



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



KANSERDE DAMAR ENDOTELİNE YÖNELİK GEN TEDAVİSİ AJANLARI GELİŞTİRİLMESİ

Pınar BAYDIN

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan AKBULUT**

2011- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANSERDE DAMAR ENDOTELİNE YÖNELİK
GEN TEDAVİSİ AJANLARI GELİŞTİRİLMESİ**

Pınar BAYDIN

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan AKBULUT**

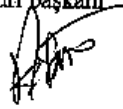
2011- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11/03/2011

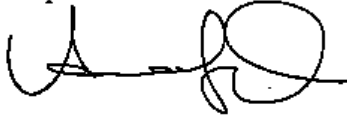
İmza

Prof. Dr. Fikri İÇLİ
Ankara Üniversitesi
Jüri başkanı



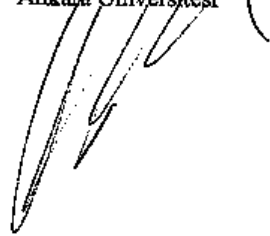
İmza

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU
Ankara Üniversitesi
Raportör



İmza

Prof. Dr. Hakan AKBULUT
Ankara Üniversitesi



İmza

Prof. Dr. Çiğdem GÜNGÖR
Ankara Üniversitesi



İmza

Prof. Dr. Uğur COŞKUN
Gazi Üniversitesi



İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Önsöz	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	v
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Anjiyogenez	1
1.1.2. Tümör Anjiyogenezi	3
1.2. Memeli Hücrelerine Gen Transferi Metodları	9
1.2.1. Adenoviral Gen Tedavisi	7
1.3. Anti-Anjiyogenik Gen Tedavisi Stratejileri	9
1.4. Tümör ya da Doku Spesifik Promotorlar	12
1.4.1. İnterselüler Adezyon Molekülü (ICAM)	13
1.4. İntihar Genleri	14
1.5. Sitokinlerin Gen Tedavisinde Kullanılması	16
2. GEREÇ ve YÖNTEM	18
2.1. Vektör Dizaynı	18
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri	18
2.1.2. pDRIVE02-ICAM2(h)v04 Vektörünün Çoğaltılması	19
2.1.3. ICAM2 Geni Promotor Bölgesinin Çoğaltılması	21
2.1.4. ICAM2 Geni Promotor Bölgesinin pCR-Blunt Vektöre Klonlanması	22
2.1.5. pCRICAM2 Plazmidinden ICAM2 Geninin Saflaştırılması	23
2.1.6. ICAM2 Geninin Shuttle Plazmide Klonlanması	24
2.1.7. pShuttleICAM2 vektörüne CD ve GM-CSF Genlerinin Klonlanması	25
2.1.8. Shuttle Plazmid ve Adenovirusun(Ad) Elektroporasyonla Birleştirilmesi	28
2.1.9. Transfeksiyon	29
2.1.10. Virus Saflaştırma	30

2.2. Kullanılan Hücre Serileri	31
2.3. TCID (Tissue Culture Infectious Dose) 50 Metodu ile Virus Titrasyonu	31
2.4. AdICAMCDIRESGM-CSF'nin <i>in vitro</i> Hücre Öldürücü Etkisinin Saptanması	32
2.4.1. MTT Testi	33
2.5. Promotor Etkinliğinin Saptanması	33
2.5.1. "Reverse" (ters) Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	33
2.5.1.1. RNA İzolasyonu	33
2.5.2.2. c-DNA Sentezi	35
2.6. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assays)	36
2.7. İstatistiksel Analiz	37
3. BULGULAR	38
3.1. AdICAMCDIRESGM-CSF Transgenik Virusun Elde Edilmesi	38
3.2. TCID50 Sonuçları	39
3.3. Elde Edilen Transgenik Virusun Tümör Hücre Serilerinde Sitotoksik Etkisi	40
3.3.1. MTT Testi Sonuçları	40
3.3.2. AdCMVCDE1A Virusunu ile Karşılaştırma	41
3.3.3. RT-PCR Yöntemiyle Hücre Serilerinde ICAM2 Varlığının Gösterilmesi	43
3.3.4. ELISA Testi Sonuçları	43
4. TARTIŞMA	45
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	48
ÖZET	49
SUMMARY	50
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	57

ÖNSÖZ

Yeni damar oluşumu anlamına gelen anjiyogenez, tümör hücrelerinin büyüüp prolifer olabilmeleri için gerekli bir işlemdir. Tümör hücrelerinin anjiyogenezle gelişimini önleyebilmek gen tedavisinin son dönemlerdeki amaçlarından biri haline gelmiştir. Bu tez çalışmasında, kanser damar endoteline spesifik bir vektör dizayn edilerek anjiyogenezin önlenmesi amaçlanmıştır.

Doktora tez çalışmam süresince gerek laboratuvar aşamasında gerekse yazım aşamasında bana yol gösteren, yardım eden ve her türlü desteği sağlayan kıymetli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Hakan AKBULUT'a;

Kendi bölümüm dışında başka bir laboratuvarında çalışma zorunluluğumu sonsuz bir anlayışla karşılayan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na;

Tıbbi Biyoloji AD'da görev yapan tüm hoca ve arkadaşlarıma;

Tıbbi Onkoloji BD Gen Tedavisi Ünitesi'nde görevli olan Nalan AKGÜN'e;

Tüm lisansüstü eğitimim ve özellikle doktora süresince manevi danışmanım, akıl hocam, canım babam Prof. Dr. Ertuğ ÖZKAL'a;

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu zorlu dönemde de beni yalnız bırakmayan, dert ortağım ablama;

Canım anneme, “Onur”um eşime ve

Yaşama sevincim, yeğenim, Nehirime sonsuz teşekkürler...

Bu tezi bitirmemi dört gözle bekleyen ama bitirdiğimi göremeyen, biricik anneannem Nevcivan Ener'in hatırasına...

SİMGELER ve KISALTMALAR

ANG	Angiopoietin (Anjiyopoetin)
bFGF	basic Fibroblast Growth factor (Bazik fibroblast büyüme faktörü)
CD	Cytosine Deaminase (sitozin deaminaz)
CMV	Cytomegalovirus (Sitomegalovirus)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik asit)
EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermal büyüme faktörü)
EPC	Endothelial Progenitor Cell (Endotel progenitör hücre)
5-FC	5-Fluorocytosine (5-fluorositozin)
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblast büyüme faktörü)
5-FU	5-Fluorouracyl (5-fluorourasil)
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor (Granulosit koloni uyarıcı faktör)
GM-CSF	Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor (Granulosit monosit koloni uyarıcı faktör)
HGF	Hepatocyte Growth Factor (Hepatosit büyüme faktörü)
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule (Hücrelerarası adezyon molekülü)
IGF	Insulin-like Growth factor (İnsülin-benzeri büyüme faktörü)
IL	Interleukin (İnterlökin)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Doku uygunluk kompleksi)
MMP	Matrix Metalloproteinase (Matriks metalloproteinaz)
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid (Mesajcı ribonükleik asit)
PDGF	Platelet-derived Growth Factor (Platelet-kaynaklı büyüme faktörü)
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (platelet endothelial cell adhesion molecule)
PF	Platelet Factor (Platelet faktör)
PlGF	Placental growth factor (Plasental büyüme faktörü)
rAAV	Recombinant Adeno-Associated Virus (Rekombinant adeno-ilişkili virus)
TCID	Tissue Culture Infectious Dose (Doku kültürü enfeksiyon dozu)
TGF	Transforme Growth Factor (Transforme edici büyüme faktörü)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Tümör nekrozis faktör)

TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related apoptosis Inducing Ligand (Tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand)
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (Doku metalloproteinaz inhibitörü)
VE	Vasküler endotelyal
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler endotelyal büyüme faktörü)
VEGFR	Vascular Endothelial growth Factor Receptor (Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü)

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	pDRIVE02-ICAM2(h)v04 haritası	19
Şekil 2.2.	pCRICAM2 plazmidinin NotI/XhoI enzimleri ile kesilmesi sonucu elde edilen ICAM2 promotor bölgesinin jel elektroforezi görüntüsü	23
Şekil 2.3.	pshICAM2 vektörünün NotI/XhoI enzimleriyle kesilmesiyle elde edilen ürünün agaroz jel elektroforezi görüntüsü	25
Şekil 2.4.	pshLpCDIRESGM-CSF plazmidinin XhoI/Bgl II enzimleriyle kesimi sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	25
Şekil 2.5.	pshICAM2 vektörünün XhoI/Bgl II enzimleriyle kesimi sonucu elde edilen ürünün agaroz jel elektroforezi görüntüsü	26
Şekil 2.6.	pshICAM2CDIRESGM-CSF plazmidinin ICAM ve GMCSF primerleri ile PCR'ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü	27
Şekil 2.7.	pAdEasy-1 ve shuttle vektör arasında gerçekleşen homolog rekombinasyon.	28
Şekil 2.8.	pshICAM2CDIRESGM-CSF vektörünün PmeI enzimi ile kesimi sonucu elde edilen ürünün agaroz jel elektroforezi görüntüsü	29
Şekil 3.1.	pDRIVE02-ICAM2(h)v04, pCR-Blunt, pShuttle, pShuttle-CMV ve pAdEasy-1 vektör haritaları	39
Şekil 3.2.	HUVEC, primer mide kanseri, HT-29 ve MCF-7 hücre serilerinde AdICAM <i>in vitro</i> sitotoksik etkileri.	41
Şekil 3.3.	HUVEC hücre serisinde ICAM ve CMV promotorları taşıyan virusların <i>in vitro</i> sitotoksik etkileri.	42
Şekil 3.4.	Primer mide kanseri hücre serisinde ICAM ve CMV promotorları taşıyan virusların <i>in vitro</i> sitotoksik etkileri.	42
Şekil 3.5.	ICAM2 PCR'ı sonrası agaroz jel görüntüsü	43

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Gen dağıtım vektörleri	7
Çizelge 1.2. Gen tedavisinde kullanılan hedef genler	11
Çizelge 1.3. Rodent modellerinde antianjiyogenik kanser gen tedavisi örnekleri	12
Çizelge 3.1. ELISA sonuçları.	44

1. GİRİŞ

1.1 Anjiyogenez

Anjiyogenez kelime anlamı olarak yeni kapiller damarların oluşumu demektir (Angio: damar, genesis: oluşma, gelişim) (Tandle ve ark., 2004). *C. elegans*'ta ve *Drosophila melanogaster*'de oksijenin difüzyonla tüm vücut hücrelerine taşınma süreci, canlılarda vücut hacminin gelişmesiyle birlikte yerini, kanın vasküler bir ağ aracılığıyla taşınma bırakmıştır. 1661 yılında Marcello Malphighi kapilleri, yine aynı yıllarda Caspar Aselius lenfatik damarları tanımlamışlardır. Kan damarları, evrim süresince uzak organlara oksijen taşımak amacıyla gelişmiştir. Bu damarlar embriyoda organ gelişimi, yetişkinlerde hasarlı dokuların tamirinden sorumludur. Embriyoda, kan damarları gelişen organlara oksijen ve besin taşımakla birlikte organ morfogenezini ile ilgili bir takım sinyalleri de sağlar. Kan damarlarının gelişimindeki bir bozukluk çok fazla sayıda hastalığa neden olabilir (Carmeliet, 2005).

Vücudumuzdaki her hücre kapillere 100-200 μ 'luk mesafe uzaklıktadır. Bu uzaklık oksijenin hücre içine difüze olabileceği maksimum mesafedir. Kapiller, yaklaşık 8-20 μ çapında, mikrovasküler ağın en küçük ve en basit birimidir. Kapillerin çok farklı çeşitleri ve bu çeşitlerin her birinin özelleşmiş fonksiyonları olsa da, hepsi bazal membranla çevrili endotel hücrelerinden ve onları çevreleyen bir ya da iki sıra perisit tabakasından oluşurlar. Endotel hücreleri metabolik olarak aktif hücrelerdir. Adezyon molekülleri, büyüme faktörleri, sitokinler ve vazoaktif peptidler üretebilirler. Nadir olarak (yaklaşık üç yılda bir) bölünürler (Polverini, 2002).

