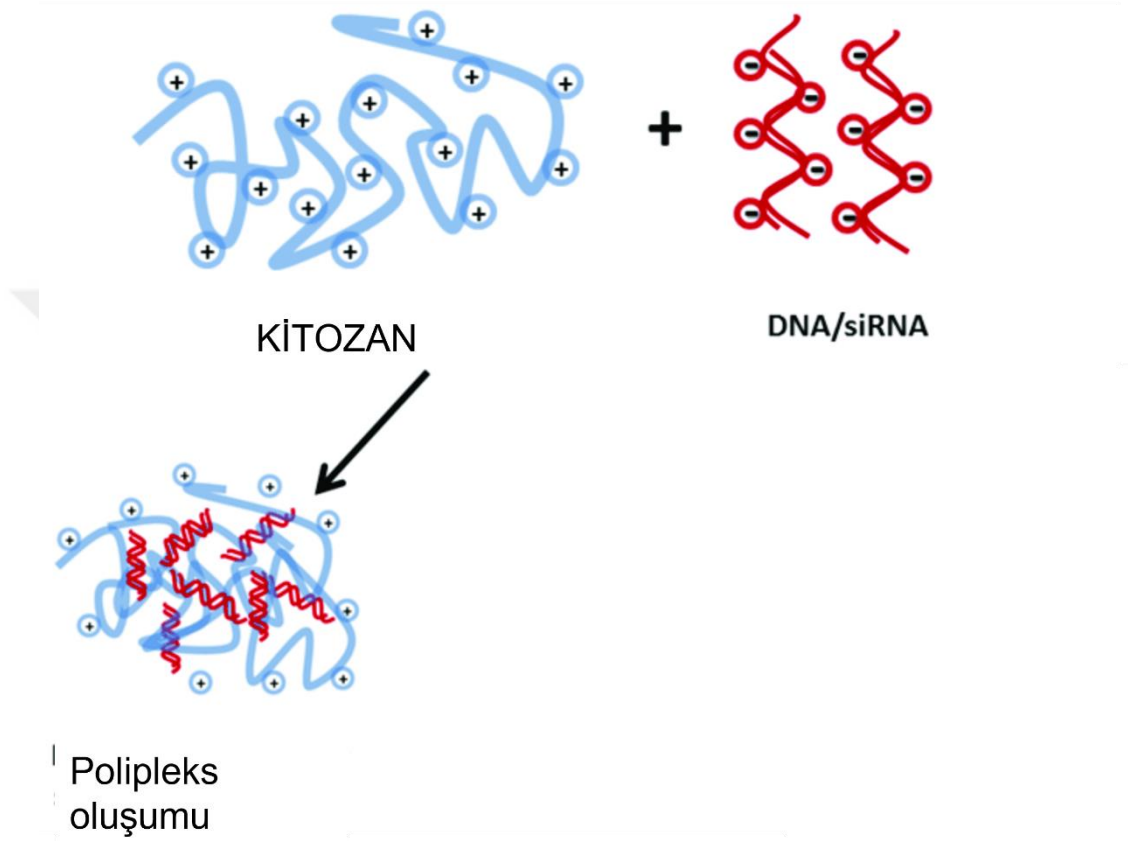
Özellikle gen tedavisi gibi çoklu uygulama gerektiren yaklaşımlar için bu önemli bir avantajdır.

Kitozanın yapısı glikozaminoglikanlara benzemesinden dolayı, insan vücudunda bulunan lizozim ve bağırsak florası tarafından üretilen kitinaz gibi enzimler tarafından parçalanabilmektedir ve böylece biyoçözünür bir polimerdir (Mura ve ark., 2022). Kitozanın parçalanması sonucu ortaya çıkan D-glukozamin gibi parçalanma ürünleri de insan vücudu için toksik değildir.

Deasetilasyon derecesi yüksek kitozanlar, protone amin gruplarından dolayı daha yüksek bir pozitif yük taşıırken, daha düşük deasetilasyon derecesi olan polimerler nötral yüke daha yakındır. Bu polimerdeki pozitif yük, hem nükleik asit gibi negatif yüklü moleküllerle elektrostatik etkileşime girmesini sağlar hem de mukozal membranlarda sıkça bulunan negatif yüklü münle (özellikle de sialik asitle) etkileşime girerek mukoadesif özellik göstermesini sağlar. Mukoadesif özelliklerinden dolayı nazal, bukkal ve oküler yollar da dahil olmak üzere mukozal yüzeyler aracılığıyla hem sistemik hem de lokal ilaç ve gen taşımada kullanılabilmektedir (Mura ve ark., 2022). Özellikle kitozanın kimyasal veya fiziksel çapraz bağlanma sonucu oluşturduğu hidrojeller hem mukozal ilaç taşımada hem de ilaçların salınım modunu kontrol etmekte önem arz etmektedir (Peers ve ark., 2020).

Kitozan bir gen taşıyıcı sistem olarak ise, siRNA ve plazmid DNA gibi anyonik nükleik asitlerle elektrostatik etkileşim sonucunda polielektrolit kompleksler oluşturabilir (Şekil 9). Örneğin, kitozanla polipeks oluşturan GM-CSF kodlayan plazmidin, HeLA hücrelerine kitozan aracılığı ile taşınabileceği ve bunun hücre proliferasyonu üzerinde anlamlı bir etkiye neden olduğu gösterilmiştir (Salva, E ve ark., 2011). Kitozanla yapılan başka bir çalışmada ise VEGF'yi susturmaya yönelik siRNA'nın, kitozanla kompleks oluşturduktan sonra sıçan meme kanseri tümör modelinde, tümör büyümesini önemli bir oranda azalttığı gösterilmiştir (Salva, Emine ve ark., 2012). Kitozan-nükleik asit kompleksleri, taşınan kargonun negatif yüklü hücre membranından geçişini kolaylaştırır, sitozol ve serumdaki nükleazlar tarafından yıkılmalarını engeller ve nükleik asitlere karşı oluşabilecek immün yanıtı korurlar. Oluşan polielektrolit komplekslerin yüzey yükü (zeta potansiyeli) nitrojen:fosfat (amin: fosfat, N:P) oranlarına yani kitozan:nükleik asit molar veya ağırlık cinsinden oranları ile değişiklik gösterir. Genellikle, kitozan oranı yani N:P oranı yükseldikçe,

yüzey yükü artmaktadır. Taşınan kargo ve hücre tipine göre farklı N:P'lerle formülasyon yapmak gerekmektedir. N:P oranı özellikle nükleik asitin kitozanla ne kadar sıkı bir kompleks oluşturduğunu etkileyerek hem oluşan kompleksin boyutuna hem de kargonun kitozandan ayrılma zamanı ve koşullarını etkilemektedir.



Şekil 9. Kitozan ve nükleik asitlerin kompleksasyonu (Cao ve ark., 2019)

Hücre içine alınan nükleik asitler, endozomdan çıkarak siRNA'larda sitozola, plazmidlerde ise hücre çekirdeğine girmesi gerekmektedir. Endozomdan kaçamayan ajanlar, endozomal olgunlaşma ile lizozomal enzimler tarafından yıkılıp, etkisiz hale getirilmektedir. Kitozan proton sünger etkisi ile, endozomdan kaçışı sağlayabilmektedir. Proton sünger etkisinde, endozomun asidifiye olması esnasında endozoma pompalanan protonların, kitozanın amin grupları tarafından tutulmasından dolayı, pH düşmemektedir ve kitozan tamponlama etkisi göstermektedir. Böylece, proton pompalanmasını devam eder. Endozoma giren protonlarla beraber yükü dengelemek için içeriye giren klorür iyonları ve sonrasında giren su moleküllerinin oluşturduğu ozmotik streten dolayı endozomlar şişip patlar. Böylece de taşınan kargo

sitoplazmaya çıkabilir (Chuan ve ark., 2019). Bu yolla kitozan endozomal kaçışı mümkün kılar ve yapılan gen taşıma deneylerinde, bu basamağın kitozan vektörü içeren formülasyonlardaki hız sınırlandırıcı basamak olduğunu göstermiştir (Thibault ve ark., 2010)

Kitozanın yapısından dolayı sahip olduğu yara iyileşmesi, hemostaz ve antibakteriyel etki gibi doğrudan biyolojik özellikler de vardır. Kitozanın dış kanalı tedavisinde kullanılması ve kitozan kaplı gaz bezleriyle hemostazı hızlandırılması üzerine klinik deneyler yapılmaktadır (Bumgardner ve ark., 2003) Kitozanın mukoadezif yara iyileştirici ve gen taşıma özellikleri aynı anda kullanılarak sıçan diyabetik ayak modelinde VEGF plazmidi taşıyan kitozanın anjiyogenezi ve yara iyileştirmesini artırdığı görülmüştür (Lord ve ark., 2017).

Kitozanın düşük (100kDa dan az), orta (100-1000 kDa) ve yüksek (1000 kDa'dan fazla) moleküler ağırlıklı çeşitleri vardır. Bu kitozan çeşitleri polimer iskeletinin uzunluğu açısından ve böylece fizyokimyasal özelliklerinde farklılık gösterir. Böylece, kullanılan kitozanın moleküler ağırlığı oluşturduğu komplekslerin boyutu, stabilitesi ve hücreye giriş etkinliği gibi olaylarda önemli bir faktördür. Yüksek moleküler ağırlıklı kitozan, genelde daha büyük kompleksler oluştururken, düşük moleküler ağırlıklı kitozan daha küçük ama daha az stabil kompleksler oluşturmaktadır. Genelde düşük moleküler ağırlıklı kitozanla oluşturulan kompleksler, küçük boyutlarından dolayı hücreye daha kolay girebilirken, daha düşük stabiliteye sahip oldukları için, nükleik asitleri nükleazlardan koruma etkileri daha düşük olabilmektedir. Kullanılacak olan kitozanın moleküler ağırlığı, yapılan çalışma için optimize edilmesi gereken bir faktördür. Örneğin, yeşil floresan protein (GFP) taşıyan plazmidle kompleks oluşturmuş kitozanalardan yüksek moleküler ağırlıklı olanları , düşük moleküler ağırlıklı kitozanalara nazaran A549 epitel karsinom hücrelerine daha etkili bir transfeksiyon gerçekleştirmiştir (Huang, M. ve ark., 2005). Başka bir çalışmada ise bunun tersine, lüsiferaz kodlayan plazmid ile kompleks oluşturmuş kitozanın, düşük moleküler ağırlıklarda çin hamster over hücre hattının daha iyi transfekte ettiğini göstermiştir (Weecharangsan ve ark., 2008).

Kitozanın yaygın kullanımının önündeki en büyük engel, fizyolojik pH'da çözünür olmamasıdır. Kitozanın pKa'sı 6.5 olduğundan dolayı sadece bu pH'ın altındaki değerlerde amino grupları protone halde bulunmaktadır. Düşük moleküler ağırlıklı ve

deasetilasyon derecesi yüksek kitozan kullanmak çözünürlülüğü nispeten artırmaktadır. Kitozana amin ve hidroksil gruplarına eklenen peptit, polimer ve kimyasallarla çözünürlük ve birçok diğer özelliği de isteğe göre değiştirebilmektedir.

4.5.2.1.3. Kitozana yapılan modifikasyonlar

Kitozanın sahip olduğu özellikler polimer yapısından özellikle de hidroksil grupları amin grupları ve polimer uzunluğundan gelmektedir. Böylece, amin ve hidroksil grubu üzerinden kitozana değişiklikler yaparak istenilen özellikler kazandırılabilir.

Polietilen glikol (PEG) etilen oksit monomerlerinden oluşan hidrofilik bir polimerdir. Genel formülü $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ ile temsil edilen PEG, n sayısı artırarak farklı moleküler ağırlıklarda olan çok yönlü bir yapıdır. PEG'in hem su da hem de bazı organik çözücülerde çözünebilir olması, onun kullanım alanlarını artırmaktadır. PEG ayrıca düşük toksisiteli ve biyouyumlu bir polimer olduğu için tercih edilen bir yapıdır. İkinci nesil biyofarmasötik ilaçlarda, plazma yarı ömrünü uzatmak ve bağışıklık yanıtını azaltmak için PEG sıklıkla eklenmektedir.

Kitozan gibi viral olmayan taşıyıcılara da PEGlenmesi, taşıyıcı sistemin plazma proteinleri gibi proteinlerin adsorpsiyonlarına ve antikorlar aracılığı tanımlarına karşı sterik engel oluşturur (Suk ve ark., 2016). Ayrıca, oluşan yapıların boyutunu da büyütürken renal klirensi azaltmakta ve retiküloendotelial sistem tarafından alınmayı azaltmaktadır, Bunlardan dolayı da PEG'lenen yapıların plazma yarı ömrünü uzatmaktadır.

Kitozanın PEG'lenmesi özellikle çözünürlülüğünü artırmak ve böylece fizyolojik pH'da solüsyonda kalmasını sağlamak için yapılmaktadır. Kitozan, fizyolojik pH'daki çözünürlülüğü düşük olduğundan, hidrofobik etkileşimle büyük agregatlar oluşturma riski vardır. Kitozana PEG eklenmesinin hem yüksek pH'lardaki suda çözünürlülüğünü hem de organik çözücüler içinde de çözülme miktarını artırdığı gösterilmiştir (Casertari ve ark., 2012).

Kitozana PEG hem amin gruplarından (N-bağlı) hem e hidroksil grubu (O-) bağlı olarak eklenebilmektedir. C2'de bulunan amin grubu, C3 ve C6'da bulunan hidroksil grubundan daha reaktif olduğu için çoğu çalışmada amin grubu aracılığıyla PEG eklenmiştir (Casertari ve ark., 2012). Kitozana PEG eklenmesi için farklı kimyasal reaksiyonlar kullanılmaktadır. Bunlardan bir tanesi, PEG'e primer aminlerle reaksiyona giren N-hidroksi süksinimid (NHS) ester bağlamaktır. Böylece bu yapı,

kitozandaki amin gruplarla kovalent amid bağları oluştur ve NHS ortamdan uzaklaşır. Çoğu çalışmada kullanılan PEG cinsi metoksi PEG'tir. Bunun sebebi de kitozana bağdalanan PEG'in diğer ucunu metoksi grubu ile kapatıp, başka kitozan moleküllerine bağlanmasını ve böylece agregasyonu engellemektir (Mao ve ark., 2010). PEG ayrıca iki ucuna farklı gruplar eklenerek, kitozana peptit ve aptamer gibi yapılar eklemek için bir bağlayıcı olarak da kullanılabilir.

Gen taşıma sistemlerinde de PEG'in agregasyon önleyici etkisi, kitozanın yaygın kullanımı için önemlidir. siRNA ile kompleks oluşturulmuş farklı miktarda PEGlenmiş kitozanla yapılan bir araştırmada PEG eklenmenin çözünürlülüğü artırdığı fakat yüksek oranda PEGlemede hem hücreye girişin hem de susturma oranının azaldığı gösterilmiştir (Guțoaia ve ark., 2016). Yükselen PEG yüzdesiyle birlikte, bağlanmamış ve pozitif yüklü amin gruplarının azalması, zeta potansiyelini düşürmüştür ve azalan transfeksiyon etkinliği buna bağlı olabileceği öne sürülmüştür. Başka bir çalışmada ise PEG'in zeta potansiyelini düşürmesiyle kitozan nanopartiküllerinin daha az karaciğer geçişinde takıldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada da görülebileceği, kitozana eklenecek PEG miktarı her sistem için test edilmesi gereken bir faktördür.

Kitozana, -SH (tiyol) grubunun kovalent bağlarla eklenmesi sonucunda kitozan tiyomeri ortaya çıkmaktadır. Bu yolla kitozan mukoadezif ve yüzeylerden geçme özelliğini artırmaktadır (Anitha ve ark., 2011; Bernkop-Schnürch, 2003). Kitozandaki tiyol grupları, mukoz yüzeylerdeki disülfid bağlarla güçlü kovalent etkileşime girerek, normalden 4 katına kadar daha çok mukoadezif özellik gösterebilmektedir (Bernkop-Schnürch, 2003). Ayrıca bu tiyomerler, molekül içi ve moleküller arası disülfid bağlar oluşturarak doku içi jel oluşturma özelliği de göstermektedir ve kontrollü salınım gibi uygulamalarda yer alabilmektedir (Anitha ve ark., 2011). İnsan korneal hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada da kitozan tiyomerinin hücreye girişi artırdığı ve böylece oküler ilaç taşınması için kullanılmak için kullanılabileceği gösterilmiştir (Anitha ve ark., 2011).

Kitozan sistin eklenilerek veya tiyoglikolik asit aracılığıyla tiyollenebilmektedir. Siklik bir yapı olan Traut ajanı ((2-iminothiolane) ile de kitozan tiyollenmesi optimize edilmiştir (Bae, I.-H. ve ark., 2011). Bu yöntemin diğerlerine göre avantajı, primer

main gruptaki yük bu bağlanma ile nötralize olsa da, tiyollenme ajanının üstündeki amin grupla kitozanın katyonik yapısı korumaktadır (Bernkop-Schnürch, 2003).

Tiyollenmiş kitozan ayrıca, tiyol-reaktif maleimid grubu taşıyan bağlayıcılar aracılığıyla, kitozan peptid, aptamer veya protein eklemek için -de kullanılabilir.

Kitozana yapılan modifikasyonlarla arasında özellikle aktif hedeflendirme sağlamak için protein veya peptit konjugasyonu vardır. Böylece kullanılan peptite göre hem kitozanın hücre içine taşınmasında reseptör aracılı endositoz mekanizması da kullanılabilmekte hem de hedef organ veya dokuya giden taşıyıcı miktarı artırılarak etkinlik ve güvenlik unsurlarında iyileştirilebilmektedir.

Kitozana peptit eklenmesi önceki bölümde de bahsedildiği gibi PEG gibi bağlayıcılarla tiyollenmiş kitozan veya peptidin tiyol-maleimid reaksiyonu ile gerçekleşebilir (Mohan ve ark., 2022). Buna ek olarak, kitozanın amin grubu ve peptidler arasında NHS aracılığıyla da bağ oluşturulabilir.

Kitozana eklenen peptitler arasında integrini hedefleyen RGD, trans-activated transcription peptiti ve laminin peptiti vardır (Mohan ve ark., 2022). Örneğin, kitozana RGD ligandının NHS kullanılarak eklendiği yapıya, quantum noktaları da eklenildiğinde, kanser hücrelerini görüntülemek için kullanılabileceği gösterilmiştir (Mansur ve ark., 2016). Başka bir çalışma da ise kitozana PEG bağlayıcı aracılığıyla trans-activated transcription peptiti eklenmiştir. Bu peptit, HIV yapısında bulunur ve hücre penetre edici peptit grubundan olup, hücre zarından geçişi kolaylaştırmaktadır. Malhotra ve arkadaşları bu yolla hazırlanan siRNA taşıyan kitozan nanopartiküllerinin fare nöroblastoma hücrelerini etkin bir şekilde transfekte ettiğini göstermiştir (Malhotra ve ark., 2013). Başka bir çalışmada ise karboimidle aktive edilen kitozanın amin gruplara başka bir hücre penetre edici peptit olan 8 arginin eklenmiştir ve plazmid DNA ile nanopleks hazırlanmıştır (Zhao ve ark., 2011). Bu nanopleks transfeksiyon etkinliği artırmıştır. Kanserlerde sıklıkla ekspresyonu artan transferrin reseptörünü hedeflemek için transferinle konjuge edilen kitozan, pozitif yüklü poli-L-lizinle birlikte MMP-9'ye karşı shRNA taşıyan bir nanopartikül oluşturmuştur. Bu protein/peptid/kitozan nanopartikülü insan nazofarenks karsinoma hücre hattına transfeksiyonu önemli ölçüde artırmıştır (Li, Jianghua ve ark., 2018).

4.5.2.1.4. Kitozan temelli CRISPR/Cas taşıyıcı sistemleri

CRISPR/Cas temelli kanser tedavisi üzerine olan araştırmaların çoğu ve klinik deneylerin hepsi ex vivo hücreleri içerir. Bölüm 4.4.2.3.'de de anlatıldığı gibi bu sistem ya ribonükleoprotein olarak veya onları kodlayan genler aracılığıyla hücrelere verilmektedir.

CRISPR/Cas sisteminin doğrudan in vivo uygulaması önünde iki önemli engel bulunmaktadır. Bunlar gen tedavi ajanlarının etkin ve güvenli bir şekilde hücreye taşınması ve hedef-dışı etkinin önlenmesidir (Yip, 2020).

Fizyolojik ve hücresel bariyerler Bölüm 4.5'de gen terapisi ajanları için listelenenlerle benzerdir. Buna ek olarak, CRISPR/Cas9 sisteminin klinik uygulamasının önünde duran engel ise hedef-dışı etkileri ve nükleazlara karşı oluşabilecek immün yanıttır. Bu engelleri aşmanın bir yolu ise CRISPR-Cas9'u hedeflendirilmiş taşıyıcı sistemler aracılığıyla uygulamaktır. Bu nedenlerden dolayı CRISPR/Cas9 aracılığıyla başarılı bir gen tedavisi yaklaşımı için uygun taşıyıcı vektörlerin tasarlanıp kullanılması gerekmektedir.

Hem büyük hem de yüksek negatif yüklü bir kargo olan CRISPR/Cas9 sisteminin taşınmasında da kitozanı başarıyla kullanan araştırmalar mevcuttur. Karboksimetil kitozanın çevrelediği protamin sülfat/ CRISPR/Cas9 plazmid kompleksine, tümör hücresi ve hücre çekirdeğini hedefleyen motifler de eklenerek, hücre döngüsü kontrolünde yer alan bir proteinin ekspresyonu kanser hücre hatlarında azaltılmıştır (Liu ve ark., 2018). Karboksimetil kitozan oluşturmak için kitozanın amin grubundan -CH₂-COOH eklenmiştir. Karboksimetil kitozan, kitozanın çözünürlüğü artırırken, yüksek pozitif yük yoğunluğu olan protamin sülfat ise, bu pozitif yükle kitozanın hem kompleks oluşturma hem de hücreye giriş özelliklerini artırabilmektedir. Bu çalışmada tümör yüzeyinde ve çekirdeğine eksprese olan nükleolini hedefleyen aptamer AS1411 kullanılmıştır. Aptamerler, tek sarmallı kısa nükleik asitlerdir ve hedef protein veya peptitlere sıkıca bağlanırlar. AS1411 aptameri aracılığıyla bu çalışmada hem tümörlü hücrelerin zarından geçiş hem de nükleer translokasyon kolaylaştırılmıştır. Bu taşıyıcı sistemde KALA peptidi de kullanılmıştır. Amfifilik bir peptit olan KALA, füzogenik etkiye sahiptir ve bir hücre penetre edici peptit olarak, kargonun hücre içine taşınmasına yardımcı olur.

İnsan embriyonik böbrek hücre hattı, HEK293 hücreleri de PEG'lenmiş kitozan kullanılarak CRISPR/Cas9 plazmidi ile transfekte edilmiştir. Kompozit vektör olarak

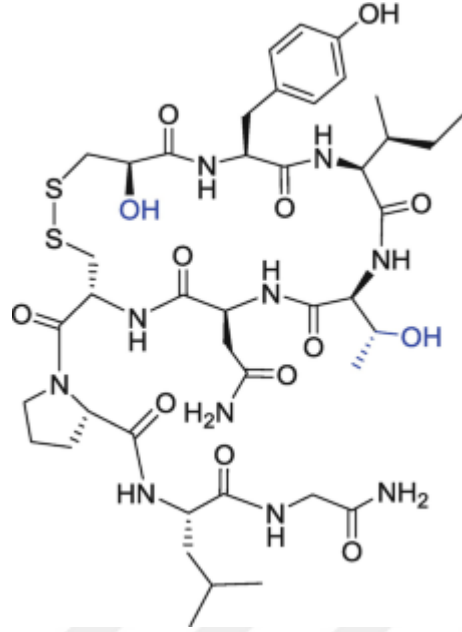
kalsiyum ve kitozandan oluşan taşıyıcı sistem de HEK293 hücrelerine, CRISPR/Cas9 plazmidini başarıyla taşımıştır (Rabiee ve ark., 2021). Kitozan sadece CRISPR/Cas9 plazmidi değil de CRISPR/Cas9 ribonükleoproteini taşınmasında da kullanılmıştır. Modifiye edilmiş (nüklear lokalizasyon sinyali eklenmiş ve yükü değiştirilmiş) Cas9 ribonükleoproteini taşıyan, kitozanla kaplanmış kırmızı floresan protein sistemi ile yapılan transfeksiyon çalışmasında, HeLa hücre hattında %70'in üstünde transfeksiyon gözlenmiştir. Ayrıca farklı hücre hatlarında yapılan çalışmada, %55'e kadar genom düzenleme etkinliği gösterilmiştir (Qiao ve ark., 2019).

Kistik fibroz üzerine *in vitro* ortamda yapılan bir çalışmada CRISPR-Cas9 plazmidleri ile PEGlenmiş kitozanla kompleks oluşturulduğunda transfeksiyon etkinliğinin arttığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2018). Bu çalışmanın devamı olarak, PEGlenmiş kitozan/CRISPR-Cas9 nanopleksleri de inhalasyon yoluyla verilmeye uygun olacak şekilde başarıyla formüle edilmiştir (Zhang ve ark., 2021).

Özetle, kitozanın CRISPR/Cas9 ile taşındığı araştırmalarda, kitozana çeşitli modifikasyonlar yapılmıştır. Bunlar arasında başlıcaları PEGlasyon ve peptid konjugasyonudur. Fakat, bu tür taşıyıcı sistemlerin hazırlanması esnasında, proteinlerin ve peptidlerin ikincil ve üçüncül yapılarını değişmemesi işlevsellikleri için önemlidir. O yüzden de kitozanın çözünür olduğu düşük pH'larda stabil olan oksitosin gibi yapılar kullanılmalıdır.

4.6. Oksitosin

Oksitosin dokuz peptidlik bir nörohormondur. İki sistin amino asiti arasındaki disülfid bağlardan dolayı siklik bir yapıdadır (Şekil 10). Oksitosin, farklı hücre tiplerinde birbirinden farklı fonksiyonları vardır. Beyinde sosyal bağlanma ve sosyal davranışlarda önemli rol oynarken, rahim ve memede miyoepitel hücrelerin kasılmasını sağlayarak sırasıyla doğum esnasında rahmin kasılması ve doğumdan sonra süt salınımında rol alır (Carter ve ark., 2020). Farmakolojik olarak oksitosin preparatları doğum sonrası kanamayı durdurmak için kullanımdadır. İlginç olarak oksitosin reseptörünün (OTR) birçok farklı kanser türünde ekspresyonu artmaktadır (Liu ve ark., 2020).



Şekil 10. Oksitosinin yapısı (Wiśniewski, 2019)

4.6.1. Meme kanseri ve oksitosin

Oksitosin reseptörü, G-proteini kenetli reseptör ailesindendir. Oksitosin ve meme kanseri ilişkisi, çocuk doğumu ve süt emzirme ile azalan meme kanseri riski ilişkisini gösteren epidemiyolojik çalışmalarla gün yüzüne çıkmıştır (Liu ve ark., 2020). Oksitosinin ayrıca fiziksel egzersizle ilintili meme kanseri riskindeki düşüşe de aracı olduğu öne sürülmektedir (Liu ve ark., 2020). İlginç olarak epitel kökenli olan meme kanseri hücrelerinde de OTR ekspresyonu artmaktadır. Ito ve arkadaşlarının OTR'ye özgül monoklonal antikora 57 meme kanseri hastasında yaptığı bir araştırmada, hastalardan alınan meme dokularının %91'inde OTR ekspresyonu görülmüştür (Ito ve ark., 1996). Yine aynı araştırmada meme kanserinin farklı türlerinden olan 4 insan meme kanseri hücre hattının (MDA-MB-468, MDA-MB- 231, MDA-MB-361, ve MCF-7) OTR ekspresse ettiğini saptanmıştır.

Oksitosin reseptörünün primer meme kanseri hücrelerinin çoğunluğunda (%80) bulunduğu gösteren başka çalışmalar da vardır (Reversi ve ark., 2005). Yapılan çalışmalarda da in vitro ortamda insan ÜNMK hücre hattı, MDA-MB-231 kültürlerine oksitosin eklenmesi, proliferasyonu azaltmıştır (Cassoni ve ark., 1997, 1994). Oksitosin güçlü bir anti enflamatuvar peptit olarak kanseri destekleyen enflamatuvar yanıtı ve sitokinleri azaltarak bu etkileri yapabilmektedir. Fakat, OTR'yi fazla eksprese eden fare modelinde, HER2+ meme tümörü oluşumu görülmüştür ve bu da oksitosinin meme kanseri türüne göre etkisinin değişebileceğini ortaya koymuştur .Yine de

oksitosinin bu tezde kullanılan(Li, D. ve ark., 2021) ÜNМК meme hattı MDA-MB-231 üzerinde yapılan çalışmalar, oksitosinin büyüme azaltıcı etkisi olduğunu göstermiştir (Liu ve ark., 2020).

Vücutta kan-beyin bariyeri ile korunan beyinin dışında, OTR ekspresyonu genelde hamile ve emzirmekte olan kadınlarda görüldüğü için, OTR meme kanseri hedefleme için de kullanabilecek bir peptit olabilir. Oksitosin nötral ve yüksek pHda stabilite sıkıntısıyla karşılaşırken, oksitosin içeren çoğu formülasyon düşük pH'da (pH 3-5) hazırlanmaktadır (Hawe ve ark., 2009). Böylece kitozanın çözülmesi için gerekli olan pH, aynı zamanda oksitosinin de stabilitesine katkıda bulunarak taşıyıcı sisteminin formülasyonunu uygun kılmaktadır. Oksitosin bu çalışmada kitozanla beraber formüle edilerek hem TN-C'ye özgül CRISPR/Cas9 plazmidleri ile transfeksiyon etkinliğini artırmak için hem de potansiyel aktif hedeflendirme için kullanılmıştır.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Araç ve Gereçler

5.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve sarflar

% 0,4 Tripan mavisi	Sigma Aldrich (ABD)
4x Laemmli tamponu	Bio-Rad (ABD)
6x jel yükleme boyası	Thermo Fisher Scientific (ABD)
8µm por çaplı kuyu inserti	Merck (Almanya)
Agaroz	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Amicon ultrasantrifüj filtresi	Merck (Almanya)
Amonyum persülfat	Bio-Rad (ABD)
Ampisilin	Sigma (ABD)
Anti-fare peroksidaz konjugatlı sekonder antikor (SA00001-1)	Proteintech (ABD)
Anti-tavşan peroksidaz konjugatlı sekonder antikor (SA00001-2)	Proteintech (ABD)
Asetik asit	Merck (Almanya)
BamHI	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Bax monoklonal primer antikor (60267-1)	Proteintech (ABD)
Borik asit	Sigma Aldrich (ABD)
Bovin serum albümin	Sigma Aldrich (ABD)
Bradford Assayı	Bio-Rad (ABD)
DAPI	Sigma Aldrich (ABD)
Diyaliz membranı	Spektra/Por (ABD)
DMEM (yüksek glikozlu)	Sigma Aldrich (ABD)
EcoRI	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Ellman Reaktifi	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Entellan- Yapıştırıcı	Merck (Almanya)
Eozin	Merck (Almanya)
Etanol	Merck (Almanya)

Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Sigma Aldrich (ABD)
Fetal sığır serumu	Capricorn Scientific (Almanya)
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit	ImmunoStep (İspanya)
Formaldehit	Merck (Almanya)
Fosfat tamponlu salin	Wisent BioProducts (Kanada)
Fosfat tamponlu salin (PBS)	Sigma Aldrich (ABD)
GAPDH monoklonal primer antikor (60004-1)	Proteintech (ABD)
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Gliserol	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Hematoksilen	Merck (Almanya)
Hidroklorik asit (HCl)	Merck (Almanya)
Hücre döngüsü kiti	Cytognos, (İspanya)
ImProm-II Reverse Transcription System	Promega (ABD)
Jelatin	Sigma Aldrich (ABD)
Kardiyogreen	Sigma Aldrich (ABD)
Kemilüminesant substrat kit Clarity	Bio-Rad (ABD)
Kitozan (düşük ağırlıklı 448969)	Sigma Aldrich (ABD)
Ksilen	Merck (Almanya)
LB agar	Thermo Fisher Scientific (ABD)
LB besiyeri	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Lipofectamine 3000	Invitrogen-Thermo Fisher Scientific (ABD)
Matrijel	Corning (ABD)
MaxiPrep Plazmid İzolasyon kiti	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Metanol	Merck (Almanya)
MTT	Sigma Aldrich (ABD)
Oksitosin	Sigma Aldrich (ABD)

OneShot™ Max Efficiency DH5α-T1R	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Opti-Mem	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Parafin- Pellet	Sigma Aldrich (ABD)
PEG bağlayıcı (NHS-PEG-Mal)	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Penisilin/streptomisin	Capricorn Scientific (Almanya)
Precision Plus protein standardı (161-0374)	Bio-Rad (ABD)
Proteaz ve fosfataz inhibitör kokteyli	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Pureyield Plasmid Miniprep system	Promega (ABD)
RIPA tampon	Thermo Fisher Scientific (ABD)
RNA izolasyon kiti RNeasy	Qiagen (Almanya)
Sodyum dodesil sülfat	Sigma Aldrich (ABD)
Sodyum hidroksit pelleti	Sigma Aldrich (ABD)
Sodyum klorür	Merck (Almanya)
Super Optimal Broth	Thermo Fisher Scientific (ABD)
SYBR Safe DNA jel boyası	Invitrogen-Thermo Fisher Scientific (ABD)
SYBR Green qPCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific (ABD)
SYBR Safe Etidyum bromür	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Taq polimerazı	Thermo Fisher Scientific (ABD)
TEMED	Bio-Rad (ABD)
Tenascin-C anti-insan primer antikor (ab108930)	AbCam (İngiltere)
TN-C CRISPR/Cas9 (KN415251)	Origene (ABD)
TN-C CRISPR/Cas9 plazmidi	Vector Builder (ABD)
Traut ajanı	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Trifan mavisi	Lonza (İsviçre)
Trypsin /EDTA	Wisent BioProducts (Kanada)
Tris baz	Sigma Aldrich (ABD)

Tween-20

Sigma Aldrich (ABD)



5.1.2. Kullanılan cihazlar

Akım sitometri cihazı	BD Biosciences (ABD)
Buzdolabı (+4°C)	Telstar (İspanya)
Çalkalayıcı inkübatör	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Çalkalayıcı su banyosu	Memmert (Almanya)
Derin dondurucu (-80°C)	Nuaire (İngiltere)
Derin dondurucu (-86°C)	Nuaire (İngiltere)
Dikey elektroforez cihazı	Bio-Rad (ABD)
Doku boyama cihazı	Leica (Almanya)
Doku takip cihazı	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Floresan mikroskop	Evos, Life sciences Thermo Fisher Scientific (ABD)
Hassas terazi	Shimadzu (Japonya)
Hassas terazi	Sartorius (Almanya)
<i>In vivo</i> ve <i>ex vivo</i> görüntüleme sistemi	Vilber (Fransa)
Işık mikroskobu	Leica (Almanya)
Jel görüntüleme cihazı	Olympus (Japonya)
Karbon dioksitli inkübatör	Esco (Singapur)
Kemigörüntüleme cihazı	Vilber Lourmat (Fransa)
Kırık buz makinesi	Hoshizaki (Japonya)
Kızıl ötesi spektroskopi cihazı	Perkin-Elmer (ABD)
Laminar akışlı kabin-Sınıf II	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Liyofilizatör	Labconco (ABD)
Magnetik karıştırıcı	Ika-Werk (Almanya)
Masaüstü soğutmalı santrifüj	Beckman Coulter (ABD)
Mikrodalga fırın	Weigh-Westinghouse (Almanya)

Mikroplaka okuyucu (SmartSpec 300)	Bio-Rad (ABD)
Mikrotom	Leica (Almanya)
NanoDrop ND-1000	IsoGen (Hollanda)
Otoklav (Kirli materyal için)	Hirayama (Japonya)
Otoklav (Temiz materyal için)	Hirayama (Japonya)
Partikül boyutu ölçme cihazı	Malvern (İngiltere)
pH metre	WTW (Almanya)
RT-PCR cihazı	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Santrifüj	Eppendorf (Almanya)
Taramalı elektron mikroskopu	Zeiss (Almanya)
Ultra saf su sistemi	Elga (İngiltere)
Ultra santrifüj	Beckman Coulter
Vorteks	Ika-Werk (Almanya)
Yatay elektroforez sistemi	Atto (Japonya)
Yıkama ve dezenfeksiyon makinesi	Miele (Almanya)
Yüksek devirli santrifüj	Beckman Coulter (ABD)
Zeta potansiyeli ölçme cihazı	Malvern (İngiltere)

5.1.3. Besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanışı

5.1.3.1. Besiyerleri

- **Hücre kültürü besiyeri**

Yüksek glikozlu DMEM besiyerinde besiyerine ısı aktivesi yapılmış %10 fetal sığır serumu, 100 I.U/ml penisilin/100µg/ml streptomisin ve 2mM L-glutamin eklenerek hücre kültürü besiyeri hazırlanmıştır.

Transfeksiyon çalışmalarında ayrıca sadece fetal sığır serumu açısından farklı besiyerler de kullanılmıştır bunlar %20 fetal sığır serumu ile yukarıdaki gibi hazırlanan tam hücre besiyeri ve hiç fetal sığır serumu kullanmadan hazırlanan hücre besiyerleridir.

- **Ampisilinli Luria Bertani (LB) sıvı besiyeri**

Ticari olarak alınan LB besiyeri tozu 10 g/L tripton, 5g/L maya ekstraktı ve 10 g/L sodyum klorür olacak şekilde 1 litre distile suda çözülmüştür. Daha sonra otoklavda sıvı programında basınç altında 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Steril LB sıvı besiyeri oda sıcaklığına geldikten sonra, aseptik koşullarda 100 µg/ml ampisilin eklenerek transformasyon çalışmaları için antibiyotik içeren LB besiyeri hazırlanmıştır.

- **Ampisilinli LB agarı**

Ticari olarak satın alınan LB besiyeri agarı 15 g/L agar, 10 g/L tripton, 5g/L maya ekstraktı ve 10 g/L olacak şekilde 1 litre distile suda çözülmüştür. Daha sonra otoklavda sıvı programında basınç altında 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Steril LB agarı bir miktar soğuduktan sonra aseptik koşullarda 100 µg/ml ampisilin eklenmiş ve petri kaplarına dökülmüştür. Steril ortamda tutulan ampisilinli LB agarlar petri kaplarında jelleştikten sonra kullanıma kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

- **Süper Optimal Broth (SOC)**

Transformasyondan sonra kullanılan SOC besiyeri %0,5 maya ekstraktı, %2 tripton, 10mM sodyum klorür, 2,5mM potasyum klorür, 10mM magnezyum klorür, 10mM magnezyum sülfat ve 20mM glukoz olacak şekilde 1 litre distile suda çözülmüştür. Daha sonra otoklavda sıvı programında basınç altında 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Steril SOC sıvı besiyeri kullanıma kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir

5.1.3.2. Çözeltiler

SDS-PAGE Jeli

SDS page jeli polimerizasyonu için aşağıdaki kimyasallar hazırlandı

1. 1 M Tris (+HCl) (100 mL), pH:8,8: 12,1 g Tris bir 50mL distile suda çözülür.
Derişik HCl ile pH, 8,8'e getirildikten sonra hacim 100 mL'ye tamamlanır.
2. 1 M Tris (+HCl) (100 ml), pH:6,8 : 12,1 g Tris bir 50mL distile suda çözülür.
Derişik HCl ile pH 6,8'e getirildikten sonra hacim 100 mL'ye tamamlanır.
3. %10 APS (Amonyum persülfat): 0,2 g APS 2 mL distile suda çözülür
4. %20 SDS: 0,4 g SDS 2 mL distile suda çözülür.