Hematopoetik hücreler ve endotel hücreleri “hemangioblast” adı verilen ortak bir progenitörden köken alırlar. Bu geçici hücre basamağı embriyonik gelişimin erken aşamalarında görülür, sonra hemen kaybolur. Hemangioblastların gelişimi vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü-2 (VEGFR-2)'ne bağlıdır (Ribatti, 2004). Öncü hücreler “vaskülogenezis” adı verilen işlemle birleşerek küçük kapilleri oluştururlar. Bu aşamada arter ve venler de şekillenir. Anjiyogenez süresince, damarlar daha

küçük damarlara ayrılarak daha karmaşık bir hal alır. Olgunlaşmamış endotel hücre kanalları perisit ve düz kas hücreleriyle kaplanarak damarın esnekliği ve damar perfüzyonunun düzenlenmesi sağlanır; ki bu işlemler de “arteriyogenez” olarak adlandırılır (Carmeliet, 2005).

Endotel progenitör hücreler (EPC) kemik iliğinden köken alırlar ve yetişkinlerde yeni damar oluşumuna katılırlar. Dolaşımdaki EPC’lerin büyük çoğunluğu kemik iliğinde, hematopoetik kök hücre ve kemik iliği stromasıyla yakın ilişkidir. EPC’ler proliferere olabilirler, göç edebilirler ve endotel hücre soyundan farklı hücrelere farklılaşabilirler; ama olgun endotel hücrelerin özelliklerine sahip değildirler. Dolaşımdaki endotel hücreler dolaşımdaki EPC’lerden farklı olarak vasküler hasar sonrası rasgele şekilde damar dışına çıkarlar ve dolaşıma katılırlar. Ayrıca, EPC’ler anjiyojenik faktörlere maruz kaldığında yüksek proliferasyon kapasitesiyle endotel kolonilerini oluştururlar. Oysa olgun endotel hücreleri sınırlı proliferasyon kapasitesine sahiptirler (Ribatti, 2004).

Doğumdan hemen sonra, anjiyogenezle organ gelişimi devam eder, fakat ergenliğe ulaşıldığında çoğu kan damarı sessiz kalır; anjiyogenez sadece ovaryum ve hamilelik süresince plasentada görülür (Carmeliet, 2005). EPC’ler, kemik iliğinden kan dolaşımına doku iskemisi, vasküler travma veya tümör gelişimi süresince yönlendirilebilirler (Ribatti, 2004). Endotel hücreleri, kan damarlarında hipoksi, lenflerde inflamasyon, yara iyileşmesi ve tamiri gibi bir reaksiyon görülene kadar bölünme yeteneklerini saklı tutarlar. Bu süre zarfında anjiyogenez inhibitörleri ve uyarıcıları arasındaki denge korunur. Malign oluşumlar, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar, obezite, astım, bakteriyel enfeksiyonlar, diyabet, siroz, endometriozis ve AIDS gibi pek çok hastalıkta bu denge ortadan kalkar (Carmeliet, 2005). Uyarıcılar büyüme faktörleri, matriks ve adezyon molekülleri, farklılaşma/özelleşme sinyalleri, kemoatraktanlar ve yeni damar oluşumundan sorumlu enzim sistemlerinden herhangi biri olabilir. İnhibitörler ise, endotel hücre proliferasyonunu, sinyal iletimini, hücre migrasyonunu, matriks metalloproteinaz ekspresyonunu ve endotel hücre öncülerinin gelişimini inhibe etmek suretiyle fonksiyon gösterirler (Polverini, 2002).

1.1.2 Tümör Anjiyogenezi

Tümör hücreleri karsinojenik etkiyle maliyn potansiyel kazanıp kontrolsüz çoğalmaya başlayana kadar oldukça uzun ve sessiz bir dönem geçirirler. Bu dönemden sonra özellikle damarlanmayla birlikte tümörlerde hızlı bir progresyon dönemi başlar. Tümör hücreleri kapiller damarlar etrafında oksijenin difüzyon mesafesi olan 200-300 mikron mesafeye kadar dizilirler. Bulundukları dokuda yeni damar oluşumuna gerek duymadan ancak 2-3 mm büyüklüğe kadar ulaşabilirler (Hart, 2001; Folkman, 2006). Daha fazla büyüebilmeleri için yeni damar oluşumuna gereksinim vardır. Yeni damar gelişimi olmayan tümörler asemptomatik lezyonlar olarak kalır. Tümörler çok sayıda anjiyogenik faktör (epidermal büyüme faktörü; EGF, fibroblast büyüme faktörü-1, -2, -3, -4; FGF-1, -2, -3, -4, granulosit koloni uyarıcı faktör; G-CSF, interlökin-8; IL-8, hepatosit büyüme faktörü; HGF, transforme edici büyüme faktör-a, -b; TGF-a, -b, vasküler-endotelyal büyüme faktörü; VEGF gibi) salgılar ve bunların çoğu komşu küçük damarlara difüze olarak endotel hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlanır ve sonuçta yeni damar oluşumu ile sonuçlanacak olaylar dizisini aktive ederler (Folkman, 2006; Liu ve Deisseroth, 2006). Endotel hücre aktivasyonunun yanı sıra tümör hücreleri: i- matriksi eritici enzimleri ile endotel hücrelerinin invazyonunu kolaylaştırır, ii- salgıladıkları bir takım kemotaktik faktörlerle ilave anjiyogenik faktör salgılayabilecek olan makrofajları ve mast hücrelerini kendilerine çekerler ve iii- stromadaki fibroblastları proanjiyogenik moleküller yapmalarını uyarmak suretiyle de anjiyogenezi hızlandırırlar (Folkman, 2002).

Tümör anjiyogenezi EPC'lerin mobilizasyonu ve fonksiyon kazanmaları ile başlar. Kansere hastalarının dolaşımdaki EPC frekansı artmıştır. Tümör hücrelerince üretilen yüksek miktardaki VEGF periferel dolaşımdaki kemik iliği kökenli hücrelerin mobilizasyonuna neden olur ve onların tümör vaskülerine doğru yönelmesini artırır (Ribatti, 2004). Endotel hücrelerinin aktivasyonunda esas rolü oynayan, anjiyogenezin oluşumunu sağlayan ana faktör pek çok insan kanserinde normalden fazla eksprese olduğu gösterilmiş olan VEGF'dür. VEGF molekül ailesi ligandları [VEGF-A (VEGF), VEGF-B, -C, -D, -E (VEGF-E memeli hücrelerinde bulunmaz),

ve plasental büyüme faktörü (PlGF)-1 ve -2] damar ve lenfatiklerdeki endotel hücreleri üzerinde bulunan reseptörlerine bağlanırlar (Bruns ve ark., 2000; Inoue ve ark., 2000). VEGFA geni alternatif splicing ile farklı proteinleri kodlayabilir. VEGFA proteinleri endotel hücrelerce eksprese edilen VEGFR-2 tirozin kinaz yoluyla kapiller geçirgenliği ve endotel hücre proliferasyonunu artırır. Bazı tümör hücreleri VEGFR-1 veya VEGFR-2 de eksprese edebilir, böylece VEGF ler ek olarak otokrin faktörler gibi de davranabilirler (Schulz, 2005). Reseptör tirozin kinaz grubunda yer alan ve VEGF ligandlarını bağlayan başlıca 3 VEGF reseptörü tanımlanmıştır. VEGFR-1 (Flt-1) endotel hücreleri ile bazı tümör hücrelerinde eksprese edilir ve esas olarak VEGF'nin endotel migrasyonunu uyarıcı etkisine aracılık eder. VEGFR-2 (KDR, FLK-1) endotel hücreleri, primitif hematopoietik kök hücreler ve bazı tümör hücreleri ile az sayıda erişkin hücresinde eksprese edilir ve VEGF ligandlarının (VEGF, VEGF-C ve VEGF-D) endotel hücrelerinin proliferasyonu, sağ kalımı ve damar geçirgenliği etkilerine aracılık eder. VEGFR-3 (Flt-4) esas olarak VEGF-C ve VEGF-D yi bağlar, lenfatik ve tümör endotel hücrelerinde eksprese edilir ve lenfajiyogenezin gelişmesinden sorumludur. Tümör anjiyogenezinde başlıca sorumlu VEGFR-2 aracılı sinyal iletim yoludur. VEGFR-2 nin bloke edilmesi hücre proliferasyonu, migrasyonu ve sağkalımını ve damar permeabilitesini azaltmaktadır (Bruns ve ark., 2000; Inoue ve ark., 2000). VEGFR-1 (Flt-1) in tümör anjiyogenezinin yanı sıra tümör hücrelerinin proliferasyonu, invazyonu ve metastazında da rol oynaması nedeniyle kanser tedavisinde önemli hedefler arasında yer almaktadır (Kaliberoy ve ark., 2004).

Normal hücreler anjiyogenik değildirler, çünkü normalde az miktarda anjiyogenik faktör salgılayabilirken daha fazla miktarlarda anjiyogenez inhibitörleri (anjiostatin, interferonlar, interlökin -1, -12, retinoik asit, protamin, platelet faktör 4;PF4, trombospondin-1, doku metalloproteinaz inhibitörü; TIMP gibi) salgırlar (Ribatti, 2004). Dolayısıyla normal bir hücrenin maliyn transformasyona uğrarken aynı zamanda anjiyogenik fenotip kazanması da gerekmektedir. Aniyogenez olayında önemli rol oynayan endotel hücreleri ise salgıladıkları bazı büyüme faktörleri (ör. Bazik fibroblast büyüme faktörü; bFGF, granulosit-stimüle edici faktör;G-CSF, platelet-kaynaklı büyüme faktörü, PDGF, insülin-benzeri büyüme faktörü;IGF,

heparin-bağlayıcı epidermal büyüme faktörü benzeri büyüme faktörü gibi) vasıtasıyla kendi aktivasyonlarını arttırırken aynı zamanda bu faktörler tümör hücreleri için de parakrin büyüme faktörleri olarak rol oynar. Maliyn transformasyonda anjiyogenik özelliklerin kazanılmasında pek çok hücrede onkogenler rol oynamaktadır. Onkogenlerin en belirgin etkisi tümör hücrelerinde anjiyogenik faktörlerin yapımlarını ve salgılanmalarını uyarmalarıdır (ör. H-ras – G-CSF, IGF-1, VEGF, N-ras – TNF-a [tümör nekrozis faktör-a], G-CSF, v-src – VEGF gibi) (Yu ve ark., 2004; Arbiser, 2004). Bazı aktive olmuş onkogenler (RAS ailesi gibi) VEGF ekspresyonunu uyarır. Tümörlerde VEGFA ekspresyonunun artışı pek çok genetik ve epigenetik olayın sonucu olabilir. Bunun tersine, TP53 VEGFA ve diğer pek çok pro-anjiyogenik faktörü “down-regüle” eder ve anti-anjiyogenik faktörlerin ekspresyonunu arttırır. RAS mutasyonları ve TP53 fonksiyon kaybı gibi insan kanserlerinde görülen pek çok değişimin VEGFA ekspresyonunu ve anjiyogenezi arttırdığı düşünülmektedir (Schulz, 2005).

Anjiyogenez normal kapillerin uzamasıyla başlar, geçirgen duruma gelir ve böylece fibrinojen gibi plazma proteinleri perivasküler boşluğa geçer. Bu durum, perivasküler hücrelerin (perisitlerin) doku içine göç etmekte kullandıkları matriksin yıkımına neden olur. Bununla birlikte, damarı çevreleyen bazal membran da yıkılır. Bu yıkımda aktif endotel hücrelerden ve stromadan salınan matriks metalloproteinazları (MMP) etkilidir. Sonra endotel hücreler proliferer olur ve kapiller çevre doku içine doğru damarlanır. Normal anjiyogenez sırasında endotel hücrelerinin proliferasyonu geçicidir ama tümör anjiyogenezinde kalıcıdır. Ayrıca, normal anjiyogenez süresince, yeni oluşan kapiller perisitlerle ve bir kere daha vasküler bazal membranla kaplanır, fakat anjiyogenezin bu bölümü tümör anjiyogenezinde tamamlanmaz. Tümör kapillerlerinin şekilleri ve oryantasyonları düzensizdir (Schulz, 2005).

Normal ve tümör anjiyogenezi arasındaki ikinci fark büyüme faktörlerinden kaynaklanır. Pek çok tümörün normal dokularda olduğu gibi anjiyogenezi uyarmak üzere büyüme faktörlerinin benzer dengeli karışımını sağlayamadığı düşünülür. Tümörler değişik miktarlarda FGF, EGF benzeri faktörler, PDGF, anjiyopoetinler (ANG-1 ve ANG-2) ve IL-8 gibi sitokinler salgırlar. Bu faktörler kapiller

oluşumunu ve endotel hücre proliferasyonunu uyarırlar. Tümör hücreleri yine bazı durumlarda bu faktörleri salgılamak yerine bunların stromal hücrelerden sentez ve salınımını uyarırlar. Özellikle inflamatuvar hücreler anjiyogenezin ilerlemesini sağlayan prostoglandinler üretirler (Schulz, 2005).

Tüm bunlara ilaveten, tümör ilişkili makrofajlar da anjiyogenez ve anjiyogenez kaskadının her bir basamağında görev alarak tümör gelişimine katkıda bulunurlar. Aktivasyon basamaklarına göre makrofajlar Tip I (M1) veya Tip II (M2) olmak üzere sınıflandırılabilirler. M1, proinflamatuvar sitokin üretilir, çok sayıda doku uygunluk kompleksi (MHC molekülü) eksprese ederek tümör hücrelerini öldürürken; M2, inflamatuvar cevabı azaltır, hücre atıklarını uzaklaştırır ve anjiyogenezin tetiklenmesini engeller. Bu tip makrofajlara tümör-assosiyasyon makrofajları (TAM) da denilmektedir (Lamagna ve ark., 2006). Sonuç olarak anjiyogenez gelişiminde tümör mikroçevresi de oldukça önemlidir.

1.2. Memeli Hücrelerine Gen Transferi Metodları

Kanserin aslında genetik temelli bir hastalık olduğunun ortaya konması ile birlikte özellikle hastalığın patogenezinde önemli rol oynayan moleküler genetik süreçlerin aydınlatılmaya başlanması aynı zamanda bu hastalığa karşı yeni tedavi stratejilerinin de geliştirilmesi sürecini beraberinde getirmiştir. Bu yeni tedavi stratejilerden bir tanesi de gen tedavisidir. Gen tedavisinin esas amacı, tedavi edici etkiyi yaratmak üzere genetik materyalin hücrelere transfer edilmesidir. Gen tedavisinin temel ilkesi “tamir etme” veya “yerine koyma”dır. Fonksiyonu bozulmuş hücresel genin ekspresyonunu değiştirme “tamir etme” ilkesini tanımlarken; fonksiyonunu kaybetmiş bir genin yeniden hücre içerisine yerleştirilmesi ise “yerine koyma” ilkesini tanımlamaktadır (Brenner, 2005). Günümüzde gen tedavisi çalışmaları başlıca onkogen ekspresyonunu baskılamaya, eksik olan tümör baskılayıcı gen aktivitesini yerine koymaya, immün sistemi uyarmaya, tümör damar endotelini ortadan kaldırmaya ve dışarıdan verilen ilaçlara karşı tümör hücre duyarlılığını arttırmaya (intihar genleri) yönelik olarak yapılmaktadır.

Genlerin hedefe ulaştırılmasında kullanılan araçlara “vektör” adı verilmektedir. Gen dağıtım vektörlerini viral vektörler, non-viral vektörler ve hücre tedavileri olarak başlıca 3 ana grupta toplayabiliriz (Çizelge 1.1) (Akbulut, 2007).

Çizelge 1.1. Gen dağıtım vektörleri

Viral vektörler retrovirüsler adenovirüsler adeno assosiye virüsler diğer virüsler
Non-viral vektörler çıplak DNA lipozomlar paketlenmiş DNA işlenmiş DNA partikülleri
Hücre tedavileri hematopoietik kök hücreler mezankimal kök hücreler nöronal kök hücreler embryonik kök hücreler

1.2.1 Adenoviral Gen Tedavisi

Adenovirusları gen tedavisi için uygun kılan pek çok özellik vardır: a- Yaygındırlar; 100’den fazla farklı türden izole edilebilmişlerdir. Bunların 43 tanesi de insandandır. Pek çok yetişkin, gen tedavisinde kullanılan adenoviruslara (serotip 2 ve 5) maruz kalmıştır. b- Adenoviral vektörler hızlı bir şekilde çok farklı tipte insan hücrelerini enfekte edebilirler. Gen transfer düzeyleri diğer vektörlerle karşılaştırıldığında oldukça yüksektir. c- Adenoviral vektörlerin insanlardaki patojenitesi düşüktür; soğuk algınlığı benzeri hafif belirtiler gösterir. d- Büyük DNA segmentleri barındırabilirler (7,5 kilobaz çiftine kadar) ve bu transgenlerin proliferasyon yapmayan hücrelerde ifadesini sağlayabilirler. e- Viral genom yeniden düzenlenmelere sıkça girmez ve böylece vektöre verilen yabancı genler başarılı viral replikasyonlar süresince değişmeden kalır. f- Rekombinant DNA teknikleri kullanarak manipüle edilebilmeleri kolaydır (Vorbürger ve Hunt, 2002).

Adenoviruslar 36 kb'lık, çift zincirli, lineer, DNA viruslarıdır. Çekirdeğe girdikten sonra, hızlı bir şekilde erken bölge 1'deki genleri (E1a ve E1b) transkribe edilir. Viral replikasyonun erken fazı süresince, genomda dört bölgede (E1, E2, E3 ve E4) ekspresyon gerçekleşir (Vorbürger ve Hunt, 2002). E1a geni ürünü Ad genlerini uyarır, hücre döngüsü düzenini bozar ve hücreyi G₀'dan S fazına geçirir. E1b bölgesi hücrel apoptozu inhibe etmekten; E3 Ad ile enfekte hücreleri immün sistemin yıkımından korumaktan sorumlu iken E4 bölgesi Ad replikasyonu ve geç mRNA olgunlaşması için gereklidir (Doronin ve ark., 2001). Virusun kendisi tarafından kodlanan fonksiyonlar cis ve trans elementleri olarak iki bölüme ayrılabilir. Replikasyon orijininin sorumlu veya DNA'yı kondanase eden paketlenme sinyali (protein IX, Ψ) gibi cis genler virusun kendisi tarafından taşınmalıdır. Trans genlerse yabancı genlerle yer değiştirebilir kabul edilen bölgelerdir (Vorbürger ve Hunt, 2002).

Yardımcı bir başka virusa bağımlı olmayan virus oluşturmak için viral genomun en az üç bölgesi DNA insersiyon ya da substitusyonlarını kabul eder: E1, E3 ve E4 ile genomun sonu arasında küçük bir bölge. İlk kuşak vektörlerinde, E1 bölgesi çıkarılarak yerine bir transgen yerleştirildiğinde kalan viral genlerde E1 gen ürünü olmasa da düşük düzeyde bir transkripsiyon görülmüştür. Bu genlerin transkripsiyonu konakçının erken doğal sitokin transkripsiyonunu uyarır ve antijen bağımlı immün cevap oluşur. Sonuçta uyarılan immün sistem hücrelerince gen aktarımı gerçekleştirilmiş hücreler yok edilir. Bu kuvvetli immün cevap erken adenoviral gen tedavisini engeller. Günümüzün ikinci ve üçüncü kuşak adenoviral vektörleri E1, E2 ve E4 genlerinde farklı delesyonlar içermektedir çünkü bu DNA dizilerince kodlanan viral proteinler konakçının immün sistemini uyarmaktadır. Bu yeni vektörler daha az toksiktir ve gen ekspresyon süreleri daha uzundur (Vorbürger ve Hunt, 2002).

Adenoviral vektörler taşıdıkları genleri konakçı çekirdeğine taşırlar fakat onları konakçının genomuna entegre etmezler. Bu sayede hücrel genler çok az ihtimalle zarar görür. Diğer taraftan, adenoviral vektör uygulaması gen tedavisini sadece geçici protein ekspresyonu gerektiren durumlarla sınırlandırır. Çünkü viral DNA genellikle kaybolur (Vorbürger ve Hunt, 2002).

Preklinik çalışmalar, adenoviral vektör DNA'sının karaciğer, iskelet kası, kalp, beyin, akciğer, pankreas ve tümör dokusunda eksprese olduğunu göstermiştir. Adenovirus intravenöz verildiğinde ise pek çoğunun karaciğerde biriktiği saptanmıştır (Vorbürger ve Hunt, 2002). Bu nedenle sadece tümör hücrelerinde replike olan adenovirüsler oluşturabilmek için 2 farklı yöntem kullanılmaktadır: i- Normal hücreler içinde etkili olan ama viral hücreler içinde etkili olmayan viral replikasyon için gerekli kritik genleri delete etmek. ii- E1a gen ürününün ekspresyonunu sadece tümör dokusuyla sınırlandırmak amacıyla tümör veya doku spesifik promotorlar kullanmak (Heise ve Kirn, 2000). Sadece tümör hücreleri içinde spesifik replikasyon sağlamak amacıyla genellikle E1 genleri üzerinde oynamalar yapılır. Çünkü E1 genleri konakçı hücrenin enfekte edilmesinden sonra eksprese edilen, adenoviral replikasyon için kilit düzenleyici ilk viral genlerdir. E1 proteinleri diğer viral genlerin ekspresyonunu tetikler, viral replikasyonu kolaylaştıran hücresel gen ekspresyonunu ve protein aktivitesini düzenlerler. Tümörle sınırlandırılmış replikasyon için E1 genlerinde; i- parsiyel ya da komple delesyonlar oluşturulur, ii- promotor bölgesi yerine tümör spesifik promotorlar yerleştirilir (Nettelbeck, 2003). Rekombinant adenoviruslar oluşturulurken genellikle kullanılan metod memeli hücreleri içinde homolog rekombinasyondur. Memeli hücreleri dışında *Escherichia coli* içinde de homolog rekombinasyon gerçekleştirilebilir. Homolog rekombinasyon, sadece kaybettikleri gen ürününü (ör. E1) sağlayan hücreler (ör. HEK-293 böbrek epitelyum hücreleri) içinde replike olabilen defektif adenovirus oluşumuyla sonuçlanır (He ve ark., 1998).

1.3. Anti-Anjiyogenik Gen Tedavisi Stratejileri

Anjiyogenezin tedavide kullanılması fikri son derece çekicidir çünkü anjiyogenezde proliferen olan hücrelerin büyük çoğunluğu genomik instabilitesi olmayan normal endotel hücreleridir. Bu yüzden diğer kanser hücreleriyle karşılaştırıldığında tedaviye direnç geliştirme oranları daha düşüktür (Schulz, 2005). Anjiyogenez kanser hastalığının klinik hale geçmesinde ve hastalığın prognozunda son derece önemli rol oynaması nedeniyle de tedavi stratejilerinde de önemli bir hedef haline

gelmiştir. Günümüzde VEGF'yi bağlayan antikorlar (Bevacuzimab) ve anjiyogeneze rol oynayan reseptör tirozin kinazların baskılanmasını hedefleyen küçük moleküllü ilaçlar (Erlotinib, Sunitinib) ruhsat alarak klinikte kullanılmaya başlanmıştır. Her iki yaklaşımda tek başlarına kullanıldıklarında pek etkili olmasalar da klasik kemoterapiye eklendiklerinde hastalarda tedavi başarısını bir miktar arttırmaktadırlar (Wanebo ve ark., 2006).