Kimyasallar	10 mL Running Jel %12	Kimyasallar	10 mL Running Jel %8
1 M Tris pH:8,8	3,76 mL	1 M Tris pH:8,8	3,76 mL
%30 Akrilamid	2,67 mL	%30 Akrilamid	2,66 mL
%20 SDS	50 µL	%20 SDS	50 µL
%10 APS	50 µL	%10 APS	50 µL
TEMED	5 µL	TEMED	5 µL
H2O	3,55 mL	H2O	3,5 mL

Kimyasallar	Stacking Jel 2x
1 M Tris pH: 6,8	1,25 mL
%30 Akrilamid	1,33 mL
%20 SDS	50 µL
%10 APS	50 µL
TEMED	10 µL
H2O	7,2 mL

Daha sonra bu kimyasallar polimerizasyon ajanları ile birlikte aşağıdaki şekilde karıştırılır.

Tris-Glisin elektroforez tamponu

1x Tris-glisin elektroforez tamponu konsantrasyonlar 25mM Tris, 0,192 M glisin, ve 0,1% olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Transfer tamponu

10X tampon için 151.425g Tris ve 720.67g Glisin' 3.5L'de çifte distile su ile çözülüp daha sonra hacim 5 litreye tamamlanmıştır.

%10 metanollu transfer tamponu için ise 10 x transfer tamponundan 500 ml ve 500 ml etanol 4L distile suya eklendi.

Tris tamponlu salin (TBS) hazırlanması

4,84 g Tris ve 18 g sodyum klorür 2 litre çifte distile suda çözülür ve pH 7.4'e ayarlanır.

TBS tween (TBST) hazırlanması:

2 lt TBS içine %0,1 olacak şekilde 200 µl Tween 20 eklenmiştir.

10X Tris-Borat-EDTA (TBE) tamponu

108 g Tris baz, 55 g Borik Asit ve 9.3 g Na₂EDTA 600ml distile suya eklenmiştir ve çözülene kadar karıştırılmıştır. Daha sonra hacim 1000ml ye tamamlanmıştır. Agaroz jel yapımı ve elektroforezi esnasında ise distile su ile 1:10 oranında (100 ml 10X TBE, 900 ml distile su) sulandırılmıştır.

%5 süt tozu (bloklama çözeltisi)

3 gram süt tozu, 60 mL TBST'de çözülerek b%5'lik süt tozu hazırlanmıştır.

10M NaOH

10M NaOH hazırlamak için 40 gram NaOH peleti 100mL su da çözülmüştür.

0,1M sodyum asetat tamponu (pH 5.5)

400 ml ultra saf su içinde 2,866 g sodyum asetata, 0,889g asetik asit eklendi ve pH 10M NaOH ile 5.5'e ayarlandı. Daha sonra hacim 500 ml'ye ultra saf su ile tamamlandı. Transfeksiyon çalışmalarında kullanılmadan önce solüsyonlar 0,22 µm por çapında filtrelerden geçirilerek sterilize edildi.

5mM HCl %1 NaCl diyaliz solüsyonu

Derişik HCl asitten 1:12 sulandırılarak ilk önce 1M HCl hazırlandı. Daha sonra bu stoktan 1:200 dilüsyon yapılarak (örneğin 1 litre solüsyon için 5 ml kullanılarak) ve %1 NaCl eklenerek (örneğin 1 litre solüsyon için 10g) diyaliz solüsyonu hazırlandı.

5.1.4. Kullanılan hücre hatları

MDA-MB-231 insan epitel kökenli üçlü negatif meme kanseri hücre hattı (ATCC HTB-26™).

MCF-7 insan hormon reseptörü pozitif meme kanseri hücre hattı (ATCC-HTB-22).

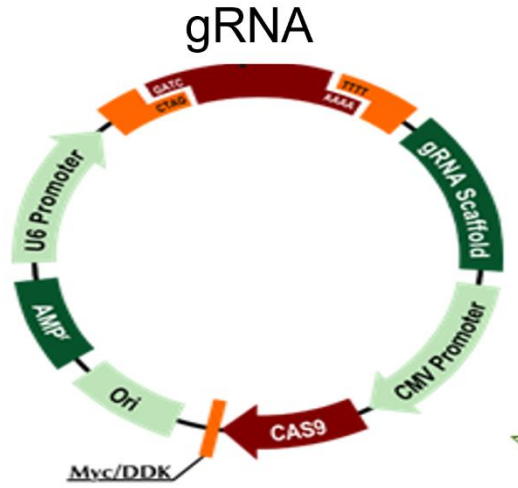
Tez çalışmasındaki in vitro deneyler ve in vivo meme kanseri modeli oluşturma çalışmaları MDA-MB-231 hücreleri ile yapılmıştır.

MCF-7 hücreleri ise tez kapsamında formüle edilen nanoplekslerin in vitro transkripsiyon etkinliği çalışmasında MDA-MB-231 hücrelerine ek olarak kullanılmıştır.

5.1.5. Kullanılan CRISPR/Cas9 plazmidleri

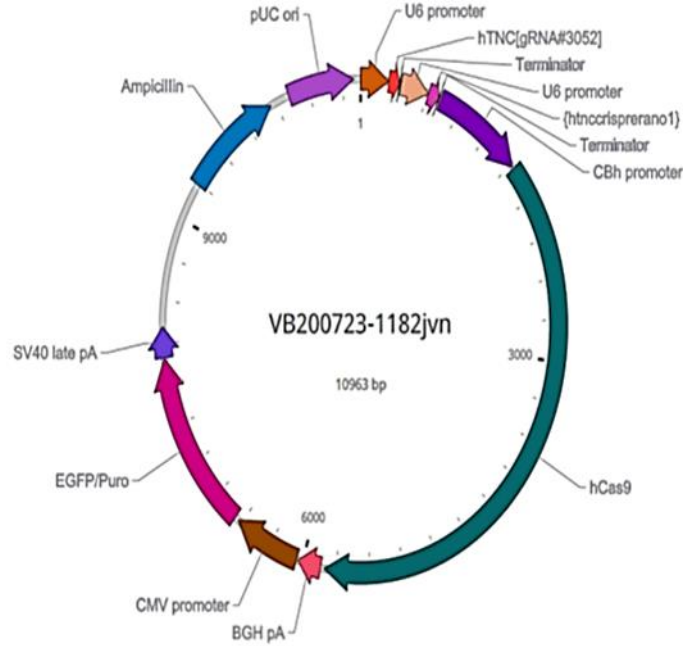
Bu tez çalışmasında kullanılan tüm plazmidler ticari olarak satın alınmıştır.

İnsan Tenascin-C (TN-C) genine özgül 20 nükleotid uzunluğundaki rehber RNA ve Cas9 (pCas-TN-C) genini taşıyan plazmid (G1: 8 kb) üretici firmadan temin edilmiştir (Şekil 11). Bu plazmidde gRNA, küçük boyutlu RNA'ların transkripsiyonu için uygun olan U6 promotörü kontrolü altındadır. U6 promotörü, shRNA'ları, tRNA'ları, ve 5S ribozomal RNA. sentezleyen RNA pol III ile bağlanır ve mRNA'da olan poliadenilasyon gerçekleştirmez. Bu plazmidde Cas9 geni ise yüksek ekspresyon sağlayan CMV promotörü kontrolündedir ve bu promotör RNA polimeraz II'ye bağlanarak mRNA sentezini sağlamaktadır . Plazmidde ayrıca bakteriyel çoğalmayı sağlayan *ori* bölgesi ve ampisilin direnç geni de bulunmaktadır.



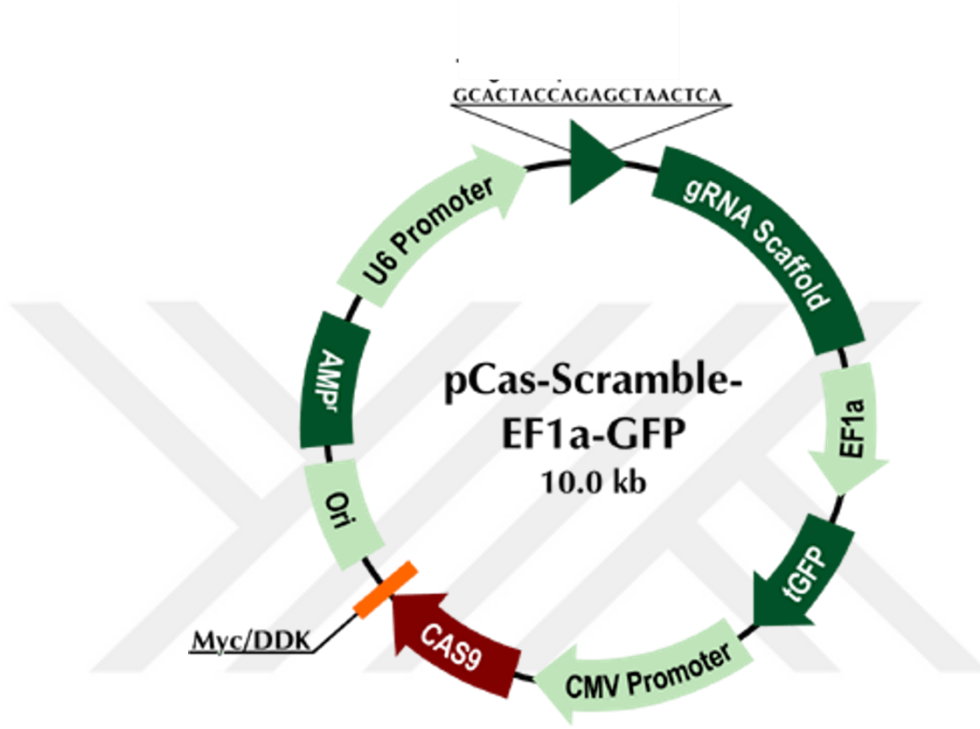
Şekil 11. Tekli TN-C (G1) ve GFPsiz scrambled gRNA CRISPR/Cas9 plazmidinin yapısı

Ticari olarak alınan plazmidlerde, yeşil floresan protein (GFP) ve puromisin direnci genleri plazmidde bulunmadığı için, iki farklı rehber RNA'nın bir plazmidde taşındığı CRISPR/Cas9 plazmidi sentezlendirilmiştir (VB: 10,96 kb). Bu plazmid TN-C ye özgül iki gRNA'yı U6 promotörü kontrolünde kodlamaktadır. EGFP/puromisin direnç genini ise tek bir CMV promotörü kontrolündedir (Şekil 12). Cas9 enzimi ise hibrid bir güçlü memeli promotörü olan CBh kontrolündedir. Bu plazmidde de bakteri de plazmid çoğalmasını sağlayan ori geni ve ampisilin direnç geni vardır.



Şekil 12. TN-C'ye özgül iki gRNA taşıyan CRISPR/Cas9 plazmidinin yapısı

Kontrol plazmidini olarak ise 20 nükleotid uzunluğunda genomda hiçbir yeri hedeflemeyen scrambled (scr) rehber RNA ve Cas9 sekanslarını taşıyan plazmid (10 kb) kullanılmıştır (Şekil 13). Bu plazmidde turbo GFP ekspresyonu Elongasyon faktörü 1a promotörü kontrolündedir.



Şekil 13. Scrambled gRNA taşıyan plazmidin yapısı

Kullanılan bir diğer kontrol plazmidini için ise yine scrambled rehber RNA, Cas9 enzimi ve ampicilin direnç genleri olan fakat raporier yeşil floresan protein (GFP) kodlamayan bir plazmidir (Şekil 11). Plazmid yapısı G1 le aynı olup sadece rehber RNA sekansı genomda herhangi bir yeri hedeflemeyen gRNA'dır.

Kullanılan plazmidlerdeki rehber RNA sekansları ve hedefledikleri ekzon aşağıda verilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. CRISPR/Cas9 plazmidlerinin rehber RNA'ları hakkında bilgiler

Plazmid İsmi	Rehber RNA sekansı	Hedeflenen Ekzon
G1-TN-C	ACCGAACACTGGGATCCCAC	<i>TN-C</i> ekzon 2
Scr (kontrol) (GFPl _i ve GFPs _{iz})	GCACTACCAGAGCTAACTCA	-
G _{vb} -TN-C	CTGTTTCGAAGGCTACGCCG	<i>TN-C</i> ekzon3
	CGGGAGAGGCGGGTGACAGT	<i>TN-C</i> ekzon1

5.1.6. Kullanılan deney hayvanları

İnsan üçlü negatif zenograft meme kanseri modeli oluşturmak için, 20-35 gram ağırlığında (6-8 haftalık) immün yetmezlikli (atimik) CD1 nude dişi fareler kullanılmıştır. CD1 nude farelerde Crl:NU-*Foxn1*^{nu} olup timüs gelişimi için gerekli olan *Foxn1* geni yoktur. Bu yüzden de bu farelerde T hücreleri bulunmamaktadır. Yapılan çalışma için Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 2021-039 sayılı kararla etik kurul onayı alınmıştır ve etik kurallar izlenerek araştırma yapılmıştır. Farelere tüm müdahaleler etik kurul ve ilkelere dayanarak yapılmıştır. Fareler immün yetmezlikli oldukları için steril mikroizolatör kafes sistemlerinde 12 saat gündüz-12 saat gece ve %50 nem ve spesifik patojen içermeyen ortamında barındırılarak patojen kontaktı, koku ve gürültü standart laboratuvar koşullarının altına düşürülerek sterilize su ve yem ile beslenilmiştir.

5.2. Yöntem

5.2.1. CRISPR/CAS9 plazmidlerinin çoğaltılması ve yapılan kontroller

5.2.1.1. CRISPR/Cas9 plazmidleri

Kullanılan plazmidlerdeki gRNA sekansları özgüllüğü ve genomda başka bir yere bağlanmayacağı (hedef-dışı etki) Cas-OFFinder kullanılarak teyit edilmiştir (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>, 01.Ocak.2020)

5.2.1.2. Plazmidlerle bakteriyel transformasyon

Bu çalışmada kullanılan tüm CRISPR/Cas9 plazmidlerinin bakteri hücrelerinde çoğalmalarını sağlayan *ori* bölgeleri olduğu için, plazmidler transformasyon yoluyla bakterilerde çoğaltılmıştır.

Bakteri transformasyonu, ısı şoku ile yapılmıştır. Transformasyonu kolaylaştırmak için hücre zarı geçirgenliği artırılmış ve böylece eksojen genetik materyali daha kolay

alabilen ticari kompetan DH5 α (patojenik olmayan *Eschericia coli* suşu) hücreleri kullanılmıştır.

Transformasyon için, -80°C’de saklanan kompetan hücrelerin buz üzerinde çözülmesi beklenmiştir ve daha sonra üzerlerine 50 ng plazmid eklenmiştir. Bakteriler plazmidle 30 dakika buz üstünde inkübe edilmiştir. Daha sonra ise ısı şoku uygulamak amacıyla 30 saniye 42°C’deki su banyosunda bekletilmiştir. Bu basamaktan sonra hücreler tekrardan 2 dakika boyunca buza konulmuştur. Bakteriler, önceden ısıtılmış 1 ml katabolit baskılı süper optimal broth SOC (Super Optimal Broth) sıvı besiyerine eklenerek 37°C de dakikada 240 devir sayısında (rpm) çalkamalı inkübatöre konulmuştur. 1 saat sonra, kültür, 1:10 ve 1:100 seyrekleştirilerek, 100 µg/ml ampisilin içeren LB agarına ekilmiştir ve 16 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. Kullanılan plazmidler ampisilin direnç geni de taşıdığı için, sadece bu plazmidlerle transforme olan bakteriler agarda üremiştir. Daha sonra ise pCas-TN-C plazmidi ile transforme edilen bakteri kolonilerinden, tek bir koloni alınıp ampisilin içeren 10 ml LB besiyerinde çalkalamalı inkübatörde bir gece (16 saat) boyunca 37°C’de kültüre bırakılmıştır.

Antibiyotikli besiyerde çoğalan bakteriler stoğundan 500µl alınarak 500 µl %50 gliserol ile karıştırılmıştır ve uzun dönemli muhafaza için -80°C’ye stok kaldırılmış.

Aynı kültürden 1 ml alınıp 250 ml ampisilin içeren sıvı LB besiyerine eklenmiştir. Bu yüksek hacimli kültür de bir gece boyunca 37°C’de 240 rpm çalkalanarak plazmid ile transforme olmuş bakterilerin çoğalması için kültüre alınmıştır.

5.2.1.3. Plazmid izolasyonu

Plazmid izolasyonu hem düşük hacimli ön kültürden hem de yüksek hacimli bakteri kültüründen sırasıyla MiniPrep ve MaxiPrep kitleri ile yapılmıştır. Bakteri kültürlerinden plazmid izolasyonu, spin kolon prensibi ile çalışan ticari kitlerle, üretici firmanın protokolüne göre yapılmıştır. Bu kitler çalışma prensibi olarak, kültürden elde edilen bakteri peletinin SDS ve alkali ajanlarla hücre parçalanması (lisis) ve daha sonra lisis solüsyonun ortamının nötralize etmesi ile başlar. Daha sonra presipite olan SDS ve istenmeyen hücre parçalarının santrifüjle uzaklaştırılıp, nükleik asit içeren süpernatant silika bazlı kolonlara yüklenir. Ortaya çıkan plazmid DNA’nın saflığını artırmak için farklı etanol konsantrasyonları içeren yıkama solüsyonu ile yıkanır ve plazmid DNA’lar kolondan elüsyon tamponu ile (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) ayrılır.

Elde edilen plazmid DNA stokları spektrofotometrik ve elektroforetik kontrolleri yapılarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

5.2.1.4. Plazmidlerin spektrofotometrik ve elektroforetik kontrolü

İzole edilen plazmidlerin miktarını ve saflığını tayin etmek için spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Plazmidlerden 2 µl, Nanodrop cihazına eklenerek, 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanları ölçülmüştür.

Plazmidlerin boyutlarını ve içerdikleri farklı plazmid formlarını tayin etmek için agaroz jel elektroforezi ile jelde görüntülenmiştir. 5 µl örnekler jel yükleme boyasının son konsantrasyonu 1 x olacak şekilde seyreltilerek, %0,8'lik etidyum bromür içeren agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez ilk olarak 50 dakika 80mV daha sonra ise 30 dakika 100mV'da yapılmıştır. Plazmidlere bağlanan etidyum bromür aracılığıyla, jel elektroforezi sonrasında plazmidler UV ışığında görüntülenmiştir.

Plazmid boyutunu doğru tespit etmek için plazmidler içerdikleri restriksiyon kesim bölgesine uygun restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. G1 ve GFPsiz scrambled CRISPR/Cas9 plazmidleri BamHI diğer iki plazmid ise EcoRI ile kesilmiştir. Plazmidler (250 ng), enzimi ve enzim tamponu ile bir gece 37°C'de lineer forma getirilmesi için inkübe edilmiştir. Daha sonra ise endonükleazın ısı inaktivasyonu 65°C'de 20 dakika bekletilerek yapılmıştır. Plazmidler %0,8'lik agaroz jele yüklenerek, 50 dakika 80mV daha sonra ise 30 dakika 100mV'da yürütülmüştür. Plazmid boyutları DNA markeri ile karşılaştırılarak tespit edilmiştir.

5.2.2. İn vitro transfeksiyon ve gen susturma çalışmaları

5.2.2.1. İn vitro transfeksiyon

TN-C eksprese eden üçlü negatif insan meme kanseri hücre hattının, MDA-MB-231, CRISPR/Cas9 TN-C ve kontrol plazmidleri ile transfeksiyonu ilk önce lipid bazlı ticari bir ajanla (Lipofektamine 3000) yapılmıştır. Hücre transfeksiyonu üretici firmanın protokolüne göre ters transfeksiyon yöntemiyle gerçekleştirildi. Bu transfeksiyonlar 24-kuyucuklu hücre kültürü plakalarında yapıp toplamda 1 µg plazmid kullanılmıştır. TN-C susturması için iki CRISPR/Cas9 plazmidi kullanıldığı için her birinden 500ng eklenmiştir. Plazmidlerin transfeksiyon ajanıyla kompleks oluşturulması için 1:3:2'lik plazmid:p3000:lipofektamin (µg:µl:µl) oranı kullanıldı. İlk basamakta her kuyucuk için toplam hacim 25 µl olacak şekilde 1 µg plazmid, 3 µl kitin içinde bulunan p3000 DNA kompleksasyon ajanı ve azaltılmış serum besiyeri Opti-MEM karıştırıldı. Daha

sonra 2 µl lipofektamin 3000 ajanı ve 23 µl Opti-MEM'den oluşan diğer tüpe hazırlanan plazmidli kompleks eklenildi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

Diğer bir yandan ise MDA-MB-231 hücreleri, 1X tripsin/EDTA ile plakalardan kaldırılmış, PBS ile yıkanmış ve tripan mavisi ile boyanmamış hücreler (canlı hücreler) hemositometrede mikroskop altında sayılmıştır. Daha sonra her kuyucuk için 150 000 hücre 450 µl tam hücre besiyeri içinde süspanse edilip 24 kuyucuklu plakalara konulmuştur.

Lipofektamin-plazmid komplekslerinin 15 dakikalık inkübasyonu bitince kuyucuklara eklenmiştir ve hücreler %5 CO₂ 37°C'de inkübe edilmiştir.

TN-C genom düzenlemesi için negatif kontrol olan GFP+ scrambled CRISPR/Cas9 plazmidi ile de transfeksiyon aynı şekilde yapılmıştır.

Transfeksiyon başarısı transfeksiyondan 24 saat sonra GFP ışımalarını floresan mikroskop altında ile görüntülenmesi ile incelenmiştir.

5.2.2.2. TN-C susturma etkinliğinin incelenmesi

5.2.2.2.1. RNA izolasyonu

Kontrol ve TN-C CRISPR/Cas9 plazmidleriyle transfekte edilmiş hücreler ve transfekte edilmemiş kontrol hücreleri transfeksiyon sonrası 3. ve 8. günde tripsinle plaklardan kaldırılmış ve PBS ile 3 kere yıkanmıştır. Daha sonra hücre peleti RNA izolasyonuna kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. RNA izolasyonu üretici firmanın protokolüne göre yapılmıştır. Spin kolon prensibi ile çalışan ticari kitte, hücre lizisi ve RNA presipitasyonundan sonra, örnekler kolonlara yüklenip, etanol bazlı yıkama solüsyonları ile yıkandıktan sonra elüsyon tamponu aracılığıyla kolondan ayrılması sağlanmıştır. Elde edilen RNA izolatlarının spektrofotometrik yöntemle 260 nm ve 280 nm dalga boyundaki absorpsanları ölçülerek miktar ve saflık tayini yapılmıştır. İzole edilen RNA örnekleri kullanıma kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

5.2.2.2.2. cDNA sentezi

Deney ve kontrol gruplarından gruplarından elde edilen RNA izolatlarından 260/280nm absorpsan oranı 2.00 olanları ile cDNA üretici firmanın protokolüne göre sentezlenmiştir. cDNA sentezi için her bir PCR reaksiyonu 500 ng RNA, oligo dT primerleri ve aşağıda sayılan kit içerikleri ile hazırlanmıştır.

RNA-500 ng

Oligo dT primer 0.5µg

5x reaksiyon tamponu 4 µl

MgCl₂ 2,5 mM (2 µl)

dNTP 1 µl (0,5 mM)

RNaz inhibitörü 0,5 µl (20 u)

Revers transkriptaz enzimi 1 µl

RNaz içermeyen su: toplam hacmi 20 µl ye getirecek şekilde

5.2.2.2.3. TN-C susturma etkinliğinin gerçek zamanlı (RT)-PCR ile ölçülmesi

TN-C mRNA'ya (NM_002160.4) özgül dizayn edilen primerler kullanılarak (Tablo 3) MDA-MB-231 hücrelerinden sentezlenen cDNA ile yarı kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. İç control olarak GAPDH'e özgül primerler kullanılmıştır (Tablo 3). Primer için kullanılan konsantrasyon 400nM olup, DNA'ya bağlanan floresan boya olarak 2x SYBR Green karışımından 25 µl, 60 ng cDNA eklenmiş, ve hacim DNaz içermeyen su ile 50 µl getirilmiştir. RT-PCR reaksiyonu aşağıdaki parametreler kullanılarak yapılmıştır (Tablo 4). Her örnek üç tekrar olarak çalışılmış, GAPDH ekspresyonu ile normalize edilmiş ve transfekte edilmemiş hücrelerdeki TN-C mRNA miktarı 1'e sabitlenerek, analiz $\Delta\Delta C_t$ metodu ile yapılmıştır.

Tablo 3. RT-PCR reaksiyonunda kullanılan primerler.

Hedef Gen	Primer Türü	Primer Sekansı
TN-C	Forward Primer	AGAGAACCAGCCAGTGGTGT
	Revers Primer	GCCTGCTCCTGCAGTACATT
GAPDH	Forward Primer	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
	Revers Primer	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

Tablo 4. RT-PCR reaksiyonu için kullanılan parametreler.

Basamak	Isı	Zaman	Döngü Sayısı
1	95°C	10 dk.	1
2	95°C	15 saniye	40
	60°C	1 dk.	

5.2.2.2.4. Protein izolasyonu

Transfeksiyon sonrası 8. günde transfeksiyon ve kontrol grubundan protein izolasyonu yapıldı. Protein izolasyonu proteaz inhibitörleri (1X) eklenmiş 1x RIPA tamponu ile soğuk ortamda yapılmıştır. Hücrelere Tripsin/EDTA ile enzimatik kesimle kuyucuklardan kaldırıldıktan sonra 2 kere soğuk PBS ile 4°C'de 2 000 g de 5 dakika santrifüjlenerek yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerine pelet büyüklüğü göz önüne alınarak yaklaşık 100 µl soğuk lizis tamponu eklendi ve her 5 dakikada bir vorteks yaparak 30 dakika buz üstünde inkübe edildi. Daha sonra hücre lizati, 4°C'de 13 000 x g'de 30 dakika santrifüjlendi ve süpernatant yeni Eppendorf tüplerinde toplandı. Protein izolatları -80 ° C'de saklanmıştır.

Protein miktarı kolorimetrik bir yöntem olan Bradford assayı ile ölçülmüştür. Bu test üretici firmanın protokolüne göre ve sığır serum albümin standartlarından oluşan standart eğri kullanılarak yapılmıştır. 96-kuyucuklu mikropalakalara 200 µl Bradford ajanı ve 10 µl örnek veya standart koyulmuştur ve oda sıcaklığında 5 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Bradford ajanı ile inkübe edilmiş protein örneklerinin 595 nm de absorbansı mikropalaka okuyucu ile ölçülmüştür.

5.2.2.2.5. TN-C protein miktarının Western blotla karşılaştırılması

TN-C CRISPR/Cas9 plazmidleri ile transfeksiyonun TN-C protein miktarında yarattığı değişimi tayin etmek için transfeksiyon sonrası 8. günde izole edilen protein örnekleri ile western blot yapıldı.

Proteinleri boyutlarına göre ayırtırmak için SDS-PAGE elektroforezi yapılmıştır. Elektroforezden önce örnek hazırlama aşamasında proteinlere Laemmli tamponu eklenmiştir ve örnekler, 99°C'de 5 dakika denatürasyona bırakılmıştır. Daha sonra %8'lik Akrilamid-N,N-metilen bisakrilamid SDS-PAGE jeli, 25 µg protein yüklenmiştir. Beklenen ağırlıkları kontrol etmek için Precision Plus protein standardı SDS-PAGE jelinin bir kuyusuna yüklenmiştir. Örnekler, 120V'da 2 saat jelde yürütülmüştür.

Daha sonra ise jel, PVDF membranına +4°C'de ıslak transfer yöntemiyle aktarılmıştır. Transfer tamponu içinde +4°C de 100V'de 2 saat transfer gerçekleştirilmiştir. Transferin olup olmadığı, Ponceau S boyası ile kontrol edilmiştir. Bu boyamadan sonra TBST (TRIS tamponlu salin ve tween 20) ile 3 yıkama yapılmıştır. Daha sonra %5 yağsız sütte oda sıcaklığında 1 saat spesifik olmayan protein bağlanmasını durdurmak için bloklama yapılmıştır. Primer TN-C antikoru (AbCam, ab108930), 1:2000

dilüsyonunda kullanılarak, gece boyunca +4°C’de çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası TBST ile yıkamalar yapılmış ve peroksidaz konjuge sekonder antikor (keçi anti-tavşan IgG) 1:10000 dilüsyonunda eklenmiştir. Oda sıcaklığında çalkalayıcıda bir saat inkübasyon sonrası, membran 3 kere TBST ile yıkanmıştır. Daha sonra kemilüminesans görüntüleme için, peroksidaz substratı içeren kimyasal eklenmiştir ve görüntüleme cihazında Fusion programıyla görüntüleme yapılmıştır. TN-C proteinin beklenen moleküler ağırlığı 241 kDa dır.

Yüklenilen protein miktarının örnekler arasında eşit olduğu teyit etmek için, membran ayrıca GAPDH primer antikoruyla 1:7500 dilüsyonunda inkübe edilmiştir. Sekonder antikor olarak ise peroksidaz konjuge sekonder keçi anti-fare IgG antikor 1:20000 olarak kullanılmıştır. Bu protein için beklenen moleküler ağırlık 36 kDa dır.

5.2.2.3. Azalan TN-C ekspresyonunun hücresel etkilerinin incelenmesi

5.2.2.3.1. Apoptozun akım sitometrisi ile değerlendirilmesi

Akım sitometrisi ile yapılan apoptoz çalışmasında GFP eksprese eden TN-C CRISPR/Cas9 ve kontrol scrambled CRISPR/Cas9 ile transfeksiyondan 48 saat sonra, hücreler tripsinle kaldırılmış ve PBS ile 3 kere yıkanmıştır. Daha sonra transfeksiyonun apoptoz üzerindeki etkisini tayin etmek için floresan etiketli Annexin-V ve propidium iyot (PI) ile üretici firmanın protokolüne göre boyanmıştır. Apoptozun başlaması ile normalde hücre zarının iç tabakasında olan fosfatidil serinin, dış tabakasına geçmesiyle, Annexin V bağlanması olur. Apoptozun ilerlemesiyle artan hücre geçirgenliğinden dolayı ise propidium iyot hücre içine geçebilir. Böylece, tek başına Annexin V FITC ışıması, erken apoptozu, annexin V ve propidium iyot (PE) çifte ışıması ise geç apoptozu/nekrozu gösterir.

Hücre peleti 100 µl PBS+3% fetal sığır serumu içinde süspande edilip 5 µl kitin içindeki Annexin-V ve 5 µl PI solüsyonundan eklenmiştir. 5 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyondan sonra 300 µl daha PBS+3% fetal sığır serumu eklenmiştir. Boyama işlemi bittikten sonra hücreler hiç bekletilmeden akım sitometri cihazında çalışılmıştır.

Akım sitometresinde kompensasyon işlemleri için, ayrıca hücreler sadece floresan etiketli Annexin V ve sadece propidium iyot ile de boyanmıştır.

5.2.2.3.2. Apoptozun Western blotla değerlendirilmesi

BCL2 associated X (Bax) bir proapoptotic proteindir ve içsel apoptoz yolağında yer alır. Bax proteinleri aktive olduktan sonra, mitokondriyal membrandan sitokrom-c nin çıkışını ve apoptozu gerçekleştiren enzimler olan kaspazların aktive olmasına neden olur. Hücrelerde Bax proteinin artması, apoptozun varlığına işaret eder. Bu yüzden de azalan TN-C miktarının apoptoz üzerindeki etkisini tayin etmek için hücrelerin çifte CRISPR/Cas9 plazmidini ile transfeksiyon sonrasındaki 8. günde elde edilen protein izolatlarından, Western blotla Bax proteinini miktarı görüntülenmiştir. Bax western blotu için izlenen protokol Bölüm 5.2.2.2.'deki 5. ile aynı olup, sadece kullanılan jelin yüzdeliği ve kullanılan primer antikor açısından fark göstermektedir. Bax protein hafif bir protein olduğu için (20kDA) %12'lik Akrilamid-N,N-metilen bisakrilamid SDS-PAGE jeli kullanılmıştır ve primer antikor olarak da Bax'a özgül monoklonal antikor 1:7500 dilüsyonda kullanılmıştır. Sekonder antikor olarak ise peroksidaz konjuge sekonder keçi anti-fare IgG antikor 1:20000 olarak kullanılmıştır.

5.2.2.3.3. Hücre döngüsünün akım sitometrisi ile değerlendirilmesi

Literatür, TN-C'nin hücre döngüsünü etkileyebileceğini gösterdiği için, azalan TN-C ekspresyonunu hücre döngüsü fazlarındaki hücre dağılımına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla RNAz, PI ve deterjan içeren akım sitometrisi bazlı hücre döngüsü kiti kullanılmıştır.

Kit içinde bulunan deterjan hücreleri geçirgen hale getirir ve PI hücre membranından geçebilir. Eklenen RNAz enziminin RNA'yı ortamdan uzaklaştırmasıyla hücre içine giren PI sadece DNA'ya bağlanır. Böylece, propidium iyot hücre içindeki DNA miktarının gösterir. DNA miktarı ise hücre döngüsü fazları için dolaylı bir göstergedir. Bölüm 5.2.2.3.1.'de anlatılan apoptoz assayine benzer olarak, GFP kodlayan kontrol ve TN-C CRISPR/Cas9 ile transfekte edilen hücreler 48 saat sonra tripsinize edilmiş ve 3 kez 1X PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra kitte bulunan hazır solüsyondan 200µl eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyon sonrası bekletilmeden akım sitometri cihazında görüntülenmiştir.

5.2.2.3.4. Hücre proliferasyonunun MTT testi ile karşılaştırılması

TN-C CRISPR/Cas9 plazmidleri ile transfeksiyonun, hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini ölçmek için kolorimetrik bir assay olan 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) yöntemi kullanılmıştır. Transfeksiyon sonrası 8. günde 5 000 hücre, 96 kuyucuklu plaklara her gruptan üç tekrar olacak şekilde ekilmiş

ve 24 saat sonra kuyucuklardaki besiyeri atılıp yerine tam hücre besiyer içinde 0,5 mg/ml MTT eklenmiştir. Canlı hücrelerin MTT'yi formazana dönüştürülmesine için %5 CO₂ ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi. 4. saatin sonunda ise oluşan mor formazan tuzu dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek çözüldü. Daha sonra ise 570 nm ve 690 nm dalga boyundaki absorbans bir mikroparka okuyucu ile ölçülmüştür. Düzeltilmiş absorbans, 690 nm'deki absorbansı 570 nm'dekinden çıkartarak elde edildi. Transfekte edilmemiş hücrelerin canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir.

5.2.2.3.5. In vitro yara iyileşme deneyi ile hücrelerin göç kapasitesinin değerlendirilmesi

TN-C ekspresyonunun CRISPR/Cas9 plazmidi ile azaltılmasının hücrelerin göç etme kapasitesi üzerindeki etkisinin araştırılması için yara iyileştirme testi (scratch assay) yapılmıştır. Transfeksiyon sonrası 8. günde, 50 000 hücre 24-kuyucuklu plaklara ekilmiştir ve bir gece inkübe edilmiştir. Tekli katman oluşturan (yaklaşık %90 hücre doluluğu) hücrelere, kuyucukların ortasında steril 200 µl'lik pipet ucu kullanılarak düz bir çizgi çekilerek, boşluk (yara) açılmıştır. Daha sonra, kuyucuklar iki kez PBS ile yıkandı ve yeni besiyeri ortamı eklendi. Çizikle oluşturulan boşluklarının invert mikroskop altındaki görüntüleri, hücrelerin göç oranını belirlemek için 0. ve 24 saat zamanında alınmıştır. Çizik/yara alanı, ImageJ yazılımının Wound Healing Size Tool eklentisi kullanılarak hesaplanmıştır (Suarez-Arnedo ve ark., 2020). Yara kapanması yani göç yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{göç hızı} = [(\text{ilk yara alanı} - \text{son yara alanı}) / \text{ilk yara alanı}] * 100$$

5.2.2.3.6. Hücrelerin invaziv kapasitesinin değerlendirilmesi

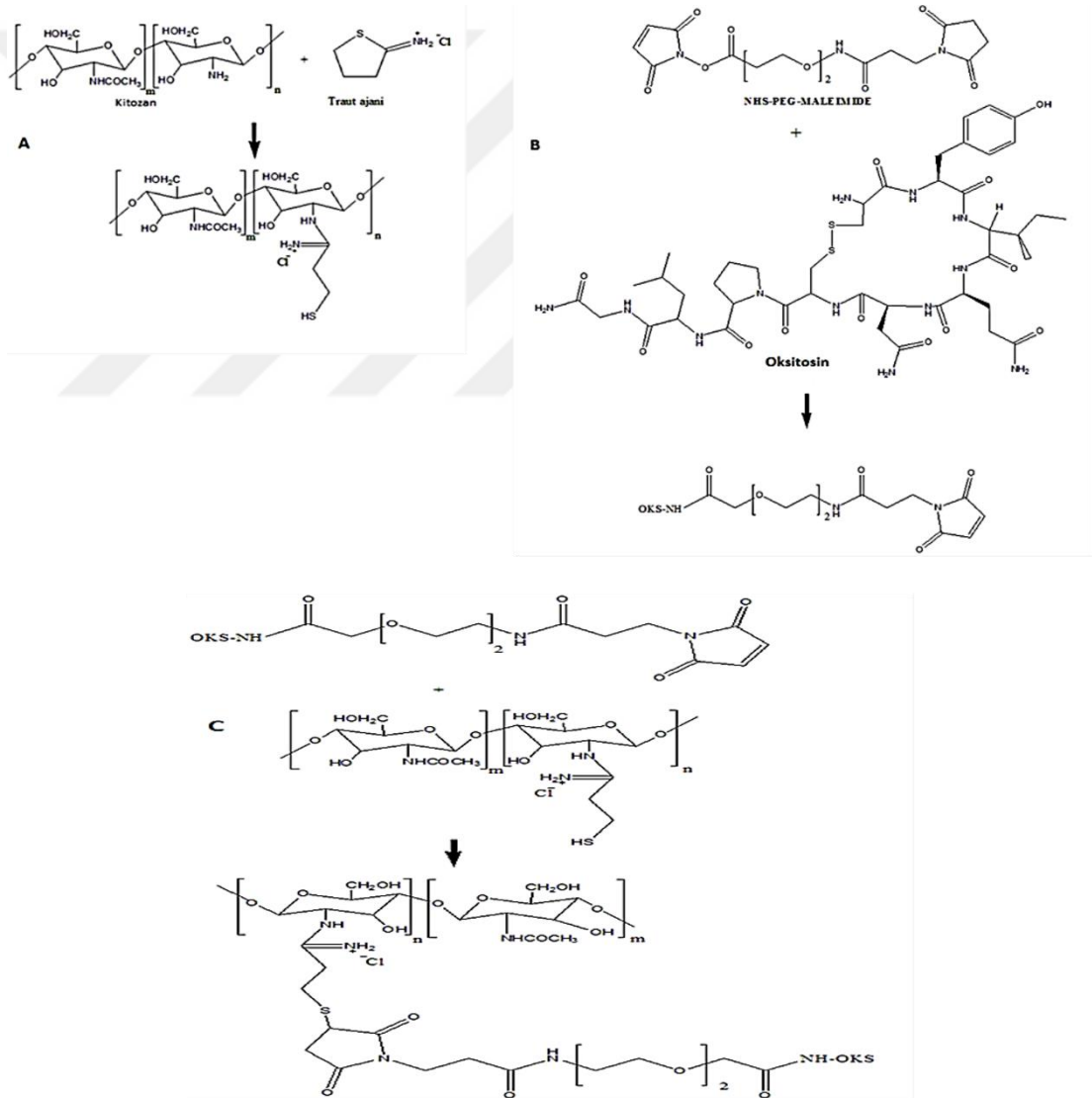
Transfeksiyon sonrası 8. günde invazyon testi yapılmıştır. Hücre invazyon testi için hücrelerin, ESM bariyerinden geçmeleri gerekmektedir. Bu yüzden de invazyon testi 8µm por çapı olan transwell insertleri %0,1 jelatin ile kaplayarak yapılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyondan sonra, 24-kuyucuklu plaklara serumlu besiyer eklenmiş ve insertler yerleştirilmiştir: Serumsuz besiyerin içinde bulunan 100 000 hücre, insertlerin içine üst taraftan konulup, 24 saat 37°C, %5 CO₂ ortamında serumlu alt katmana geçebilmeleri için inkübe edilmiştir. Transfekte edilmemiş MDA-MB-231 hücreleri de kontrol olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Daha sonra insertler alınıp, üst kısımdaki invaziv olmayan hücreler pamuklu çubuk aracılığıyla uzaklaştırılıp, PBS ile yıkanmıştır. Hücreler soğuk metanolde 10 dakika fikse edilmiştir ve PBS ile yıkama sonrasında, floresan DAPI boyasıyla boyanmıştır.