Anjiyogeneze sürecinde rol oynayan genlerin ve proteinlerin hedef alınması ile ortaya çıkan antianjiyogenik gen tedavisi stratejileri başlıca 2 noktada yoğunlaşmaktadır. Bunlardan birincisi doğrudan endotel hücrelerini hedefleyerek anjiyogeninin baskılanması, ikincisi ise tümör hücrelerinin hedeflenerek onların proanjiyogenik maddeler salgılamasını engelleme stratejileridir. Birinci stratejide tedavi ajanları (endostatin, anjiostatin, trombospondin-1 vb) endotel hücre proliferasyonunu, migrasyonunu, tüp oluşumunu inhibe ederek endotel hücre apoptozunu uyarırlar (Rege ve ark., 2005; Sridhar ve Shepherd, 2003). Endotel hücreler tümör hücrelerine göre daha kararlı bir yapıda oldukları için burada direnç gelişimi söz konusu olmaz. İndirekt inhibitörler, tümör hücrelerini hedef alırlar. Anjiyogenik büyüme faktörlerinin ve reseptörlerinin ekspresyonunu önlerler. Tümör hücreleri hedef alındığı için ve tümör hücreleri de kararlı bir yapıda olmadığı için burada direnç gelişimine hassasiyet vardır. (Örneğin interferon alfa, tirozin kinaz reseptörlerinin inhibitörleri gibi) (Tandle ve ark., 2004).

Anjiyogenik proteinlerin tedavi amacıyla verilmesi için 2 farklı gen tedavi stratejisi geliştirilmiştir (Gyorffy ve ark., 2005):

Sistemik gen tedavisi: Vektörler hastaya enjekte edilerek dolaşımda yüksek düzeyde anjiyogenik inhibitörlerin olması sağlanır (Folkman, 1998). Viral vektörlerin kullanımı sırasında vektörlerin sistemik dağıtımıyla oluşabilecek toksisite istenmeyen bir yan etkidir (Gyorffy ve ark., 2005).

Lokal, tümör hedefli anti-anjiyogenik gen tedavisi: Tümör çevresinde anti-anjiyogenik protein düzeyini arttırmayı amaçlar (Kong ve Crystal, 1998). Bu

uygulama tümör içinde yüksek protein düzeyinin oluşmasını sağlar ve protein ya da vektörün biyolojik özelliğinden dolayı sistemik toksisite yaratabilir. Fakat burada da vektör hedefe ulaşamayabilir (Gyorffy ve ark., 2005).

Antianjiyogenik gen tedavisinde kullanılan bir takım hedef genler söz konusudur (Çizelge 1.2)

Çizelge1.2. Gen tedavisinde kullanılan hedef genler

Anjiyogenik Faktörler	Anti-anjiyogenik Faktörler
Vasküler endotel büyüme faktörü	Trombospondin-1 ve -2
Fibroblast büyüme faktörü (FGF)	Endostatin
Transföme edici büyüme faktörü	Angiostatin
Platelet-kaynaklı büyüme faktörü	Interferon- α , - β
Hepatosit büyüme faktörü (HGF)	Interlökin -12
Tümör Nekrosis Faktör (TNF- α)	Platelet Faktör -4 fragmanı
Epidermal Büyüme faktörü (EGF)	Anjiopoetin-2
Plasental büyüme faktörü	Human macrophage metalloelastase
Doku faktörü	TIMP-1 ve -2
Interlökin -6 (IL-6)	VEGF
Interlökin -8 (IL-8)	Vazostatin
Anjiopoetin-1	Anti-thrombin III fragmanı

Anti-anjiyogenik gen tedavisinde kullanılan genler plazmid veya çıplak DNA gibi non-viral yollarla verilebileceği gibi, adeno-virus, adeno-ilişkili virus, retroonkovirus ve lentivirus gibi viral stratejiler kullanılarak da verilebilir. Bu

şekilde rodentler üzerinde yapılmış pek çok çalışma mevcuttur (Çizelge 1.3) (Gyorffy ve ark., 2005).

Çizelge 1.3. Rodent modellerinde antianjiyogenik kanser gen tedavisi örnekleri (Gyorffy ve ark., 2005).

Vektör	Gen	Referans
Plazmid	Endostatin Anjiyostatin	Blezinger ve ark., 1999 Chen ve ark., 1999; Sacco ve ark., 2000
Plazmid transfekte edilen hücreler	Endostatin, anjiyostatin Trombospondin	Cao ve ark., 1998 Hill ve ark., 2003
Endotelial öncü kök hücre	Çözünebilir VEGFR2	Davidoff ve ark., 2001
Adenovirus	Anjiyostatin IL-12 Endostatin Çözünebilir VEGFR1 Çözünebilir VEGFR2 TIE-2 TIMP	Stewart ve ark., 1997 Gyorffy ve ark., 2001 Tahara ve ark., 1995 Kuo ve ark., 2001 Wen ve ark., 2001 Calvo ve ark., 2002 Rigg ve ark., 2001
Adeno-ilişkili virus	VEGF antisense Anjiyostatin Çözünebilir VEGFR1	Nguyen ve ark., 1998 Ma ve ark., 2002 Davidoff ve ark., 2002
Lentivirus/kök hücreler	(Tie2/Tek) promotor/timidin kinaz	De Palma ve ark., 2003
MMLV (moleney murine leukemia virus)	Endostatin, anjiyostatin Platelet faktör 4(PF 4) Dominant negatif Flk-1	Scappaticci ve ark., 2001 Tanaka ve ark., 1997 Machein ve ark., 1999

Tümör hücreleri ile tümör endotelinin karşılıklı etkileşimi hem lokal tümör büyümesinde hem de metastazda önemli bir süreçtir. Dolayısıyla her ikisinin birden hedeflenmesi tedavinin daha başarılı olabileceği düşüncesini akla getirmektedir.

1.4. Tümör ya da Doku Spesifik Promotorlar

Kanser gen tedavisinde transkripsiyonel yönlendirme özellikle tedavi toksisitesinin azaltılması ve tümöre spesifik etkinliğin artırılmasında son derece önemlidir. Transkribe edilecek gen dizisinin önünde promotor geni yer almalıdır. Tümör ya da organ spesifik promotorların kullanımının (karsinoembriyonik antijen, prostat

spesifik antijen gibi) hayvan modelleri üzerinde başarılı olduğu gösterilmiştir. Promotorlar için sınırlandırıcı faktör, hedef tümör ya da organ dokusu tarafından eksprese edilecek spesifik bir antijenin varlığıdır (Vorbürger ve Hunt, 2002).

Endotel hücrelerine spesifik promotorların kullanılması ile hem tümör damar endoteline hem de bir çok tümörde tümör hücrelerine spesifik gen ekspresyonu elde edilmesi mümkün olabilmektedir (Work ve ark., 2004; Everts ve ark., 2005).

1.4.1. İnterselüler Adezyon Molekülü (ICAM)

Endotel hücre bağlantıları endotel bütünlüğünün devam ettirilmesi, dokulara olan hücre girişinin düzenlenmesi, endotel hücre yaşamının devam ettirilmesinde son derece önemlidir. Endotel hücre bağlantılarında yer alan vasküler endotelyal (VE)-kaderin ve CD31/PECAM (platelet endothelial cell adhesion molecule) gibi adezyon molekülleri endotel hücreleri arasındaki bağlantıyı sağlar ve aynı zamanda anjiyogenezin regülasyonunda rol oynar. İmmünglobulin süper gen ailesinin bir üyesi olan interselüler adezyon molekülü-2 (ICAM-2) endotel hücre bağlantılarında eksprese edilir. Çalışmalar ICAM-2 nin lökosit migrasyonunda uyarılara spesifik bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (Huang ve ark., 2005).

Endotel hücrelerinde ICAM-2 ekspresyonu endotel-endotel hücre teması ve büyüme faktörleri ile düzenlenmektedir. Bunun yanı sıra trombospondin, VE-kaderin gibi anjiyogenezde rol oynayan proteinlerin regülasyonunda rol oynayan Erg transkripsiyon faktörünün ICAM-2 ekspresyonunda da etkili olması ICAM-2 nin anjiyogenezde önemli rol oynadığını düşündürmektedir (McLaughlin ve ark., 1999; McLaughlin ve ark., 2001; Gory ve ark., 1998; Huang ve ark., 2005).

ICAM-2 lenfositler ve monositler üzerinde eksprese edilse de (Xu ve ark., 1992) erişkin dokulardaki ekspresyonu genellikle damar endotel hücreleri ve megakaryositler ile sınırlıdır. Dolayısıyla ICAM-2 promotoru ile regüle edilen vektörler genellikle endotel hücrelerinde spesifik ekspresyon göstermektedirler (Richardson ve ark., 2004; Cowan ve ark., 2003). İnsan ICAM-2 promotoru, in vivo

endotel spesifik transgen ekspresyonu için küçük bir bölgede (<350 bp) tüm gerekli sinyalleri içerir (Cowan ve ark., 1998). Endotele spesifik olması olası olan çok sayıda promotor ile yapılan bir çalışmada Flt-1 ve ICAM-2 promotorları ile elde edilen transgen ekspresyonunun en fazla olduğu ve bunun da Sitomegalovirus (CMV) promotoru ile elde edilene eşdeğer olduğu bulunmuştur (Nicklin ve ark., 2001). Bütün bu çalışmalar ICAM-2 promotorlarının endotel hücrelerine spesifik gen tedavisi çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir.

1.5. İntihar Genleri

İntihar genleri olarak adlandırılan ve memeli hücrelerinde bulunmayan ancak bu hücrelere yerleştirildiğinde normal hücreler için toksik olmayan ilaçları metabolize ederek bunları sitotoksik ajanlara dönüştüren gen tedavileri doğrudan sitotoksik bir etkiyi amaçladığı için gen tedavisi yöntemleri arasında en fazla umut vaadeden yöntem gibi görünmektedir. Bazı bakteri ve mantarlarda bulunan sitozin deaminaz (CD) geni tümör hücrelerine yerleştirildiğinde 5-florositozini (5-FC) hücre içinde 5-florourasile (5-FU) dönüştürmekte ve böylece diğer normal hücreler zarar görmeden sadece tümör hücreleri spesifik olarak öldürülebilmektedir. 5-FU'nin sitotoksik özelliği 5-floro deoksiüridin monofosfat (5-FdUMP) ve 5-floroüridin trifosfat (5-FUTP)'a dönüşümü ile ortaya çıkar. 5-FdUMP timidilat sentaz (TS) enzimini inhibe eder ki; bu enzim DNA sentezi boyunca replike olan hücrelere timidin nükleotidini sağlar. 5-FUTP ise üridin 5-trifosfat yerine RNA yapısına katılarak RNA sentezini dolayısıyla rRNA ve mRNA işlenmesini de inhibe eder (Koyama ve ark., 2000; Chung-Faye ve ark., 2001; Miyagi ve ark., 2003). Ayrıca CD'nin kendisi de immünojeniktir; antijen olarak davranır ve efektör T hücrelerinin poliklonal aktivasyonuna neden olur (Pope ve ark., 1997).

Aslında 5-FU diğer kemoterapi ajanlarıyla beraber toksisiteye yol açmayacak dozda tedavi amacıyla kullanıldığında sadece bölünen hücreleri öldürebilir. Neoplastik epitel hücrelerde bölünen hücrelerin herhangi bir anda oranı ise %10'dan daha azdır. Bu sebeple çoğu kanser hücresi 5-FU'nin toksik etkisinden kaçmış olur. CD/5-FC

tedavisi sayesinde artan 5-FU bölünmeyen kanser hücrelerinde de etkili olur; RNA yapısına katılarak protein sentezini inhibe eder (Koyama ve ark., 2000; Chung-Faye ve ark., 2001).

Kanserin metastatik özelliği nedeniyle tedavi ajanlarının tüm vücutta dağılması ve tüm tümör hücrelerine spesifik olarak ulaştırılması gerekmektedir. Teorik olarak gen tedavisi vektörlerinin vücuttaki tüm tümör hücrelerine ulaştırılması durumunda kanserin eradike edilebilmesi beklenmektedir. Nitekim yapılan in vitro çalışmalarda tümör hücrelerinin tamamının CD geni taşıyan vektör ile enfekte edilebilmesi sağlandığı takdirde tümör hücrelerinin eradikasyonunun mümkün olabileceğini gösterilmiştir (Akbulut ve ark., 2004).

Mevcut gen tedavisi yöntemlerinin çok başarılı olamamasında tümör hücrelerinin heterojenitesi ve her hücre için uygun olabilecek bir hedef genin bulunamaması gibi tümörlerin biyolojik davranışlarından kaynaklanan engellerin yanı sıra bir diğer önemli engel de gen tedavisi vektörlerinin tüm tümör hücrelerine etkin bir şekilde ulaştırılamamasıdır. İntihar gen tedavisi çalışmalarında transfekte hücrelerde vektörün hücreye yerleştirdiği enzimin aktifleştirdiği ilaç, komşu hücreleri de kolaylıkla etkileyebilmektedir (Wildner ve ark., 1999; Huber ve ark., 1994). “Komşu etkisi (bystander effect)” olarak bilinen bu tanım, gen tedavisinde karışık bir popülasyonda bir hücrenin hedeflenip farklı tipte tümör hücrelerin de öldürülebilme kapasitesi anlamına gelir (Hall, 2003). Daha önce CD/5-FC sistemi ile yapılan bir çalışmada tümör hücrelerinin % 10 unun CD transkripsiyon ünitesi taşıyan vektörle enfekte edildiğinde bile sentezlenen 5-FU’nin %50’ye ulaşan sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır (Akbulut ve ark., 2003). Bu durum komşu etkisinden ileri gelmektedir. Oksidatif metabolizma, salgılandıktan sonra difüze olabilen moleküller (Azzam ve ark., 2003), apoptotik veziküller, immün sistem (Pope ve ark., 1997) ve oluklu bağlantılar (gap-junction) ile hücreler arası iletişim komşu etkisini oluşturan önemli faktörler olarak görülmektedir (Azzam ve ark., 2003). 5-FU hücre membranlarından pasif difüzyonla geçebildiği için yanındaki tümör hücresine kolayca difüze olabilir. Benzer ilaçlara göre daha kuvvetli bir komşu etkisi oluşturduğu düşünülmektedir (Pope ve ark., 1997).

1.6. Sitokinlerin Gen Tedavisinde Kullanılması

Sitokinler immün cevabı düzenlerler ve inflamatuvar hücrelerin olgunlaşması, aktivasyonu, göçü üzerinde etkili olurlar (Schmidt-Wolf ve Schmidt-Wolf, 1995). Sitokinlerin immün cevapta bu düzenleyici fonksiyonları onları kanser gen tedavisinde hedef haline getirmiştir.

Mevcut immün sistem tümörleri fonksiyonel olarak “non-immünojenik” tanımlar. Sitokin gen tedavisinin birinci hedefi immün sistemi “in situ” uyarmak ve tümörlerin yabancı ve immünojenik olarak tanıtımını sağlamaktır. 1990 lı yılların başında uygulanmaya başlanan gen tedavisi, sitokinlerin vücuda verilmesinde pek çok yeni uygulama ve olasılığı beraberinde getirmiştir (Chada ve ark., 2003). İmmün sistemi uyarıcı sitokin genlerinin lokal olarak verilmesinin birtakım avantajları mevcuttur: 1. Vücudun yabancı antijenlere cevabına benzer şekilde, lokal olarak yüksek miktarda sitokin üretilir. 2. İmmün sistemi aktive eden, yüksek parakrin etkili, fazla miktarda sitokin üretilir (Li ve ark., 2005).

Anti-tümöral immün cevaptaki yetersizlikler tümör spesifik antijenlerin yokluğunun yanı sıra immün düzenlenmedeki hatalardan da kaynaklanmaktadır. Bu nedenle tedavi yaklaşımlarından biri de tümör hücrelerinin immünjenitesini arttıracak şekilde lokal mikro çevreyi değiştirmektir (Qiu ve ark., 2001). Mikro çevreyi değiştiren ajanların başlıcası sitokinlerdir. Granulosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) kuvvetli bir immün uyarıcı olması nedeniyle pek çok gen tedavisi çalışmasında direkt veya diğer gen tedavisinde kullanılan genlerle kombine olarak etkisi ve etkinliği araştırılan sitokinlerden biridir. Esas olarak kemik iliğinde granulosit ve makrofajların yapımını kolaylaştırır. Geni kromozom 17 üzerinde yer alır ve protein ürünleri endotel hücreleri, makrofajlar ve fibroblastlarca eksprese edilir (Chada ve ark., 2003).

Deneyisel ortamda GM-CSF ile yapılan gen tedavisi çalışmalarında, uygulanan GM-CSF geni sonrasında antijen sunan hücrelerin (APC) aktive edildiği, dendritik hücrelerin (DC) göç etmesinin ve maturasyonunun sağlandığı, doğal immün sistem

efektör hücrelerinin aktive olduğu elde edilen bulgular arasındadır (Ogawa ve ark., 2000; Pan ve ark., 2004; Ferrantini ve ark., 2008). Ayrıca GM-CSF'nin aktive ettiği dendritik hücre ve makrofajlar T hücrelerine antijeni başarılı bir şekilde sundukları takdirde antijen spesifik sitotoksik T lenfositlerin de arttığı saptanmıştır (Ogawa ve ark., 2000).

Bu çalışmanın amacı tümör endoteline spesifik promotorlar (ICAM2) ile düzenlenen intihar geni (CD) ve ayrıca bunlara ilave olarak GM-CSF geni taşıyan vektör inşa etmek ve in vitro modellerde vektörün etkinliğini araştırmaktır. Daha önce yapılan çalışmalarda, spesifik promotorlarla tümör endoteline yönlendirilmiş, hem intihar geni hem de immün sistemi uyarıcı bir gen taşıyan vektör dizaynı bulunmamaktadır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Vektör Dizaynı

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

SOC Medium : 20 g Bakteriyolojik Tryptone casein Peptone (Amresco, J859)

5 g Bakteriyolojik Maya Ekstresi (Amresco, J850)

2 ml 5 M NaCl (Amresco, 0241)

2,5 ml 1 M KCl (Amresco, 0395)

10 ml 1M MgCl₂ (Amresco, 0288)

10 ml 1 M MgSO₄ (Amresco, 0662)

20 ml 1 M Glukoz (Amresco, 0188)

Distile suyla 1 litreye tamamlandı ve otoklavlandı.

E. coli FastMedia™ Zeo Agar (InvivoGen, fas-zn-s): Hazırlanmış toz karışım 200 ml distile suda mikrodalga fırında ısıtılmak suretiyle çözüldü, her petri kabına 15-20 ml döküldü.

E. coli FastMedia™ Zeo TB (InvivoGen, fas-zn-l): Hazırlanmış toz karışım 200 ml distile suda mikrodalga fırında ısıtılmak suretiyle çözüldü.

E. coli FastMedia™ Kan Agar (InvivoGen, kan-zn-s): Hazırlanmış toz karışım 200 ml distile suda mikrodalga fırında ısıtılmak suretiyle çözüldü, her petri kabına 15-20 ml döküldü.

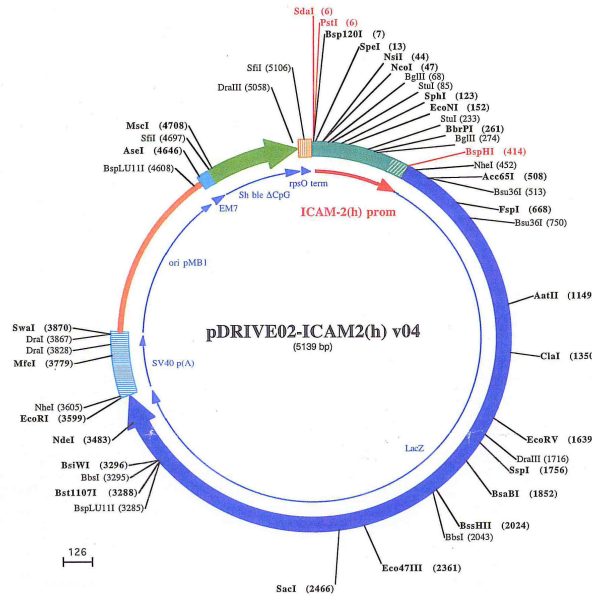
E. coli FastMedia™ Kan TB (InvivoGen, kan-zn-l): Hazırlanmış toz karışım 200 ml distile suda mikrodalga fırında ısıtılmak suretiyle çözüldü.

E. coli FastMedia™ Amp Agar (InvivoGen, amp-zn-s): Hazırlanmış toz karışım 200 ml distile suda mikrodalga fırında ısıtılmak suretiyle çözüldü, her petri kabına 15-20 ml döküldü.

E. coli FastMedia™ Amp TB (InvivoGen, amp-zn-l): Hazırlanmış toz karışım 200 ml distile suda mikrodalga fırında ısıtılmak suretiyle çözüldü.

2.1.2. pDRIVE02-ICAM2(h)v04 Vektörünün Çoğaltılması

pDRIVE02-ICAM2(h)v04 vektörünü içeren bakteri (Şekil 2.1) (InvivoGen) zeosin içeren katı besiyerlerinde seçici olarak üretildi ve koloni seçimi yapıp Zeosin içeren 5 ml sıvı vasatlara ekilerek koloniler çoğaltıldı. Çoğalan plazmid Mini Prep Kitle saflaştırıldı (Qiagen, 27106).



Şekil 2.1. pDRIVE02-ICAM2(h)v04 haritası

Mini Prep Kitle Plazmid Saflaştırma

- 15 ml lik falkon tüplerde üretilen ve pDRIVE02-ICAM2(h)v04 plazmidi içeren bakteriler 5000 rpm de 10 dak. santrifüj edildi.
- Pelet üzerine 250 µl RNase içeren Buffer P1 eklendi, pipetaj yapıldı.
- 250µl P2 tamponu (Lizis tamponu) eklendi ve tüp 6 defa alt üst edildi.
- 350µl N3 tamponu (Nötrale edici tampon) eklendi ve tüp 6 defa alt üst edildi.
- 13000 rpm'de 10 dak. santrifüj edildi.

- Süpernatant *QIAprep spin* kolonuna aktarıldı.
- 13000 rpm'de 1 dak. santrifüj edildi.
- Kolona 500 µl PB tamponu (yıkama tamponu) eklendi ve 1 dak. 13000 rpm'de santrifüj edildi.
- Kolona 750 µl PE tamponu (yıkama tamponu) eklendi ve 1 dak. 13000 rpm'de santrifüj yapılarak kolonun yıkanması sağlandı.
- Kolon 1 dakika 13000 rpm'de bir kez daha boş olarak santrifüj edildikten sonra temiz 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı ve 40 µl steril distile su eklendi. 1 dakika oda sıcaklığında beklendi.
- 13000 rpm'de 1 dak. santrifüj edilerek plazmid saflaştırıldı.
- Bu aşamada izole edilen plazmid DNA'sı %1 lik agaroz jelde yürütülmek suretiyle kontrol edildi.

Agaroz Jel Elektroforezi:

Agaroz III (Amresco, X174)

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

27,5 gr Borik asit

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

1 litre distile suya tamamlandı.