DAPI boyama işlemi hücreleri kaplamaya yetecek kadar 300 nM DAPI solüsyonu ekleyerek ve 3 dakika karanlıkta inkübe ederek yapıldı. Daha sonra 3 kez PBS ile insertler yıkanmıştır. Daha sonra boyanmış hücreler 5 alanda floresan mikroskop kullanılarak görüntülenmiş ve ImageJ programı kullanılarak sayılmıştır.

5.2.3. Oksitosinle hedeflendirilmiş PEGli kitozan nanoplekslerinin hazırlanması ve karakterizasyonu

Kitozana PEG aracılığıyla eklenen oksitosinden oluşan CRISPR/Cas9 taşıyıcı sistemi heterobifonksiyonel PEG (NHS-PEG_n-MAL) kullanılmıştır (Thermo Scientific, n=2, moleküler ağırlık= 425,39). Taşıyıcı sistemin formülasyonunda izlenen basamaklar Şekil 14'te gösterilmiştir.



Şekil 14. Kitozan-okitosin taşıyıcı sisteminin hazırlanma basamakları. A. Kitozanın tiyollenmesi, B. Oksitosinin PEG'ye bağlanması, C. PEG aracılığıyla oksitosinin kitozana bağlanması (Oks: oksitosin)

5.2.3.1. Oksitosin-kitozan taşıyıcı sisteminin hazırlanması ve kontrolü

5.2.3.1.1. Kitozanın tiyollenmesi

Taşıyıcı sistemin oluşturulması için kitozanla PEG arasındaki bağlantı maleimide-tiyol (-SH) grubu arasındaki reaksiyonla yapılmıştır (Şekil 14a). Bu nedenle kitozana ilk basamakta tiyollenmiştir.

Kitozanın tiyollenmesi Traut ajanı (2-iminothiolane.HCl) kullanarak yapılmıştır. Kitozanın tiyollanması için literatürde daha önce optimize edilmiş protokol kullanılmıştır (Bae, I.-H. ve ark., 2011). %0,1 düşük moleküler ağırlıklı kitozan (Sigma 448969), %1 asetik asitte gece boyu karıştırılarak çözülmüştür. Daha sonra solüsyonun pH'sı, 10M NaOH ile 7'ye getirilmiştir. Daha sonra 10:1 (kitozan: Traut ajanı) (ağırlık: ağırlık) oranında Traut ajanı nitrojen atmosferinde eklenmiştir. Reaksiyon oda sıcaklığında çalkalanarak 24 saat sürdürülmüştür.

Daha sonra bağlanmamış Traut ajanını uzaklaştırmak ve tiyollenmiş amin gruplarını stabilize etmek için 5 gün boyunca 4°C'de diyaliz membranı ile karanlıkta diyaliz yapılmıştır (moleküler ağırlık cut-off u 12,000-14,000). Diyaliz, ilk gün 5mM HCl karşı, daha sonraki iki gün %1 NaCl içeren 5 mM HCl karşı, daha sonra sadece 5mM HCl ve en son olarak 1 mM HCl ye karşı yapılmıştır. Diyaliz sonrasında, taşıyıcı sistem formülasyonu için tiyollenmiş kitozan hemen kullanılmıştır. Tiyollenme miktarını kontrol etmek için ise örnekler ayrıca -49°C, 0.040 mBarda 3 gün boyunca liyofilize edilmiştir.

5.2.3.1.2. Tiyollenme miktarının Ellman reaktifi ile tayini

Kitozana tiyol gruplarının eklenme miktarı Ellman reaktifi (5,5'-ditiyobis- (2-nitrobenzoik asit) veya DTNB) kullanarak teyit edilmiştir. İlk önce 1.5mM-0.25 mM aralığında sistin hidroklorik standartları hazırlanmıştır ve üretici firmanın protokolüne göre standart eğri oluşturulmuştur. Ellman reaktifi 4mg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde 1mM EDTA içeren 0.1 M sodyum fosfat (pH=8.0) reaksiyon tamponunda çözülmüştür ve bu çözeltinin 10µl'si 500µl reaksiyon tamponuna eklenmiştir. Daha sonra ise standartlardan 50µl eklenip, 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda, örneklerin 412 nm'deki absorbansları mikropilaya okuyucusunda bekletilmeden belirlenmiştir.

Standart eğri oluşturulduktan sonra, kitozanın tiyollenme miktarı tayini literatürde anlatıldığı gibi yapılmıştır (Bernkop-Schnürch, 2003). 1 mg liyofilize tiyollenmiş kitozan, 500µl distile suda çözülmüştür. Daha sonra 250 µl alikuot alınmış ve yukarıda

standartlarda olduğu gibi 10µl Ellman reaktifi ve 500µl reaksiyon tamponuna eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 saat inkübasyondan sonra, çökmüş polimeri ayırmak için 24 000x g de 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant mikropalakalara alınıp, 412 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri alınmıştır. .

5.2.3.1.3. PEG aracılığıyla kitozan-oksitosin konjugasyonunun yapılması

Oksitosinin amin grubu ve NHS-PEG-Mal'ın, NHS ester arasında tepkime aracılığıyla PEG'e oksitosin eklenmiştir (Şekil 14b). NHS ester, amin grubu ile kovalent bağ oluşturmaktadır ve bu reaksiyon sonrasında N-hydroxysuccinimide grubu PEG'den ayrılmaktadır.

Bu konjugasyon için üretici firmanın protokolü izlenmiştir. 5mM EDTA'lı PBS'den (pH=7,2) oluşan konjugasyon tamponuna, oksitosin (final konsantrasyon: 0,1mM) ve 10 molar fazlalıkta NHS-PEG₂-MAL (1mM) eklenmiştir. 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Infrared spektroskopisi için bu oksitosin eklenmiş PEG'in (Oksitosin-PEG-Mal) bir kısmı vakumla kurutularak (-49°C, 0.040 mBar) liyofilize edilmiştir.

Bir sonraki adımda ise tiyollenmiş kitozana PEG aracılığıyla oksitosin eklenmiştir (Şekil 14c). Oksitosin-PEG-Mal a kitozan eklemek için, kitozanın tiyol (S-H) grubu ve PEG'in maleimide grubu arasında reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

Tiyollenmiş ve diyalizlenmiş kitozan solüsyonun pH'sı 10mM NaOH ile 7'e getirilmiştir. Eşit hacimde Oks-PEG-MAL solüsyonu, tiyollenmiş kitozan solüsyonuna eklenmiştir ve nitrojen atmosferinde ilk önce 2 saat oda sıcaklığında ve daha sonra gece boyu 4°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra reaksiyon solüsyonu içinde bir gün boyunca (moleküler ağırlık: 12-14 kDa cutoff) diyaliz edilmiştir. Örnekler -80°C'de dondurulmuş ve vakumla kurutularak (-49°C, 0.040 mBar, 3 gün) liyofilize edilmiştir. Taşıyıcı sistem +4°C'de muhafaza edilmiştir.

5.2.3.1.4. Taşıyıcı sistemin Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

Örneklerin, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) spektraları attenuated total reflectance (ATR) aparatı ile FT-IR cihazı kullanılarak 4000–450cm⁻¹ aralığında liyofilize örnekler kullanılarak analiz edilmiştir. Oksitosin eklenmiş PEG ve taşıyıcı sistem, ilgili reaksiyonlarda değişen bağlar analiz edilerek karakterize edilmiştir.

5.2.3.2. Plazmid taşıyan nanoplekslerin hazırlanışı ve karakterizasyonu

5.2.3.2.1. Nanopleksinin hazırlanması

Plazmid ve taşıyıcı sistem (oksisosinli kitozan) arasında kompleks oluşumu elektrostatik etkileşimle gerçekleşmiştir. Liyofilize taşıyıcı sistem %1'lik asetik asitte çözülmüştür. Plazmid DNA ise 0.1M sodyum asetat tamponunda (pH 5.5) seyreltilmiştir.

Nanopleks oluşturmak için 1 µg plazmid DNA 25 µl tamponda dilüe edilmiş ve aynı hacimdeki taşıyıcı sistemin üzerine farklı N:P oranlarında yüksek hızda vorteks karıştırıcıda karıştırılarak eklenmiştir. Daha sonra 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Böylece nanopleks (CRISPR p/CS-PEG-Oks) oluşumu gerçekleşmiştir.

5.2.3.2.2. Kompleks oluşumunun elektroforetik yöntemle kontrolü

Nanopleks oluşturmak için gereken ideal N:P oranını belirlemek ve tam kompleks oluşumunu teyit etmek için, elektroforetik mobilite geciktirme deneyi yapılmıştır. Nanopleksler Bölüm 5.2.3.3.2.1. de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Kullanılan N:P oranları, plazmid DNA miktarını sabit tutup (1 µg), eklenen taşıyıcı sistem miktarını değiştirerek elde edilmiştir. Agaroz jel, 0,8'lik (a/h) konsantrasyonda hazırlanmış ve 0,5µg/ml etidyum bromür eklenmiştir. 5µl nanopleksler jel yükleme boyasının son konsantrasyonu 1x olacak şekilde seyreltilerek jele yüklenmiştir. Jel 100 Voltta 30 dakika yürütülmüştür. Nanopleksin, plazmidin jelde yürümesini durdurması ve böylece plazmidin UV ışığında yüklenen kuyudan çıkmamış halde görüntülenmesi ile kompleks oluşumu kontrol edilmiştir

5.2.3.2.3. Nanoplekslerin partikül boyutu ve zeta potansiyellerinin ölçülmesi

2µg plazmid içeren ve 100:1 oranında hazırlanan nanopleksler, distile suda seyreltilmiştir ve uygun küvetlere konulmuştur. Hazırlanan nanoplekslerin partikül boyutu, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi Zetasizer Nano ZS instrument cihazında 25°C'de dinamik ışık saçılımı analizi ile belirlenmiştir.

Her örnek için en az 3 defa ölçüm yapılmıştır. Zeta potansiyeli, kullanılan software programı tarafından Smoluchowsky denklemi ile otomatik olarak hesaplanmıştır.

5.2.3.2.4. Nanoplekslerin taramalı elektron mikroskopuyla yüzey özelliklerinin incelenmesi

Hazırlanan CRISPR p/CS-PEG-Oks nanopleks formülasyonlarının büyüklük ve morfolojik özelliklerinin belirlenebilmesi amacı ile taramalı elektron mikroskopunda

(SEM) incelenmiştir. Bu amaçla, 100:1 oranında hazırlanan örnekler kurutulularak, altın paladyum karışımı ile kaplandı. Kaplanan örneklerin 20 kV hızlandırma voltajı altında, 40-200 kX magnifikasyonda görüntülemesi yapılmıştır.

5.2.3.2.5. Nanoplekslerin serum stabilitesinin incelenmesi

Taşıyıcı sistemin, CRISPR/Cas9 plazmidini serum şartlarında ne kadar koruduğunu tayin etmek için serum stabilite testi yapılmıştır. 500 ng plazmid kullanılarak 100:1 oranında Bölüm 5.2.3.2.1.'de ifade edildiği gibi hazırlanmış nanoplekslere, %10 ısı inaktivasyonu yapılmamış fetal sığır serumu eklenmiştir. Daha sonra örnekler 37°C'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Belirlenen aralıklarda (0 dk, 5dk., 15 dk., 30 dk., 1 saat, 19 saat, 24 saat ve 48 saat) örnek alınıp, analize kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Kontrol olarak ise aynı şekilde muamele edilmiş çıplak plazmid kullanılmıştır.

Nanopleksin, plazmidin serumda parçalanmasına karşı koruyucu etkisi %0,8'lik (a/h) agaroz jele yapılan elektroforezle (100 V, 30 dakika) incelenmiştir.

5.2.3.2.6. Nanoplekslerle nükleaz (DNAaz I) koruma deneyi

Taşıyıcı sistemin CRISPR/Cas9 plazmidlerini nükleaz (DNAaz I) tarafından parçalanmaya karşı koruyucu etkisi test edilmiştir. Bu amaçla 500 ng plazmid DNA içeren 100:1 oranında (N:P) hazırlanmış kitozan nanopleks formülasyonuna 1,0 U DNAaz I ilave edilerek 37°C'deki çalkalamalı su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. 0 dk., 5 dk., 15 dk., 30 dk. ve 1, 4, 24. saat aralıklarında 10 µl örnek alınıp enzim etkisini durdurmak için üzerine 5 µl 0.5 M EDTA çözeltisi eklenmiştir. Sadece plazmid içeren örnekler kontrol olarak kullanılmıştır. Daha sonra nükleaz uygulamasına tabi tutulmuş nanopleks örnekleri, nükleik asit yapısında meydana gelebilecek parçalanma gibi değişimlerin belirlenebilmesi için örnekler %0,8'lik (a/h) agaroz jel ile elektroforez (100 V 30 dakika) sonrası incelenmiştir.

5.2.3.2.7. Nanoplekslerin sitotoksik etkisi

Nanopleks formülasyonun, sitotoksik etkiye sahip olup olmadığını araştırmak için, 96-kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 4 000 hücre gelecek şekilde MDA-MB-231 hücresi, ekilmiştir ve bir gece boyunca 37 °C'de, %5 CO₂'de inkübe edilmiştir. Daha sonra, ise 16 saat boyunca hücreler 100:1 (N:P) oranında nanopleksle muamele edilmiştir. 16 saatin sonunda kuyucuklardaki besiyeri Bölüm 5.2.2.3.4.'de anlatıldığı gibi 0,5mg/ml MTT (100 µl/kuyucuk) içeren besiyerle değiştirilmiş ve 4 saat hücre kültürü inkübatöründe plakalar bekletilmiştir. Canlı hücrelerin MTT'den oluşturduğu formazan tuzunu çözmek için DMSO eklenmiş ve mikropilaya okuyucusunda

absorbans 690 ve 570nm dalga boyunda ölçülmüştür. Düzeltilmiş absorbans, 690 nm'deki absorbansı 570 nm'dekinden çıkartarak elde edildi.

5.2.4. Nanopleksle in vitro transfeksiyon çalışmaları

5.2.4.1. Nanopleksle TN-C CRISPR/Cas9 plazmidlerinin transfeksiyonu

Plazmidlerin TN-C susturma etkinliği ve bu susturmanın hücrelerin malignant özellikleri üzerindeki etkisinin gösterilmesinden sonra, hazırlanan ve karakterize edilen nanopleksle transfeksiyon çalışması yapılmıştır.

Transfeksiyondan bir gün önce 80 000 MDA-MB-231 ve hormon reseptörü pozitif insan meme kanseri hattı hücresi MCF-7, 24-kuyucuklu plaklara ekilmiştir

Nanopleks hazırlığı Bölüm 5.2.3.2.1.'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. 25 µl 1%asetik asit içinde çözülen 5 µg taşıyıcı sisteme, aynı hacimdeki (25µl) 0.1 M sodyum asetat (pH=5.0) içinde her plazmidten 500 ng plazmid (N:P=100:1) hızlıca karıştırılarak eklenmiştir. Daha sonra ise, bir saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Oluşan nanopleks besiyeri 500µl serumsuz DMEM'le değiştirilen hücrelerin üzerine, damla damla eklenmiştir. 4 saat sonra ise %20 serum içeren DMEM hücrelerin üzerine eklenmiştir.

Düşük moleküler ağırlıklı kitozanla aynı şekilde yapılan transfeksiyon da (N:P=100:1) kontrol olarak kullanılmıştır.

Transfeksiyon hücrelerdeki GFP ışımalarının transfeksiyondan 24 saat sonra floresan mikroskopunda incelenmesi ile kontrol edilmiştir.

5.2.4.2. Oksitosin reseptörü ekspresyonu tayini

Oksitosin-kitozan konjugatının bağlanabilmesi için MDA-MB-231 hücrelerinin oksitosin reseptörü ekspresyonun hem cDNA'den PCR hem de real-time PCR yapılmıştır. Kültürdeki hücrelerden yukarıda anlatılan şekilde (Bölüm 5.2.2.2.) RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. Daha sonra 100ng cDNA ile Oksitosin reseptörüne özgül (OTR) 400nM primerler kullanılarak ısı gradyan PCR yapılmıştır (Forward Primer: CCTTCATCGTGTGCTGGACG, Reverse Primer: CTAGGAGCAGAGCACTTATG). Beklenen PCR ürünü büyüklüğü 391 baz çiftidir. Konvansiyonel PCR için aşağıdaki parametreler kullanılmıştır (Tablo 5).

Tablo 5. Oksitosin reseptörü için PCR parametreleri

Basamak	Isı	Zaman	Döngü Sayısı
1	94°C	5 dk.	1
2	94°C	15 saniye	35
	Isı gradyan 46,48,50,53,55°C	45 saniye	
	72°C	1 dk.	
3	72°C	5 dk.	1

Real time PCR ise yukarıda Bölüm 5.2.2.2.3. belirtilen parametrelerle OTR'ye özgül yukarıda belirtilen primerler ve aynı RT-PCR reaksiyonu reaktif hacimleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Oksitosin reseptör ekspresyonu olup olmadığı, amplifikasyon eğrisinin yani Ct değerinin oluşup oluşmadığına bakılarak yapılmıştır

5.2.4.3. Nanopleksle transfeksiyonun TN-C susturması etkinliğinin RT-PCR ile incelenmesi

Floresan mikroskop ile görülen transfeksiyonunun, TN-C geninin mRNA seviyesinde anlamlı bir değişikliğe neden olup olmadığını incelemek için yukarıda Bölüm 5.2.2.2.3'te belirtilen lipofektamin transfeksiyon çalışmalarında kullanılan RT-PCR protokolü izlenmiştir. Transfeksiyon sonrası 4. günde hücrelerden izole edilen RNA ve onlardan sentezlenen cDNA ile yapılan RT-PCR'da TN-C mRNA miktarı transfekte olmamış hücrelere oranla, karşılaştırılmıştır.

5.2.5. In vivo çalışmalar

5.2.5.1. CD1 Nude farelerde ksenograft meme kanseri modeli oluşturulması

Tümör oluşturmak için, MDA-MB-231 hücreleri matrigel içerisinde (2×10^6 hücre/100 μ L) süspanse edilerek enjeksiyona hazır hale getirilmiştir. Ketamin ve ksilazin ile anestezi altına alınan farelerin sol arka ayaklarının üstüne kalça-sırt düzlemine (Caudo-dorsal düzleminin sol lateral kısmına) sub-kütanoz olarak enjekte edilerek farelerin; enjeksiyon bölgelerinin kontrolü, tümör gelişimi, yara oluşumu ve kilo kayıpları kontrol edilerek kanser modeli geliştirilmiştir. Tümör oluşumu yaklaşık 3 hafta sürmüştür ve tümör hacmi kaliperle ölçülmüştür. Tümör çapı geometrik ortalama alınarak ve aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Varan ve ark., 2021):

Tümör çapı = $\sqrt{AB}$, (A ve B sırasıyla en küçük ve en büyük ölçülen yarıçap)

Ölçülen tümör büyüklükleri 400 mm'ye ulaştığında, nanoplekslerin terapötik etkinliğini analiz etmek için enjeksiyonlar yapılmıştır.

5.2.5.2. Histopatolojik değerlendirme

Tümör oluşumundan sonra alınan meme tümör dokuları %10 tamponlu formaldehit solüsyonunda 24 saat boyunca fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası dokular kasetlere alınarak otomatik doku takip cihazında (Shandon) 12 saatlik dehidrasyon, şeffaflandırma ve infiltrasyon işlemlerinden geçirildikten sonra doku gömme cihazında doku büyüklüklerine göre uygun kalıplar kullanılarak paraffin bloklar hazırlanmıştır. Paraffin blok haline getirilen dokulardan rotary mikrotom cihazında 3-4 µm kalınlığında kesitler alınarak 60°C lik etüvde deparafinizasyon işlemi için 1 saat inkübe edildi. Deparafinizasyon işlemi sonrasında preparatlar otomatik boyama cihazında rutin Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi ile boyandı ve lamel kapama entellan kullanılarak kapatıldı.

5.2.5.3. İn vivo biyodağılımı çalışması

Biyodağılım çalışmaları intravenöz n=2 ve intratümör n=2 olarak yapılmıştır. Enjekte edilen taşıyıcı sistemin kanser dokusunu ve diğer organ/doku birikiminin gözlemlenip, gen tedavisi için optimum uygulama yoluna karar verilmesi için yapılmıştır.

Yakın kızılötesinde (814 nm) ışıma veren kardiyogreende bulunan negatif yüklü sülfonik asit ve pozitif yüklü kitozan arasında elektrostatik etkileşim aracılığıyla kompleks oluşturulabildiği gösterilmiştir (Sonin ve ark., 2020). Her fare için 50 µl içinde 1,5 µg kardiyogreen boyası ile 50 µl %1 asetik asitte çözölmüş taşıyıcı sistem (N:P=50:1, 1.5 µg kardiyogreen/fare) bir saat oda sıcaklığında inkübasyon sonrası kompleks oluşturulmuş ve bağlanmayan kardiyogreen Ultracentrifugal filtreler kullanılarak (molekül ağırlık limiti= 10000kDA), 4000 g de 30 dakika santrifüjlenerek uzaklaştırılmıştır. Kullanılana kadar hazırlanan sistem

-20°C'de muhafaza edilmiştir.

Enjeksiyon sonrasında floresan ışıma, hayvan görüntöleme cihazındaki yakın kızıl ötesi (NIR) floresan görüntöleme modülü vasıtasıyla takip edilmiş ve her bir hayvanın anterior ve posterior görüntüleri zaman aralıklarına göre kaydedilmiştir. Yakın kızılötesi boya ile hayvan diseke edilmeden birikimler izlenilmiştir. Enjeksiyon sonrası 16. saatte, hayvanlar disekte edilmiş ve tümör ve iç organlardaki ışıma

kaydedilmiştir. Kardiyogreen boyanın ortalama floresans yoğunluğu (MFI), ImageJ Fiji programı (Madison, ABD) kullanılarak hesaplanmıştır.

5.2.5.4. Nanoplekslerle tedavi uygulanması

Biyodağılım deneyi sonuçları göz önünde bulundurarak nanoplekslerin intratümöral yoldan uygulanmasına karar verilmiştir. Bu amaçla her grupta 6 fare olacak şekilde 4 deney grubu oluşturulmuştur (Tablo 6).

Tablo 6. İn vivo deneylerdeki gruplar ve enjeksiyon planı

Deney Grupları	Doz	Uygulama yolu	Hacim	Uygulama sıklığı
Tümör grubu	150µl serum fizyolojik(SF) /fare	Intratümöral	150µl	Her 4 günde bir
TN-C CRISPR/Cas9 taşıyan nanopleks	9 µg plazmid+450µg taşıyıcı sistem kompleksi/fare	Intratümöral	150µl	Her 4 günde bir
Scrambled CRISPR/Cas9 taşıyan nanopleks	9 µg plazmid+450µg taşıyıcı sistem kompleksi/fare	Intratümöral	150µl	Her 4 günde bir
Taşıyıcı sistem	450µg/fare	Intratümöral	150µl	Her 4 günde bir

Nanopleks hazırlanması, in vitro çalışmalardaki gibi yapıp, bu çalışmalar ışığında birkaç değişiklik yapılmıştır. Küçük hacimde enjeksiyon yapılacağı için kitozan-oksitosen taşıyıcı sisteminin çözünür kalması için N:P oranı yine tam kompleksasyonun görüldüğü 50:1 oranında kullanılmıştır. TN-C plazmidlerinden GFP taşıyan ve iki gRNA bulunduran vektörden her fare için 3 µg, GFPsiz ve tek gRNA taşıyan plazmidten ise gRNA oranlarını eşitlemek için 6 µg olacak şekilde toplamda 9 µg plazmid kullanılmıştır. Kontrol scrambled CRISPR/Cas9 plazmidlerinden ise GFP kodlayanda 3 µg, GFPsiz olandan ise 6µg olacak şekilde toplamda 9 µg plazmid kullanılmıştır. Her fare için taşıyıcı sistemden ise 50:1 N:P oranına ulaşmak için ise 450 µg (9µg*50) kullanılmıştır. Bu çalışma 3 hafta sürdürülmüş ve toplamda 5 enjeksiyon yapılmıştır. Her enjeksiyon öncesi tümör hacimleri Bölüm 5.2.5.1.'de anlatıldığı gibi ölçülmüştür.

Deney boyunca tüm hayvanlar hayatta kalmıştır ve etik olarak tümör boylarının kontrol gruplarında 1 cm'i geçmesinden dolayı ve deney sonlandırılmıştır.

Deneyin sonunda hayvanlara servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi yapılmıştır. Tümör ve akciğer dokuları çıkarılarak, boyutları ölçülmüştür. Daha sonra ise histopatolojik değerlendirme, Western blotlama ve RT-PCR için örnekler tamponlanmış formaldehit ve RNAlater içeren tüplere bölünmüştür.

5.2.6. İstatistiksel değerlendirme

Proje kapsamında elde edilen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara ilişkin sonuçların değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi, GraphPad 7.0 programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılığı test etmek için Student t testi ve One-Way Anova (tukey-düzeltilmeli) kullanıldı. 0,05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (*p<0,05; **p<0,01).

6. BULGULAR

6.1. CRISPR/Cas9 Plazmidlerinin İzolasyonu ve Kontrolüne Ait Bulgular

6.1.1. CRISPR/Cas9 plazmidlerinin izolasyonuna ait bulgular

Bu tez çalışmasında kullanılan CRISPR/Cas9 plazmidleri ticari kompetan *Escherichia coli* DH5α bakteri hücrelerine ısı şoku yöntemi ile başarılı bir şekilde transforme edilmiştir. Plazmidler ampisilin direnç geni taşıdıkları için, transformasyon başarısı ampisilinli agarda büyüyen bakteri kolonileri ve ampisilin besiyerindeki transforme edilmiş bakterilerin inkübasyon sonrası oluşturduğu bulanık görüntü ile teyit edilmiştir.

Transforme olmuş bakterilerden plazmid izolasyonu Bölüm 5.2.1.3.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

6.1.2. Plazmidlerin spektrofotometrik kontrolüne ilişkin bulgular

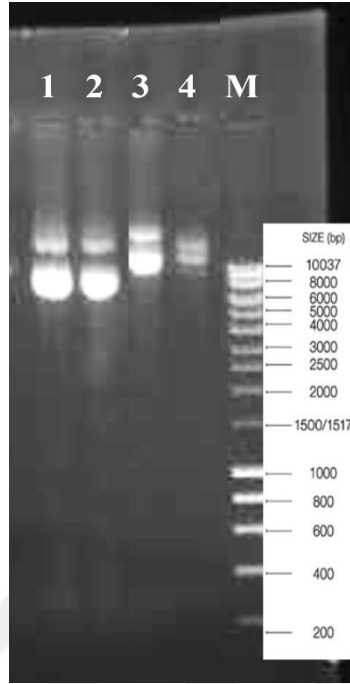
Spektrofotometrik değerlendirme ile izole edilen CRISPR/Cas9 plazmidlerinin miktar ve saflık tayini yapılmıştır. Saflığı gösteren, 260/280 absorbans oranı 1,80-1,85 arasında olan plazmidler transfeksiyon çalışmalarında kullanılmıştır. Miniprep sonrası elde edilen sonuçlardan temsili bir sonuç aşağıda verilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Miniprep plazmid izolasyondan elde edilen temsili plazmid miktarı ve saflığı

Plazmid Adı	Konsantrasyon ng/μl	A260/A280	Hacim μl
GFP kodlayan scrambled kontrol CRISPR/Cas9 plazmidi	390	1,82	50
GFP kodlamayan scrambled kontrol CRISPR/Cas9 plazmidi	230	1,83	50
Tek gRNA'lı TN-C CRISPR/Cas9 plazmidi	300	1,85	50
İki gRNA TN-C CRISPR/Cas9 plazmidi	345	1,85	50

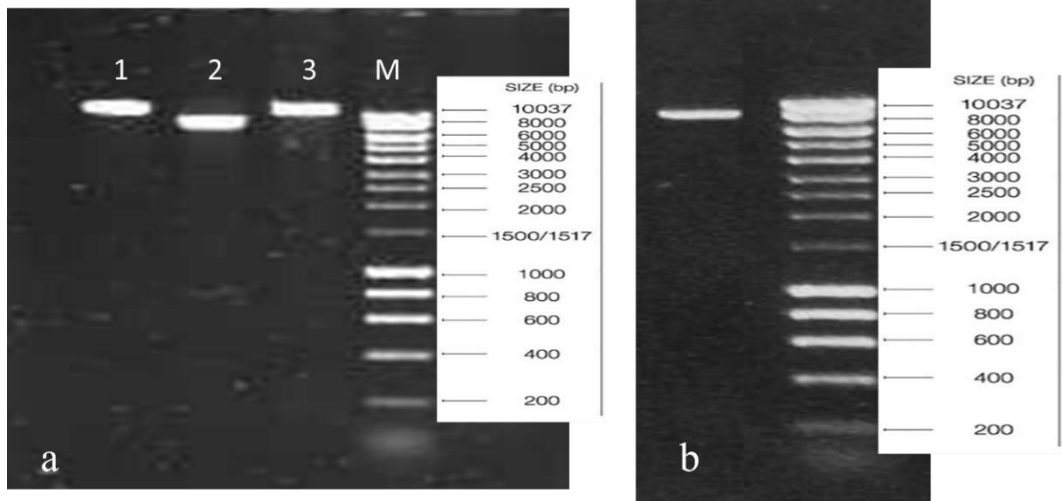
6.1.3. CRISPR/Cas9 plazmidlerinin elektroforetik kontrolüne ilişkin bulgular

Transforme bakterilerden izole edilen plazmidler spektrofotometrik kontrolünden sonra agaroz jelde görüntülenmiştir (Resim 1).



Resim 1. İzole edilen CRISPR/Cas9 plazmidlerinin agaroz jel görüntüsü (1: GFP kodlamayan tekli TN-C pCRISPR/Cas9 (G1: 8 kb); 2: GFP kodlamayan scrambled pCRISPR/Cas9 (Scr/GFP-: 8kb); 3: GFP kodlayan ikili TN-C pCRISPR/Cas9 (G_{vb}: 10.8 kb); 4: GFP kodlayan scrambled pCRISPR/Cas9 (Scr/GFP+: 10kb); M: Marker.

Plazmid yapısında bulunan restriksiyon bölgelerine uygun enzimlerle yapılan restriksiyon kesimi ile plazmidler doğrusal hale getirilmiştir. Yapılan elektroforetik kontrolünde, doğrusal hale getirilen plazmidlerin beklenen plazmid boyutunda olduğu doğrulanmıştır (Resim 2).



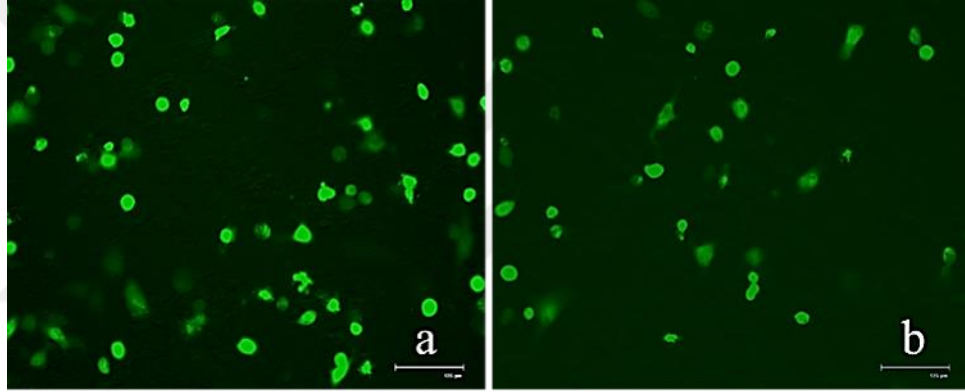
Resim 2. Restriksiyon kesimi sonrası plazmidlerin jel görüntüsü. **a.** 1: GFP kodlayan ikili TN-C pCRISPR/Cas9 (G_{vb}: 10.8 kb); GFP kodlamayan tekli TN-C pCRISPR/Cas9 (G1: 8 kb), Resim 2 devam: 3: GFP kodlayan scrambled pCRISPR/Cas9 (Scr/GFP+: 10kb); M: marker. **b.** GFP kodlamayan scrambled pCRISPR/Cas9 (Scr/GFP-: 8kb).

6.2. İn vitro Transfeksiyon ve Gen Susturma Çalışmalarına İlişkin Bulgular

6.2.1. Transfeksiyonun GFP ışıması ile kontrolüne ilişkin bulgular

TN-C geninin CRISPR/Cas9 sistemi ile susturulmasının etkileri MBA-MB-231 hücrelerini *TN-C*'ye özgül CRISPR/Cas9 ve kontrol GFP+ scrambled plazmidi ile transfecte ederek incelenmiştir. Bu amaca uygun olarak, ilk önce ticari ajanla transfectiyonun gerçekleştiği floresans mikroskop altında GFP ışımasını gözlemleyerek teyit edilmiştir.

Kullanılan scrambled CRISPR/Cas9 plazmidinde ve *TN-C*'ye özgül CRISPR/Cas9 plazmidlerinin bir tanesinde kodlanan GFP ışımasını transfectiyondan 24 saat sonra incelendiğinde hem scrambled kontrol grubunda hem de deney grubunda ışıma görülmüştür (Resim 3).



Resim 3. Transfectiyon sonrası 24. saatte GFP ışıması. a. Scrambled CRISPR/Cas9 plazmidi ile transfectiyon, b. CRISPR/Cas9 *TN-C* plazmidleri ile transfectiyon.

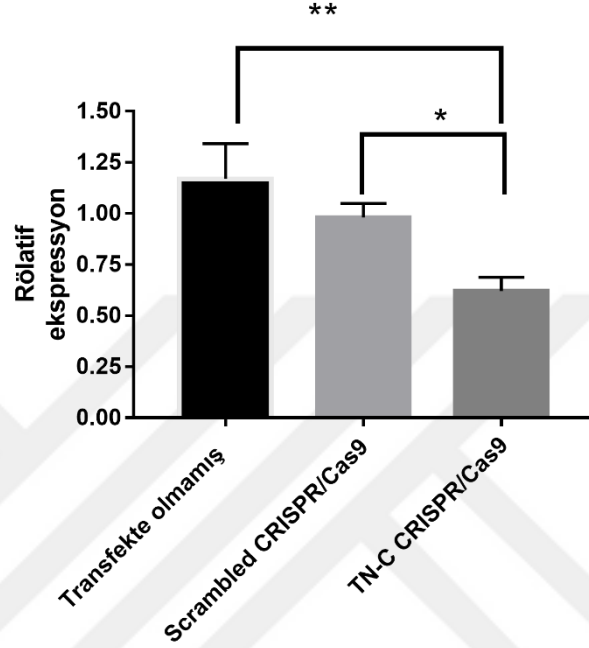
6.2.2. *TN-C* susturma etkinliğinin incelenmesi

6.2.2.1. *TN-C* mRNA seviyelerinin karşılaştırılmasına ilişkin bulgular

TN-C CRISPR/Cas9 plazmidleri ile lipofektamin kullanılarak yapılan başarılı transfectiyonun, *TN-C* lokusunda genom düzenlemesi gerçekleştirip gerçekleştirmediği, *TN-C* mRNA seviyelerinin transfecte hücreler ve kontrol grupları (scrambled CRISPR/Cas9 plazmidi ile transfecte hücreler ve transfecte edilmemiş hücreler) arasında RT-PCR yöntemiyle karşılaştırılarak yapılmıştır.

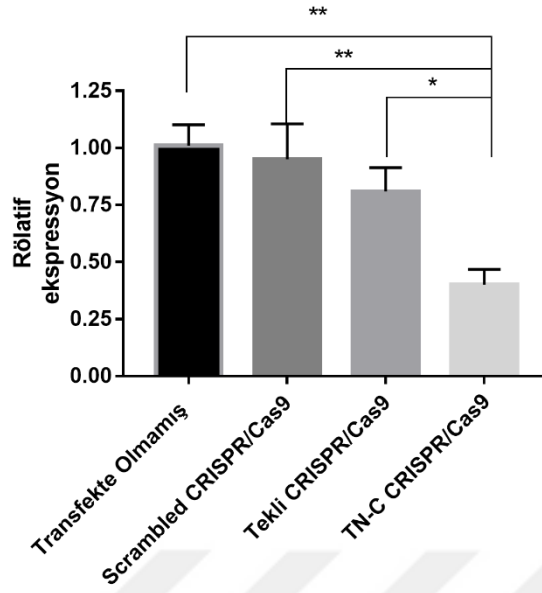
Transfectiyondan 72 saat sonra, *TN-C* mRNA seviyesinin deney grubunda (*TN-C* CRISPR/Cas9 plazmidleriyle transfecte edilmiş hücreler) transfecte edilmemiş kontrole kıyasla %40 oranında azaldığı görülmüştür ($p=0.0025$) (Şekil 15). *TN-C* ve kontrol scrambled CRISPR/Cas9 plazmidler ile transfecte edilmiş hücrelerin *TN-C*

seviyeleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p=0,0192$). İki kontrol grubu arasında (transfekte edilmemiş hücreler ile scrambled CRISPR/Cas9 transfekte edilmiş hücreler) TN-C mRNA seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,1820$).