Yükleme tamponu : Gliserol (Amresco, 0854) , %30 (v/v)

Bromofenol mavisi (Amresco, 0449) , %0,25 (w/v)

Distile su

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

2.1.3. ICAM2 Geni Promotor Bölgesinin Çoğaltılması

Saflaştırılan pDRIVE02-ICAM2(h)v04 vektöründeki ICAM geni promotoru uygun primerlerle (Forward 5'-AAATATGCGGCCGCATGACTCCAACAATGCATCC-3'; Reverse 5'-CCGCTCGAGCAGGTCTGAGCTATGGCCCAGAA-3') çoğaltıldı. Reaksiyon şartları:

Denaturasyon: 94°C 2 dak.

30 döngü

Denaturasyon: 94°C 15-30 sn.

Hibridizasyon: 50-65°C 30-60 sn.

Uzama: 72°C 45sn-3 dak.

Final: 72°C 7 dak.

Uygun primerlerle çoğaltılan ICAM geni promotor bölgesi DNA Clean & Concentrator-5TM (Zymo Research, D4003S) kiti ile saflaştırıldı:

DNA Clean & Concentrator-5TM ile Saflaştırma

- Mevcut hacmin 2 katı hacimde DNA bağlama tamponu eklendi.
- Karışım kolona aktarıldı.
- 13000 rpm'de 10 sn santrifüj edildi.
- 200 µl yıkama tamponu ile 2 kez yıkandı.
- Kolon 1,5 ml lik yeni bir tüpe alınarak 10-20 µl distile su eklendi ve 13000 rpm'de 1 dak santrifüj edildi.

2.1.4. ICAM2 Geni Promotor Bölgesinin pCR-Blunt Vektöre Klonlanması

Saflaştırılan ICAM2 geni promotor bölgesi pCR-Blunt vektöre klonlandı:

Ligasyon (T_4 DNA ligaz ile)

Zero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen, 44-0302)

pCR-Blunt vektör	1 µl
ICAM2 geni promotoru	5 µl
T_4 DNA ligaz (Bioron, 402010)	1 µl
Reaksiyon tamponu 10X T_4 DNA/RNA ligaz (Bioron, A-3T02646)	1 µl
Distile su	2 µl

Ligasyon 16⁰C’de 1 saat inkübasyonla gerçekleştirildi.

Elde edilen pCRICAM2 ligasyon ürünü kimyasal transformasyonla çoğaltıldı:

Transformasyon

Bir DNA molekülünün doğal ya da yapay yollarla (genellikle) bakteri hücrelerine aktarılması olayı transformasyon olarak tanımlanmaktadır. Çalışmanın bu aşamasında yapılan işlemler aşağıda açıklanmıştır.

- Kullanılan kompetan bakteri: E.coli Top10 suşu.
- 10 ng vektör kompetan bakterinin üzerine eklendi.
- Buzda 30 dakika bekletildikten sonra 42⁰C su banyosunda 45 saniye bekletildi ve hemen buz içine konuldu.
- Üzerine 250 µl SOC medium eklenerek 225 rpm çalkalama hızında 37⁰C’de 1,5 saat inkübe edildi.
- Transforme edilen E.coli hücrelerinden Zeosinli besiyerine ekildi.

16-18 saatlik inkübasyondan sonra üreyen kolonilerden seçim yapılarak, her biri 5 ml Zeosin TB’ye ekilerek çoğaltıldı. pCRICAM2 plazmidi Mini Prep Kitle saflaştırıldı (Bkz Yöntem 2.1.2).

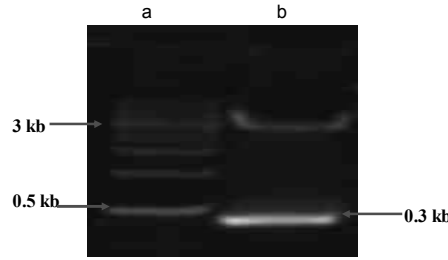
2.1.5. pCRICAM2 Plazmidinden ICAM2 Geninin Saflaştırılması

PCRICAM plazmidi uygun restriksiyon enzimleriyle kesildi.

Reaksiyon içeriği:	PCRICAM	16,4 µl
	NotI (NEB, R0189L)	0,7 µl
	XhoI (NEB, R0146S)	0,7 µl
	Tampon 3 10X (NEB, B7003S)	2 µl
	BSA 100X (NEB, B9001S)	0,2 µl

Reaksiyon 37°C’de, 1 gece inkübe edildi.

Ertesi gün %1 lik agaroz jelde yürütülen kesim ürününden 300-400 baz çiftlik (bp) ICAM2 bandı (Şekil 2.2) jelden kesilerek QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, 28706) ile saflaştırıldı:



Şekil 2.2. pCRICAM2 plazmidinin NotI/XhoI enzimleri ile kesilmesi sonucu elde edilen ICAM2 promotor bölgesinin jel elektroforezi görüntüsü (a: Marker, b: Kesim ürünü)

Jelden DNA Saflaştırma

- Jelden kesilen bandın ağırlığı ölçüldü.
- 100 mg jele 300 µl olacak şekilde Tampon QG (Çözücü Tampon) eklendi.
- 50°C’de yaklaşık 10 dak inkübe edildi. Her 2-3 dak da bir vortekslendi.
- Jel tamamen çözününce çözelti kolona (Qiaquick Spin Columns) aktarıldı.
- 10000 rpm’de 1 dak santrifüj edildi.
- 500 µl Tampon QG eklendi.
- 10000 rpm’de 1 dak santrifüj edildi.
- 750 µl Tampon PE (Yıkama Tamponu) eklendi.
- 2-5 dak. oda ısısında inkübe edildikten sonra 10000 rpm’de 1 dak santrifüj edildi.

- 13000 rpm’de 1 dak boş santrifüj edildi.
- Kolon temiz bir ependorfa aktarılarak 30 µl steril distile su eklendi. 1 dak. oda ısısında bekledikten sonra 13000 rpm’de 1 dak santrifüj edilerek elüsyon tamamlandı.

2.1.6. ICAM2 Geninin Shuttle Plazmide Klonlanması

pShuttle plazmidi daha önce ICAM2 geni için uygulandığı üzere NotI/XhoI restriksiyon enzimleriyle aynı koşullarda kesildi. Kesim ürünü olan pShuttle plazmidi DNA Clean & Concentrator-5TM ile saflaştırıldı. Yukarıda daha önce anlatılan ligasyon kitinden farklı bir kitle ligasyon yapıldı (Novagen, 69838-3):

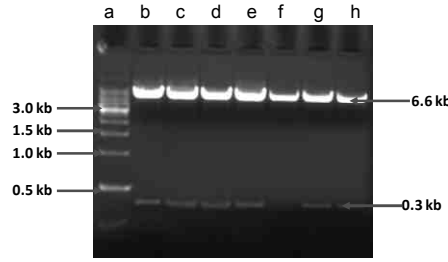
Ligasyon

pShuttle plazmid	2 µl
ICAM	4 µl
ATP	1 µl
DTT	0,5 µl
Ligasyon tamponu	1 µl
Ligaz	1 µl
Distile su	0,5 µl

Reaksiyon 8⁰C’de, 16-18 saat bekletildi.

Ligasyon ürünü E. coli Top 10 suşuna (Top 10 Cells One Shot Chemically Competent, Invitrogen, C4040-06) transforme edildi. Transformasyon ürünü kanamisinli katı besiyerlerinde çoğaltıldı, koloni seçimi yapılarak bu defa kanamisinli sıvı besiyerlerinde üretim yapıldı. Ürünler Mini Prep kit ile saflaştırıldı (Bkz. Yöntem 2.1.2).

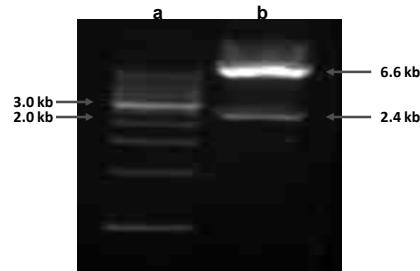
Ürünün doğruluğunu kontrol etmek amacıyla ligasyon ürünü pshICAM2 vektörü Mini Prep Kit ile saflaştırma sonrası NotI/XhoI enzimleriyle kesildi (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. pshICAM2 vektörünün NotI/XhoI enzimleriyle kesilmesiyle elde edilen ürünün agaroz jel elektroforezi görüntüsü (a: Marker, b-h: pshuttleICAM2 kesimi 7 örnek koloniden saflaştırıldı).

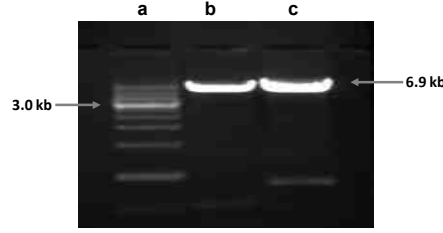
2.1.7. pShuttleICAM2 vektörüne CD ve GM-CSF Genlerinin Klonlanması

pShuttleLpCDIRESGM-CSF (Dr. Hakan Akbulut hediyesidir) plazmidini XhoI ve Bgl II (NEB, R0143L) restriksiyon enzimleriyle kesildi. Kesim ürünü %1 lik agaroz jelde görüntülendi. Jel elektroforezi sonunda yaklaşık 6,6 kb lık pShuttle plazmidine ve 2,4-2,5 kb lık CDIRESGM-CSF genlerine ait 2 adet band elde edildi (Şekil 2.4). Bu bandlardan CDIRESGM-CSF'ye ait olan band jelden kesilerek Qiaquick Gel Extraction Kit ile daha önce belirtildiği biçimde saflaştırıldı (Bkz. Yöntem 2.1.5).



Şekil 2.4. pshLpCDIRESGM-CSF plazmidinin XhoI/Bgl II enzimleriyle kesimi sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi görüntüsü (a: Marker, b: Kesim ürünü).

Benzer şekilde pShuttleICAM2 vektörü de XhoI/Bgl II enzimleriyle kesilerek yaklaşık 7 kb lık kesim ürünü jelden saflaştırıldı (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. pshICAM2 vektörünün XhoI/Bgl II enzimleriyle kesimi sonucu elde edilen ürünün agaroz jel elektroforezi görüntüsü (a: Marker, b-c: 2 örnek koloniden saflaştırılan kesim ürünü).

Bu jelden kesilip saflaştırılan iki ürün (pShuttleICAM2 ve CDIRESGM-CSF) ligasyonla birleştirildi. Ligasyon ürünü *E. coli* Top 10 suşuna transforme edildi ve kanamisin plaklarında çoğaltıldı. Koloni amplifikasyonunu kanamisinli TB’de gerçekleştirildikten sonra plazmid Mini Prep Kitle saflaştırıldı. Ürünün doğruluğu dizi analizi çalışmasıyla kontrol edildi (Dizi analizi çalışması Refgen firması tarafından yapılmıştır).

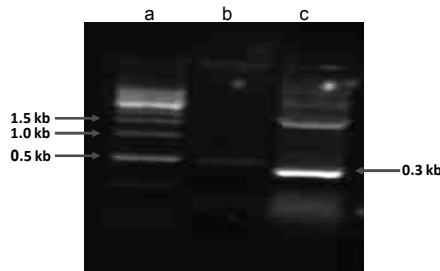
Dizi analiziyle doğruluğu saptanan plazmid miktar ve yoğunluğunu daha fazla arttırmak için 100 ml Kan içeren TB’ye 200 µl pShuttleICAM2CDIRESGM-CSF plazmidi eklendi, 225 rpm çalkalama hızında 37⁰C’de 16-18 saat inkübe edildi. Sonrasında Midi Prep Kit (Qiagen, 12143) ile plazmid saflaştırıldı.