Şekil 15. Transfeksiyon sonrası 3. günde TN-C mRNA seviyeleri

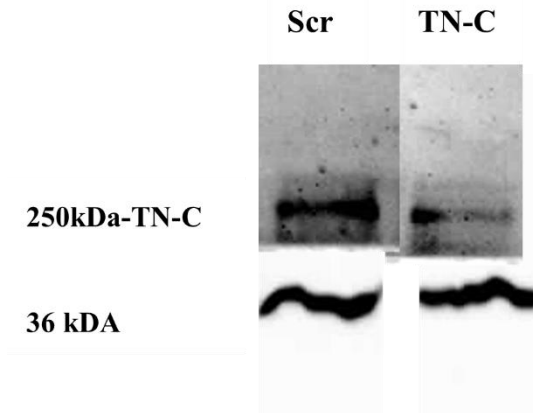
CRISPR/Cas9 üretici firma kullanım kılavuzunda, genom düzenlemenin 7 gün boyunca sürdüğü belirtildiğinden transfeksiyon sonrası 8. günde de RT-PCR analizi yapılmıştır. Yapılan analizde TN-C mRNA miktarının, transfekte olmamış hücrelere kıyasla %60 azaldığı gözlemlenmiştir ($p=0,0030$) (Şekil 16). Scrambled kontrol plazmidi ile transfeksiyona nazaran da deney grubunda istatistiki olarak anlamlı azalma görülmüştür ($p=0,0081$). Transfekte olmamış ve kontrol plazmidi ile transfekte hücrelerin TN-C mRNA seviyesinde istatikselsel anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,9218$). TN-C'ye özgül iki plazmidle yapılan transfeksiyon sonrası TN-C mRNA seviyesi tekli CRISPR/Cas9 plazmidi ile (GFP kodlamayan, G1) yapılan transfeksiyon sonrasındaki seviyeden anlamlı derecede daha düşüktür ($p=0,0211$).



Şekil 16. Transfeksiyon sonrası 8. günde TN-C mRNA seviyeleri

6.2.2.2. TN-C susturulmasının protein seviyesinde incelemesine ilişkin bulgular

mRNA seviyesinde yüksek susturmanın olduğu zaman noktası olan 8. günde, transfecte edilen hücrelerden protein izolasyonu yapılmıştır. TN-C özgül antikorla yapılan Western blot çalışmasında, TN-C proteinin deney grubunda scrambled CRISPR/Cas9 grubuna göre azaldığı, 250kDa'da gözlemlenen bantla görülmüştür(Resim 4). Yüklenen protein miktarların benzer olduğunu kontrol etmek için GAPDH antikoruyla yapılan melezleme de, deney ve kontrol grubu için yüklenen protein miktarının benzer olduğu görülmüştür. Böylece, TN-C protein miktarındaki farklılıklar CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme ile ilişkilendirilebilmektedir.



Resim 4. TN-C proteinin Western blot yöntemiyle elde edilen membran görüntüsü

6.2.3. TN-C gen düzenlemesinin hücreler üzerindeki etkilerine ilişkin bulgular

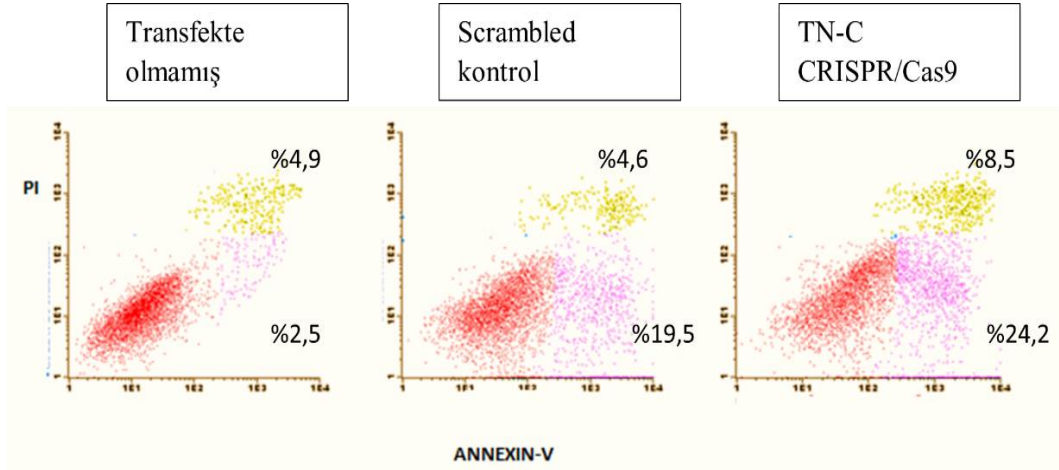
6.2.3.1. Hücre apoptozundaki değişikliklere ilişkin bulgular

Literatürde TN-C'nin apoptoz önleyici etkisine dair bulgular olduğundan dolayı CRISPR/Cas9 sistemi ile TN-C seviyesinin azaltılmasının apoptoz üzerindeki etkileri çalışılmıştır. Bu çalışmalar iki zaman noktasında (gün 2 ve gün 8) sırasıyla akım sitometrisi ve Western blotla çalışılmıştır.

Akım sitometrisinde sadece tekli Annexin-V pozitif hücreler, erken dönemdeki apoptozdayken hem Annexin-V hem de PI ışıması gösteren hücreler ise geç apoptoz/nekrozdadır. Transfeksiyon sonrası 2. gün de yapılan analizde TN-C genom düzenlemesi, hem erken hem de geç apoptotik aşamalardaki hücre yüzdesini scrambled kontrol CRISPR/Cas9 plazmidleri ile transfekte hücrelerde ve transfekte edilmeyen hücrelere nazaran artırdığı görülmüştür (Şekil 17, Tablo 8). Özellikle, geç apoptotik evredeki hücre yüzdeliğinde 1,8 katı artış görülmüştür. Scrambled kontrol CRISPR/Cas9 plazmidleriyle de transfeksiyon daha az miktarda olsa da transfekte olmayan hücrelere nazaran (toplam apoptotik hücre sayısında %16 artış) apoptotik etkiye neden olmuştur.

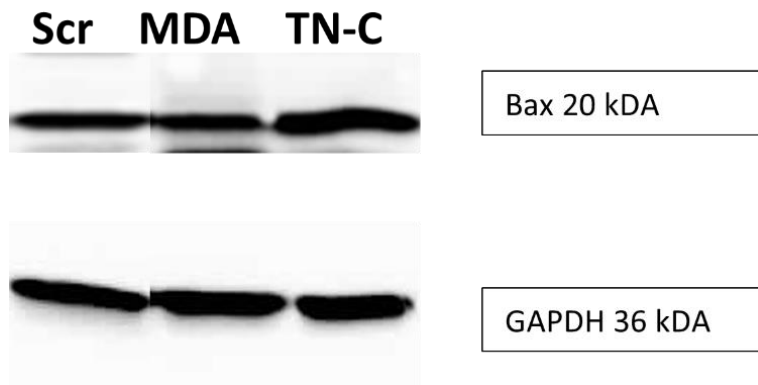
Tablo 8. Transfeksiyondan 48 saat sonra canlı ve apoptotik hücre yüzdeleri

Grup	% Canlı	%Erken Apoptoz	% Geç Apoptoz	%Toplam apoptotik hücre
Transfekte Olmamış	92,319	2,456	4,972	7,428
Scrambled CRISPR/Cas9 plazmidi ile transfekte	76,055	19,067	4,559	23,626
TN-C CRISPR/Cas9 plazmidi ile transfekte	67,079	24,235	8,483	32,718



Şekil 17. Transfeksiyon sonrası 48. saatte akım sitometrisi ile apoptoz incelemesi (Annexin V-, PI-: canlı hücre, Annexin V+,PI-: erken apoptozdaki hücre, Annexin V+, PI+: geç apoptozdaki hücre)

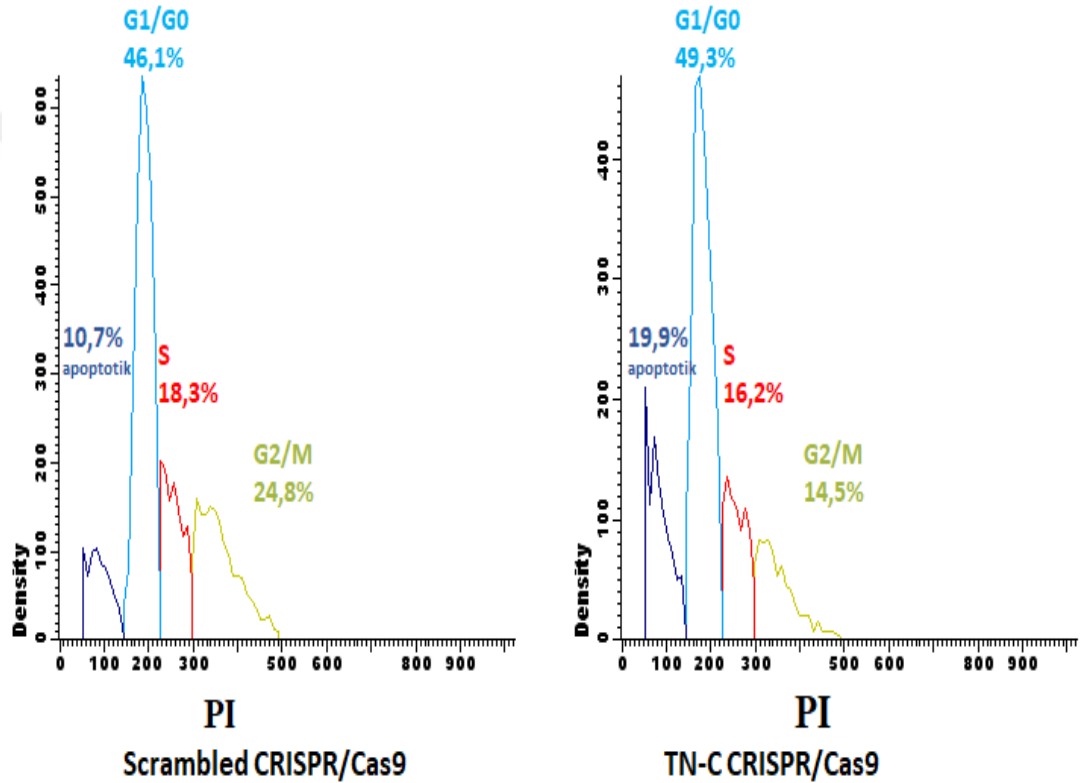
Transfeksiyondan sonraki 8. günde ise apoptoz Western blot tekniğiyle incelenmiştir. Bunun sebepleri ise TN-C genom düzenleme etkinliğinin 8. günde daha yüksek olması ve transfeksiyon stresinden dolayı oluşan apoptozun azalması veya giderilmesi için zaman verilmesidir. Böylece Western blot yöntemi ile proapoptotik Bax proteinin seviyeleri karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada yükleme kontrolü GAPDH seviyeleri deney grupları arasında eşikten, TN-C CRISPR/Cas9 plazmidleri ile yapılan transfeksiyonda Bax seviyeleri transfekte olmayan ve scrambled kontrol CRISPR/Cas9 plazmid ile transfekte edilen hücrelerdekine nazaran arttığı görülmüştür (Resim 5).



Resim 5. Transfeksiyon sonrası 8. günde Bax protein ekspresyonu (Scr: scrambled CRISPR/Cas9 ile transfekte hücreler, MDA: transfekte olmamış hücreler, TN-C: TN-C CRISPR/Cas9 plazmidleri ile transfekte hücreler).

6.2.3.2. Hücre döngüsündeki değişikliklere ilişkin bulgular

Hücreler GFP kodlayan kontrol ve TN-C CRISPR/Cas9 ile transfeke edildikten 48 saat sonra hücre döngüsündeki farklılıklar akım sitometrisi yöntemi ile DNA miktarı karşılaştırılarak yapılmıştır. TN-C gen inhibisyonu, G1/G0 hücre fazındaki (%46,1'den, %49,3'e) ve apoptozdaki hücrelerin yüzdesinin (%10,7'den %19,9) artmasına neden olmuştur (Şekil 18). Devam eden hücre döngüsü aşamalarındaki, yani S ve G2/M fazlarındaki, hücrelerin yüzdesini scrambled kontrol hücrelerinininkine göre azaltmıştır. Özellikle G2/M fazındaki hücre yüzdeliği %41 azalmıştır.

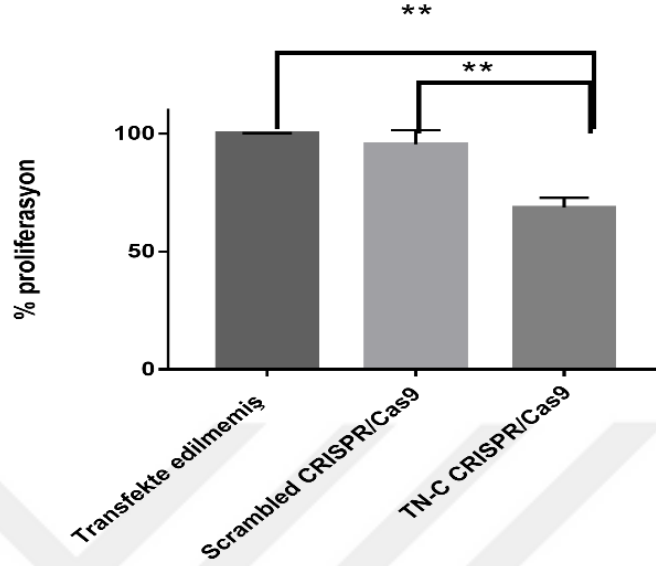


Şekil 18. Transfeksiyon sonrası 48. saatte hücre döngüsü analizi

6.2.3.3. Hücre proliferasyonu analizine ait bulgular

Transfeksiyon sonrası 8. günde görülen TN-C'nin %60 oranda susturulmasının hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi MTT assayı ile analiz edilmiştir. Transfeksiyon sonrası 8. günde TN-C CRISPR/Cas9 plazmidi ile transfeke olan hücrelerin proliferasyonunun, %68'e düştüğü görülmüştür ($p=0,002$) (Şekil 19). Böylece proliferasyon %32 oranında azalmıştır. Transfeke edilmemiş kontrol hücreleri ve scrambled plazmidi ile transfeke edilen hücreler arasında istatistiki önemli bir hücre proliferasyonu farkı yoktur ($p=0,2603$). Scrambled

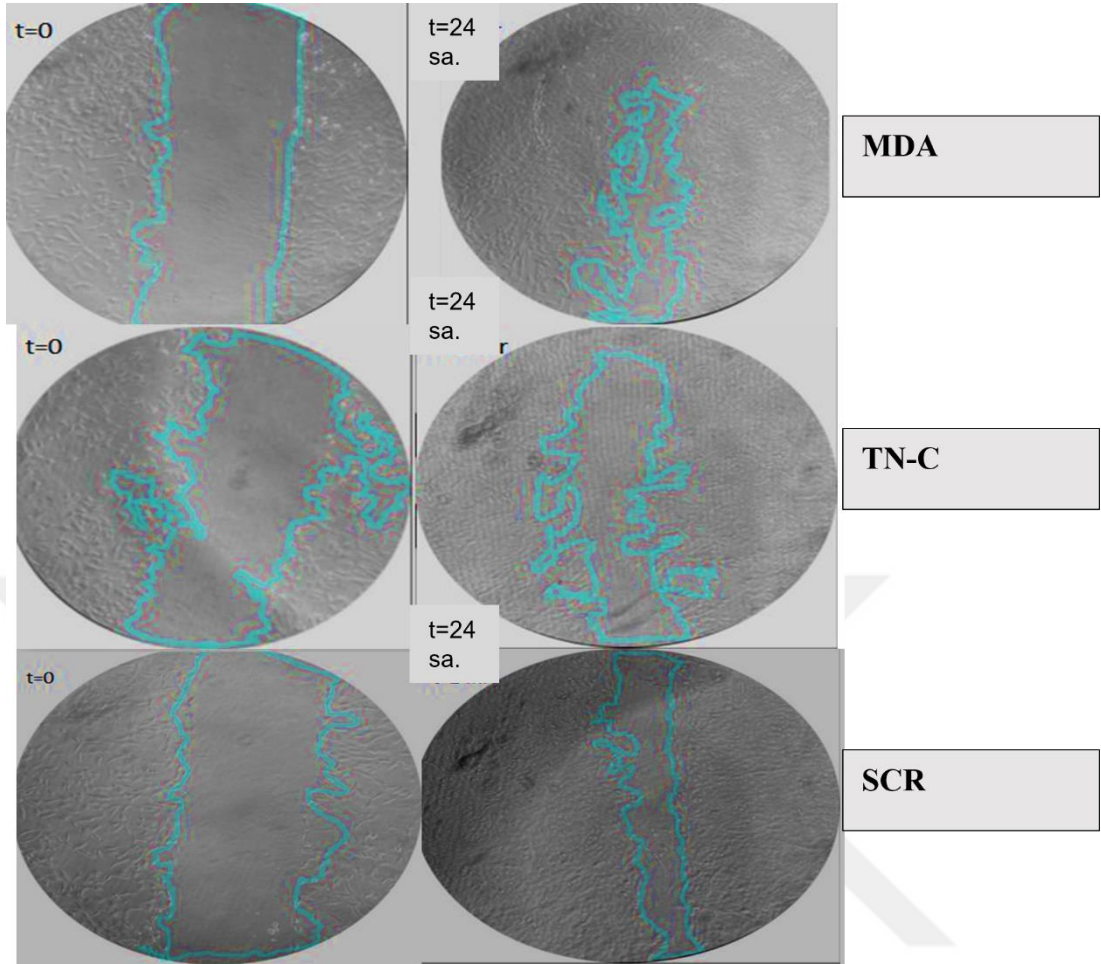
CRISPR/Cas9 plazmidi ve TN-C plazmidi ile transfekte, hücreler kıyaslandığında, p değerleri sırasıyla 0,0031'dir.



Şekil 19. Deney ve kontrol grupları arasındaki hücre proliferasyonu farkı

6.2.3.4. Azalan TN-C ekspresyonunun hücrelerin göç kapasitesine etkisi üzerine bulgular

CRISPR/Cas9 plazmidi ile TN-C ekspresyonunu azaltmanın hücrelerin göç hızı üzerindeki etkisi, transfeksiyonun 8. gününde yara iyileştirme deneyi ile araştırıldı. Transfeksiyon yapılmamış kontrol hücrelerinde açılan yaranın bazı bölgeleri 24 saatte kapanırken, Scrambled CRISPR/Cas9 plazmidi ile transfeksiyonda kapanan bölge yoktur (Resim 6). Fakat, TN-C CRISPR/Cas9 plazmidlerine nazaran, Scrambled CRISPR/Cas9'da da daha çok göç olmuştur. Yara kapanması yani göç hızı yüzdesi, transfekte edilmemiş kontrol hücreleri için %72 iken, scrambled CRISPR/Cas9 kontrol plazmidi ile transfekte hücreler için %70 idi. TN-C CRISPR/Cas9 ile transfekte edilmiş hücrelerin göç yüzdesi, %47 olarak her iki gruptan da daha düşük bulunmuştur.



Resim 6. Deney gruplarında yara alanın görüntüsü (MDA: transfekte olmamış hücreler, TN-C: TN-C CRISPR/Cas9 plazmidleri ile transfekte hücreler, Scr: scrambled CRISPR/Cas9 ile transfekte hücreler).

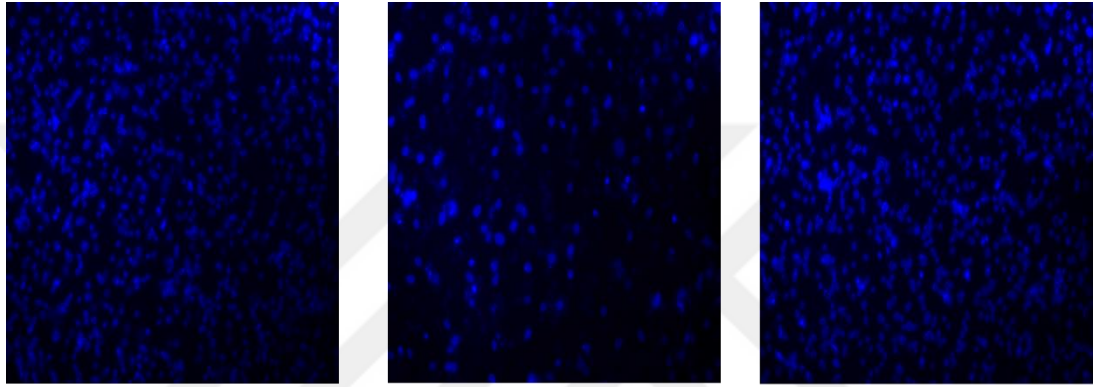
6.2.3.5. Azalan TN-C ekspresyonunun hücrelerin invaziv kapasitesine etkisi üzerine bulgular

Transfeksiyon sonrası 8. günde jelatin bariyerinin üzerine ekilen hücrelerde invazyon oranı 24 saat sonra incelenmiştir. Hücrelerden invazyon gerçekleştirenler hücre çekirdeğine bağlanan floresan DAPI ile boyanmıştır. Daha sonra hücrelerden floresan mikroskop altında 5 bölgeden görüntü alınmıştır. Yapılan analizde (Tablo 9), TN-C'ye özgü plazmidlerle yapılan transfeksiyonun, invazyonu hem scrambled plazmidle transfeksiyonuna nazaran hem de transfekte edilmemiş hücrelere nazaran baskılandığı görülmüştür (Resim 7) (her iki durumda da $p < 0.0001$). Scrambled CRISPR/Cas9 kontrol plazmid ve transfekte edilmemiş hücreler arasında, invaziv hücre sayısı açısından fark görülmemiştir ($p=0,8833$). Böylece, CRISPR/Cas9 aracılı TN-C

ekspresyonunun azalmasının, kanser hücrelerinin invaziv, yani metastatik gücünü azalttığı gösterilmiştir.

Tablo 9. Sayılan alanlardaki ortalama invaziv hücre sayısı.

Grup	Ortalama Her Bölgedeki İnvaziv Hücre Sayısı
Transfekte Edilmemiş Kontrol Hücreleri	641
TN-C CRISPR/Cas9 Plazmid ile Transfekte Hücreler	170 hücre
Scrambled Plazmid ile Transfekte Hücreler	621



Transfekte edilmemiş

TN-C CRISPR/Cas9

Scrambled CRISPR/Cas9

Resim 7. İnvaziv hücrelerin DAPI boyaması sonrası floresan görüntüleri

6.3. Nanopleks Formülasyonu ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular

6.3.1. Kitozan-oksitosis taşıyıcı sisteminin hazırlanması ve karakterizasyonuna ait bulgular

6.3.1.1. Kitozanın tiyollenmesine ait bulgular

Kitozan tiyomerinin literatürde tanımlanan görünür özelliklerine uygun olarak, bu tez çalışmasında oluşturulan liyofilize tiyollenmiş kitozan, kokusuz ve fibröz beyaz bir yapıdır (Zhu ve ark., 2012) (Resim 8).

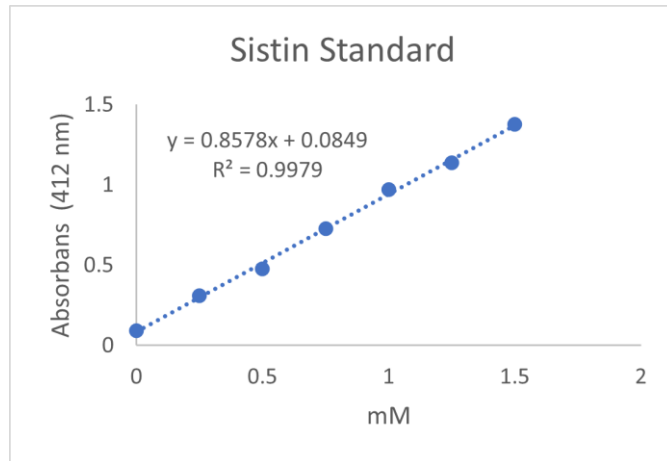


Resim 8. Liyofilize tiyollenmiş kitozanın pamuksu görüntüsü

Kitozanın tiyollenme miktarı Ellman ajanının, serbest sülfidril grupları ile reaksiyonu sonucu oluşan 2-nitro-5-tiyobenzoik asitin, 412 nm de absorbansı ölçülerek belirlenmiştir. Kitozanın tiyollenme konsantrasyonu sistin hidroklorik standardı ile oluşturulan aşağıdaki standart eğrinin denklemi kullanılarak literatürle uyumlu şekilde 113 μ moles/gram olarak bulunmuştur (Tablo 10, Şekil 20).

Tablo 10. Sistin standartları ile elde edilen 412 nm'deki absorbans değerleri

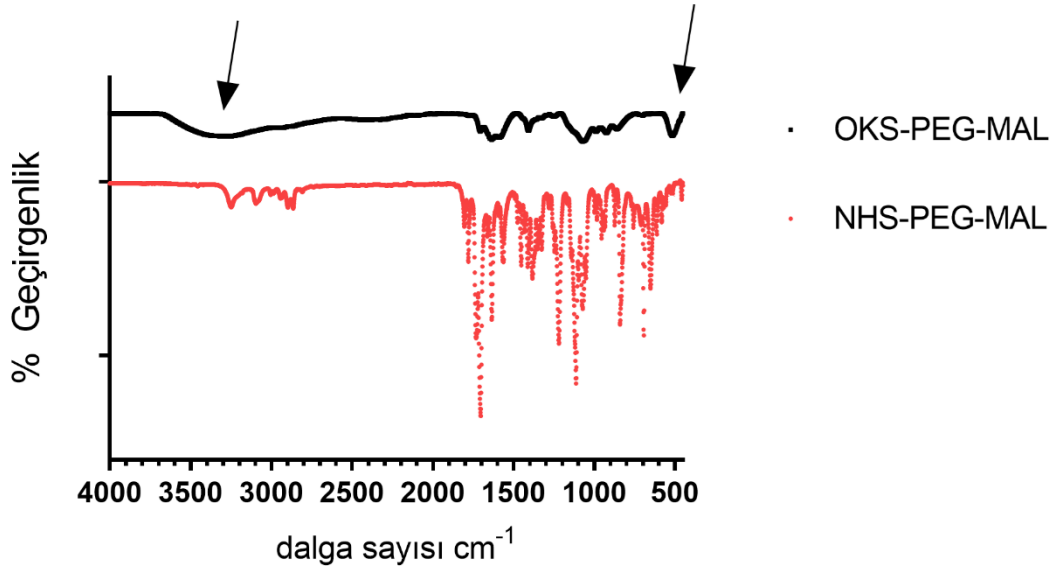
Konsantrasyon mM	Absorbans (A_{412})
1,5	1.284220
1,25	1.043745
1	0.876912
0,75	0.63404
0,5	0.383856
0,25	0.214361
0	0



Şekil 20. Tiyol miktarı için oluşturulan standart eğri

6.3.1.2. Oksitosinin PEG'e konjugasyonu ile ilgili bulgular

Oksitosin ve PEG konjugasyonu, PEG heterobifonksiyonel bağlayıcıda bulunan NHS ester ve oksitosinin primer amin grubu arasındaki reaksiyonla oluşan amid bağla gerçekleştirilmiştir. Bu konjugasyon FT-IR ile kontrol edilmiştir (Şekil 21). Oksitosinle eklenen OH gruplarının temsil edildiği 3300-3500 bandları konjugasyondan sonra genişlemiştir. Konjugasyon sonucunda 3000'lerdeki C-H pikleri, geniş 3300-3500 piki etkisiyle görülmemektedir. Oksitosinin yapısında bulunan aromatik tirozinden gelen C-H pikleri, alkan C-H'nin tersine 3000'den daha yüksek dalga sayısında absorbands yaptığından dolayı da OH pikiyle örtülmüştür. Oksitosinde bulunan S-S bandı ise 498 pikinde görülebilmektedir.



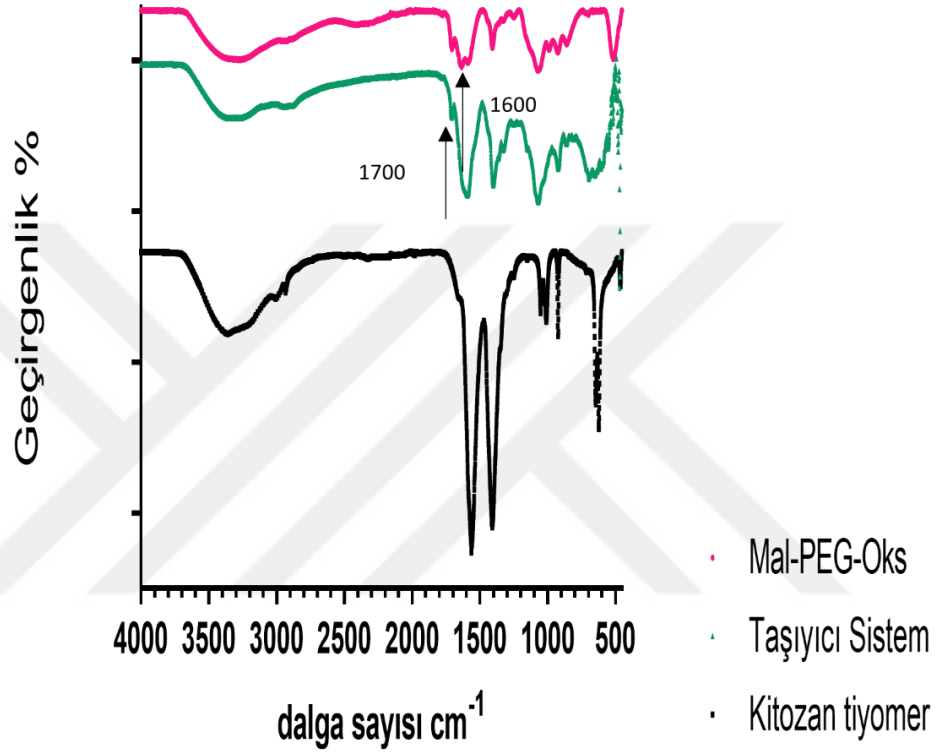
Şekil 21. PEG bağlayıcının ve oksitosin eklenmiş bağlayıcının FTIR spektrası (OKS-PEG-MAL: oksitosin eklenmiş PEG bağlayıcısı, NHS-PEG-MAL: Heterobifonksiyonel PEG bağlayıcı)

6.3.1.3. Oksitosin-kitozan konjugasyonuna ait bulgular

Peptid-polimer taşıyıcı sisteminin oluşturulması için oksitosinlenmiş PEG (Oks-PEG-Mal)'in maleimid grubu ile tiyollenmiş kitozan arasında reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Konjugasyon reaksiyonu sonrası, Ellman ajanıyla serbest tiyol varlığı test edildiğinde serbest tiyol grubu saptanmamıştır, böylece kitozanın tiyol grupları ile maleimid grubu arasında reaksiyon gerçekleşmiş olduğuna dair bulgu elde edilmiştir.

Konjugasyon ayrıca FT-IR ile gösterilmiştir (Şekil 22). Tiyollenmiş kitozan, Mal-PEG-Oks (sadece oksitosin konjüge edilmiş PEG bağlayıcı) ve taşıyıcı sistemde -NH₃ amin ve -OH gerilme titreşimleri 3400cm⁻¹ de görülmektedir. Bu pikler taşıyıcı sistemde de

oksitosinle gelen hidroksil gruplarından dolayı genişlemiştir. -CH gerilme absorpsiyonu ise 2900 cm^{-1} de mevcuttur. Taşıyıcı sistemde sekonder amide ait 1700 bandı, oksitosindeki peptid bağlarından dolayı ortaya çıkmıştır. Ayrıca taşıyıcı sistemde Mal-PEG-Oks'a nazaran reaksiyona girmemiş maleinidiein siklik C=C ye ait 1650 cm^{-1} piki kaybolmuştur.

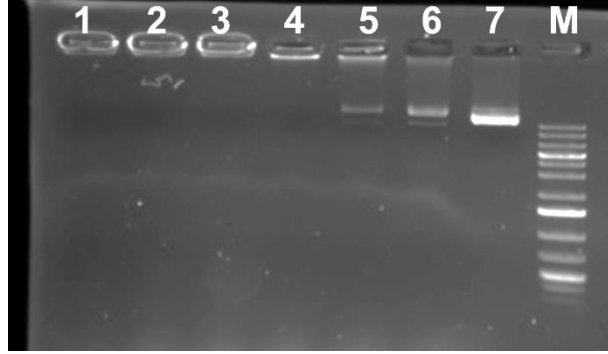


Şekil 22. Formülasyon ve ara ürünlerin FTIR spektrası (Yukarıdan sırasıyla oksitosin konjüge PEG bağlayıcı (Mal-PEG-Oks, pembe), Oksitosin-kitozan konjugatı (taşıyıcı sistem, yeşil), Tiyollenmiş kitozan (siyah).

6.3.2. Nanopleklerin oluşturulması ve karakterizasyonuna ait bulgular

6.3.2.1. Nanopleksinin elektroforetik kontrolüne ilişkin bulgular

Plazmid ve taşıyıcı sistem arasındaki kompleks oluşumu elektroforetik mobilite geciktirme deneyi ile gösterilmiştir. Tam kompleks oluşumu 100:1, 50:1, 25:1 ve 10:1 (Resim 9, 1-4) N:P oranlarında, plazmidin jelde mobilitesinin durdurulması ile görülmüştür (Resim 9). İn vitro transfeksiyon deneylerine 100:1 N:P oranı ile devam edilmiştir.



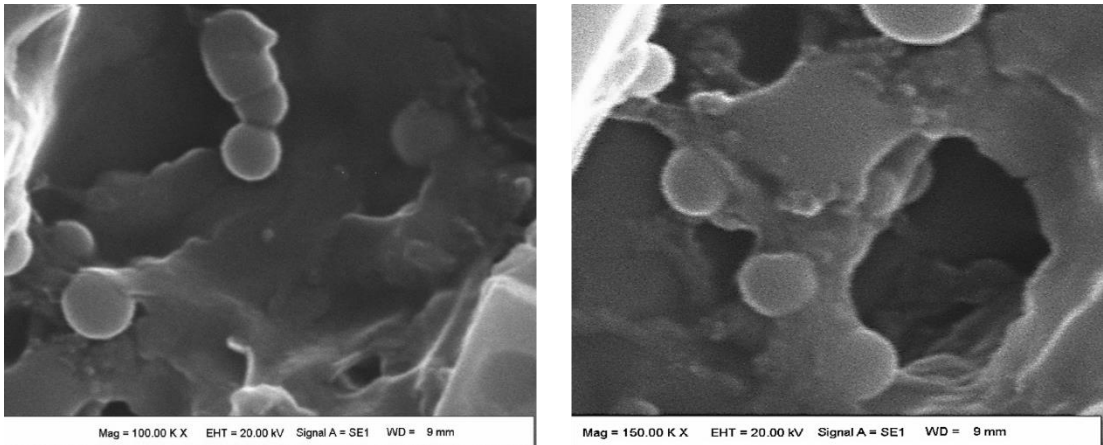
Resim 9. Farklı N:P oranlarında kompleks oluşumunun agaroz jelde kontrolü (1-6, N:P oranı sırasıyla 100:1, 50:1, 25:1, 10:1, 5:1, 1:1. 7: plazmid: M: Marker)

6.3.2.2. Nanoplekslerin partikül boyutu ve zeta potansiyeline ait bulgular

N:P, 100:1 oranında oluşan nanopleksin partikül büyüklüğü $290 \text{ nm} \pm 9$ olup polidispersite indeksi 0,301 dir. Oluşan nanopleksin zeta potansiyeli ise $+11,3 \text{ mV} \pm 2,10$ dur. Böylece bu N:P oranında, monodispers, pozitif yüklü nanopleksler oluşturulmuştur.

6.3.2.3. Nanoplekslerin yüzey morfolojisinin SEM'le incelenmesine ait bulgular

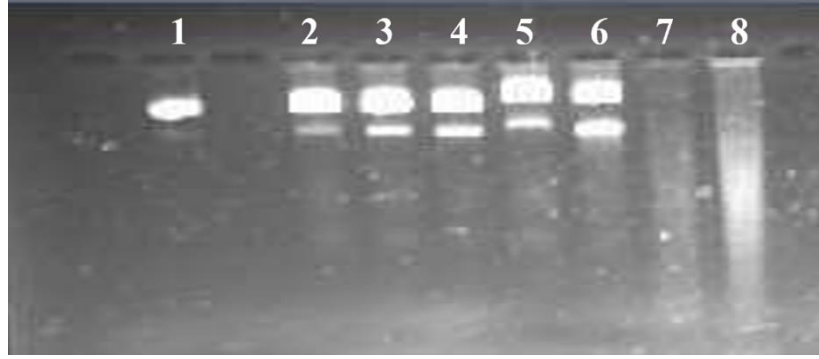
100:1 oranında hazırlanan nanoplekslerin yüzey morfolojisi SEM ile incelendiğinde, dinamik ışık saçılımı verisiyle uyumlu yaklaşık 330 nm büyüklüğünde sferik yapılar görülmüştür (Resim 10).



Resim 10. CRISPR/Cas9 plazmidi ile kitozan-oksitosis taşıyıcı sistemin oluşturduğu nanoplekslerin SEM görüntüsü

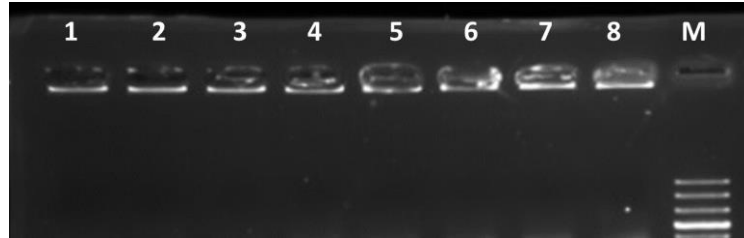
6.3.2.4. Nanoplekslerin serum stabilitesine ait bulgular

Plazmid %10 serum ortamında hızlıca (30. dakikadan itibaren) parçalanmaya başlamış ve 19. saatte tamamen parçalanmıştır (Resim 11).



Resim 11. Çıplak plazmidlerin serum stabilitesi (1: plazmid, 2-8: %10 serumla muamele edilmiş plazmidler, sırasıyla 0 dk, 5dk., 15 dk., 30 dk., 1 saat, 19 saat, 24 saat inkübasyon)

Kitozan-oksitosisin/TN-C-CRIPSR-Cas9 (100/1) nanopleksleri ise %10 serum ile muamele edildiğinde 48.saat sonuna kadar kompleks yapısının varlığını koruduğu görülmüştür (Resim 12). Böylece oluşan nanoplekslerin serumla karşı stabil olduğu ve plazmidleri serumun etkilerinden koruduğu çıkarımı yapılmıştır.

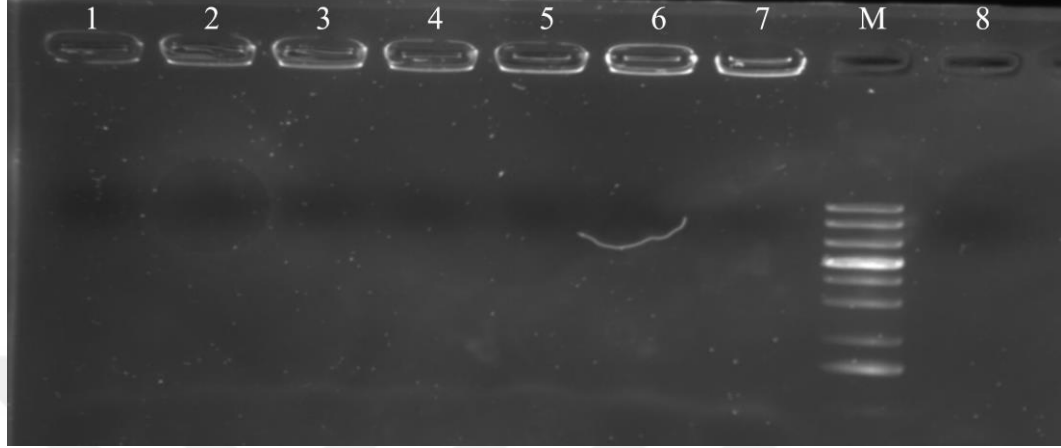


Resim 12. Nanoplekslerin serum karşısındaki stabilitesinin agaroz jel elektroforezi ile kontrolü (1-8: sırasıyla 0 dk, 5dk., 15 dk., 30 dk., 1 saat, 19 saat, 24 saat, 48 saat inkübasyon; M: marker)

6.3.2.5. Nanopleksin enzim (DNaz I) karşı koruma etkisine ait bulgular

Nanoplekslerin CRISPR/Cas9 plazmidlerini DNaz I nükleazı tarafından yıkımdan koruma etkisi incelenmiştir. DNaz I enzimi, çıplak plazmide hemen parçalamıştır (Resim 13). Taşıyıcı sistemle kompleks oluşturmuş plazmidlerin ise DNaz I etkisinden 24 saat boyunca korunduğu gösterilmiştir. Formülasyonun içeriğindeki asetik asit ve sodyum asetatın DNaz I aktivitesini etkileyip etkilemediğini incelemek için, plazmidler formülasyonda kullanılan asetik asit ve sodyum asetat içinde de DNaz I'le muamele edilmiş ve yine de tamamen parçalanma olduğu gözlemlenmiştir. Böylece

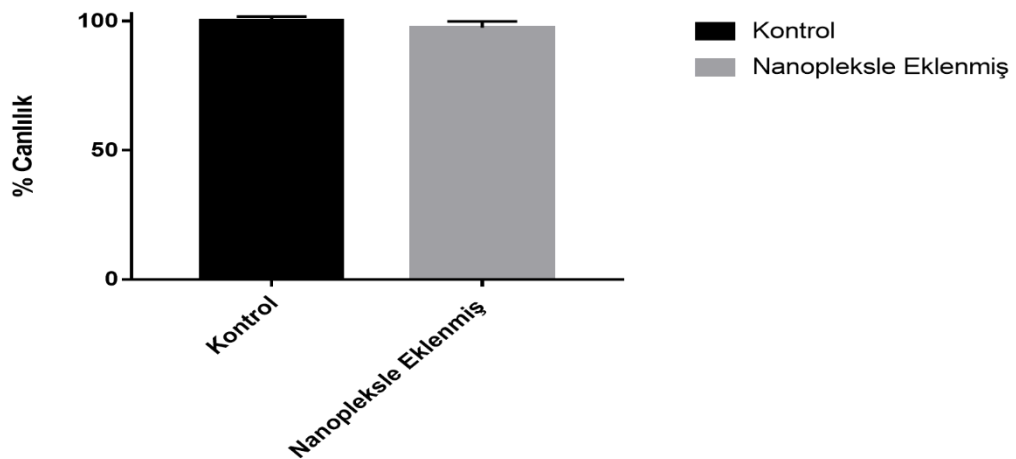
DNAz'ın formülasyon çözeltisinde aktif olduğu ve görülen koruma etkisinin nanopleks aracılı olduğu gösterilmiştir.



Resim 13. DNaz koruma deneyine ait agaroz jel fotoğrafı (1-7: nanoplekslerin sırasıyla 0 dk., 5 dk., 15 dk., 30 dk., 60 dk., 240 dk., 24 saat DNAz I enzimi ile inkübasyonu, M: marker, 8: çıplak plazmidin 5 dakika DNAzI ile inkübasyonu).

6.3.2.6. Nanoplekslerin sitotoksik etkisine ait bulgular

Formülasyonların hücrelerin canlılığı üzerindeki etkileri GFP eksprese etmeyen plazmidle hazırlanan nanoplekslerle transfeksiyondan 16 saat sonra MTT yöntemi ile analiz edilmiştir. Transfekte edilmemiş hücrelerin canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. Transfekte edilmemiş hücrelerle, nanopleksle muamele edilmiş hücrelerin canlılığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,2980$) (Şekil 23)

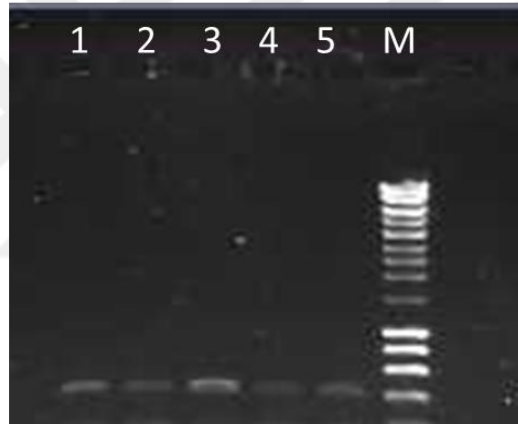


Şekil 23. Nanoplekslerin MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığına etkisi

6.4. Nanoplekslerle İn Vitro Transfeksiyon ve Gen Susturma Çalışmalarına Ait Bulgular

6.4.1. MDA-MB-231’de oksitosin reseptörü ekspresyonuna ait bulgular

Transfeksiyon etkinliğini ve özgüllüğü artırmak için kitozana oksitosin peptidi konjuge edilerek taşıyıcı sistem formüle edilmiştir. Bu taşıyıcı sistemin hücreleri hedefleyebilmesi hücrelerin oksitosin reseptörü eksprese etmesi gerekmektedir. Bundan dolayı da transfeksiyon çalışmalarında kullanılan ÜNMK hücre hattında OTR ekspresyonu cDNA’den yapılan konvansiyonel PCR’la teyit edilmiştir. Konvansiyonel PCR’dan sonra yapılan agaroz jel görüntülenmesinde, PCR ürününün beklenen büyüklükte (391 bp) olduğu görülmüştür (Resim 14). Farklı annealing ısılarında yapılan konvansiyonel PCR’da 50°C’nin uygun annealing ısısı olduğuna, UV ışığı altından bandın daha parlak yani PCR ürününün daha çok olmasından dolayı karar vermiştir.



Resim 14. cDNA ile farklı annealing ısılarında yapılan oksitosin reseptörü PCR’ının agaroz jeldeki görüntüsü (annealing ısısı 1: 55°C, 2:53°C, 3: 50°C, 4: 48°C, 5: 46°C. M: marker)

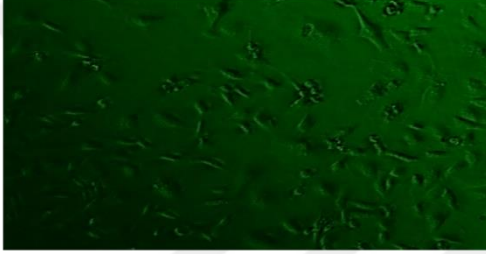
Transfeksiyonun oksitosin reseptörü ekspresyonunu değiştirip değiştirmediğini incelemek için real time PCR yapılmıştır. Hem transfekte olmamış MDA-MB-231 hem de TN-C CRISPR/Cas9 plazmidi ile transfekte hücrelerde benzer Ct oranları ($Ct=30 \pm 0.7$) elde edilmiştir.

6.4.2. Transfeksiyonun floresan mikroskopta incelenmesine ait bulgular

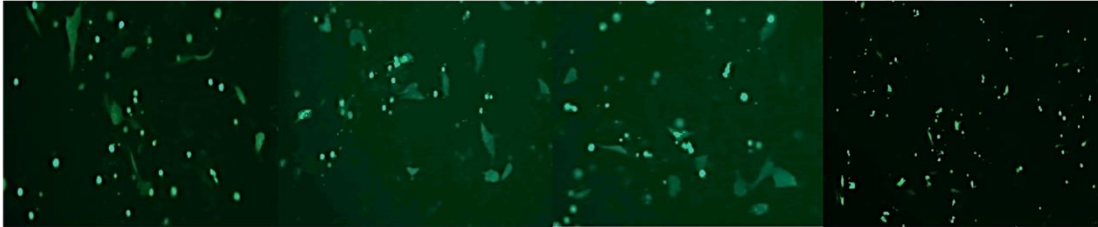
Formüle edilen taşıyıcı sistemin CRISPR/Cas9 plazmidlerini hücreye taşıma kapasitesi hücre tipine göre farklılık gösterebileceğinden iki hücre hattında test edilmiştir. Bu amaçla, tez çalışmada kullanılan TN-C eksprese eden MDA-MB-231 ÜNMK hücre

hattı ile hormon reseptörü pozitif insan meme kanseri hattı MCF-7 hücre hattı kullanılmıştır. Transfeksiyondan 24 saat sonra (lipofektamin transfeksiyonlarında en çok GFP ışımısını görüldüğü zamanda), GFP ışıması floresan mikroskopla görülmüştür (Resim 15). Saf kitozan ve plazmidle oluşturulan komplekste, floresan mikroskopta hiç ışıma görülmemiştir. MCF-7 hücrelerinin genelde daha yoğun bir ışıma verirken, taşıyıcı sistem MDA-MB-231 hücrelerine de CRISPR/Cas9 plazmidlerini başarıyla taşımıştır.

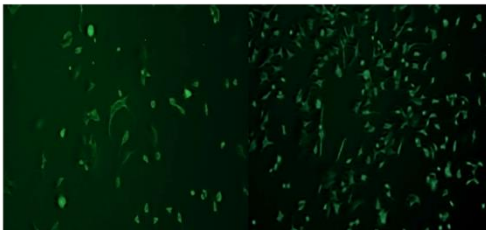
a
MDA-MB-231 Kitozan nanopleksi



b
MDA-MB-231 Kitozan-oksitosin nanopleksi



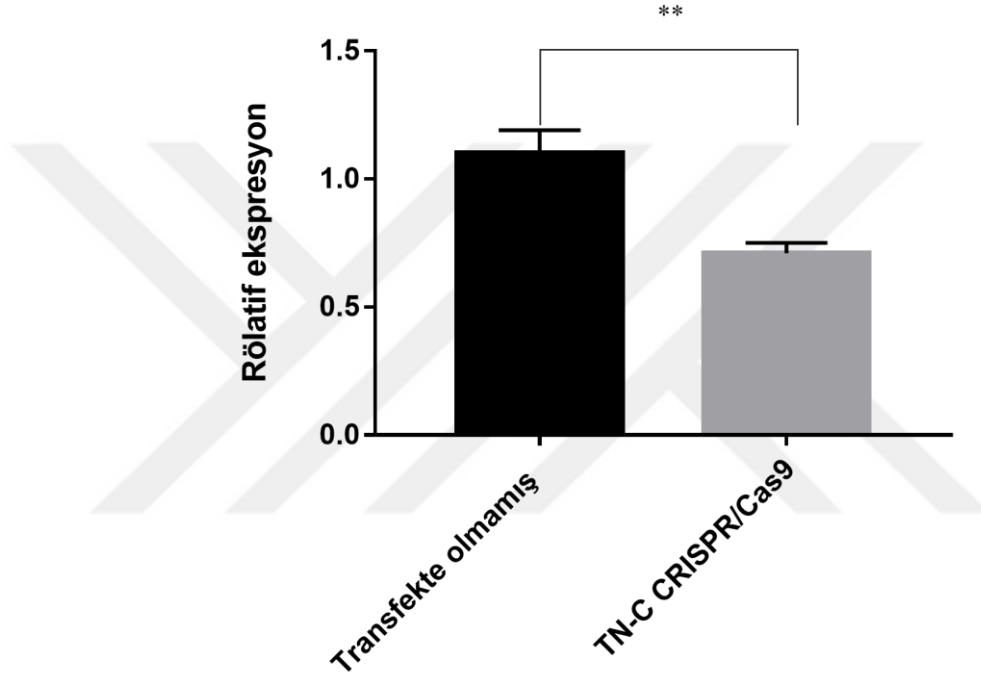
c
MCF-7 Kitozan-oksitosin nanopleksi



Resim 15. Nanopleksle ve kontrol nanopleks ile transfeksiyon sonrası (t=24 saat) GFP ışıması **a.** MDA-MB-231 hücrelerinde sadece kitozan-plazmid nanopleksleri ile yapılan transfeksiyon **b.** MDA-MB-231 hücrelerinde kitozan-oksitosin taşıyıcı sistemi ile yapılan transfeksiyon **c.** MCF-7 hücrelerinde kitozan-oksitosin taşıyıcı sistemi ile yapılan transfeksiyon sonrası

6.4.3. Transfeksiyon sonrası gen susturma çalışmalarına ilgili bulgular

Floresan mikroskopunda nanopleksle görülen transfeksiyonunun, MDA-MB-231 hücrelerinde, TN-C geninin mRNA seviyesinde anlamlı bir değişikliğe neden olup olmadığını yukarıda belirtilen lipofektamin transfeksiyon çalışmalarında kullanılan RT-PCR protokolü izlenerek analiz edilmiştir. Transfeksiyon sonrası 4. günde yapılan RT-PCR’da transfecte olmamış hücelere oranla, TN-C mRNA miktarının %30 azaldığı görülmüştür ($p=0,007$) (Şekil 24).



Şekil 24. TN-C ye özgül CRISPR/Cas9 taşıyan nanopleksle transfeksiyonun TN-C mRNA seviyesine etkisi

6.5. *İn Vivo* Çalışmalar

6.5.1. CD1 nude farelerde ksenograft meme kanseri modelinin oluşturulmasına ait bulgular

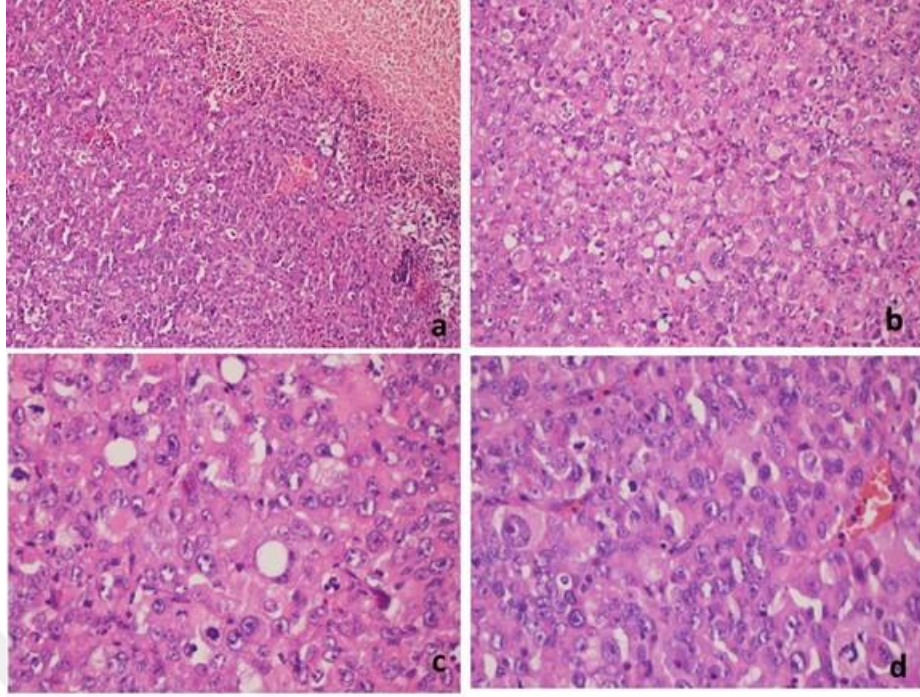
MDA-MB-231 hücreleri matrijel içinde farelere enjekte edildikten 3 hafta sonra, dişi CD1 nude farelerin sırtında xenograft tümörler büyümeye başlamıştır (Resim 16).



Resim 16.CD1 nude dişi farelerde insan meme kanseri hücreleri enjeksiyonu sonucu oluşan tümör

6.5.2. Meme kanseri modelinin histopatolojik incelenmesine ait bulgular

Oluşturulan deneysel meme tümör modelinde enjeksiyondan 8 hafta sonra yapılan histopatolojik incelemede, tümörlerde geniş koagülasyon, nekroz alanları izlendi (Resim 17a)'da geniş nekroz alanı komşuluğunda solid invaziv meme karsinom alanı görüldü (Resim 17c ve 17d) de sinsityal büyüme paterni, nükleer pleomorfizm, tipik ve atipik mitotik figürler gözlemlendi. Tümörlerin tamamı yüksek derecelidir olup modifiye Bloom Richardson skorlamasına göre tümörler solid paternde olup derece 3'tür (en yüksek derece). Nükleer atipi belirgindir, Atipik mitotik figürlerinde izlendiği tümöral alanlarda mitoz sayısı belirgin derecede yüksektir (20-25 adet /10 büyük büyütme alanı). Alınan tüm kesitlerde tümörün histopatolojik olarak BRCA 1 germ hattı mutasyonu olan hastalarda sıklıkla görülen invaziv meme karsinomu olduğu gözlemlendi.

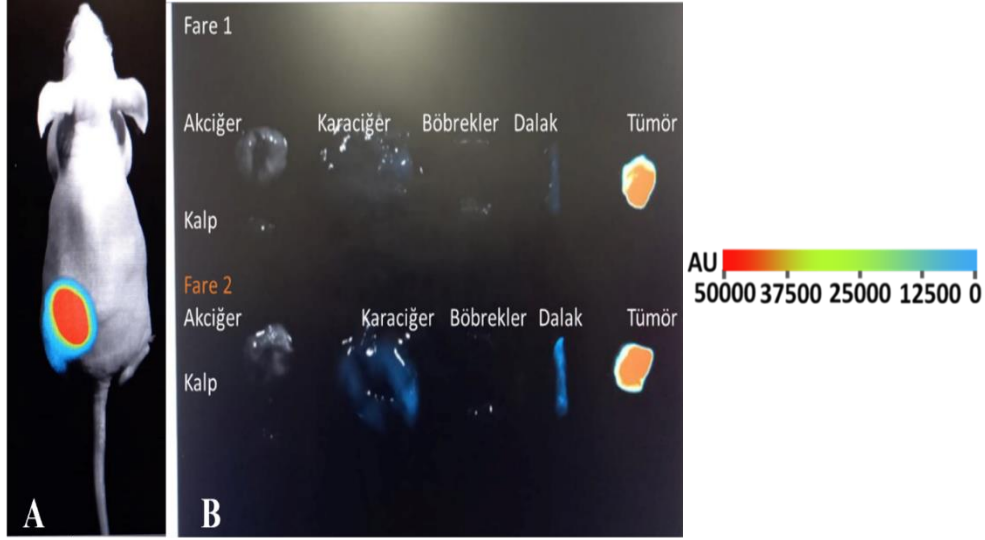


Resim 17. Meme tümörlerinin histopatolojik görüntüleri. a.100 lük büyütme, b. 200 lük büyütme,c,d. 400 lük büyütme

6.5.3. Nanoplekslerle deneysel meme tümöründeki çalışmalara ait bulgular

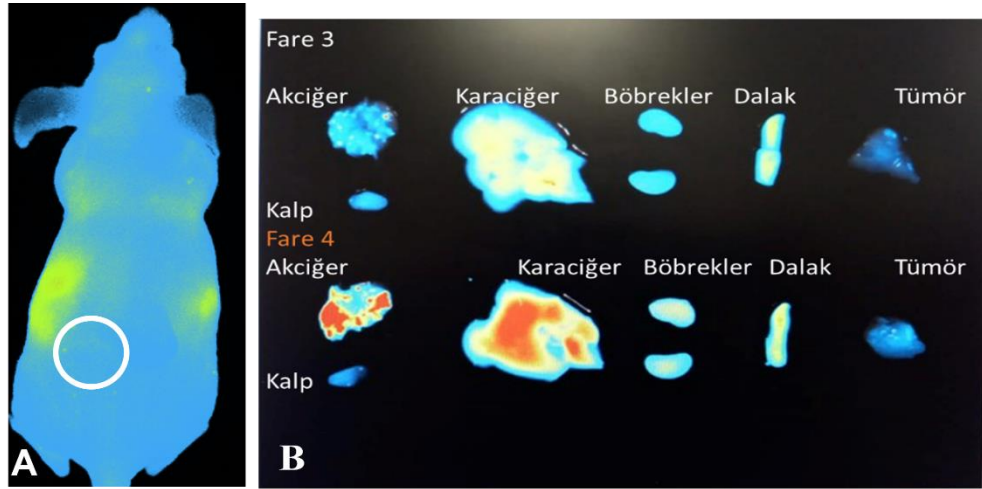
6.5.3.1. Biyodağılıma ilişkin bulgular

Yakın kızılötesinde parlayan kardiyogreen boyası ve taşıyıcı sistem arasında yapılan kompleksle gerçekleştirilen biyodağılım çalışmasında, intratümöral enjeksiyondan 16 saat sonra (n=2), taşıyıcı sistemin çoğunlukla tümörde kaldığı gösterilmiştir (Resim 18). İç organların diseksiyonu sonrasında da floresan yoğunluğunun çoğunluğu tümörde görülmüştür.



Resim 18. İntratümöral enjeksiyon sonrası 16. saatte nanopleksin biyodağılımını gösteren floresan yoğunluğu. (A: tüm fare, B:disekte edilen iç organlar ve tümördeki floresan yoğunluğu (AU: arbitrer birim)

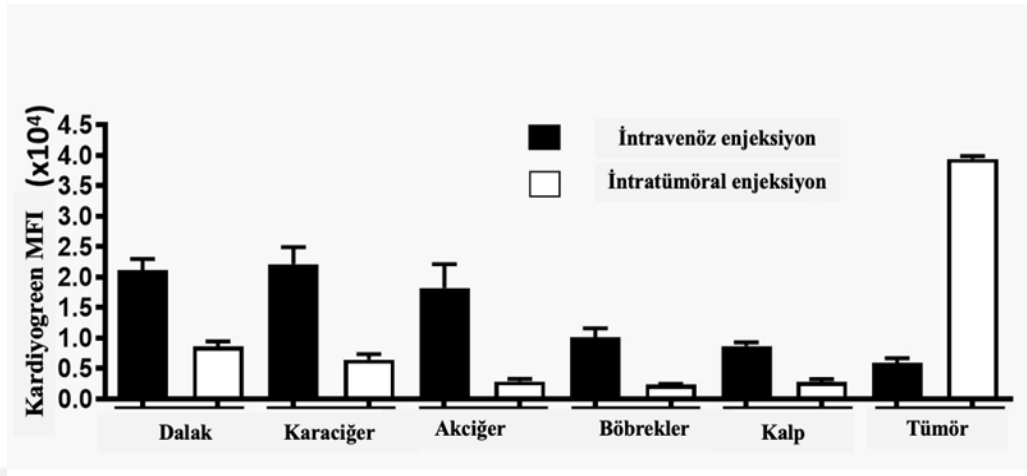
Taşıyıcı sistem-kardiyogreen konjugatı intravenöz yoldan verildiğinde (n=2), 16 saat sonra başta karaciğer olmak üzere akciğerler ve dalakta birikmektedir. Bu sistem tümöre de ulaşmasına rağmen, iç organlara kıyasla daha az tümöre ulaşım gözlenmiştir (Resim 19).



Resim 19. İntravenöz enjeksiyon sonrası, 16. saatte nanopleksin biyodağılımını gösteren floresan yoğunluğu. (A: tüm fare, B:disekte edilen iç organlar ve tümördeki floresan yoğunluğu

Her uygulama yolu için kullanılan ikişer farede görülen ortalama floresan yoğunluğu (MFI) ile yapılan nicel analizde de, formüle edilen sistemin intravenöz uygulamasında en çok karaciğer, dalak ve akciğerler dağılım görülürken, intratümöral uygulamada ise

sistem uygulama sonrası 16 saat sonra çoğunlukla tümörde kalıp, dalak ve karaciğere düşükte olsa bir miktar kompleks görölmektedir (Şekil 25).



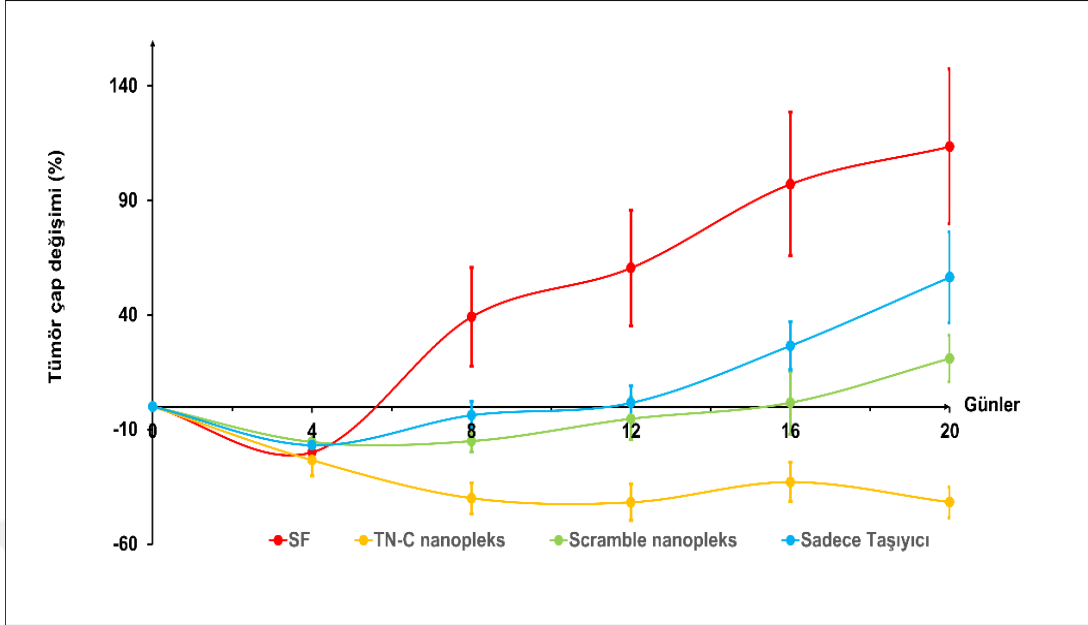
Şekil 25. Uygulamadan 16 saat sonra yakın kızıl ötesinde ortalama floresan yoğunluğu

6.5.4. Nanoplekslerle uygulanan tedavinin tümör çapına etkisi

TN-C'ye deneysel meme kanseri modelinde CRISPR/Cas9 sistemiyle susturmak için her 4 günde bir toplamda 5 adet intratümöral enjeksiyon yapılmıştır. Deneye başlanırken ve her enjeksiyon öncesinde hayvanların ağırlık ve tümör ölçümleri alınmıştır. Tümör çapında başlangıç çapına göre yüzdelik (%) değişim hesaplanmıştır (Şekil 26).

İlk enjeksiyondan sonra tüm gruplarda tümör çapı küçülmüştür. Ancak ikinci enjeksiyondan sonra (gün=4) 3 kontrol grubunda da tümörler büyümeye başlamıştır. Serum fizyolojik (sf) verilen grupta tümörler hızlıca büyürken, scrambled CRISPR/Cas9 plazmidi taşıyan nanoplekslerle enjeksiyonlarda tümör büyümesi daha yavaş olmuştur.

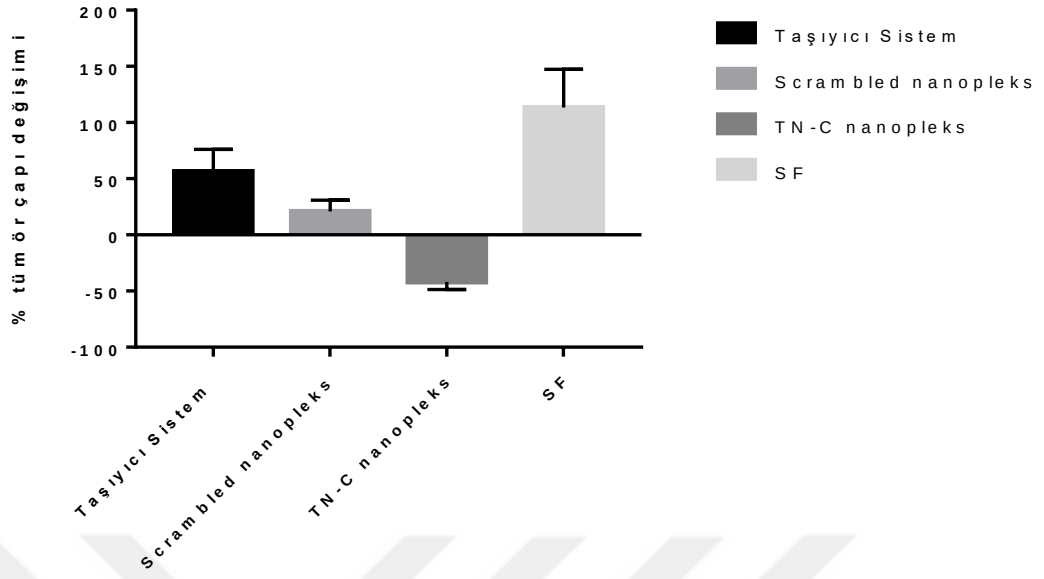
Serum fizyolojik enjekte edilen kontrol grubunda (n=5) tümörler 20 günün sonunda başlangıç tümör çapına göre %213 daha büyük bir çapa sahip olmuşlardır (2,13 kat büyüme). Plazmid eklenmeden verilen sadece taşıyıcı sistem kontrol grubunda (n=6) ise tümörler 20 günün sonunda 1,56 (%156) katına çıkmıştır. Scrambled CRISPR/Cas9 plazmidleri ile intratümöral enjeksiyon sonucu (n=6), tümör çapı 1,20 kat büyümüştür (120%). TN-C CRISPR/Cas9 nanopleksleri ile yapılan enjeksiyonlar sonucu (n=6) ise 20. Günde tümörlerin çapı başlangıç çapının %60'ına düşmüştür.



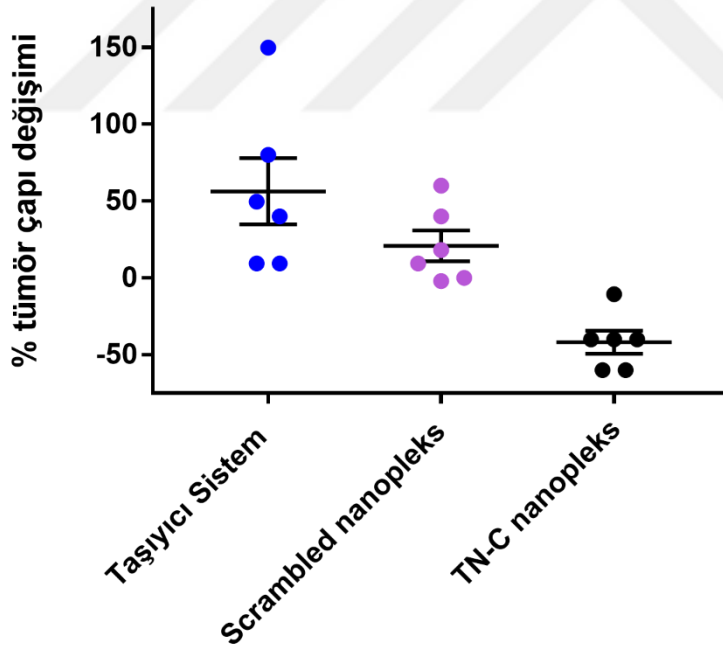
Şekil 26. Tedavi boyunca deney gruplarında tümör çapındaki değişim yüzdesi (veriler ortalama değişim $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir).

TN-C CRISPR/Cas9 içeren nanoplekslerin etkisini görebilmek için deney sonundaki % tümör çapı değişimi hem sadece taşıyıcı sistem hem de scrambled CRISPR/Cas9 nanopleksleri uygulamasıyla karşılaştırılmıştır (Şekil 27). Yapılan analizde, TN-C CRISPR/Cas9 nanopleks uygulamasının sadece taşıyıcı ($p=0,006$) ve scrambled CRISPR/Cas9 plazmidlere göre ($p=0,0195$) tümör çapını istatistiksel anlamlı derecede daha çok azaltmıştır. Sadece taşıyıcı sistem ve scrambled CRISPR/Cas9 plazmidlerini taşıyan nanoplekslerle yapılan uygulamalar arasında deney sonunda istatistiksel anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Deney gruplarında toplam ortalama tümör çapı değimi yerine, her fare için tümör çapı değişimine bakıldığında, tümör çapında düşüş bir tek TN-C CRISPR/Cas9 plazmidi ile muamele edilen farelerde görülmüştür ve bu deney grubunda hiçbir farede tümör boyutunun büyümesi görülmemiştir (Şekil 28).



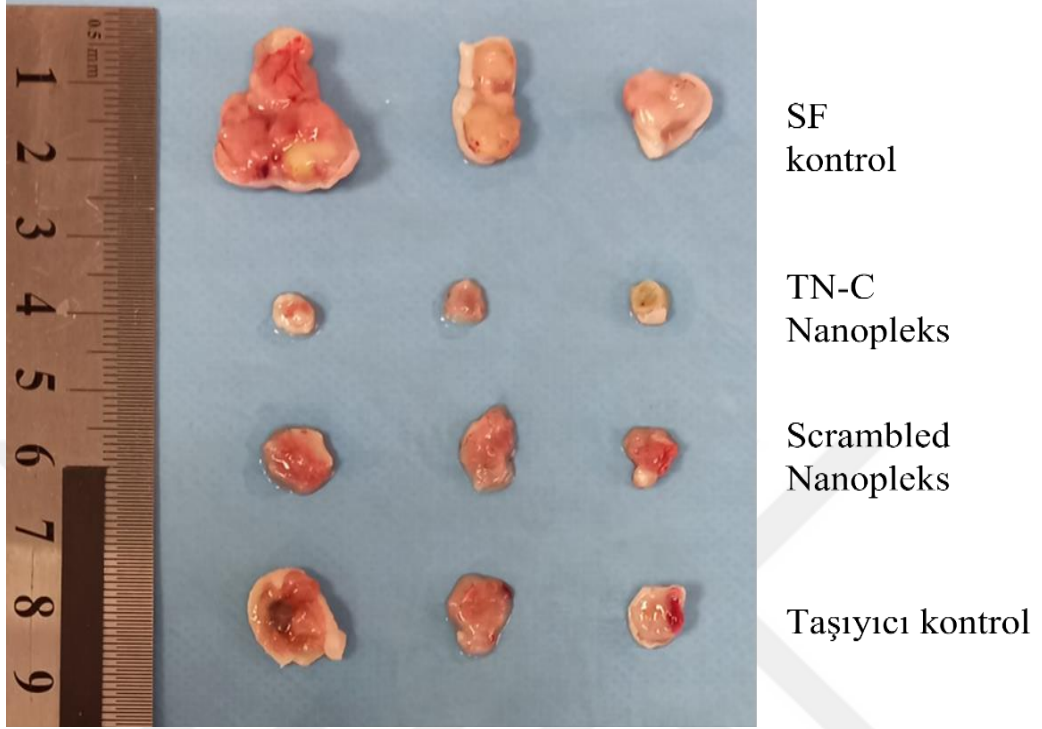
Şekil 27. 20. günde tümör çapı değişim yüzdesinin karşılaştırılması.



Şekil 28. 20. günde her bir farede görülen tümör çapı değişimi yüzdesi (standart hata gösterilmiştir)

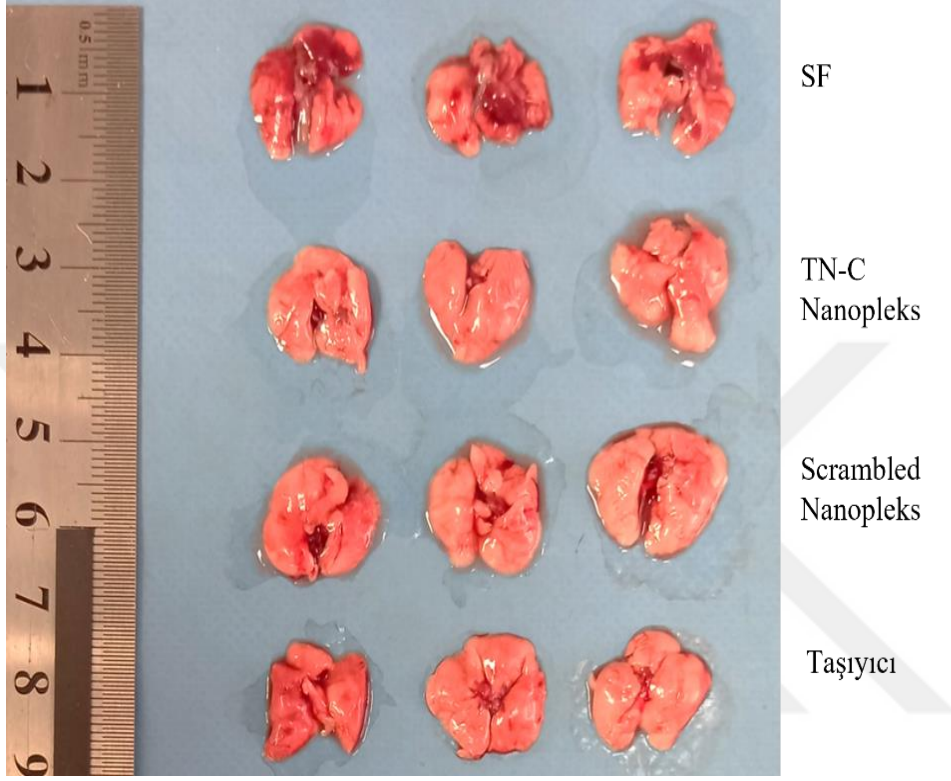
Yapılan son enjeksiyondan 4 gün sonra (gün=20) hayvanlar sakrifiye edilip, tümör ve akciğerleri çıkartılmıştır. Gruplar arasındaki tümör boyutlarına bakıldığında da en

küçük tümörler TN-C CRISPR/Cas9 plazmidi taşıyan nanoplekslerin uygulandığı grupta görülmüştür (Şekil 20).



Resim 20. Deney sonundaki tümör görüntüleri

6.5.5. Meme kanseri modelinde akciğer metastazının incelenmesine ait bulgular
CD1 nude dişi farelerde oluşturulan ÜNМК meme kanseri modeli, akciğer metastazına neden olup olmadığı deneyin sonunda akciğer dokularının incelenmesiyle analiz edilmiştir. 4 deney grubunda da akciğer metastazı gözlemlenmemiştir (Resim 21).



Resim 21. Deney gruplarının akciğer görüntüleri

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında önemli bir halk sağlığı problemi olan üçlü negatif meme kanserin için güncel bir teknik olan CRISPR/Cas9 sistemini kullanarak potansiyel yeni bir gen temelli terapötik yaklaşımın in vitro ve in vivo deneylerle test edilmesi amaçlanmıştır. Yapılan deneylerde, en agresif meme kanseri alt tipinin CRISPR/Cas9 temelli gen terapisi uygulaması için hem hedef gen (TN-C) ve ona uygun rehber RNA'lar çalışılmış hem de bu yaklaşımın in vivo uygulanabilirliği için oksitosin konjugatlı kitozandan oluşan bir taşıyıcı sistem formüle edilmiştir.

Özgül ve güvenli gen terapisi uygulamaları için kilit noktalardan biri hedef gen seçimidir. Sağlıklı hücreler tarafında da ihtiyaç duyulan ya da yüksek miktarda ekspresse edilen siklin bağımlı kinazlar gibi normal hücre fizyolojisinin bir parçası olan genleri CRISPR/Cas9 sistemi ile kalıcı olarak susturmak büyük yan etkilere neden olabilmektedir. Bu moleküllerin aksine TN-C, sağlıklı dokularda ekspresse olmamaktadır. Meme kanserine özgül ve tümör oluşumu ve yayılmasında önemli olan TN-C, CRISPR/Cas9 bazlı gen susturması için hedef gen olarak seçilmiştir. TN-C ÜNMK'de, kanser tanımlayıcı özellikler olarak bilinen proseslerin çoğunu desteklemektedir. Bunlar arasında anjiyogenez, metastaz, proliferasyon ve immün kaçış vardır (Hongu ve ark., 2022; Li, Z.-L. ve ark., 2020; Wawrzyniak ve ark., 2020). Bu çalışma bilimiz ışığında meme kanserinde TN-C'ye CRISPR/Cas9 teknolojisi ile susturmayı hedefleyen ilk çalışmadır.