Midi Prep Kitle Plazmid Saflaştırma

- Çoğalan bakteriler 50ml’lik falkon tüpte +4⁰C’de, 5000 rpm’de 10 dak. santrifüjlendi.
- Süpernatant atıldı.
- Peletin üzerine 4 ml resüspanسیون için kullanılan P1 tamponu eklendi ve pipetaj yapıldı, ardından vortekslendi.
- 4ml P2 tamponu (Lizis tamponu) eklendi, alt-üst yapılarak karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dak. bekletildi. Bu aşamada kullanılan *LyseBlue* solüsyonu nedeni ile mavi renk oluştu.
- Lizatın üzerine 4 ml, soğuk P3 tamponu (Nötralizasyon tamponu) eklendi, tüpler 4-6 defa alt-üst yapılarak karıştırıldı. Mavi renk kayboldu. Buzda 15 dak bekletildi.

- Karışım 15000 rpm’de, +4⁰C’de, 30 dak. santrifüjlendi.
- Süpernatant temiz bir tüpe alınarak tekrar 15000 rpm’de, +4⁰C’de, bu sefer 15 dak. santrifüjlendi.
- *QIAGEN Plasmid Plus Midi Spin* kolon 4 ml Buffer QBT eklenmek suretiyle kalibre edildi, solüsyonun kolondan akması beklendi.
- Bir önceki aşamadan elde edilen süpernatant kolona uygulandı, süzülmesi beklendi.
- Kolona 2 defa 10’ar ml Tampon QC eklenerek kolon yıkandı.
- Kolon yeni bir tüpe aktarıldı, elüsyon amacıyla 5 ml Tampon QF eklendi.
- Elüsyon üzerine 3.5 ml oda ısındaki izoprapanol eklendi.
- 15000 rpm’de, +4⁰C’de, 30 dak. santrifüjlendi.
- Pelet 2 ml oda ısındaki %70 lik etanolle yıkandı.
- 15000 rpm’de, +4⁰C’de, 10 dak. santrifüjlendikten sonra pelet havada kurutularak distile su ile çözüldü.
- İzole edilen plazmid DNA’sının konsantrasyonu 260 nm dalga boyunda ölçüldü.

Midi Prep Kitle saflaştırma yapıldıktan sonra ürünün doğruluğu bu defa ICAM (Forward 5’-AAATATGCGGCCGCATGACTCCAACAATGCATCC-3’; Reverse 5’-CCGCTCGAGCAGGTCTGAGCTATGGCCCAGAA-3’) ve GM-CSF (Forward 5’-TAAGCTTGTCGCGATGTGGCTGCAGAATTTACTTTTC-3’; Reverse 5’-CGGGAAGATCTTCATTTTTGGCCTGGTTTTTTTG-3’) primerleri ile yapılan PCR ile kontrol edildi (Şekil 2.6).



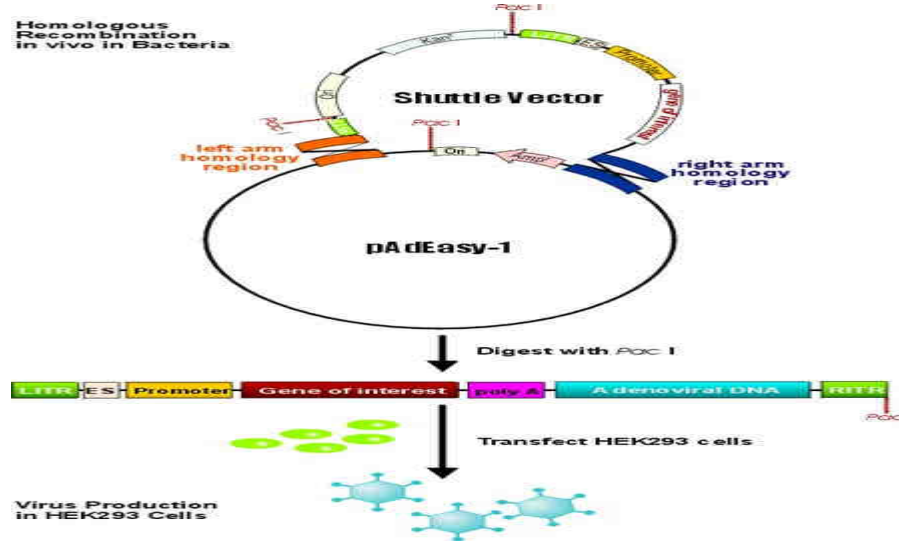
Şekil 2.6. pshICAM2CDIRESGM-CSF plazmidinin ICAM ve GMCSF primerleri ile PCR’ı sonucu elde edilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü (a: Marker, b: GM-CSF, c: ICAM2).

2.1.8. Shuttle Plazmid ve Adenovirusun(Ad) Elektroporasyonla Birleştirilmesi

Elektroporasyon, hücelere veya dokulara DNA aktarımı yapabilmek amacıyla kısa zamanlı çok yüksek elektrik akımı uygulayarak hücre zarında DNA'nın geçebileceği büyüklükte geçici porlar oluşturulmasıdır. Bu çalışmada homolog translokasyon yapma yeteneğine sahip kompetent hücre olarak BJ5183 bakteri hücreleri (Stratagene, 200154) kullanıldı.

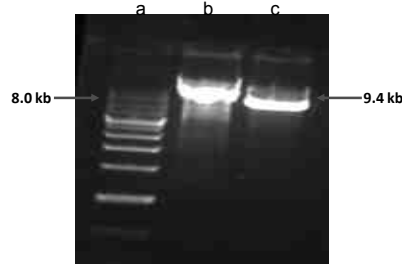
Elde ettiğimiz plazmiddeki genlerimizi taşıyacak adenovirusu oluşturmak üzere homolog translokasyon için pAdEasy-1 adenoviral vektörü (Stratagene, 240005-51) kullanıldı. pAdEasy-1 Ad5 genomunun büyük bir çoğunluğunu içermekte olup E1-E3 genleri çıkarılmış bir vektördür.

Bu işlemde, AdEasy vektöründe çıkarılmış olan genlerin yerine pShuttleICAM2CDIRESGM-CSF plazmidimizdeki ICAM2CDIRESGM-CSF genlerinin yer alması beklenmektedir. İşlem Şekil 2.7'da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.7. pAdEasy-1 ve shuttle vektör arasında gerçekleşen homolog rekombinasyon.

Bu amaçla elektroporasyon öncesi pShuttleICAM2CDIRESGM-CSF plazmidi PmeI (NEB, R0560S) restriksiyon enzimi ile kesilerek lineer hale getirildi (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. pshICAM2CDIRESGM-CSF vektörünün PmeI enzimi ile kesimi sonucu elde edilen ürünün agaroz jel elektroforezi görüntüsü (a: Marker, b-c: 2 örnek koloniden saflaştırılan kesim ürünü).

Elektroporasyon

- Elektroporasyon küveti (Bio-Rad, 165-2086) buzda soğutuldu.
- pAdEasy-1 1 µl
pShuttle ICAM2CDIRESGM-CSF 1 µg olacak şekilde karıştırıldı ve 50 µl BJ5183 elektroporasyon kompetent hücreleri ile karıştırıldı.
- Daha sonra küvet içinde elektroporatörde (Bio-Rad, Gene Pulser X cell, 617BR1) 5 msn 2500 voltluk akım uygulandı.
- Elektroporasyon sonrası bakteriler Kanamisinli besiyerinde çoğaltıldı.

Amplifiye olan kolonilerden uygun olanlar çoğaltılarak Mini Prep Kitle saflaştırıldı. Elde edilen plazmidlerin istenen ürün olup olmadığı PacI (NEB, RO547L) restriksiyon enzim kesimi ile kontrol edildi. Daha sonra uygun olan plazmid yeniden E. coli'ye transforme edilerek katı besiyerinde çoğaltıldı ve uygun koloniler tekrar çoğaltılıp restriksiyon enzimleri ile doğruluğu test edildikten sonra çok miktarda pAdICAM2CDIRESGM-CSF virusu elde etmek amacıyla bu plazmidi taşıyan koloni 200 ml Kan TB'de çoğaltılarak Midi Prep Kitle saflaştırıldı.

2.1.9. Transfeksiyon

Çalışmada, oluşturulan pAdICAM2CDIRESGM-CSF virusu HEK-293 insan embriyonik böbrek hücrelerine transfeke edildi. HEK-293 hücreleri virus partikülünün çıkarılmış olan E1 geni fonksiyonuna sahiptirler; virusun enfeksiyöz viral partikül şeklinde paketlenerek hücre dışına çıkmasını sağlayacak özelliktedirler.

Bu çalışmada transfeksiyonda DNA taşıyıcısı olarak LipofektaminTM 2000 (Invitrogen, 11668) kullanıldı.

HEK-293 insan embriyonik böbrek hücrelerinin kültürü

- HEK-293 insan embriyonik böbrek hücresi (Gibco Invitrogen Cell Culture, 11631-017)
- DMEM (Biological Industries, 01-055-1A)
- %10 FBS (Lonza, DE14-801E)
- %1 Pen-Strep Solution (Pen: 10000 units/ml; Strep: 10 mg/ml) (Biological Industries, 03-031-1B) ile 37⁰C’de, %5 CO₂ li etüvde inkübe edildi.
- 6 lık plaklara ekim yapılarak (her kuyuda 2 x 10⁵ hücre olacak şekilde) yukarıda yazılı şartlarda 1 gün inkübe edildi.

Transfeksiyon işlemi

- DNA (µg)/ Lipofektamin oranı 1/2 olacak şekilde ayarlandı.
- DMEM, lipofektamin ve AdICAM2CDIRESGM-CSF transgenik virusu ile karıştırılarak daha önceden hazırlanmış olan HEK-293 hücreleri içeren kuyulara eklendi.
- 37⁰C’de, %5 CO₂ li etüvde inkübasyonun yaklaşık 7. gününde yapışan HEK-293 hücreleri tamamen enfekte oldu; enfekte olan hücreler yapışma özelliklerini kaybettiler, yuvarlaklaştılar. Bu aşamada hücreler pipetajla toplanarak -80⁰C’de donduruldu.

2.1.10. Virus Saflaştırma

Virus saflaştırma işlemi için Adeno- XTM Virus Purification Kit (Clontech, 631533) kullanılmıştır. Saflaştırma işlemi kitin klavuzunda belirtilen yöntemle göre yapılmıştır. Kısaca:

- Transfeksiyondan sonra hücreler toplanarak 1500 rpm’de 5 dak. santrifüjlendi.

- Hücre peleti 3 defa dondurulup çözülerek lizise uğratıldı ve 1500 rpm'de 5 dak. santrifüjlendi.
- Süpernatana kontamine hücresel DNA'yı uzaklaştırmak amacıyla 40 µl Benzonaz- Nükleaz enzimi eklendi, 37⁰C'de, 30 dak. inkübe edildi.
- Bu esnada 1x Seyreltme tamponu ve 1x Yıkama tamponu hazırlandı.
- 30 dak. sonunda Benzonaz- Nükleaz ile inkübe edilmiş filtrat üzerine eşit hacimde 1x Seyreltme tamponu eklendi.
- Virus saflaştırma filtresine alınarak filtre edildi.
- Filtre 1x Yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra 1 ml Elüsyon tamponu içeren enjektör yardımı ile virus basınç uygulayarak filtreden ayrıldı ve elde edilen virus -80⁰C'de saklandı.

2.2. Kullanılan Hücre Serileri

HEK-293 (Human Embryonic Kidney) İnsan Embryonik Böbrek Hücre Serisi (ATCC, CRL-1573); HUVEC-CS (Human Umbilical Vein Vascular Endothelium) İnsan Umbilikal Damar Endoteli (ATCC, CRL-2873TM); HT-29 İnsan Kolon Kanseri Hücre Serisi (ATCC, HTB-38); MCF-7 İnsan Meme Adenokarsinom Hücre Serisi (Şap Enstitüsü); SELFET, İnsan Primer Mide Kanseri Hücre Serisi (AÜTF Tıbbi Onkoloji Laboratuvarında üretilmiştir.)