TN-C knockout farelerin de sağlıklı olarak doğduğu gösterilmiştir (Yoshida, K. I. ve ark., 2022). Daha derin incelemelerde ise TN-C knockout farelerde yara iyileşmesinde gecikme ve hafif tendinopatiler gibi şu anda kullanılan farmasötik kanser tedavi ajanlarının yan etkilerine nazaran hafif etkiler görülmüştür (Yoshida, K. I. ve ark., 2022). Bu bilgiler ışığında, insanda TN-C ekspresyonunun CRISPR/Cas9 aracılığı ile tümör dışındaki dokularda olası susturulmasının çok ciddi yan etkilere yol açmayacağı düşünülebilmektedir. Böylece TN-C, kanserde zor bulunan ve tedavilerde önemli bir eksiklik olan kansere özgül moleküllerden biridir.

Literatürde daha önce CRISPR/Cas9 plazmidleri ile TN-C susturması denenmemiştir. Bu yüzden de plazmidlerin TN-C'yi susturma etkinliği ve bu susturmanın sonuçları ilk önce ticari lipit bazlı bir ajanla transfeksiyon yaparak tayin edilmiştir.

CRISPR/Cas9 bazlı gen düzenlemesinin başarısı için seçilen rehber RNA (gRNA) sekansları büyük önem arz etmektedir. Büyük bir gen olan TN-C'nin etkin bir şekilde susturulması için bu araştırmada 3 gRNA kullanılmıştır. Çalışmamızda tek bir gRNA kodlayan plazmidle yapılan in vitro transfeksiyon sonrası susturma, çifte plazmidle susturmaya nazaran anlamlı derecede azdır (%20 susturmaya karşı %60 susturma). Bu yüzden de çalışmalara iki TN-C'ye özgül CRISPR/Cas9 plazmidi kullanılarak devam edilmiştir.

Liu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da allojenik KAR T hücreleri oluşturabilmek için CRISPR/Cas9 sistemiyle 2 geni gen başına 2 gRNA kullanarak susturmuşlardır (Liu ve ark., 2017). T hücreleri ve hematopoetik kök hücreler üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise ikili gRNA kullanımının tek gRNA kullanımından daha etkili bir gen susturmaya neden olduğu gösterilmiştir (Mandal ve ark., 2014). Yapılan bu çalışmada T hücreleri için hedef genlerdeki (CCR5 ve B2M) düzenlemenin sadece çifte gRNA ile gerçekleşebildiği görülmüştür. Tek gRNA kullanıldığında DSB sonucunda gerçekleşen NHEJ genomda indel değişimlerine neden olmaktadır. Bu indel değişikliklerin protein seviyesinde fark yaratabilmesi RNA kesimi ve transkripsiyon regülasyonu gibi birçok faktöre bağlıdır. Tek bir gen çoklu gRNA'lar ile hedeflendiğinde ise indel değişikliklerin yanı sıra aynı anda kesimler sonucu gende daha büyük delesyon yaratabilmektedir. Böylesi bir çoklu ekzon hedeflendirmesi ve olası büyük delesyon, genin susturulma etkinliği için daha etkin bir yaklaşım olabilmektedir. Kim ve Zhang'ın zebra balıklarında yaptığı bir araştırmada da genlerin ilk ekzonlarını tek gRNA ile hedeflendirilmesinde ortaya çıkan indellerin fenotipde bir değişiklik yaratmadığını ancak çalışılan genin (*smarca2*) 7 gRNA ile hedeflendirilmesinin ise gende daha büyük delesyonlara neden olarak, protein seviyesinde farklılık yarattığı gösterilmiştir (Kim, B. H. ve Zhang, 2020).

Multipleks gRNAlar ile yapılan TN-C genom düzenlenmesi çalışmamızda, transfeksiyon sonrası 8. günde TN-C mRNA ekspresyonunun %60 azaldığı görülmüştür. Böylece kullanılan rehber RNA'ların TN-C'yi susturma da etkili olduğu sonucuna varılabilmektedir. TN-C mRNA seviyesindeki azalmaya paralel olarak Western blotla TN-C protein seviyesinde gözle görülür bir azalma kaydedilmiştir. Transfeksiyon sonrası gen ekspresyon patterninde global bir değişiklik olmadığı

MDA-MB-231 hücrelerindeki oksitosin reseptör mRNA seviyesinde deney grupları arasında bir fark olmaması ile kısmen gösterilmiştir.

Genom düzenlenmesi sonucu gende sekans seviyesinde ne tür değişiklikler olduğu sekanslama bazlı TIDE gibi analizlerle ileriki çalışmalarda incelenebilir (Brinkman ve ark., 2014). TIDE metodunda, genom düzenlemesi yapılmış ve kontrol hücrelerinden elde edilen DNA örneklerinde, hedef lokusu içine alan primerler kullanılarak konvansiyonel PCR yapılır ve daha sonra PCR ürünleri Sanger dizileme yöntemiyle sekanslanır. TIDE programı kesim bölgesini göz önünde bulundurarak kontrol ve düzenlenmiş sekansları karşılaştırır ve kesim noktasını referans olarak oluşan indelleri raporlar. TN-C CRISPR/Cas plazmidleriyle transfekte edilen hücrelerde ileride yapılacak TIDE çalışmasında da TN-C ekzon 1-3 bölgesinde yaratılan indeller karakterize edilebilir. Eğer bu analiz sonucunda hangi tür değişikliklerin susturmada önemli olduğu tam olarak tanımlanabilirse, gRNA sekanslarında değişiklikler ile bu sistem optimize edilebilir.

Rehber RNA sekansı hem genin hangi bölgesinin hedefleneceğini hem de hedef-dışı riskini belirler. Yapılan araştırmalar transkripsiyon başlama sekansına yakın hedeflemelerin knockout etkinliğini artırdığını göstermiştir (Radzishchanskaya ve ark., 2016). Yapılan bu çalışmada da kullanılan 3 gRNA, ekzon 1, 2 ve 3'ü hedeflemektedir. TN-C'nin fibronektin benzeri bölgesinde alternatif uç birleştirme ile farklı izoformları olduğundan, yine genin baştaki ekzonlarının hedeflendirilmesi susturma etkisini artıracağı düşünülmüştür.

Hedef-dışı etki riski CRISPR/Cas9 sisteminin klinikte kullanımı için en önemli güvenlikle ilişkili engellerdendir. Hedef-dışı etkiler aracılığıyla genomda istenmeyen kalıcı değişiklikler yaratılıp büyük delesyonlar ve genlerin yerlerinin değişmesine yol açılabilir. Bu hedef-dışı etkilerle ilgili en büyük riskler ise önemli genlerde olabilecek işlev kaybı mutasyonları sonucu ölüm yaşanması ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar gibi değişimlerle kansere yol açmaktır.

Hedef dışı etkiler gRNA'nın bir gene özgül olmamasından veya tam olarak komplementer olmadığı sekanslara (3 baz uyumsuzluğundan fazla) bağlanmasından dolayı gerçekleşebilir. Bu tez çalışmasında kullanılan gRNA, Cas-OFFinder aracılığıyla *in silico* olarak hedef dışı olası bir bağlanma için değerlendirilmiştir (Bae, S. ve ark., 2014). Bu değerlendirmede kullanılan rehber RNA'ların sadece TN-C

genini hedeflediği ve scrambled gRNA'nın ise insan genomunda bir yeri hedeflemediği gösterilmiştir. Cas-OFFinder, PAM dizisini veya eşleşmeyen bazların sayısını sınırlama getirmeden herhangi bir genomda potansiyel hedef dışı bölgelerin hızla aranmasını sağlamaktadır. Örneğin, PAM sekansı 5'-NGG-3' olan *Streptococcus pyogenes* den (bu çalışmada da kullanılan Cas9 enzimi) gelen Cas9 enzimi için PAM sekansları 5'-NRG' olarak aranarak, PAM sekansında da uyumsuz bağlanmayı göz önüne alınmaktadır. Cas-OFFinder den gelen *in silico* veriye dayanılarak bu tez çalışmasında kullanılan gRNA'ların, genomda başka bir yere bağlanması ve hedef-dışı etki yaratması beklenmemektedir.

Gelecek çalışmalarda olası bir beklenmeyen hedef-dışı etkiyi *in vitro* çalışmalardan elde edilen DNA örneklerinden doğrudan tayin etmek için Digenome-seq gibi tüm genom sekanslaması yapılabilir (Kim, D. ve ark., 2015). Bu yöntem, *in vitro* nükleazla kesilmiş genomları (digenomlar) sıralayarak hücre popülasyonu havuzundan nükleazlar tarafından indüklenen hedef dışı mutasyonları tespit eder. Bu yöntemin sıklığı 0,1%'den az görülen hedef dışı etkileri bile saptayabilmektedir. Hedef-dışı etkiyi azaltmak için aynı zamanda Cas enzimlerine ve gRNA moleküllerine de değişiklik yapıldığı çalışmalar vardır. Örneğin, Bölüm 4'te bahsedildiği gibi Cas enziminde nokta mutasyonları yaparak hedefe tam komplementer olmayan gRNA'ya bağlanması engellenebilir. Hedef-dışı etkiyi azaltmak için CRISPR/Cas sisteminde özgüllüğü belirleyen gRNA üzerinden de değişiklikler yapılabilir. Örneğin ölü RNA hedef-dışı etki baskılama yönteminde, 20 nükleotid uzunluğundaki gRNA'larla beraber kısaltılmış 16 nükleotid uzunluğunda gRNA da verilmektedir. 16 nükleotidlik gRNA hedefe bağlansa bile Cas9 kesimini sağlayamamaktadır (ölü gRNA). Böylece olası hedef-dışı bölgelere bağlanan bu moleküller, o bölgeleri esas 20 nükleotid uzunluğunda gRNA'nın bağlanmasından korumakta ve böylece hedef dışı etkiyi 40 kattan fazla azaltmaktadır (Rose ve ark., 2020). Literatürdeki bu ve benzeri gelişmelere göre gelecekte, bu araştırmada kullanılan CRISPR/Cas9 sistemi tekrardan gözden geçirilip, olası bir hedef-dışı etkiyi önlemek için modifikasyonlar yapılabilir.

Yapılan tez çalışmasında kullanılan CRISPR/Cas9 sistemi ve seçilen gRNA'ların TN-C mRNA ekspresyonunu transfeksiyon sonrası 8. günde %60 azaltılmasının, ÜNMK hücre hattının proliferasyonu, apoptozu, göç ve metastatik kapasitesini önemli oranda etkileyerek tümör karşıtı etki yaratmıştır.

Literatürde MDA-MB-231 hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada RNA interferansı sonucu elde edilen proliferasyon sonuçları, bu tezde elde edilen sonuçlarla birebir bir uyum göstermektedir. O araştırmada da, TN-C'yi benzer miktarda (%60) susturan çift sarmallı RNA konsantrasyonunun da MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyon veya canlılığında benzer bir düşüş (yaklaşık konttolün%68 seviyesi) görülmüştür (Wawrzyniak ve ark., 2020).

TN-C'nin proliferatif etkilerinin, TN-C'nin en kapsamlı araştırıldığı kanser türü olan glioblastoma hücre hatlarında Ras/MAPK, PLC γ ve PI3K/Akt yollarının aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Brösicke ve Faissner, 2015; Fujita ve ark., 2019). Bu yolların aktivasyonu ise TN-C'nin EGF benzeri alanı ile EGF reseptörlerine bağlanması ve PDGF ekspresyonunu indüklemeye gibi çeşitli reseptörler ve moleküller aracılığıyla gerçekleşmektedir.

TN-C'nin pleiotropik etkilerinden dolayı, azalan TN-C ekspresyonu ile proliferasyonda gözlemlenen fark potansiyel olarak artan apoptoza ve/veya azalan proliferasyondan kaynaklanabilir. İleriki çalışmalarda bir hücrenin tam olarak kaç kere bölündüğünü gösterebilen carboksifloresin diasetat (CFSE) ile hücreler muamele edilip, akım sitometrisi ile hücrelerin proliferasyon hızı doğrudan ölçülebilir.

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, hücrede içsel (örn. DNA hasarı) ve dışsal sinyaller (örn. ölüm reseptörlerinin aktivasyonu) tarafından tetiklenir. Apoptoz normal bir fizyolojik proses olup, doku gelişiminde, homeostazda ve tümör hücreleri gibi zararlı hücreleri yok etmekte hayati öneme sahiptir (Singh, R. ve ark., 2019) . Apoptozda kaspaz enzimlerinin birbirlerini aktive etmesi sonucu, DNA parçalanması, apoptotik cisimlerin oluşumu ve apoptotik hücrenin fagositik hücreler tarafından temizlenmesi gerçekleşir. Apoptozdan kaçış kanser tanımlayıcı özelliklerden biridir. Meme kanseri gibi kanser hücreleri, Bax gibi proapoptotik proteinleri ekspresyonunu baskılayarak ve Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırarak apoptozdan kaçışı başarır (Mohammad ve ark., 2015). Çoğu kemoterapötik maddenin uygulanması apoptoz indüksiyonuna yol açtığından, apoptoz direnci veya apoptozdan kaçış da tedavi direncini artırır (Mohammad ve ark., 2015). Bu nedenle, bir tümördeki anti-apoptotik mekanizmalar, onun hayatta kalmasını, tedavi direncini ve nüksetmesini destekler.

Bu tez kapsamında yapılan in vitro apoptoz çalışmasında scrambled kontrol ve TN-C CRISPR/Cas9 ile transfekte edilmiş hücre gruplarında, transfekte edilmemiş hücrelere göre erken apoptozdaki hücre yüzdesi daha yüksektir. Bunlara rağmen transfeksiyon sonrası 2. günde deney grubundaki (TN-C CRISPR/Cas9 plazmidleri ile transfekte grup) hücre popülasyonundaki erken ve geç apoptotik hücre yüzdeleri (toplam 32%), scrambled kontrol hücrelerinden (23%) daha yüksekti.

Kontrol CRISPR/Cas9 plazmidi ile transfekte edilmiş hücrelerde gözlenen hücre ölümündeki artış, plazmidde kodlanan Cas9 ve GFP ekspresyonundan dolayı hücresel kaynakların üzerindeki baskıdan dolayı olma ihtimali vardır. İn vitro çalışmalarda kullanılan scrambled plazmid GFP kodlarken, TN-C CRISPR/Cas9 plazmidlerinden sadece birisi GFP kodlamaktaydı. Bu da scrambled kontrol grubunda, GFP ekspresyonun ve onunla gelen hücresel etkinin iki katı olmasına neden olmaktadır. Bundan dolayı da in vitro çalışmalardan sonra tasarlanan in vivo çalışmalarda, deney ve scrambled grubu arasında GFP taşıyan plazmid miktarı GFP kodlamayan scrambled plazmid de kullanılarak eşitlenmiştir. Narimani ve arkadaşlarının insan lösemi hücre hatlarında CRISPR/Cas9 bazlı gen susturma çalışmasında da scrambled kontrol grubundaki canlılık transfekte olmayan hücrelere nazaran transfeksiyondan 48 saat %15 oranında düşmüştür (Narimani ve ark., 2019). Ancak bu düşüş kullanılan hücre hatlarından birinde gözlemlenirken, diğerinde gözlemlenmemiştir. Bu da scrambled kontrolün hücreler üzerindeki etkisinin hücre tipine göre değişebileceğini öne çıkarmaktadır.

Coumans ve arkadaşlarının GFP ekspresyonunun MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki etkisinin proteomik yöntemlerle araştırdığı çalışmada, kalıcı GFP ekspresyonu ile apoptozla ilgili proteinlerde artış ve proliferasyonla ilgili nükleotid ve nükleik asit metabolik işlemlerinde yer alan proteinlerde de düşüş olduğunu göstermiştir (Coumans ve ark., 2014). Scrambled CRISPR/Cas9 ticari olarak satın alındığından, hedef-dışı etkisi olması beklenmese de yukarıda anlatılan Digenome-seq yöntemi gibi bir yöntemle kullanılan hücre hattındaki hedef-dışı etkisi araştırılabilir. Bununla birlikte, apoptoz analizinden, TN-C ekspresyonundaki azalmanın, onkoterapilerin nihai hedeflerinden biri olan kanser hücrelerinin sayısında anlamlı düşüşler sağladığı ve apoptozu indüklediği görülmüştür.

Bax içsel apoptotik yolakta önemli rol oynayan bir proteindir ve genelde hastalardan alınan meme kanseri örneklerinde ekspresyonu azalmış olarak görülmektedir (Pluta ve ark., 2011). Hücrelerde Bax miktarının çoğalması içsel apoptotik yolağın aktive olmasının göstergesi olarak kullanılmaktadır. Transfeksiyon sonrası 8. günde yapılan Bax proteini Western blotuna bakıldığında, Bax proteini miktarı deney grubunda yükselmişken, scrambled ve kontrol grubu arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Böylece özellikle transfeksiyon sonrası 8. günde görülen apoptotik etki, CRISPR/Cas9 aracılığıyla oluşan TN-C inhibisyonuna bağlı olduğu sonucuna varılmaktadır.

TN-C, anti-apoptotik etkilerini de EGF-benzeri alanı aracılığıyla büyüme faktörü reseptörlerine bağlanarak ve ERK/NF- κ B yolunun indüklenmesi yoluyla etkilere gerçekleştirebilir (Iyoda ve ark., 2020; Shi ve ark., 2015). Bu yol daha sonra apoptozu azaltan ve hücre döngüsü ilerlemesini tetikleyen anti-apoptotik proteinlerin ve siklin D1'in aktivasyonuna yol açabilir. Metastaz ÜNMK'de morbiditenin başlıca nedenidir ve metastatik ÜNMK hücrelerinin apoptoza daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, TN-C genom düzenleme sistemi, tedavi seçeneklerinin en kısıtlı olduğu metastatik ÜNMK'de özellikle etkili olabilir.

TN-C'nin, hücre döngüsü üzerinde literatürde gösterilen etkisinden dolayı, TN-C'nin kısmi inhibisyonunun hücre döngüsü üzerindeki etkisi de bu çalışmada incelenmiştir. Pankreatik duktal adenokarsinom hücreleri üzerinde yapılan bir çalışma, kültürlerde TN-C ilave edildiğinde, G1/S geçişinin tetiklendiğini göstermiştir (Shi ve ark., 2015). Başka bir çalışma, ise TN-C'nin S fazına ilerlemeyi siklin D1 ekspresyonunu artırarak desteklediğini göstermiştir (Cai, J. ve ark., 2018). Siklin D1 ise CDK4 ile kompleks oluşturup, E2F'nin retinoblastom proteinden serbest kalmasını sağlar ve böylece G1/S geçişi gerçekleşir. Bu veriler ışığında TN-C ekspresyonunun azaltılmasının G1/S geçişini azaltacağı çıkarımı yapılabilir. Bu çalışmada da CRISPR/Cas9 sistemi ile gerçekleştirilen TN-C seviyesindeki düşüşün, transfeksiyondan 2 gün sonra G1/G0 fazındaki hücre yüzdesini arttırdığı (%46'dan, %49'a) ve diğer fazlardaki hücre yüzdesini azalttığı görülmüştür. Böylece, TN-C seviyesinin azaltılmasının hücre döngüsünde G1'de durdurulmaya yol açtığını gösterildi. İlaç direnci ÜNMK tedavisinde karşılaşılan en büyük zorluklardan biridir ve yüksek mortalite ile sonuçlanır. Önceki araştırmalar, TN-C'nin, doksorubisinin G1/S geçişini durdurma etkisini tersine çevirerek ilaç direncine yardımcı olduğunu göstermiştir (Wang, B. ve

ark., 2010). Gelecekteki çalışmalarda, bu yaklaşımın doksorubisin direncini tersine çevirmek veya doksorubisinle beraber bir kombinasyon tedavisini test etmek için değerlendirilmesinin terapötik potansiyeli mevcuttur.

TN-C adezyon değiştirici bir moleküldür ve etkilerini integrinler, sindekan-4 MMP'lerin de dahil olduğu çeşitli moleküller aracılığıyla göstermektedir (Iyoda ve ark., 2020). TN-C ekspresyonunun özellikle meme kanserinde akciğer metastazı olmak üzere metastaz ile pozitif korelasyonunu gösteren birçok çalışma vardır (Oskarsson ve ark., 2011; Sun, Z. ve ark., 2019). Metastaz, kanserde malignitenin ayırt edici özelliklerinden biridir. Metastazın hücrelerin bağlı olduğu stratumdan ayrılması, göç, tümör stromasının invazyonu, damarlara giriş ve dolaşımında hayatta kalma, ekstrasvazasyon ve yeni metastatik nişte hayatta kalmayı içeren oldukça karmaşık bir süreçtir. Bu karmaşık adımları gerçekleştirmek için tümör ve mikroçevresi arasında yakın bir etkileşim vardır. Parafine gömülü insan meme duktal karsinomu numuneleri üzerinde yürütülen bir çalışmada, TN-C ekspresyonu, tümör evresi, lenf nodu metastazı ve tümör nodu metastazı ile pozitif olarak ilişkilendirilmiştir (Yang, Z. ve ark., 2017). Bir akciğer adenokarsinomu çalışmasında, farelerden toplanan metastatik numunelerin TN-C ekspresyonunu arttırdığı, buna karşın normal akciğer dokusunun molekül ekspresyonunun çok düşük olduğu gösterilmiştir (Parekh ve ark., 2005). MDA-MB-231 hücrelerinde TN-C ekspresyonunun RNA interferans aracılığıyla azaltıldığı çalışmada ise TN-C susturulmasının hem göçü azalttığı hem de adezyonu artırdığı da gösterilmiştir (Wawrzyniak ve ark., 2020).

Bu tez çalışmasında da TN-C ekspresyonun transfeksiyon sonrası 8. günde azaltılmasının MDA-MB-231 hücrelerinin göç ve invaziv kapasitesini anlamlı derece azalttığını gösterilmiştir. Bu çalışmadaki göç deneyi literatürde sıklıkla kullanılan yara iyileşme assayı ile yapılmıştır. İnvazyon deneyi ise jelatin kaplanmış transwell assayı ile hücrelerin kemotaktik gradientde matriksten geçiş kapasiteleri çalışılmıştır. Hücrelerin göç hızı scrambled kontrol plazmidi ile transfekte hücrelere nazaran 1,4 kat azalmıştır. Özellikle invazyon assayı sonuçlarına bakıldığında ise invaziv hücre sayısında 3,7 kat bir düşüş görülmektedir.

Göç ve invazyon deneylerinin sonuçları birbirlerine paralel ama inhibisyon miktarında farklılık görülmektedir. Sonuçlara bakıldığında, TN-C susturulmasının göç üzerinde önemli ama daha düşük bir etkisi olduğu görülmektedir. İnvazyon assayinde ise bu etki

çok daha dramatik boyuttadır. Hücre göçü normal fizyolojinin bir parçası olduğu için, TN-C'ye ek olarak diğer proteinlerin de TN-C benzeri etkisi vardır. Bu yüzden de TN-C susturulmasının göç üzerindeki etkisini kompanse edebilecek diğer mekanizmalar bulunabilir. Ayrıca bu farkın sebepleri arasında, göç assayinde hücrelerin bariyer olmadan hareket etmesinin daha kolay olması ve TN-C'nin invazyonda aktin hücre iskeleti dışında invazyon işleminde yer alan diğer molekülleri de etkilemesi olabilir. Yani TN-C, hücre invazyonunun sadece kadherinleri etkileyerek değil matriks yıkımını gerçekleştiren MMP leride doğrudan etkileyerek desteklemektedir (Wawrzyniak ve ark., 2020). Böylece, TN-C ekspresyonunun azalması invazyonda çoklu basamaklarda etki ettiği için (hücre adezyonu, maktriks yıkımı, kadherin değişimi vb.), invazyona etkisi daha büyük olması bu çalışmada da görüldüğü gibi beklenmektedir. 3 insan pankreatik kanseri hücre hattıyla yapılan bir çalışmada bu tez çalışmasında görülen göç ve invazyon farkını destekler veriler bulmuştur (Cai, J. ve ark., 2017). O araştırmada siRNA aracılığı ile TN-C ekspresyonu azaltılmıştır ve bunun sonucundaki TN-C susturulmasının invazyonu (matrijel maktriksinden geçiş) göçten daha çok etkilediği görülmüştür.

Özet olarak, lipofektamin aracılı TN-C CRISPR/Cas9 plazmidleri ile transfeksiyon, insan ÜNМК meme hattı hücrelerinde TN-C ekspresyonunu başarıyla azaltmıştır. Azalan TN-C ekspresyonu ise hücre popülasyonunda apoptozun arttığı ve buna karşın göç, invazyon ve proliferasyonun azaldığı bulunmuştur. Böylece, TN-C ekspresyonunu azaltmak ÜNМК'nin habis (malign) özelliklerini negatif yönde etkilemiş ve bu yaklaşımın terapötik potansiyelini göstermiştir.

CRISPR/Cas9 ile etkin TN-C susturması ve tümör karşıtı etkileri gösterildikten sonra, bu sistemi *in vivo* uygulamada güvenli ve etkin şekilde taşıyabilmesi için kitozan-oksitosin vektörü formüle edilmiştir.

Klinik ve klinik deneylerdeki çoğu gen tedavi yaklaşımları yüksek etkinliğinden dolayı viral vektörleri kullanmaktadır. Özellikle AAV-2 ve diğer AAV serotipleri sıklıkla kullanılan viral vektörlerdir. Bu vektörlerin transduksiyon başarısı en önemli avantajları olurken, genotoksisite riski, mutajenite potansiyeli ve yüksek üretim maliyetleriyle yaygın kullanılmalarını önleyen önemli faktörlerdir. Örneğin, 2019 yılında spinal müsküler atrofi (SMA) gen tedavisi için onay alan AAV9-bazlı Zolgensma (onasemnogene abeparvovec-xioi)'nın dünyanın en pahalı ilacı

konumundadır (yaklaşık 2.125 milyon dolar), ve bu yüksek maliyet SMA'lı bireylerin tedaviye ulaşması önünde büyük bir engeldir. Ayrıca özellikle CRISPR/Cas9 bazlı gen terapilerinde AAV vektörünün küçük genomundan dolayı (yaklaşık 4.7 kb) güçlü promotörlerin kullanabilmek için yeterli yer yoktur ve genellikle iki AAV vektörü kullanılması gerekmektedir (Yang, Y. ve ark., 2016). Bu dezavantajlar göz önünde bulundurulduğunda, viral olmayan vektörlerle nükleik asit taşınabilmesi için formülasyonlar geliştirilmesinin önemi ortaya çıkmaktadır. Viral olmayan vektörler arasında lipozomlar ve lipid nanopartikülleri gibi lipid bazlı taşıyıcılar etkili vektörler olmalarına rağmen, bu çalışmada kullanılan kitozana kıyasla daha maliyetli ve daha yüksek toksik etkiye sahiptir (Lv ve ark., 2006). Dolayısıyla, özellikle CRISPR/Cas9 bazlı in vivo gen tedavilerin kliniğe geçebilmesi için bu çalışmada kullanılan kitozan gibi biyoyumlu, ucuz ve güvenli vektör ajanları ile yapılan araştırmalara ihtiyaç vardır.

Formüle edilen taşıyıcı sistem bir polimer-peptid konjüгатı olup, tiyollenen kitozana PEG aracılığıyla oksitosin peptidi bağlanarak elde edilmiştir. Kitozan, farklı ortalama moleküler ağırlıklara ve deasetilasyon derecesine sahip olacak şekilde ince ayarlanabilen esnek bir yapıya sahiptir. Yüksek deasetilasyon derecesi kitozana, daha yüksek yük yoğunluğu verir. Böylece, kitozan nükleik asitlerle ve hücre membranı ile daha kolay elektrostatik etkileşime girer ve daha yüksek endozomal tamponlama yapabilir (Huang, M. ve ark., 2005). Farklı deasetilasyon derecelerindeki kitozanla siRNA arasında kompleks oluşturarak, transfeksiyon etkinliğini inceleyen bir çalışmada da en yüksek transfeksiyon etkinliği yüksek deasetilasyon seviyesindeki kitozanla bulunmuştur (Alameh ve ark., 2018). Bu çalışmada bazı amin gruplar oksitosinle bağ kurmak için kullanıldığından, plazmid DNA ile kompleks oluşturacak amin grupların da kalması önemlidir. Bundan dolayı amin grupların daha çok olduğu yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitozan kullanılması tercih edilmiştir. Böylece bu çalışmada %75-85 deasetilasyon derecesine sahip kitozan kullanılmıştır.

Kitozanın ortalama moleküler ağırlığı da oluşan nanopleksin özelliklerini etkileyen faktörler arasındadır. Yüksek moleküler ağırlıklı kitozan nükleik asitlerle stabil bir polipeks oluşturmasına rağmen düşük çözünürlüklerinden dolayı zayıf kolloidal stabiliteye sahiptir (Patil ve ark., 2016). Yüksek N:P oranlarında ayrıca viskoziteye neden oldukları için in vivo gen terapisi için gerekli miktarlarda uygulanmaya uygun

değildirler. CRISPR/Cas9 plazmidleri de negatif yüklerinin yüksek olmasından dolayı nanopleks oluşumu için yüksek N:P oranına yani yüksek taşıyıcı miktarına ihtiyaç vardır. Bu yüzden de çalışmada düşük moleküler ağırlıklı (50-190 kDA) kitozan kullanılmıştır.

Kitozana PEG aracılığıyla oksitosin bağlanması için ilk adımda kitozana -SH grubu Traut ajanı aracılığıyla eklenmiştir. Ellman ajanı ile tayin edilen kitozan tiyollenme miktarı literatürde aynı yöntem kullanılarak elde edilen tiyolleme miktarlarına (yaklaşık 160 μ moles/gram) ile uyumluluk göstermektedir (Bae, I.-H. ve ark., 2011). Daha yüksek tiyollenme oluşabilecek disülfid bağlardan dolayı jelleşmeye neden olabileceği görüldüğünden, tiyollenme miktarı daha da yükseltilmemiştir. Ayrıca, yukarıda da belirtildiği gibi kitozanda oksitosinlenmemiş protone amin grubu bulunması da nükleik asitle elektrostatik etkileşime gitmesi için önemlidir, o yüzden de tiyolleme miktarı artırılmamıştır.

Taşıyıcı sistemin hazırlanması için ilk olarak NHS-PEG-Mal ve oksitosin arasında NHS-amin grupları aracılığıyla bağlanma gerçekleştirilmiştir. İlk basamakta bu bağlanmanın gerçekleştirilmesinin sebebi NHS'nin hızlıca hidrolize olmasıdır ve hidroliz gerçekleşmeden bu reaksiyonun yapılması gerektiğindendir. PEG heterobifonksiyonel bağlayıcı oksitosin eklenmesi FTIR analizi ile kontrol edilmiştir. Bu analizde, PEG'e oksitosin eklenmesi, bağlayıcının yapısında bulunmayan fakat oksitosinde bulunan OH gruplarının temsil edildiği 3300-3500 cm^{-1} bandının konjugasyondan sonra genişlemesi ile gösterilmiştir. Daha sonra oksitosin eklenmiş PEG'in maleimid-tiyol reaksiyonu ile kitozana eklenmesi Ellman ajanı ile yapılan serbest tiyol testinin negatif olması ile dolaylı yoldan gösterilmiştir. Ayrıca, tiyollenmiş kitozan ve kitozan-oksitosinin FTIR spektralleri incelendiğinde tiyollenmiş kitozanda bulunmayan sekonder amide ait 1700 cm^{-1} bandı, kitozan-oksitosin preparatında oksitosindeki peptid bağlarından dolayı ortaya çıkmıştır. Oksitosinin kompleks bir tersiyer yapısının olmaması ve stabil olduğu pH'ın kitozanın çözünür olduğu pH'a benzer olması bu konjugasyonun oksitosin yapısını değiştirmeden yapılmasını sağlamıştır.

Gen terapisi vektörlerinin fizyokimyasal özellikleri transfeksiyon etkinliğini doğrudan etkilemektedir. Özellikle partikül boyutu ve zeta potansiyeli kolloidal stabiliteyi, farmakokinetiği ve hücre ile etkileşimini etkileyen en önemli faktörler arasındadır

(Alameh ve ark., 2018). Nanopleksler etkin bir transfeksiyon için hücre membranına bağlanmalı, hücreye alınmalı, endozomal kaçışı gerçekleşip kargoyu sitoplazmaya taşınmalıdır. Bu araştırmada plazmid kullanıldığı için ayrıca plazmid DNA hücre çekirdeğine girip, transkripte edilmelidir. Bu proseslerin ilk adımı olan membrana bağlanıp hücreye girişte, partikül büyüklüğünü önemli bir etkisi vardır. Yapılan araştırmalar arasında etkin partikül boyutu farklılık göstermesi ile transfeksiyon etkinliği için ideal boyutun taşıyıcı sistem, kargo ve hücre tipi gibi faktörlere bağlı olduğu öne çıkmıştır (Zu ve Gao, 2021). Küçük nanopartiküller genelde hücreye daha kolay girebilirken, plazma yarı ömürleri renal kliransdan dolayı çok daha düşüktür (Zu ve Gao, 2021). Küçük partikül boyutundaki taşıyıcılar, klatrin-aracılı endositoz ile hücreye kolayca giriş yapabilmektedir. Bu tür endositoz için 200 nm'ye kadar etkin ve kolay hücre girişi mümkündür. Kitozan bazlı moleküllerin hücreye giriş şekillerinin genelde klatrin aracılı endositoz ve makropinositoz olduğu literatürde belirtilmektedir (Manzanares ve Ceña, 2020). Klatrin aracılı giriş için üst limitin 500 nm'ye kadar olduğunu belirten yayınlar da vardır ve 200 nm den büyük kitozan bazlı nanopartiküllerin de klatrin aracılı endositoz ile hücreye etkili şekilde girebileceği gösterilmiştir (Decuzzi ve Ferrari, 2008; Jiang ve ark., 2017). Bu çalışmada ortalama nanopleks büyüklüğü 290nm olup, kitozan-oksitosin taşıyıcı sisteminin plazmidle kondense olarak bir kompleks oluşturulduğu gösterilmiştir.

Taşıyıcı sistem-nükleik asit oranı da (N:P) hem kompleksasyon başarısını hem de oluşan sistemin fizyokimyasal özelliklerini etkiler. Bizim araştırmamızda N:P oranı (ağırlık/ağırlık) 10:1'den itibaren tam kompleksasyon gerçekleştiği agaroz jelde, plazmid DNA'nın pozitif yüklü anota doğru kompleks halinde olduğu için yürüyemeyip, kuyucukda kalmasıyla görülmüştür. Fakat N:P= 100:1 ile pozitif zeta potansiyeline ulaşıldığı için in vitro çalışmalarda bu oran kullanılmıştır. Amin grupları nitrojenden zengin tetrazol ile değiştirilen kitozan taşıyıcı sistemle yapılan CRISPR/Cas9 çalışmasında da en yüksek transfeksiyon etkinliği, N:P= 100:1 de bulunmuştur (Rabiee ve ark., 2022). Taşıyıcı ve nükleik asit kompleksinin bu çalışmadaki gibi elektrostatik etkileşim ile oluştuğu durumlarda ortam pH'sı da önemli faktörler arasındadır. pKa'si 6.2 olan kitozan, bu değerden daha düşük pH'larda amin grupları protone haldedir. Amin gruplarında maksimum protonasyonu sağlamak için taşıyıcı sistemin %1 asetik asitte (pH yaklaşık 3.2) çözülerek, plazmid DNA ile

kompleks oluşturacak şekilde formüle edilmiştir. TMÇ de hipoksik ortamından dolayı asidik bir yapıya sahiptir, bu yüzden intratümöral enjeksiyon yolu için bu formülasyon hem kolloid stabilite hem de biyouyumluluk açısından uygundur (Li, Y. ve ark., 2021). Nanoplekslerin yüzey özellikleri de biyolojik ortamdaki etkileşim ve hareketlerini belirler. Özellikle çözünürlük, agregasyon yatkınlığı, stabilite, biyolojik bariyerleri geçebilme, toksisite ve biyodağılımda önemli rol oynar (Gagliardi ve ark., 2021). %1 asetik asitte çözülen taşıyıcı sistemle oluşturulan 100:1, N:P oranındaki nanopleksin zeta potansiyeli ise $+11.3\text{mV} \pm 2.10$ ve böylece katyonik bir nanopleks oluşturulmuştur. Oluşan nanopleksin zeta potansiyeli ise nanopleksin diğer yüklü hücrel ve plazma molekülleriyle etkileşimi için önemlidir. Katyonik nanopleksler genelde negatif yüklü hücre membranından daha kolay giriş yaparlar. Ayrıca, hücre içine alınma şekilleri sıklıkla klatrin-aracılıdır (Manzanares ve Ceña, 2020). Fakat pozitif yüklü nanoplekslerin daha kısa dolaşım yarı ömrü vardır ve negatif yüklü plazma proteinlerine bağlanma oranları ve oluşan protein koronası daha fazladır (Tekie ve ark., 2020). Protein koronası nanotaşıyıcıların, albümin ve fibrinojen gibi proteinlerle elektrostatik etkileşimle çevrilmesi ile oluşur. Çoğu zaman bu biyomoleküllerin opsonin etkisi yaparak karaciğerde birikme ve retiküloendotelyal sistemdeki makrofajlar tarafından eleme edilmesini hızlandırır (Gagliardi ve ark., 2021). Biyodağılım sonrası bizim çalışmamızda intratümöral uygulama seçildiğinden, katyonik yapının dezavantajlarından çok avantajları ön plana çıkmaktadır.

Plazma yarı ömrü uzatmak için en sık başvurulmuş yöntem, nanopariküllere PEG eklenip, PEG'in sterik engelleme ile etkileşimi durdurmasını sağlamaktadır (Guțoia ve ark., 2016). Bu çalışmada temelde bağlayıcı olarak kullanılıp, düşük moleküler ağırlıkta kullanılmıştır. Gelecek çalışmalarda PEG linker büyüklüğünü, daha önceki çalışmalarda transfeksiyon için ideal uzunluğu veren 2-5kDA ile formüle edip, sterik engellemeyle bu korona oluşumu riski azaltılabilecektir.

Nanoplekslerin yüzey morfolojisinin transfeksiyon etkinliği ve fizyolojik etkileşimleri üzerindeki etkisi tam olarak kesinleşmemiştir. Bazı taşıyıcı sistemler küre (sferik) şeklinde olurken, bazıları uzun çubuk şeklinde ya da eliptik olabilmektedir. Oluşan nanopleksin yüzey morfolojisini görebilmek için çalışmamızda SEM kullanılmıştır. Saf kitozanın SEM görüntülenmesi düz, kubbe gibi boşlukları olan ve mikrofibril ve kristalit yapıları olan şekiller verdiği bilinmektedir (Kumar ve Koh, 2012). 100:1

oranında yapılan nanopleks de SEM ile görüntülendiğinde hem daha önce tanımlanan kitozana ait görüntüler görülmüş hem de sferik yapıdaki nanopleksler görüntülenmiştir. Sferik nanopartiküllerin yüzey alanı:hacim oranları yüksek olması ve simetrisinden dolayı hücre membranıyla belli bir oryantasyonda etkileşime girme zorunluluğu olmadığından genelde istenilen bir nanopartikül şeklidir (Gagliardi ve ark., 2021).

Oluşturulan nanoplekslerin, CRISPR/Cas9 plazmidlerini nükleazdan ve serumda bulunan enzimlerden koruma etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda, 100:1 N:P oranında oluşturulan kompleksin plazmidi DNaz 1 tarafından yıkımdan 24 saate kadar tamamen koruduğu görülmüştür. Plazmidin kullanılan DNaz 1 konsantrasyonunda hemen yok edildiği göz önünde bulundurulduğunda, bu koruma etkisi taşıyıcı sistemin hem hücre içinde hem de dolaşımda plazmidi koruyabileceği gösterilmiştir. Yapılan serum stabilitesi çalışmasında ise kompleksin plazmidi serumun etkisinden 48 saate kadar koruduğu görülmüştür. Bu veriler ışığında taşıyıcı sistemin plazmidi enzimler tarafından oluşturulan fizyolojik bariyerlerden koruduğu gösterilmiştir.

Gen terapisi için formüle edilen nanopleksin düşük ya da hiçbir toksik etkiye sahip olmaması uygulanabilirliği için büyük önem arz etmektedir. Kitozanın PEI gibi bazı diğer katyonik polimerlere nazaran en büyük avantajlarından biri toksik etkisinin çok düşük ya da olmamasıdır. Bizim çalışmamızda da 100:1 N:P oranı kullanılarak yapılan MTT aracılı sitotoksikite testinde, transfeke edilmemiş hücrelerle, nanopleksle muamele edilmiş hücrelerin canlılığı arasında bir fark görülmemiştir. Böylece nanoplekslerin, sitotoksik bir etkiye sahip olmadığı gözlemlenmiştir.

Formüle edilen taşıyıcı sistemin karakterizasyonu yapıldıktan sonra ve CRISPR/Cas9 plazmidi ile oluşturduğu nanoplekslerin transfeksiyon için istenilen özelliklere sahip olduğu tespit edilince, nanoplekslere in vitro transfeksiyon çalışması yapılmıştır. CRISPR/Cas9 sisteminin yaygın kullanımı ve özellikle de terapötik in vivo uygulamaları önündeki bariyerlerden biri bu CRISPR/Cas9 plazmidleri büyüklüğü (8-10 kb) ve yüksek negatif yükünden dolayı transfeksiyonu zor plazmidler olmasıdır. Aynı zamanda, hızlı çoğalan MDA-MB-231 hücre hattı da transfeksiyon yapılması güç olan hücrelerdendir. Hücrelerin hızlı çoğalması (ikilenme zamanı 38 saat) dolayısıyla mitotik stabilitesi olmayan plazmidler mitozla hızlı bir şekilde dilüe olmaktadır. Bu yüzden plazmidlerin etkin bir şekilde ve yeterli miktarda hücrelere taşınması bu tedavi

yaklaşımının başarısında kilit adımlardandır. Literatürdeki benzer taşıyıcı sistem çalışmaları çoğunlukla transfeksiyonu kolay insan embriyonik böbrek hücrelerinde, HEK 293T’de yapılmaktadır (Rabiee ve ark., 2022). Bizim çalışmamız insan meme kanseri hücre hattı kullanarak, sistemin kanser gen terapisi için etkinliğini doğrudan göstermiştir. Bu nedenle formüle edilen taşıyıcı sistemin bu zor transfekte edilen hücre hattını, transfeksiyonu zor CRISPR/Cas9 plazmidler ile etkin bir şekilde transfekte edebilmiş olması önemli bir adımdır. Oksitosin eklenmemiş kitozanla oluşturulan nanoplekslerle hiç transfeksiyon görülmemesi, kitozana oksitosin aracılığıyla yapılan modifikasyonun önemini göstermektedir. Bu transfeksiyon etkinliği, reseptör aracılı endositoz mekanizması aracılığıyla olması olasıdır.

Oksitosin reseptörü eksprese eden MCF-7 hücrelerinde de hazırlanan nanoplekslerle transfeksiyon gerçekleşmiştir. Transfeksiyondan 24 saat sonra MCF-7 hücrelerinde GFP ışması genel olarak daha fazla gözlemlenmiştir. Bunun sebebi hem bu hücrelerdeki oksitosin reseptörü ekspresyonunu daha fazla olması hem de bu hücrelerin genel olarak transfeksiyona daha açık olması olabilir. Sonuç olarak, bu yolla nanoplekslerin birden fazla hücre tipini transfekte edebileceği de gösterilmiştir. MCF-7 hücreleri TN-C eksprese etmediği için bu tezdeki diğer çalışmalarda kullanılmamıştır.

Hazırlanan nanopleksler farelerde oluşturulan insan meme kanseri modelinde in vivo test edileceği için ve literatürde in vivo deneylerde enjeksiyonların genelde 4 günde bir yapılmasından dolayı, in vitro transfeksiyondan 4 gün sonra TN-C mRNA seviyeleri analiz edilmiştir. Nanopleksle yapılan ÜNMK hücre hattındaki transfeksiyondan 4 gün sonra TN-C mRNA seviyesini kontrole göre %30 azalttığını görülmüştür. Bu veriler, GFP ışması verileri ile birlikte nanopleksin CRISPR/Cas9 plazmidlerini MDA-MB-231 hücrelerine başarıyla taşıdığını gösteren bir diğer veridir. Aynı zamanda, taşınan CRISPR/Cas9’un nanopleksten ayrılarak fonksiyonel olduğunu da göstermektedir. Lipofektamin ile yapılan transfeksiyonlarda 3. günde susturma oranı %40 olsa da in vivo deneylerde tekrarlı doz uygulaması ile nanoplekslerle genom düzenlenmesi etkisi artırılmış olmaktadır.

Taşıyıcı sistemle yapılan in vivo biyodağılım çalışmasında, taşıyıcı sistemin intravenöz uygulama sonrasında en çok karaciğere ve ikincil olarak dalak ve akciğerde toplandığı görülmüştür. Bu dağılım sadece kitozan nanopartikülleri ile yapılan bir

çalışmadaki sonuçlarla uyumludur ve aynı çalışma nanoplekslerin boyutlarının biyodağılım için kilit faktör olduğunu da göstermiştir (Lee, S. Y. ve ark., 2016; Sonin ve ark., 2020).

Bu tez çalışmasında oksitosini tümörün aktif hedeflendirilmesi için kullanmak amaçlanmıştır. Buna benzer bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Biyodağılım verileri ışığında, oksitosinin tümör hücrelerini intravenöz yoldan aktif hedeflendirmede yeterli olmadığı görülmüştür. Oksitosin konjugatının tümörü aktif hedeflememeye yeterli olmamasının sebebi, hücre hattında yeterince oksitosin reseptörü ekspresse edilmemesinden dolayı olma imkânı vardır. MDA-MB-231 hücrelerinde yapılan OTR RT-PCR'ında Ct (döngü eşiği) değerlerinin yüksek olması (30. döngü) oksitosin reseptörü ekspresyonun yüksek olmadığını göstermektedir. Gelecek çalışmalarda, oksitosin reseptör ekspresyonu daha yüksek olduğu gösterilen meme kanseri hücre hatlarında, örneğin MDA-MB-361, bu sistemin test edilmesi hem transfeksiyon etkinliğini hem de hedefleme etkinliğini artırabilme potansiyeline sahiptir (Ito ve ark., 1996).

Oksitosin yapısal olarak ozmoregülasyonda rol alan vazopresin hormonuna çok benzer olduğundan (sadece iki amino asit farkı), kitozan-oksitosin taşıyıcı sistem insanda kullanıldığında, vücuttaki vazopresin reseptörlerine bağlanma riski vardır. Fakat oksitosin yerine oksitosin reseptörüne yüksek özgüllüğü olan oksitosin analoglarının kullanılması bu sorunu olası insan uygulamaları için çözebilecektir. Örneğin, oksitosinin yapısında 7. pozisyonda bulunan glisin sarkosinle değiştirilmesiyle ortaya çıkan oksitosin agonistinin OTR spesifitesini artırdığı gösterilmiştir (Wiśniewski, 2019).

Yeni çıkan bir araştırma ise tümörün yanındaki meme dokusundaki OTR ekspresyonunun ÜNМК hastalarında kötü prognozla ilişkisi göstermiştir (Liu ve ark., 2020). MDA-MB-231 hücreleri ile yapılan in vitro deneylerde ise OTR ekspresyonunun çoğaltılmasının hücre göçü ve metastazı oksitosinden bağımsız şekilde artırdığı ortaya çıkmıştır (Liu ve Muttenthaler, 2022). Görülen bu etkinin, OTR sinyal yolağının EGF'ye olan hassasiyetini artırmakla gerçekleştiği bulunmuştur. Bu veriler ışığında, formüle edilen kitozan-oksitosin taşıyıcı sistemin, özellikle OTR yüksek ekspresyonu gösteren, yani prognozu daha kötü ÜNМК hastalarında daha etkili olma olasılığını ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca, TN-C'nin hem stroma hem de

meme kanseri hücreleri tarafından üretildiği göz önünde bulundurulursa, her iki yapının da hedeflendirilmesi etki açısından önemli olabilmektedir. Tümör etrafındaki dokuda da OTR ekspresyonunun arttığını gösterilmesi ile oksitosinli taşıyıcı sistemin hem TMC’de hem de meme kanseri hücrelerinde TN-C’yi susturmada etkili olabilme potansiyeli vardır.

Intravenöz uygulamada oksitosin ile aktif hedeflendirme yüksek başarı göstermiş olmasa da yine de kullanılan sistemle doku hedeflendirme yapabilme olasılığı gözlemlenmiştir. Taşıyıcı sistemin boyutu ve yükünden dolayı, karaciğer ve dalaktaki makrofajlar tarafından fagosite edilmesi beklenen bir sonuçtur. Taşıyıcı sistemin akciğerde birikmesinin mikrovaskülatürden geçişte partiküllerin yavaşlaması, geçici agregasyon sonucu partiküllerin geçiş süresinin uzaması ve alveolar makrofajlar tarafından fagosite edilmesinden dolayı olabileceği önceki araştırmalarda gösterilmiştir (Lee, S. Y. ve ark., 2016; Sonin ve ark., 2020). Böylelikle akciğerde birikme büyük ihtimal oksitosin peptidinden dolayı değil de, nanopleksin fizyokimyasal özelliklerinden dolayı gerçekleşmiştir. TN-C’nin akciğer metastazındaki büyük önemi göz önüne bulduğunda, nanoplekslerin meme kanserinde akciğer metastazını hedeflemek için denenebileceğini göstermektedir.

Floresan kardiyogreen boyası ile kompleks oluşturmuş taşıyıcı sistem intratümöral yoldan uygulandığında ise, uygulamadan 16 saat sonra taşıyıcı sistemin tümörde bulunduğu görülmüştür. Dalakta görülen az da olsa ışıma, taşıyıcı sistemi fagosite eden makrofajların dalağa gitmesinden veya dolaşıma karışan bir miktar taşıyıcı sistemden dolayı olabilir. Taşıyıcı sistemin büyük çoğunluğunun tümörde kalması ise bu sistemin intratümöral uygulamaya uygun olduğunu göstermiştir.

Nanopleksle in vivo çalışmalar için atimik nude farelerde ksenograft tümör modeli seçilmiştir. Bunun nedeni ise, yukarıda belirtildiği gibi CRISPR/Cas9 sisteminin başarısında gRNA sekansı önemli bir yer oynamaktadır ve bu yüzden de in vitro çalışmalarla aynı gRNA kullanılması tercih edilmiştir. İnsan meme kanseri hücre hattı ile meme kanseri modeli oluşturulduğu için de sonuçların insanlardaki etkileri daha iyi modelleyebileceği de düşünülmüştür.

Oluşturulan deneysel meme kanseri modelinin histopatolojik analizinde ise tümörlerin modifiye Bloom Richardson skorunun dediferensiye tümörleri gösteren derece 3 olduğu görülmüştür. Bu skora, meme kanseri dokusundaki tübül sayısı

(farklılaşmayı gösteren), mitotik indeks ve hücre çekirdeğindeki boyut farklılığı skorlanarak yapılır. Böylece oluşturulan meme kanseri modeli yüksek mitotik indeksli, yüksek nükleer polimorfizm gösteren ve başkalaşımın azaldığı agresif bir ÜNМК meme kanseri modelidir.

İn vivo insan meme kanseri modelinde, ilk enjeksiyondan sonra tüm gruplarda tümör çapında düşüş olmuştur. Bunun nedeni, enjeksiyonun yarattığı stres olabilmekle birlikte, enjeksiyonla deri bariyerinin geçirmesinden dolayı gelişen enflamatuvar yanıtla doğal bağışıklık sistemi hücrelerinin bölgeye çekilmesi olabilir. Buna karşın ikinci enjeksiyonla beraber farklı hızlarda olsa da 3 kontrol grubunda da (SF, yalnız taşıyıcı sistem ve scrambled CRISPR/Cas9 nanopleks grupları) tümör çağı artmaya başlamıştır. Sadece taşıyıcı sistem ve SF verilen fareler arasındaki tümör çapı farkı, kitozanın sahip olduğu antiproliferatif etkiden ve/veya oksitosin-OTR bağlanmasının anti proliferatif etkisinden olabilir. Literatürde hem kitozanın hem de oksitosinin MDA-MB-231 hücreleri üzerinde proliferasyon baskılayıcı etki gösterdiğine dair çalışmalar vardır (Cassoni ve ark., 1997; Taher ve ark., 2019).

Serum fizyolojik grubuna kıyasla scrambled CRISPR/Cas 9 plazmidleri taşıyan nanoplekslerin de özellikle erken dönemde tümör büyümesini azalttığı görülmüştür. Bu verilen in vitro deneylerde transfeksiyon sonrası erken dönemde (48 saat) scrambled grubunda da görülen artan apoptoz verileri ile uyumludur. Yukarıda belirtildiği gibi görülen bu etki transfeksiyon stresinden, GFP ekspresyonundan ve/veya scrambled CRISPR/Cas9 un hedef dışı etkilerinden olabilir. CRISPR/Cas9 sistemi için kullanılan scrambled sistemi, siRNA gibi uygulamalardakiler kadar spesifik olmama riskine sahiptir. Bunun nedeni ise genom dizilerinin mRNA'dan çok daha fazla ve çeşitli olmasından dolayı tam olmayan eşleşme aracılı hedef-dışı etki riskinin daha yüksek olmasıdır. Literatürde CRISPR/Cas9 sisteminin doğrudan uygulandığı kısıtlı sayıdaki prelinik kanser tedavisi çalışmalarına da genelde SF veya boş vektörle kontrol yapılmaktadır.

Kitozan-oksitosen ve TN-C CRISPR/Cas9 plazmidinden oluşan nanopleks tümör büyümesini durdurmuş ve tümörün %42 oranında küçülmesine neden olmuştur. In vitro proliferasyon verilerine bakıldığında, 8. günde hücre proliferasyonu %32 azaldığı görülmektedir. In vivo sistemdeki daha yüksek orandaki tümör küçülmesi hem tekrarlı uygulamalara hem de tümörün fizyolojik bir ortamda olması ile TN-C susturulmasının

çoklu etkisi olmasından dolayı olabilmektedir. Tümör dokularında TN-C susturulmasının doğrudan gösterilmesi de bu verileri güçlendirecektir.

TN-C CRISPR/Cas9 plazmidi taşıyan nanoplekslerde görülen terapötik etkinlik ayrıca taşıyıcı sistemin in vivo ortamda da pCRISPR/Cas9'u başarıyla taşıdığını da göstermektedir.

Nude atimik farelerde subkutan enjeksiyonla oluşturulan ksenograft kanser modellerinde genelde metastaz görülememektedir (Xie ve ark., 1992). SCID farelerde ise ksenograft modellerde metastaz oluşumu daha sıktır. Bunun sebeplerinden bir tanesi SCID farelerin tersine bu farelerde B hücrelerinin bulunması ve IgM antikorlarının varlığı olabilir. Nude farelerdeki B hücreleri T bağımlı olmayan antijenlere yanıt verebilirler ve metastaz için primer bölgeden ayrılan tümör hücrelerinin bağışıklık yanıtı ile temizlenmesi sağlanabilir. Bu çalışmada nude farelerde oluşturulan in vivo modelimizde, ÜNMK'nin en çok metastaz yaptı organ olan akciğerde makroskobik metastaz odaklarına rastlanmamıştır. Doku analizi ile görülemeyen metastazlar için analiz yapılması gerekmektedir. Bu yüzden de TN-C gen düzenlemesinin invazyona etkisi in vitro gösterilirken, in vivo düzeyde metastaza etkisi tayin edilememiştir. TN-C'nin özellikle akciğer metastazına katkısı göz önüne bulundurulduğunda, gelecek çalışmalarda, SCID farelerde ksenograft oluşturularak, bu sistem test edilebilir(Richert ve ark., 2005).

Özet olarak bu tez çalışmasında bilimsel literatürde var olmayan bir oksitosin-kitozan konjugatı ilk defa formüle edilmiştir. Bu formülasyon ise hem in vitro hem de in vivo deneylerde CRISPR/Cas9 sistemi ile başarılı bir transfeksiyon sağlamıştır. CRISPR/Cas9 sistemi ile TN-C ekspresyonunun azaltılmasının in vitro ortamda ÜNMK hücre hattında apoptozu artırdığı ve proliferasyon, göç ve invaziv özellikleri azalttığı gösterilmiştir. In vivo deneylerde ise, formülasyonun tümörün aktif hedeflendirmesi için yeterli olmadığını fakat intratümöral uygulamada TN-C'ye özgül CRISPR/Cas9 plazmidleri ile oluşturulan nanoplekslerin tümör büyümesini azalttığı gösterilmiştir. Böylece, özgün bir formülasyonla TN-C CRISPR/Cas9 bazlı kanser gen terapilerinin geliştirilmesine katkıda bulunulmuştur ve ilerideki benzer çalışmalara yol gösterecek veriler toplanmıştır.

Gelecek çalışmalarda bu sistemin terapötik etkinliği kombine tedavilerle artırılabilir. Özellikle ÜNMK'da kullanılan PARP inhibitörleri, tümöre doğrudan etkilerinin yanı

sıra CRISPR/Cas9'un da etkinliği artırabilir. Olaparib gibi PARP inhibitörleri hücreleri hataya açık DNA hasarı onarımına (NHEJ'e) yönlendirerek hücrede ölümcül mutasyonlar yaratarak etkisini gösterir (Patel ve ark., 2011). CRISPR/Cas9 temelli susturma çalışmaları da NHEJ tarafından DNA onarımı sırasında yapılan hatalara bağlı olduğundan, PARP inhibitörlerinin CRISPR/Cas9 tabanlı terapilerle birleştirilmesinin susturma etkinliğini artırması olasıdır. Böylelikle, bu kombine tedavi ile ÜNМК'de sinerjistik bir anti-tümör etki yaratılabilir.



8. KAYNAKLAR

Adams M, Jones JL, Walker RA, Pringle JH, Bell SC. Changes in tenascin-C isoform expression in invasive and preinvasive breast disease. *Cancer Res.* 2002;62:3289–97.

Alameh M, Lavertu M, Tran-Khanh N, Chang C-Y, Lesage F, Bail M, Darras V, Chevrier A, Buschmann MD. siRNA delivery with chitosan: influence of chitosan molecular weight, degree of deacetylation, and amine to phosphate ratio on in vitro silencing efficiency, hemocompatibility, biodistribution, and in vivo efficacy. *Biomacromolecules.* 2018;19:112–31.

Allaoui R, Bergenfelz C, Mohlin S, Hagerling C, Salari K, Werb Z, Anderson RL, Ethier SP, Jirstrom K, Pahlman S, Bexell D, Tahin B, Johansson ME, Larsson C, Leandersson K. Cancer-associated fibroblast-secreted CXCL16 attracts monocytes to promote stroma activation in triple-negative breast cancers. *Nat Commun.* 2016;7:13050.

Angel I, Pilo Kerman O, Rouso-Noori L, Friedmann-Morvinski D. Tenascin C promotes cancer cell plasticity in mesenchymal glioblastoma. *Oncogene.* 2020;39:6990–7004.

Anitha A, Deepa N, Chennazhi KP, Nair SV, Tamura H, Jayakumar R. Development of mucoadhesive thiolated chitosan nanoparticles for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers.* 2011;83:66–73.

Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR. Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol.* 2020;38:824–44.

Arce-Sillas A, Álvarez-Luquín DD, Tamaya-Domínguez B, Gomez-Fuentes S, Trejo-García A, Melo-Salas M, Cárdenas G, Rodríguez-Ramírez J, Adalid-Peralta L. Regulatory T cells: molecular actions on effector cells in immune regulation. *Journal of Immunology Research.* 2016;2016:1–12.

Aubert A, Mercier-Gouy P, Aguero S, Berthier L, Liot S, Prigent L, Alcaraz LB, Verrier B, Terreux R, Moali C, Lambert E, Valcourt U. Latent TGF- β activation is a hallmark of the tenascin family. *Front Immunol.* 2021;12:613438.

Avgerinos KI, Spyrou N, Mantzoros CS, Dalamaga M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism.* 2019;92:121–35.

Bae I-H, Jang WG, Lim H-P, Park S-W, Lee K-M, Park Y-J, Park I-K, Jeong MH, Koh J-T. Morphological property and in vitro enzymatic degradation of modified chitosan as a scaffold. *Macromol Res.* 2011;19:1250–6.

Bae S, Park J, Kim J-S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics.* 2014;30:1473–5.

Bagley RG, Honma N, Weber W, Boutin P, Rouleau C, Shankara S, Kataoka S, Ishida I, Roberts BL, Teicher BA. Endosialin/TEM 1/CD248 is a pericyte marker of embryonic and tumor neovascularization. *Microvasc Res.* 2008;76:180–8.

Bareke H, Juanes-Velasco P, Landeira-Viñuela A, Hernandez A-P, Cruz JJ, Bellido L, Fonseca E, Niebla-Cárdenas A, Montalvillo E, Góngora R, Fuentes M. Autoimmune Responses in Oncology: Causes and Significance. *IJMS.* 2021;22(15):8030.

Baretta Z, Mocellin S, Goldin E, Olopade OI, Huo D. Effect of BRCA germline mutations on breast cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. *Medicine.* 2016;95(40):e4975.

BeLow M, Osipo C. Notch signaling in breast cancer: a role in drug resistance. *Cells.* 2020;9(10):E2204.

Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol.* 2005;7(4):452–64.

Bergin ART, Loi S. Triple-negative breast cancer: recent treatment advances. *F1000Res.* 2019;8:1342.

Bernkop-Schnürch A. Thiolated polymers—thiomers: synthesis and in vitro evaluation of chitosan-2-iminothiolane conjugates. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003;260(2):229–37.

Biffi G, Tuveson DA. Diversity and biology of cancer-associated fibroblasts. *Physiological Reviews*. 2021;101(1):147–76.

Bouchal P, Schubert OT, Faktor J, Capkova L, Imrichova H, Zoufalova K, Paralova V, Hrstka R, Liu Y, Ebhardt HA, Budinska E, Nenutil R, Aebersold R. Breast cancer classification based on proteotypes obtained by SWATH mass spectrometry. *Cell Rep*. 2019;28(3):832-843.e7.

Bożyk A, Wojas-Krawczyk K, Krawczyk P, Milanowski J. Tumor microenvironment—A short review of cellular and interaction diversity. *Biology*. 2022;11(6):929.

Brinkman EK, Chen T, Amendola M, van Steensel B. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(22):e168–e168.

Brösicke N, Faissner A. Role of tenascins in the ECM of gliomas. *Cell Adhes. Migr*. 2015;9(1–2):131–40.

Brufsky A, Valero V, Tiangco B, Dakhil S, Brize A, Rugo HS, Rivera R, Duenne A, Bousfoul N, Yardley DA. Second-line bevacizumab-containing therapy in patients with triple-negative breast cancer: subgroup analysis of the RIBBON-2 trial. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;133(3):1067–75.

Brufsky AM, Dickler MN. Estrogen receptor-positive breast cancer: exploiting signaling pathways implicated in endocrine resistance. *Oncologist*. 2018;23(5):528–39.

Bumgardner JD, Wiser R, Gerard PD, Bergin P, Chestnutt B, Marini M, Ramsey V, Elder SH, Gilbert JA. Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2003;14(5):423–38.

Cai H, Wang J, Xi S, Ni X, Chen Y, Yu Y, Cen Z, Yu Z, Chen F, Guo C, Zhang J, Ke C, Wang J, Chen Z. Tenascin-C mediated vasculogenic mimicry formation via regulation of MMP2/MMP9 in glioma. *Cell Death Dis.* 2019;10(12):879.

Cai J, Du S, Wang H, Xin B, Wang J, Shen W, Wei W, Guo Z, Shen X. Tenascin-C induces migration and invasion through JNK/c-Jun signalling in pancreatic cancer. *Oncotarget.* 2017;8(43):74406–22.

Cai J, Lu W, Du S, Guo Z, Wang H, Wei W, Shen X. Tenascin-C modulates cell cycle progression to enhance tumour cell proliferation through akt/foxo1 signalling in pancreatic cancer. *J Cancer.* 2018;9(23):4449–62.

Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llargo A, Espinet E, Hernando-Momblona X, Iglesias M, Sevillano M, Palomo-Ponce S, Tauriello DVF, Byrom D, Cortina C, Morral C, Barceló C, Tosi S, Riera A, Attolini CS-O, Rossell D, Sancho E, Batlle E. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2015;47(4):320–9.

Cao Y, Tan YF, Wong YS, Liew MWJ, Venkatraman S. Recent advances in chitosan-based carriers for gene delivery. *Marine Drugs.* 2019;17(6):381.

Carroll D. Genome editing: Past, present, and future. *Yale J Biol Med.* 2017;90(4):653–9.

Carter CS, Kenkel WM, MacLean EL, Wilson SR, Perkeybile AM, Yee JR, Ferris CF, Nazarloo HP, Porges SW, Davis JM, Connelly JJ, Kingsbury MA. Is oxytocin “nature’s medicine”? Dantzer R. *Pharmacol Rev.* 2020;72(4):829–61.

Casettari L, Vllasaliu D, Castagnino E, Stolnik S, Howdle S, Illum L. PEGylated chitosan derivatives: Synthesis, characterizations and pharmaceutical applications. *Prog. Polym. Sci.* 2012;37(5):659–85.

Cassoni P, Sapino A, Fortunati N, Munaron L, Chini B, Bussolati G. Oxytocin inhibits the proliferation of MDA-MB231 human breast-cancer cells via cyclic adenosine monophosphate and protein kinase A. *Int J Cancer.* 1997;72(2):340–4.

Cassoni P, Sapino A, Negro F, Bussolati G. Oxytocin inhibits proliferation of human breast cancer cell lines. *Virchows Arch.* 1994;425(5):467–72.

Chen M, Mao A, Xu M, Weng Q, Mao J, Ji J. CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges. *Cancer Lett.* 2019;447:48–55.

Chiovaro F, Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M. Transcriptional regulation of tenascin genes. *Cell Adh Migr.* 2015;9(1–2):34–47.

Chiquet-Ehrismann R., Kalla P, Pearson CA. Participation of tenascin and transforming growth factor-beta in reciprocal epithelial-mesenchymal interactions of MCF7 cells and fibroblasts. *Cancer Res.* 1989;49(15):4322–5.

Chiquet-Ehrismann Ruth, Orend G, Chiquet M, Tucker RP, Midwood KS. Tenascins in stem cell niches. *Matrix Biol.* 2014;37:112–23.

Chuan D, Jin T, Fan R, Zhou L, Guo G. Chitosan for gene delivery: Methods for improvement and applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2019;268:25–38.

Collias D, Beisel CL. CRISPR technologies and the search for the PAM-free nuclease. *Nat Commun.* 2021;12(1):555.

Coumans JVF, Gau D, Poljak A, Wasinger V, Roy P, Moens P. Green fluorescent protein expression triggers proteome changes in breast cancer cells. *Exp. Cell Res.* 2014;320(1):33–45.

Cox TR. The matrix in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2021;21(4):217–38.

De Braud FG, Catania C, Onofri A, Pierantoni C, Cascinu S, Maur M, Masini C, Conte PF, Giovannoni L, Tasciotti A, Lovato V, Neri D, Menssen HD. Combination of the immunocytokine F16-IL2 with doxorubicin or paclitaxel in patients with solid tumors: Results from two phase Ib trials. *JCO.* 2011;29(15_suppl):2595–2595.

De Laporte L, Rice JJ, Tortelli F, Hubbell JA. Tenascin C promiscuously binds growth factors via its fifth fibronectin type iii-like domain. *Engler AJ. PLoS ONE.* 2013;8(4):e62076.

De Wever O, Nguyen Q-D, Van Hoorde L, Bracke M, Bruyneel E, Gespach C, Mareel M. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J*. 2004;18(9):1016–8.

Decuzzi P, Ferrari M. The receptor-mediated endocytosis of nonspherical particles. *Biophys. J*. 2008;94(10):3790–7.

Deligne C, Midwood KS. Macrophages and extracellular matrix in breast cancer: partners in crime or protective allies? *Front Oncol*. 2021;11:620773.

Deligne C, Murdamoothoo D, Gammage AN, Gschwandtner M, Erne W, Loustau T, Marzeda AM, Carapito R, Paul N, Velazquez-Quesada I, Mazzier I, Sun Z, Orend G, Midwood KS. Matrix-targeting immunotherapy controls tumor growth and spread by switching macrophage phenotype. *Cancer Immunol Res*. 2020;8(3):368–82.

Depil S, Duchateau P, Grupp SA, Mufti G, Poirot L. ‘Off-the-shelf’ allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(3):185–99.

Derakhshan F, Reis-Filho JS. Pathogenesis of triple-negative breast cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2022;17(1):181–204.

Dhaouadi S, Ben Abderrazek R, Loustau T, Abou-Faycal C, Ksouri A, Erne W, Murdamoothoo D, Mörgelin M, Kungl A, Jung A, Ledrappier S, Benlasfar Z, Bichet S, Chiquet-Ehrismann R, Hendaoui I, Orend G, Bouhaouala-Zahar B. Novel human tenascin-C function-blocking camel single domain nanobodies. *Front Immunol*. 2021;12:635166.

Dillekås H, Rogers MS, Straume O. Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Med*. 2019;8(12):5574–6.

Dvorak HF. Tumors: Wounds that do not heal. *N Engl J Med*. 1986;315(26):1650–9.

Eble JA, Niland S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2019;36(3):171–98.

Emami Nejad A, Najafgholian S, Rostami A, Sistani A, Shojaeifar S, Esparvarinha M, Nedaeinia R, Haghjooy Javanmard S, Taherian M, Ahmadlou M, Salehi R, Sadeghi B, Manian M. The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell Int.* 2021;21(1):62.

Falou O, Sadeghi-Naini A, Prematilake S, Sofroni E, Papanicolau N, Iradji S, Jahedmotlagh Z, Lemon-Wong S, Pignol J-P, Rakovitch E, Zubovits J, Spayne J, Dent R, Trudeau M, Boileau JF, Wright FC, Yaffe MJ, Czarnota GJ. Evaluation of neoadjuvant chemotherapy response in women with locally advanced breast cancer using ultrasound elastography. *Transl. Oncol.* 2013;6(1):17–24.

Fan Y, He S. The characteristics of tumor microenvironment in triple negative breast cancer. *Cancer Manag Res.* 2022;14:1–17.

Ferrua F, Aiuti A. Twenty-five years of gene therapy for ADA-SCID: from bubble babies to an approved drug. *Hum Gene Ther.* 2017;28(11):972–81.

Follenzi A, Santambrogio L, Annoni A. Immune responses to lentiviral vectors. *Curr Gene Ther.* 2007;7(5):306–15.

Frangoul H, Altshuler D, Cappellini MD, Chen Y-S, Domm J, Eustace BK, Foell J, de la Fuente J, Grupp S, Handgretinger R, Ho TW, Kattamis A, Kernysky A, Lekstrom-Himes J, Li AM, Locatelli F, Mapara MY, de Montalembert M, Rondelli D, Sharma A, Sheth S, Soni S, Steinberg MH, Wall D, Yen A, Corbacioglu S. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia. *N Engl J Med.* 2021;384(3):252–60.

Fu C, Jiang A. Dendritic cells and CD8 T cell immunity in tumor microenvironment. *Front Immunol.* 2018;9:3059.

Fujita M, Yamamoto T, Iyoda T, Fujisawa T, Nagai R, Kudo C, Sasada M, Kodama H, Fukai F. Autocrine production of PDGF stimulated by the Tenascin-C-derived peptide TNIIA2 induces hyper-proliferation in glioblastoma cells. *IJMS.* 2019;20(13):3183.

Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunology Research*. 2017;5(1):3–8.

Gagliardi A, Giuliano E, Venkateswararao E, Fresta M, Bulotta S, Awasthi V, Cosco D. Biodegradable polymeric nanoparticles for drug delivery to solid tumors. *Front Pharmacol*. 2021;12:601626.

Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*. 2013;31(7):397–405.

Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*. 2013;14(10):1014–22.

Garaud S, Zayakin P, Buisseret L, Rulle U, Silina K, de Wind A, Van den Eyden G, Larsimont D, Willard-Gallo K, Linē A. Antigen specificity and clinical significance of IgG and IgA autoantibodies produced in situ by tumor-infiltrating B cells in breast cancer. *Front Immunol*. 2018;9:2660.

Gersbach CA. Genome engineering: the next genomic revolution. *Nat Methods*. 2014;11(10):1009–11.

Ghatnekar A, Trojanowska M. GATA-6 is a novel transcriptional repressor of the human Tenascin-C gene expression in fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2008;1779(3):145–51.

Giblin S. Investigating cell lineage specific biosynthesis of Tenascin-C during inflammation. *Doktora Tezi*, 2018; Oxford, İngiltere (Danışman: Prof. Dr. Kim Midwood)

Gidwani B, Vyas A. The potentials of nanotechnology-based drug delivery system for treatment of ovarian cancer. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2015;43(4):291–7.

Gobin E, Bagwell K, Wagner J, Mysona D, Sandirasegarane S, Smith N, Bai S, Sharma A, Schleifer R, She J-X. A pan-cancer perspective of matrix metalloproteases (MMP) gene expression profile and their diagnostic/prognostic potential. *BMC Cancer*. 2019;19(1):581.

Gocheva V, Naba A, Bhutkar A, Guardia T, Miller KM, Li CM-C, Dayton TL, Sanchez-Rivera FJ, Kim-Kiselak C, Jailkhani N, Winslow MM, Del Rosario A, Hynes RO, Jacks T. Quantitative proteomics identify Tenascin-C as a promoter of lung cancer progression and contributor to a signature prognostic of patient survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(28).

Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn H-J, Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2206–23.

Gonçalves H, Guerra MR, Duarte Cintra JR, Fayer VA, Brum IV, Bustamante Teixeira MT. Survival study of triple-negative and non-triple-negative breast cancer in a Brazilian cohort. *Clin Med Insights Oncol*. 2018;12:117955491879056.

Grzywa TM, Sosnowska A, Matryba P, Rydzynska Z, Jasinski M, Nowis D, Golab J. Myeloid cell-derived arginase in cancer immune response. *Front Immunol*. 2020;11:938.

Guan Z, Zeng J, Wang Z, Xie H, Lv C, Ma Z, Xu S, Wang X, He D, Li L. Urine tenascin-C is an independent risk factor for bladder cancer patients. *Molecular Medicine Reports*. 2014;9(3):961–6.

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

Guillerey C. NK cells in the tumor microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1273:69–90.

Guo M, Wang SM. Genome instability-derived genes are novel prognostic biomarkers for triple-negative breast cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:701073.

Guțoaia A, Schuster L, Margutti S, Laufer S, Schlosshauer B, Krastev R, Stoll D, Hartmann H. Fine-tuned PEGylation of chitosan to maintain optimal siRNA-nanoplex bioactivity. *Carbohydr. Polym.*. 2016;143:25–34.

Guttery DS, Shaw JA, Lloyd K, Pringle JH, Walker RA. Expression of tenascin-C and its isoforms in the breast. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(4):595–606.

Han B, Qu C, Park K, Konieczny SF, Korc M. Recapitulation of complex transport and action of drugs at the tumor microenvironment using tumor-microenvironment-on-chip. *Cancer Letters.* 2016;380(1):319–29.

Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery.* 2022;12(1):31–46.

Hareendran S, Balakrishnan B, Sen D, Kumar S, Srivastava A, Jayandharan GR. Adeno-associated virus (AAV) vectors in gene therapy: immune challenges and strategies to circumvent them. *Rev Med Virol.* 2013;23(6):399–413.

Hasegawa M, Yoshida T, Sudo A. Tenascin-C in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Front Immunol.* 2020;11:577015.

Hassani Najafabadi A, Abdouss M, Faghihi S. Synthesis and evaluation of PEG-O-chitosan nanoparticles for delivery of poor water soluble drugs: Ibuprofen. *Materials Science and Engineering: C.* 2014;41:91–9.

Hawe A, Poole R, Romeijn S, Kasper P, van der Heijden R, Jiskoot W. Towards Heat-stable Oxytocin Formulations: Analysis of Degradation Kinetics and Identification of Degradation Products. *Pharm Res.* 2009;26(7):1679–88.

He MY, Rancoule C, Rehailia-Blanchard A, Espenel S, Trone J-C, Bernichon E, Guillaume E, Vallard A, Magné N. Radiotherapy in triple-negative breast cancer: Current situation and upcoming strategies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2018;131:96–101.

Hemesath TJ, Marton LS, Stefansson K. Inhibition of T cell activation by the extracellular matrix protein tenascin. *J Immunol.* 1994;152(11):5199–207.

Hielscher AC, Qiu C, Gerecht S. Breast cancer cell-derived matrix supports vascular morphogenesis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2012;302(8):C1243–56.

Hirakawa MP, Krishnakumar R, Timlin JA, Carney JP, Butler KS. Gene editing and CRISPR in the clinic: current and future perspectives. *Bioscience Reports*. 2020;40(4):BSR20200127.

Hongu T, Pein M, Insua-Rodríguez J, Gutjahr E, Mattavelli G, Meier J, Decker K, Descot A, Bozza M, Harbottle R, Trumpp A, Sinn H-P, Riedel A, Oskarsson T. Perivascular tenascin C triggers sequential activation of macrophages and endothelial cells to generate a pro-metastatic vascular niche in the lungs. *Nat Cancer*. 2022;3(4):486–504.

Huang M, Fong C-W, Khor E, Lim L-Y. Transfection efficiency of chitosan vectors: Effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. *J Control Release*. 2005;106(3):391–406.

Huang W, Chiquet-Ehrismann R, Moyano JV, Garcia-Pardo A, Orend G. Interference of tenascin-C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation. *Cancer Res*. 2001;61(23):8586–94.

Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Letters*. 2015;368(1):7–13.

Insua-Rodríguez J, Pein M, Hongu T, Meier J, Descot A, Lowy CM, De Braekeleer E, Sinn H, Spaich S, Sütterlin M, Schneeweiss A, Oskarsson T. Stress signaling in breast cancer cells induces matrix components that promote chemoresistant metastasis. *EMBO Mol Med*. 2018;10(10).

Ishihara A, Yoshida T, Tamaki H, Sakakura T. Tenascin expression in cancer cells and stroma of human breast cancer and its prognostic significance. *Clin Cancer Res*. 1995;1(9):1035–41.

Ito Y, Kobayashi T, Kimura T, Matsuura N, Wakasugi E, Takeda T, Shimano T, Kubota Y, Nobunaga T, Makino Y, Azuma C, Saji F, Monden M. Investigation of the oxytocin receptor expression in human breast cancer tissue using newly established monoclonal antibodies. *Endocrinology*. 1996;137(2):773–9.

Iyoda T, Fujita M, Fukai F. Biologically active TNIIIA2 region in tenascin-C molecule: A major contributor to elicit aggressive malignant phenotypes from tumors/tumor stroma. *Front Immunol.* 2020;11:610096.

Jachetti E, Caputo S, Mazzoleni S, Brambillasca CS, Parigi SM, Grioni M, Piras IS, Restuccia U, Calcinotto A, Freschi M, Bachi A, Galli R, Bellone M. Tenascin-C protects cancer stem-like cells from immune surveillance by arresting T-cell activation. *Cancer Res.* 2015;75(10):2095–108.

Jiang LQ, Wang TY, Webster TJ, Duan H-J, Qiu JY, Zhao ZM, Yin X-X, Zheng CL. Intracellular disposition of chitosan nanoparticles in macrophages: intracellular uptake, exocytosis, and intercellular transport. *IJN.* 2017;Volume 12:6383–98.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816–21.

Jones PL. Extracellular matrix and tenascin-C in pathogenesis of breast cancer. *The Lancet.* 2001;357(9273):1992–4.

Kaczmarek MB, Struszczyk-Swita K, Li X, Szczęsna-Antczak M, Daroch M. Enzymatic modifications of chitin, chitosan, and chitooligosaccharides. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:243.

Kakarla S, Song X-T, Gottschalk S. Cancer-associated fibroblasts as targets for immunotherapy. *Immunotherapy.* 2012;4(11):1129–38.

Katoh D, Nagaharu K, Shimojo N, Hanamura N, Yamashita M, Kozuka Y, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T. Binding of $\alpha\beta 1$ and $\alpha\beta 6$ integrins to tenascin-C induces epithelial–mesenchymal transition-like change of breast cancer cells. *Oncogenesis.* 2013;2(8):e65–e65.

Katoh Daisuke, Kozuka Y, Noro A, Ogawa T, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T. Tenascin-C induces phenotypic changes in fibroblasts to myofibroblasts with high contractility through the integrin $\alpha\beta 1$ /transforming growth factor β /smad signaling axis in human breast cancer. *Am. J. Pathol.* 2020;190(10):2123–35.

Khalil AM. The genome editing revolution: review. *J Genet Eng Biotechnol*. 2020;18(1):68.

Kim BH, Zhang G. Generating stable knockout zebrafish lines by deleting large chromosomal fragments using multiple gRNAs. *G3 Genes|Genomes|Genetics*. 2020;10(3):1029–37.

Kim D, Bae S, Park J, Kim E, Kim S, Yu HR, Hwang J, Kim J-I, Kim J-S. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods*. 2015;12(3):237–43.

Krishnamurti U, Silverman JF. HER2 in breast cancer: a review and update. *Adv Anat Pathol*. 2014;21(2):100–7.

Krstic J, Santibanez JF. Transforming growth factor-beta and matrix metalloproteinases: functional interactions in tumor stroma-infiltrating myeloid cells. *Sci. World J*. 2014;2014:1–14.

Kubo Y, Ishikawa K, Mori K, Kobayashi Y, Nakama T, Arima M, Nakao S, Hisatomi T, Haruta M, Sonoda K-H, Yoshida S. Periostin and tenascin-C interaction promotes angiogenesis in ischemic proliferative retinopathy. *Sci Rep*. 2020;10(1):9299.

Kuczek DE, Larsen AMH, Thorseth M-L, Carretta M, Kalvisa A, Siersbæk MS, Simões AMC, Roslind A, Engelholm LH, Noessner E, Donia M, Svane IM, Straten P, Grøntved L, Madsen DH. Collagen density regulates the activity of tumor-infiltrating T cells. *J Immunotherapy Cancer*. 2019;7(1):68.

Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;293(2):247–69.

Kumar S, Koh J. Physiochemical, optical and biological activity of chitosan-chromone derivative for biomedical applications. *IJMS*. 2012;13(5):6102–16.

Kunkel TA. Evolving views of DNA replication (in)fidelity. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2009;74(0):91–101.

Kunte S, Abraham J, Montero AJ. Novel HER2-targeted therapies for HER2-positive metastatic breast cancer. *Cancer*. 2020;126(19):4278–88.

Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited-The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer*. 2011;128(11):2527–35.

Lanigan TM, Kopera HC, Saunders TL. Principles of genetic engineering. *Genes*. 2020;11(3):291.

Lee E, Pandey NB, Popel AS. Lymphatic endothelial cells support tumor growth in breast cancer. *Sci Rep*. 2015;4(1):5853.

Lee SY, Jung E, Park J-H, Park JW, Shim C-K, Kim D-D, Yoon I-S, Cho H-J. Transient aggregation of chitosan-modified poly(d,l-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles in the blood stream and improved lung targeting efficiency. *J. Colloid Interface Sci*. 2016;480:102–8.

Lee WS, Yang H, Chon HJ, Kim C. Combination of anti-angiogenic therapy and immune checkpoint blockade normalizes vascular-immune crosstalk to potentiate cancer immunity. *Exp Mol Med*. 2020;52(9):1475–85.

Lepucki A, Orlńska K, Mielczarek-Palacz A, Kabut J, Olczyk P, Komosińska-Vashev K. The role of extracellular matrix proteins in breast cancer. *JCM*. 2022;11(5):1250.

Li B, Chan HL, Chen P. Immune checkpoint inhibitors: Basics and challenges. *CMC*. 2019;26(17):3009–25.

Li D, San M, Zhang J, Yang A, Xie W, Chen Y, Lu X, Zhang Y, Zhao M, Feng X, Zheng Y. Oxytocin receptor induces mammary tumorigenesis through prolactin/p-STAT5 pathway. *Cell Death Dis*. 2021;12(6):588.

Li Jianghua, Cai C, Li J, Li J, Li J, Sun T, Wang L, Wu H, Yu G. Chitosan-based nanomaterials for drug delivery. *Molecules*. 2018;23(10):2661.

Li Jue, Shen C, Wang X, Lai Y, Zhou K, Li P, Liu L, Che G. Prognostic value of TGF- β in lung cancer: systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2019;19(1):691.

Li M, Wang Y, Li M, Wu X, Setrerrahmane S, Xu H. Integrins as attractive targets for cancer therapeutics. *Acta Pharm Sin B*. 2021;11(9):2726–37.

Li Y, Zhao L, Li X-F. Hypoxia and the Tumor Microenvironment. *Technol Cancer Res Treat*. 2021;20:153303382110363.

Li Z, Dong P, Ren M, Song Y, Qian X, Yang Y, Li S, Zhang X, Liu F. PD-L1 expression is associated with tumor FOXP3(+) regulatory T-cell infiltration of breast cancer and poor prognosis of patient. *J Cancer*. 2016;7(7):784–93.

Li ZL, Zhang HL, Huang Y, Huang JH, Sun P, Zhou NN, Chen YH, Mai J, Wang Y, Yu Y, Zhou L-H, Li X, Yang D, Peng XD, Feng GK, Tang J, Zhu XF, Deng R. Autophagy deficiency promotes triple-negative breast cancer resistance to T cell-mediated cytotoxicity by blocking tenascin-C degradation. *Nat Commun*. 2020;11(1):3806.

Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous dna end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*. 2010;79(1):181–211.

Lightner VA, Marks JR, McCachren SS. Epithelial cells are an important source of tenascin in normal and malignant human breast tissue. *Exp. Cell Res*. 1994;210(2):177–84.

Lingasamy P, Tobi A, Haugas M, Hunt H, Paiste P, Asser T, Rätsep T, Kotamraju VR, Bjerkvig R, Teesalu T. Bi-specific tenascin-C and fibronectin targeted peptide for solid tumor delivery. *Biomaterials*. 2019;219:119373.

Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Delivery*. 2018;25(1):1234–57.

Liu B-Y, He X-Y, Zhuo R-X, Cheng S-X. Tumor targeted genome editing mediated by a multi-functional gene vector for regulating cell behaviors. *J Control Release*. 2018;291:90–8.

Liu H, Gruber CW, Alewood PF, Möller A, Muttenthaler M. The oxytocin receptor signalling system and breast cancer: a critical review. *Oncogene*. 2020;39(37):5917–32.

Liu H, Muttenthaler M. High oxytocin receptor expression linked to increased cell migration and reduced survival in patients with triple-negative breast cancer. *Biomedicines*. 2022;10(7):1595.

Liu X, Zhang Y, Cheng C, Cheng AW, Zhang X, Li N, Xia C, Wei X, Liu X, Wang H. CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells. *Cell Res*. 2017;27(1):154–7.

Liu Y-T, Sun Z-J. Turning cold tumors into hot tumors by improving T-cell infiltration. *Theranostics*. 2021;11(11):5365–86.

Lord MS, Ellis AL, Farrugia BL, Whitelock JM, Grenett H, Li C, O’Grady RL, DeCarlo AA. Perlecan and vascular endothelial growth factor-encoding DNA-loaded chitosan scaffolds promote angiogenesis and wound healing. *J Control Release*. 2017;250:48–61.

Lotfinejad P, Asghari Jafarabadi M, Abdoli Shadbad M, Kazemi T, Pashazadeh F, Sandoghchian Shotorbani S, Jadidi Niaragh F, Baghbanzadeh A, Vahed N, Silvestris N, Baradaran B. Prognostic role and clinical significance of Tumor-Infiltrating Lymphocyte (TIL) and Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) expression in triple-negative breast cancer (TNBC): A systematic review and meta-analysis study. *Diagnostics*. 2020;10(9):704.

Lowy CM, Oskarsson T. Tenascin C in metastasis: A view from the invasive front. *Cell Adh Migr*. 2015;9(1–2):112–24.

Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release*. 2006;114(1):100–9.

Maishi N, Hida K. Tumor endothelial cells accelerate tumor metastasis. *Cancer Sci*. 2017;108(10):1921–6.

Makarova KS, Koonin EV. Annotation and classification of crispr-cas systems. In: Lundgren M, Charpentier E, Fineran PC. CRISPR. New York, NY: Springer New York; 2015. p. 47–75. (Methods in Molecular Biology; vol. 1311).

Malhotra M, Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Kahouli I, Prakash S. Development and characterization of chitosan-PEG-TAT nanoparticles for the intracellular delivery of siRNA. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:2041–52.

Mandal PK, Ferreira LMR, Collins R, Meissner TB, Boutwell CL, Friesen M, Vrbanc V, Garrison BS, Stortchevoi A, Bryder D, Musunuru K, Brand H, Tager AM, Allen TM, Talkowski ME, Rossi DJ, Cowan CA. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell*. 2014;15(5):643–52.

Mansur AAP, de Carvalho SM, Mansur HS. Bioengineered quantum dot/chitosan-tripeptide nanoconjugates for targeting the receptors of cancer cells. *Int. J. Biol. Macromol*. 2016;82:780–9.

Manzanares D, Ceña V. Endocytosis: The nanoparticle and submicron nanocompounds gateway into the cell. *Pharmaceutics*. 2020;12(4):371.

Mao S, Sun W, Kissel T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(1):12–27.

Mårlind J, Kaspar M, Trachsel E, Sommariva R, Hindle S, Bacci C, Giovannoni L, Neri D. Antibody-mediated delivery of interleukin-2 to the stroma of breast cancer strongly enhances the potency of chemotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(20):6515–24.

Maschler S, Grunert S, Danielopol A, Beug H, Wirtl G. Enhanced tenascin-C expression and matrix deposition during Ras/TGF- β -induced progression of mammary tumor cells. *Oncogene*. 2004;23(20):3622–33.

Mattiuzzi C, Lippi G. Current cancer epidemiology. *JEGH*. 2019;9(4):217.

McGowan E, Lin Q, Ma G, Yin H, Chen S, Lin Y. PD-1 disrupted CAR-T cells in the treatment of solid tumors: Promises and challenges. *Biomed. Pharmacother.* 2020;121:109625.

Medeiros B, Allan AL. Molecular mechanisms of breast cancer metastasis to the lung: clinical and experimental perspectives. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9):E2272.

Medeiros B, Goodale D, Postenka C, Lowes LE, Kiser P, Hearn S, Salmond N, Williams KC, Allan AL. Triple-negative primary breast tumors induce supportive premetastatic changes in the extracellular matrix and soluble components of the lung microenvironment. *Cancers.* 2020;12(1):172.

Medina MA, Oza G, Sharma A, Arriaga LG, Hernández Hernández JM, Rotello VM, Ramirez JT. Triple-negative breast cancer: a review of conventional and advanced therapeutic strategies. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(6):E2078.

Meijer MT, Uhel F, Cremer OL, Schultz MJ, van der Poll T. Tenascin C plasma levels in critically ill patients with or without sepsis: a multicenter observational study. *Shock.* 2020;54(1):62–9.

Midwood KS, Chiquet M, Tucker RP, Orend G. Tenascin-C at a glance. *J. Cell Sci.* 2016;129:4321-7.

Midwood KS, Hussenet T, Langlois B, Orend G. Advances in tenascin-C biology. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(19):3175–99.

Midwood KS, Orend G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal.* 2009;3(3–4):287–310.

Ming X, Qiu S, Liu X, Li S, Wang Y, Zhu M, Li N, Luo P, Liang C, Tu J. Prognostic role of Tenascin-C for cancer outcome: A meta-analysis. *Technol Cancer Res Treat.* 2019;18:153303381882110.

Mohammad RM, Muqbil I, Lowe L, Yedjou C, Hsu H-Y, Lin L-T, Siegelin MD, Fimognari C, Kumar NB, Dou QP, Yang H, Samadi AK, Russo GL, Spagnuolo C, Ray SK, Chakrabarti M, Morre JD, Coley HM, Honoki K, Fujii H, Georgakilas AG,

Amedei A, Niccolai E, Amin A, Ashraf SS, Helferich WG, Yang X, Boosani CS, Guha G, Bhakta D, Ciriolo MR, Aquilano K, Chen S, Mohammed SI, Keith WN, Bilsland A, Halicka D, Newsheer S, Azmi AS. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2015;35:S78–103.

Mohan T, Kleinschek KS, Kargl R. Polysaccharide peptide conjugates: Chemistry, properties and applications. *Carbohydrate Polymers.* 2022;280:118875.

Mura P, Maestrelli F, Cirri M, Mennini N. Multiple roles of chitosan in mucosal drug delivery: an updated review. *Marine Drugs.* 2022;20(5):335.

Murdamoothoo D, Sun Z, Yilmaz A, Riegel G, Abou-Faycal C, Deligne C, Velazquez-Quesada I, Erne W, Nascimento M, Mörgelin M, Cremel G, Paul N, Carapito R, Veber R, Dumortier H, Yuan J, Midwood KS, Loustau T, Orend G. Tenascin-C immobilizes infiltrating T lymphocytes through CXCL12 promoting breast cancer progression. *EMBO Mol Med.* 2021;13(6).

Naik A, Al-Yahyaee A, Abdullah N, Sam J-E, Al-Zeheimi N, Yaish MW, Adham SA. Neuropilin-1 promotes the oncogenic Tenascin-C/integrin $\beta 3$ pathway and modulates chemoresistance in breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2018;18(1):533.

Nallanthighal S, Heiserman JP, Cheon D-J. The role of the extracellular matrix in cancer stemness. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:86.

Nandgude T, Pagar R. Plausible role of chitosan in drug and gene delivery against resistant breast cancer cells. *Carbohydr. Res.* 2021;506:108357.

Narimani M, Sharifi M, Jalili A. Knockout of BIRC5 gene by CRISPR/Cas9 induces apoptosis and inhibits cell proliferation in leukemic cell lines, HL60 and KG1. *Blood Lymphat Cancer.* 2019;9:53–61.

Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvisé M, Corbo V, Oni TE, Hearn SA, Lee EJ, Chio IIC, Hwang C-I, Tiriác H, Baker LA, Engle DD, Feig C, Kultti A, Egeblad M, Fearon DT, Crawford JM, Clevers H, Park Y, Tuveson DA. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* 2017;214(3):579–96.

Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clin Med Res*. 2009;7(1–2):4–13.

Orend G. Potential oncogenic action of tenascin-C in tumorigenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2005;37(5):1066–83.

Orend G, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Letters*. 2006;244(2):143–63.

Oskarsson T, Acharyya S, Zhang XH-F, Vanharanta S, Tavazoie SF, Morris PG, Downey RJ, Manova-Todorova K, Brogi E, Massagué J. Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med*. 2011;17(7):867–74.

Ou L, Przybilla MJ, Ahlat O, Kim S, Overn P, Jarnes J, O’Sullivan MG, Whitley CB. A highly efficacious ps gene editing system corrects metabolic and neurological complications of mucopolysaccharidosis Type I. *Mol Ther*. 2020;28(6):1442–54.

Parekh K, Ramachandran S, Cooper J, Bigner D, Patterson A, Mohanakumar T. Tenascin-C, over expressed in lung cancer down regulates effector functions of tumor infiltrating lymphocytes. *Lung Cancer*. 2005;47(1):17–29.

Patel AG, Sarkaria JN, Kaufmann SH. Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(8):3406–11.

Patil S, Bhatt P, Lalani R, Amrutiya J, Vhora I, Kolte A, Misra A. Low molecular weight chitosan–protamine conjugate for siRNA delivery with enhanced stability and transfection efficiency. *RSC Adv*. 2016;6(112):110951–63.

Peers S, Montembault A, Ladavière C. Chitosan hydrogels for sustained drug delivery. *J Control Release*. 2020;326:150–63.

Penault-Llorca F, Radosevic-Robin N. Ki67 assessment in breast cancer: an update. *Pathology*. 2017;49(2):166–71.

Pickar-Oliver A, Gersbach CA. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(8):490–507.

Pluta P, Smolewski P, Pluta A, Cebula-Obrzut B, Wierzbowska A, Nejc D, Robak T, Kordek R, Gottwald L, Piekarski J, Jeziorski A. Significance of BAX expression in breast cancer patients. *Polish Journal of Surgery.* 2011;83(10).

Porteus M. Genome editing: a new approach to human therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2016;56(1):163–90.

Primac I, Maquoi E, Blacher S, Heljasvaara R, Van Deun J, Smeland HYH, Canale A, Louis T, Stuhr L, Sounni NE, Cataldo D, Pihlajaniemi T, Pequeux C, De Wever O, Gullberg D, Noel A. Stromal integrin $\alpha 11$ regulates PDGFR β signaling and promotes breast cancer progression. *Journal of Clinical Investigation.* 2019;129(11):4609–28.

Puente Navazo MD, Valmori D, Rüegg C. The alternatively spliced domain TnFnIII A1A2 of the extracellular matrix protein Tenascin-C suppresses activation-induced T lymphocyte proliferation and cytokine production. *J Immunol.* 2001;167(11):6431–40.

Qiao J, Sun W, Lin S, Jin R, Ma L, Liu Y. Cytosolic delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins for genome editing using chitosan-coated red fluorescent protein. *Chem Commun.* 2019;55(32):4707–10.

Rabiee N, Bagherzadeh M, Ghadiri AM, Kiani M, Ahmadi S, Jajarmi V, Fatahi Y, Aldhafer A, Tahriri M, Webster TJ, Mostafavi E. Calcium-based nanomaterials and their interrelation with chitosan: optimization for pCRISPR delivery. *J Nanostruct Chem.* 2021;

Rabiee N, Bagherzadeh M, Tavakolizadeh M, Pourjavadi A, Atarod M, Webster TJ. Synthesis, characterization and mechanistic study of nano chitosan tetrazole as a novel and promising platform for CRISPR delivery. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials.* 2022;71(2):116–26.

Radzisheuskaya A, Shlyueva D, Müller I, Helin K. Optimizing sgRNA position markedly improves the efficiency of CRISPR/dCas9-mediated transcriptional repression. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(18):e141–e141.

Rahimmanesh I, Fatehi R, Khanahmad H. Identification of significant genes and pathways associated with tenascin-C in cancer progression by bioinformatics analysis. *Adv Biomed Res.* 2022;11:17.

Reardon DA, Akabani G, Coleman RE, Friedman AH, Friedman HS, Herndon JE, McLendon RE, Pegram CN, Provenzale JM, Quinn JA, Rich JN, Vredenburgh JJ, Desjardins A, Guruangan S, Badruddoja M, Dowell JM, Wong TZ, Zhao X-G, Zalutsky MR, Bigner DD. Salvage radioimmunotherapy with murine iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81c6 for patients with recurrent primary and metastatic malignant brain tumors: phase ii study results. *JCO.* 2006;24(1):115–22.

Reversi A, Cassoni P, Chini B. Oxytocin receptor signaling in myoepithelial and cancer cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2005;10(3):221–9.

Ribeiro AL, Okamoto OK. Combined effects of pericytes in the tumor microenvironment. *Stem Cells Int.* 2015;2015:868475.

Richert MM, Phadke PA, Matters G, DiGirolamo DJ, Washington S, Demers LM, Bond JS, Manni A, Welch DR. Metastasis of hormone-independent breast cancer to lung and bone is decreased by alpha-difluoromethylornithine treatment. *Breast Cancer Res.* 2005;7(5):R819-827.

Rick JW, Chandra A, Dalle Ore C, Nguyen AT, Yagnik G, Aghi MK. Fibronectin in malignancy: Cancer-specific alterations, protumoral effects, and therapeutic implications. *Semin. Oncol.* 2019;46(3):284–90.

Roma-Rodrigues C, Mendes R, Baptista P, Fernandes A. Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. *IJMS.* 2019;20(4):840.

Rose JC, Popp NA, Richardson CD, Stephany JJ, Mathieu J, Wei CT, Corn JE, Maly DJ, Fowler DM. Suppression of unwanted CRISPR-Cas9 editing by co-administration of catalytically inactivating truncated guide RNAs. *Nat Commun.* 2020;11(1):2697.

S Alharth A, A Alsuliman M, Baker I Alshomrani A, A Alyami W. Tenascin-C (TNC) promotes breast cancer cell invasion and proliferation: functional effects of tnc knockdown in highly invasive breast cancer cell lines. *AJMBR.* 2021;9(1):16–22.

Salva E, Akbuga J, Turan S. Increased in vitro cell proliferation by chitosan/pGM-CSF complexes. *Indian J Pharm Sci.* 2011;73(2):131.

Salva Emine, Kabasakal L, Eren F, Ozkan N, Cakalağaoğlu F, Akbuğa J. Local delivery of chitosan/VEGF siRNA nanoplexes reduces angiogenesis and growth of breast cancer in vivo. *Nucleic Acid Ther.* 2012;22(1):40–8.

Sánchez-Rivera FJ, Jacks T. Applications of the CRISPR–Cas9 system in cancer biology. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(7):387–93.

Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, Diéras V, Hegg R, Im S-A, Shaw Wright G, Henschel V, Molinero L, Chui SY, Funke R, Husain A, Winer EP, Loi S, Emens LA. Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(22):2108–21.

Shang B, Liu Y, Jiang S, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2015;5(1):15179.

Shi M, He X, Wei W, Wang J, Zhang T, Shen X. Tenascin-C induces resistance to apoptosis in pancreatic cancer cell through activation of ERK/NF- κ B pathway. *Apoptosis.* 2015;20(6):843–57.

Sikov WM, Dizon DS, Strenger R, Legare RD, Theall KP, Graves TA, Gass JS, Kennedy TA, Fenton MA. Frequent pathologic complete responses in aggressive stages II to III breast cancers with every-4-week carboplatin and weekly paclitaxel with or without trastuzumab: a Brown University Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 2009;27(28):4693–700.

Singh M, Yelle N, Venugopal C, Singh SK. EMT: Mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacol Ther.* 2018;182:80–94.

Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(3):175–93.

Snoderly HT, Boone BA, Bennewitz MF. Neutrophil extracellular traps in breast cancer and beyond: current perspectives on NET stimuli, thrombosis and metastasis, and clinical utility for diagnosis and treatment. *Breast Cancer Res.* 2019;21(1):145.

Sonin D, Pochkaeva E, Zhuravskii S, Postnov V, Korolev D, Vasina L, Kostina D, Mukhametdinova D, Zelinskaya I, Skorik Y, Naumysheva E, Malashicheva A, Somov P, Istomina M, Rubanova N, Aleksandrov I, Vasyutina M, Galagudza M. Biological Safety and Biodistribution of Chitosan Nanoparticles. *Nanomaterials.* 2020;10(4):810.

Spenlé C, Loustau T, Murdamoothoo D, Erne W, Beghelli-de la Forest Divonne S, Veber R, Petti L, Bourdely P, Mörgelin M, Brauchle E-M, Cremel G, Randrianarisoa V, Camara A, Rekima S, Schaub S, Nouhen K, Imhof T, Hansen U, Paul N, Carapito R, Pythoud N, Hirschler A, Carapito C, Dumortier H, Mueller CG, Koch M, Schenke-Layland K, Kon S, Sudaka A, Anjuère F, Van Obberghen-Schilling E, Orend G. Tenascin-C orchestrates an immune-suppressive tumor microenvironment in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Res.* 2020;8(9):1122–38.

Su C, Li J, Zhang L, Wang H, Wang F, Tao Y, Wang Y, Guo Q, Li J, Liu Y, Yan Y, Zhang J. The biological functions and clinical applications of integrins in cancers. *Front Pharmacol.* 2020;11:579068.

Suarez-Arnedo A, Torres Figueroa F, Clavijo C, Arbeláez P, Cruz JC, Muñoz-Camargo C. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *Chirico G. PLoS ONE.* 2020;15(7):e0232565.

Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016;99:28–51.

Sun R, Kong X, Qiu X, Huang C, Wong P-P. The emerging roles of pericytes in modulating tumor microenvironment. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:676342.

Sun Z, Schwenzer A, Rupp T, Murdamoothoo D, Vegliante R, Lefebvre O, Klein A, Hussenet T, Orend G. Tenascin-C promotes tumor cell migration and metastasis through integrin $\alpha 9\beta 1$ -mediated YAP inhibition. *Cancer Res.* 2018;78(4):950–61.

Sun Z, Velázquez-Quesada I, Murdamoothoo D, Ahowesso C, Yilmaz A, Spenlé C, Averous G, Erne W, Oberndorfer F, Oszwald A, Kain R, Bourdon C, Mangin P, Deligne C, Midwood K, Abou-Faycal C, Lefebvre O, Klein A, van der Heyden M, Chenard M-P, Christofori G, Mathelin C, Loustau T, Hussenet T, Orend G. Tenascin-C increases lung metastasis by impacting blood vessel invasions. *Matrix Biol.* 2019;83:26–47.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA A Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.

Suwiwat S, Ricciardelli C, Tammi R, Tammi M, Auvinen P, Kosma V-M, LeBaron RG, Raymond WA, Tilley WD, Horsfall DJ. Expression of extracellular matrix components versican, chondroitin sulfate, tenascin, and hyaluronan, and their association with disease outcome in node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(7):2491–8.

Taher FA, Ibrahim SA, El-Aziz AA, Abou El-Nour MF, El-Sheikh MA, El-Husseiny N, Mohamed MM. Anti-proliferative effect of chitosan nanoparticles (extracted from crayfish *Procambarus clarkii*, Crustacea: Cambaridae) against MDA-MB-231 and SK-BR-3 human breast cancer cell lines. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019;126:478–87.

Taraseviciute A, Vincent BT, Schedin P, Jones PL. Quantitative analysis of three-dimensional human mammary epithelial tissue architecture reveals a role for Tenascin-C in regulating c-Met function. *Am. J. Pathol.* 2010;176(2):827–38.

Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massagué J. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature.* 2008;451(7175):147–52.

Tekie FSM, Hajiramezanali M, Geramifar P, Raoufi M, Dinarvand R, Soleimani M, Atyabi F. Controlling evolution of protein corona: a prosperous approach to improve chitosan-based nanoparticle biodistribution and half-life. *Sci Rep.* 2020;10(1):9664.

Thibault M, Nimesh S, Lavertu M, Buschmann MD. Intracellular trafficking and decondensation kinetics of chitosan–pDNA polyplexes. *Molecular Therapy*. 2010;18(10):1787–95.

Toh M, Ngeow J. Homologous recombination deficiency: cancer predispositions and treatment implications. *The Oncologist*. 2021;26(9):e1526–37.

Tökés A-M, Paku S, Tóth S, Paál E, Kulka J, Tóth J, Telekes A. Tenascin expression in primary and recurrent breast carcinomas and the effect of tenascin on breast tumor cell cultures. *Pathol Oncol Res*. 2000;6(3):202–9.

Tomko LA, Hill RC, Barrett A, Szulczewski JM, Conklin MW, Eliceiri KW, Keely PJ, Hansen KC, Ponik SM. Targeted matrisome analysis identifies thrombospondin-2 and tenascin-C in aligned collagen stroma from invasive breast carcinoma. *Sci Rep*. 2018;8(1):12941.

Tse LV, Moller-Tank S, Asokan A. Strategies to circumvent humoral immunity to adeno-associated viral vectors. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(6):845–55.

Tsou P, Katayama H, Ostrin EJ, Hanash SM. The emerging role of B cells in tumor immunity. *Cancer Res*. 2016;76(19):5597–601.

Tucker RP, Degen M. Revisiting the Tenascins: exploitable as cancer targets? *Front Oncol*. 2022;12:908247.

Turley SJ, Cremasco V, Astarita JL. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(11):669–82.

Urooj T, Wasim B, Mushtaq S, Shah SNN, Shah M. Cancer cell-derived secretory factors in breast cancer-associated lung metastasis: Their mechanism and future prospects. *CCDT*. 2020;20(3):168–86.

Vakulskas CA, Dever DP, Rettig GR, Turk R, Jacobi AM, Collingwood MA, Bode NM, McNeill MS, Yan S, Camarena J, Lee CM, Park SH, Wiebking V, Bak RO, Gomez-Ospina N, Pavel-Dinu M, Sun W, Bao G, Porteus MH, Behlke MA. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene

editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2018;24(8):1216–24.

Varan G, Varan C, Öztürk SC, Benito JM, Esendağlı G, Bilensoy E. Therapeutic efficacy and biodistribution of paclitaxel-bound amphiphilic cyclodextrin nanoparticles: Analyses in 3D tumor culture and tumor-bearing animals in vivo. *Nanomaterials*. 2021;11:515-531.

Venkitaraman AR. How do mutations affecting the breast cancer genes BRCA1 and BRCA2 cause cancer susceptibility? *DNA Repair*. 2019;81:102668.

Viallard C, Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*. 2017;20(4):409–26.

Videira M, Arranja A, Rafael D, Gaspar R. Preclinical development of siRNA therapeutics: Towards the match between fundamental science and engineered systems. *Nanomedicine*. 2014;10(4):689–702.

Vollmer G. Biologic and oncologic implications of tenascin-C/hexabrachion proteins. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 1997;25(3):187–210.

Wang B, Liu K, Lin H-Y, Bellam N, Ling S, Lin W-C. 14-3-3 τ regulates ubiquitin-independent proteasomal degradation of p21, a novel mechanism of p21 downregulation in breast cancer. *Mol Cell Biol*. 2010;30(6):1508–27.

Wang G, Yang Q, Li M, Zhang Y, Cai Y, Liang X, Fu Y, Xiao Z, Zhou M, Xie Z, Huang H, Huang Y, Chen Y, He Q, Peng F, Chen Z. Quantitative proteomic profiling of tumor-associated vascular endothelial cells in colorectal cancer. *Biology Open*. 2019;bio.042838.

Wang M, Zhang J, Huang Y, Ji S, Shao G, Feng S, Chen D, Zhao K, Wang Z, Wu A. Cancer-associated fibroblasts autophagy enhances progression of triple-negative breast cancer cells. *Med Sci Monit*. 2017;23:3904–12.

Wang Q, Lv L, Tang Y, Zhang L, Wang L. MMP-1 is overexpressed in triple-negative breast cancer tissues and the knockdown of MMP-1 expression inhibits tumor cell malignant behaviors in-vitro. *Oncol Lett*. 2018;

Wang T, Srivastava S, Hartman M, Buhari SA, Chan C-W, Iau P, Khin LW, Wong A, Tan S-H, Goh B-C, Lee S-C. High expression of intratumoral stromal proteins is associated with chemotherapy resistance in breast cancer. *Oncotarget*. 2016;7(34):55155–68.

Wang YA, Jian J-W, Hung C-F, Peng H-P, Yang C-F, Cheng H-CS, Yang A-S. Germline breast cancer susceptibility gene mutations and breast cancer outcomes. *BMC Cancer*. 2018;18(1):315.

Wawrzyniak D, Grabowska M, Głodowicz P, Kuczyński K, Kuczyńska B, Fedoruk-Wyszomirska A, Rolle K. Down-regulation of tenascin-C inhibits breast cancer cells development by cell growth, migration, and adhesion impairment. *Languino LR. PLoS ONE*. 2020;15(8):e0237889.

Weecharangsan W, Opanasopit P, Ngawhirunpat T, Apirakaramwong A, Rojanarata T, Ruktanonchai U, Lee RJ. Evaluation of chitosan salts as non-viral gene vectors in CHO-K1 cells. *Int. J. Pharm*. 2008;348(1–2):161–8.

Wiegman AP, Ward A, Ivanova E, Duijf PHG, Adams MN, Najib IM, Van Oosterhout R, Sadowski MC, Kelly G, Morrical SW, O’Byrne K, Lee JS, Richard DJ. Genome instability and pressure on non-homologous end joining drives chemotherapy resistance via a DNA repair crisis switch in triple negative breast cancer. *NAR Cancer*. 2021;3(2):zcab022.

Wing JB, Tanaka A, Sakaguchi S. Human FOXP3⁺ regulatory t cell heterogeneity and function in autoimmunity and cancer. *Immunity*. 2019;50(2):302–16.

Wiśniewski K. Design of oxytocin analogs. In: Goetz G. *Cyclic Peptide Design*. New York, NY: Springer New York; 2019. p. 235–71. (Methods in Molecular Biology; vol. 2001).

Wold WSM, Toth K. Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2013;13(6):421–33.

Wouters MCA, Nelson BH. Prognostic significance of tumor-infiltrating B cells and plasma cells in human cancer. *Clin Cancer Res.* 2018;24(24):6125–35.

Wyszko E, Rolle K, Nowak S, Zukiel R, Nowak M, Piestrzeniewicz R, Gawrońska I, Barciszewska MZ, Barciszewski J. A multivariate analysis of patients with brain tumors treated with ATN-RNA. *Acta Pol Pharm.* 2008;65(6):677–84.

Xie X, Briinnert N, Jensen G, Albrechtsen J, Gotthardsen B, Rygaard J. Comparative studies between nude and scid mice on the growth and metastatic behavior of xenografted human tumors. *Clin Exp Metast.* 1992;10(3):201–10.

Xu S, Xu H, Wang W, Li S, Li H, Li T, Zhang W, Yu X, Liu L. The role of collagen in cancer: from bench to bedside. *J Transl Med.* 2019;17(1):309.

Yang L, Achreja A, Yeung T-L, Mangala LS, Jiang D, Han C, Baddour J, Marini JC, Ni J, Nakahara R, Wahlig S, Chiba L, Kim SH, Morse J, Pradeep S, Nagaraja AS, Haemmerle M, Kyunghee N, Derichsweiler M, Plackemeier T, Mercado-Urbe I, Lopez-Berestein G, Moss T, Ram PT, Liu J, Lu X, Mok SC, Sood AK, Nagrath D. Targeting stromal glutamine synthetase in tumors disrupts tumor microenvironment-regulated cancer cell growth. *Cell Metabolism.* 2016;24(5):685–700.

Yang Y, Wang L, Bell P, McMenamin D, He Z, White J, Yu H, Xu C, Morizono H, Musunuru K, Batshaw ML, Wilson JM. A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice. *Nat Biotechnol.* 2016;34(3):334–8.

Yang Z, Ni W, Cui C, Fang L, Xuan Y. Tenascin C is a prognostic determinant and potential cancer-associated fibroblasts marker for breast ductal carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2017;102(2):262–7.

Yang Z, Zhang C, Feng Y, Quan M, Cui Y, Xuan Y. Tenascin-C predicts poor outcomes for patients with colorectal cancer and drives cancer stemness via Hedgehog signaling pathway. *Cancer Cell Int.* 2020;20(1):122.

Yin L, Duan J-J, Bian X-W, Yu S-C. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res.* 2020;22(1):61.

Yip B. Recent advances in CRISPR/Cas9 delivery strategies. *Biomolecules.* 2020;10(6):839.

Yonebayashi S, Tajiri K, Hara M, Saito H, Suzuki N, Sakai S, Kimura T, Sato A, Sekimoto A, Fujita S, Okamoto R, Schwartz RJ, Yoshida T, Imanaka-Yoshida K. Generation of transgenic mice that conditionally overexpress Tenascin-C. *Front Immunol.* 2021;12:620541.

Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science.* 2004;95(11):866–71.

Yoshida KI, Midwood KS, Orend G. Editorial: Tenascins – key players in tissue homeostasis and defense. *Front Immunol.* 2022;12:834353.

Young JL, Hua X, Somsel H, Reichart F, Kessler H, Spatz JP. Integrin subtypes and nanoscale ligand presentation influence drug sensitivity in cancer cells. *Nano Lett.* 2020;20(2):1183–91.

Zhang Hairui, Bahamondez-Canas TF, Zhang Y, Leal J, Smyth HDC. Pegylated chitosan for nonviral aerosol and mucosal delivery of the CRISPR/cas9 system in vitro. *Mol Pharmaceutics.* 2018;15(11):4814–26.

Zhang Hairui, Zhang Y, Williams RO, Smyth HDC. Development of PEGylated chitosan/CRISPR-Cas9 dry powders for pulmonary delivery via thin-film freeze-drying. *Int. J. Pharm.* 2021;605:120831.

Zhang Huimin, Qin C, An C, Zheng X, Wen S, Chen W, Liu X, Lv Z, Yang P, Xu W, Gao W, Wu Y. Application of the CRISPR/Cas9-based gene editing technique in basic research, diagnosis, and therapy of cancer. *Mol Cancer.* 2021;20(1):126.

Zhang J, Wang Q, Wang Q, Cao J, Sun J, Zhu Z. Mechanisms of resistance to estrogen receptor modulators in ER+/HER2- advanced breast cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(4):559–72.

Zhang Q, Xu B, Hu F, Chen X, Liu X, Zhang Q, Zuo Y. Tenascin C promotes glioma cell malignant behavior and inhibits chemosensitivity to paclitaxel via activation of the PI3K/AKT signaling pathway. *J Mol Neurosci*. 2021;71(8):1636–47.

Zhao X, Li Z, Liu W, Lam W, Sun P, Kao RYT, Luk KDK, Lu WW. Octaarginine-modified chitosan as a nonviral gene delivery vector: properties and in vitro transfection efficiency. *J Nanopart Res*. 2011;13(2):693–702.

Zhdanov RI, Podobed OV, Vlassov VV. Cationic lipid-DNA complexes-lipoplexes-for gene transfer and therapy. *Bioelectrochemistry*. 2002;58(1):53–64.

Zheng H, Siddharth S, Parida S, Wu X, Sharma D. Tumor microenvironment: key players in triple negative breast cancer immunomodulation. *Cancers*. 2021;13(13):3357.

Zhu X, Su M, Tang S, Wang L, Liang X, Meng F, Hong Y, Xu Z. Synthesis of thiolated chitosan and preparation nanoparticles with sodium alginate for ocular drug delivery. *Mol Vis*. 2012;18:1973–82.

Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther*. 2008;16(6):1073–80.

Zu H, Gao D. Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *AAPS J*. 2021;23(4):78.