2.3. TCID (Tissue Culture Infectious Dose) 50 Metodu ile Virus Titrasyonu

Virus stoğundaki konsantrasyon TCID50 metodu ile tayin edildi. Temel prensip olarak 96 lık plaklarda virus dilüsyonları ile beraber hücreler inkübe edilir. Her bir kuyudaki sitopatik etki gözlemlenir. Bu amaçla:

- 96 lık plaklara her bir kuyuda 5000 hücre olacak şekilde HEK-293 hücreleri ekildi.
- 1 gün sonra hücreler vektör ile enfekte edildi. Enfeksiyon sırasında virus 10⁻⁵-10⁻¹² oranında değişen dilüsyonlarda kullanıldı. FBS oranı her kuyuda %5'e düşürüldü.

- 37⁰C CO₂ li etüvde 10 gün inkübe edildi.
- 10 günün sonunda “inverted” mikroskopta sitopatik etki görülen kuyular tespit edildi.
- KÄRBER istatistiğine göre TCID₅₀/mL hesaplanarak PFU(plaque forming unit)/mL ya çevrildi:

$$T \text{ (titrasyon)} = 10^{1+d(S-0,5)}$$

$$d = \text{Log } 10 \text{ dilüsyonu (10 kat dilüsyon için 1'dir.)}$$

$$S = \text{oranların toplamı (her zaman } 10^{-1} \text{ dilüsyondan başlar.)}$$

2.4. AdICAMCDIRESGM-CSF'nin *in vitro* Hücre Öldürücü Etkisinin Saptanması

Transgenik virusun farklı tipte hücre serileri üzerindeki sitotoksik etkisini saptamak amacıyla MTT Testi yapıldı.

2.4.1. MTT Testi

Hücrelerde canlılık oranını hesaplamak amacıyla kullanılan bir yöntemdir. MTT redüksiyonu sadece metabolik olarak aktif hücrelerde gerçekleşir. Aktivite düzeyi yaşayan hücrelerin oranını verir.

MTT solüsyonunun hazırlanması: (Chemicon, CT01-5)

Reagent A (MTT): 50 mg

Solüsyon B: 10 ml

Solüsyon B'ye Reagent A'nın tamamı eklendi. Kullanıma kadar +4⁰C'de, karanlık ortam sağlanacak şekilde saklandı.

1. 96 lık plağa tümör hücreleri her kuyuda 1×10^4 hücre olacak şekilde ekildi.
2. 24 saat sonra hücrelerin bir kısmı 3 ml serumsuz vasatla seyreltilmiş 10^8 pfu vektör ile enfekte edildi.
3. Enfeksiyondan 24 saat sonra enfekte edilmiş bir grup hücreye 500 µg/ml olacak şekilde 5-FC eklendi.

4. Enfeksiyondan 72 saat sonra her kuyuya 10 µl MTT solüsyonu eklendi.
5. 1 saat 37⁰C’de inkübe edildi.
6. 1 saat sonunda her kuyuya 100 µl 0,04 N HCl-izopropanol solüsyonu eklendi.
7. Formazan kristallerinin çözünmesi amacıyla 1saat çalkalamalı etüvde (180 rpm) inkübe edildi.
8. 1saat sonunda 96 lı plaklar 492-630 nm dalga boylarında okundu.
9. MTT testi 3 defa tekrarlandı.

2.5. Promotor Etkinliğinin Saptanması

2.5.1. “Reverse” (ters) Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

“Reverse” transkriptaz enzimi kullanılarak RNA’dan c-DNA’nın (komplementer DNA) sentezlenmesi ilkesine dayanan moleküler bir tekniktir. RNA izolasyonunu takiben elde edilen c-DNA transkribe edilecek olan diziyi içerdiği için, bu DNA’dan uygun primerlerle yapılan PCR istenilen gen bölgesinin transkribe olup olmadığına işaret edecektir.

Bu çalışmada RT-PCR, tümör hücrelerinde ICAM2 gen ekspresyonunun olup olmadığını saptamak amacıyla kullanıldı.

İşlem RNA izolasyonu ve c-DNA eldesi olmak üzere iki aşamada gerçekleştirildi:

2.5.1.1. RNA İzolasyonu

Trizol (Invitrogen, 15596026) fenol ve guanidin izotiyosiyanattan meydana gelen tek fazlı bir solüsyon olup, örneğin homojenizasyonu ya da lizisi sırasında hücreleri parçalayıp, hücre bileşenlerini çözerken RNA bütünlüğünü sağlar.

Homojenizasyon:

HUVEC, HT-29, MCF-7 ve insan primer mide tümörü hücreleri 5×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 24 kuyuluk kültür plaklarına ekildi. Ekimden 72 saat sonra kuyuların vasatları aspire edilerek yüzeye yapışan hücreler üzerine (1×10^6 hücreye 1 ml Trizol) Trizol eklendi. Pipetajla hücreler ayrı ayrı ependorf tüplere toplandı.

Faz Ayrımı:

Homojenize edilmiş hücreler $15-30^\circ\text{C}$ 'de 5 dk. inkübe edildi. Her tüpe 0.2 ml kloroform (Merck, K38200945) eklendi. Tüpler elle 15 sn. boyunca sallandı. Daha sonra $15-30^\circ\text{C}$ 'de 10 dak inkübe edildi. $12,000 \times g$ 'de $2-8^\circ\text{C}$, 15 dak santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki faz kırmızı fenol-kloroform fazı (protein fazı), ara faz (DNA fazı) ve renksiz-akıcı üst faz (RNA fazı) olmak üzere 3 faz oluştu.

RNA Çöktürmesi:

RNA'yı içeren üst faz yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine 0.5 ml izopropil alkol (Merck, K37727334) eklendi. $15-30^\circ\text{C}$ 'de 10 dak. inkübe edildi. Tüpler $12,000 \times g$ 'de 10 dak. $2-8^\circ\text{C}$ 'de santrifüj edildi. RNA tüpün dibinde jel benzeri bir pelet oluşturdu.

RNA Yıkaması:

Süpernatant atıldı, 1 ml %75'lik etanol (Merck, K39349583) eklendi. Örnekler vortekslendi ve $7,500 \times g$ 'de 5 dak. $2-8^\circ\text{C}$ 'de santrifüj edildi.

RNA'nın Yeniden Çözülmesi:

RNA pelleti oda sıcaklığında bekletilerek kurutuldu. Sonrasında RNA, 35 μl RNaz içermeyen DEPC (Diethylpyrocarbonate)'li (Applchem, A0881-0050) su içinde çözüldü.

RNA lar %1 lik agaroz jelde, 90 v'da, 20 dak. yürütülerek kontrol edildi.

2.5.2.2. c-DNA Sentezi

Bu çalışmada RT-PCR yöntemi kullanılarak ICAM2 geninin ifadesi analiz edilmiştir.

İlk olarak HUVEC, HT-29, MCF-7 ve insan primer mide kanseri hücre serilerinden (enfekte edilmemiş) izole edilmiş RNA lar kullanılarak “c-DNA Synthesis Kit” (Finnzymes, F-470) ile c-DNA sentezlendi:

“Random Hexamer Primer Set”	300 ng / μ l
RNA	200 ng
dH ₂ O	RNA miktarına göre ayarlandı

65⁰C’de 5 dak. tutuldu. Sonra tüplere:

RT Tamponu	10 μ l /20 μ l reaksiyon karışımı
“M-MuLV RNase H ⁺ Reverse Transcriptase”	2 μ l
Reaksiyon koşulları: 25 ⁰ C 10 dak., 37 ⁰ C 30 dak., 85 ⁰ C 5 dak.	

c-DNA sentezini takiben, kontrol hücrelerinde ICAM2 gen ekspresyonlarının olup olmadığını gösterebilmek amacıyla uygun primerlerle PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

ICAM2 F: 5’-ATTCAACAGCACGGCTGACA-3’

ICAM2 R: 5’-CAGGCTCATAGATCTCCAACATCT-3’

10xDyNAzyme™ II Hot Start Reaksiyon tamponu	2 μ l
DyNAzyme II Hot Start DNA Polimeraz	0.25 μ l
F primer	1 μ l
R primer	1 μ l
dNTP (Vivantis, NP2406)	1.8 μ l
c-DNA	2 μ l
dH ₂ O	11.95 μ l

Reaksiyon koşulları: [94⁰C 10 dak., 40 döngü (94⁰C 30 sn., 62.5⁰C 30 sn., 72⁰C 30 sn.), 72⁰C 5 dak.]

PCR ürünleri %3 lük agaroz jelde, 130 v.’da, 20 dak. yürütüldü.

2.6. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assays)

Bir örnek içinde spesifik antijen ya da antikorların varlığını tespit etmekte kullanılan bir yöntemdir. Yöntemde kullanılan plağın kuyuları özel antijene özgü antikorlarla kaplanmıştır. Kuyulara eklenen örnekte kaplı antikora bağlanmayan antijenler yıkanarak uzaklaştırılır. Daha sonra antijene bağlanan sekonder antikor ise uygun solüsyon eklendiğinde ışıma yapan bir enzimle bağlanmış durumdadır. Örnekte aranan antijenin varlığı renk oluşumuna neden olurken, antijen yokluğu renksizlikle kendini gösterir.

Bu çalışmada ELISA yöntemi, vektörle enfekte edilen hücrelerde virusun taşıdığı genlerin transkribe olup olmadığını göstermek amacıyla kullanıldı.

Yöntemde kullanılan solüsyonlar:

Kaplama Tamponu	NaHCO ₃	7.13 g
	Na ₂ CO ₃	1.59 g
	dH ₂ O	1 L. pH: 9.5
Seyreltme Çözeltisi	PBS + %10 FBS	pH: 7
Yıkama Tamponu	PBS + %0.05 Tween-20	
Substrat Çözeltisi	Tetrametilbenzidin (TMB) + Hidrojen peroksit	
Durdurma Çözeltisi	1 M H ₃ PO ₄ veya 2 N H ₂ SO ₄ (Chemicon, ES020)	

Örneklerin hazırlanması:

HUVEC, HT-29, MCF-7 ve insan primer mide tümörü hücreleri 5x10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde 24 kuyuluk kültür plaklarına ekildi. 24 saat sonra hücre tipi başına düşen 6 kuyudan 2'ser tanesi 10⁸ pfu AdICAMCDIRESGM-CSF ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 24 saat sonra yine her hücre için 2'ser adet kuyuya 500 uM 5-FC eklendi. Kalan 2'ser adet kuyu ise kontrol amaçlı kullanıldı. 5-FC eklenmesinden 48 saat sonra hücreler vasatlarıyla beraber kazınarak toplandı. 700 rpm'de 5 dak. santrifüj edildikten sonra süpernatant ELISA'da kullanılmak üzere -80⁰C'ye kaldırıldı.

ELISA yönteminde “Mouse GM-CSF ELISA Set” (BD Biosciences, 555167) kullanıldı:

- 96 kuyulu kültür plağı kuyuları kaplama tamponu içinde seyreltilmiş antikorla (Capture antibody) kaplandı (100 µl). 4⁰C’de bir gece inkübe edildi.
- Ertesi gün kuyular aspire edildi ve 3 defa 300’er µl yıkama tamponu ile yıkandı.
- Kuyulara 200’er µl seyreltme çözeltisi eklendi ve 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- Kuyular aspire edildi ve 3 defa 300’er µl yıkama tamponu ile yıkandı.
- Kuyulara 100’er µl GM-CSF standartı (kitin sağladığı) ve örnekler eklendi. 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- Kuyular aspire edildi ve 5 defa 300’er µl yıkama tamponu ile yıkandı.
- Kuyulara 100’er µl tespit çözeltisi (Tespit antikor + SAv-HRP) eklendi. 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- Kuyular aspire edildi ve 3 defa 300’er µl yıkama tamponu ile yıkandı .
- Kuyulara 100’er µl substrat çözeltisi eklendi. 30 dakika, oda ısısında, karanlıkta inkübe edildi.
- Her kuyuya 50 µl durdurma çözeltisi eklendi. Oluşan renk değişimi 450-630 nm dalga boylarında okundu.

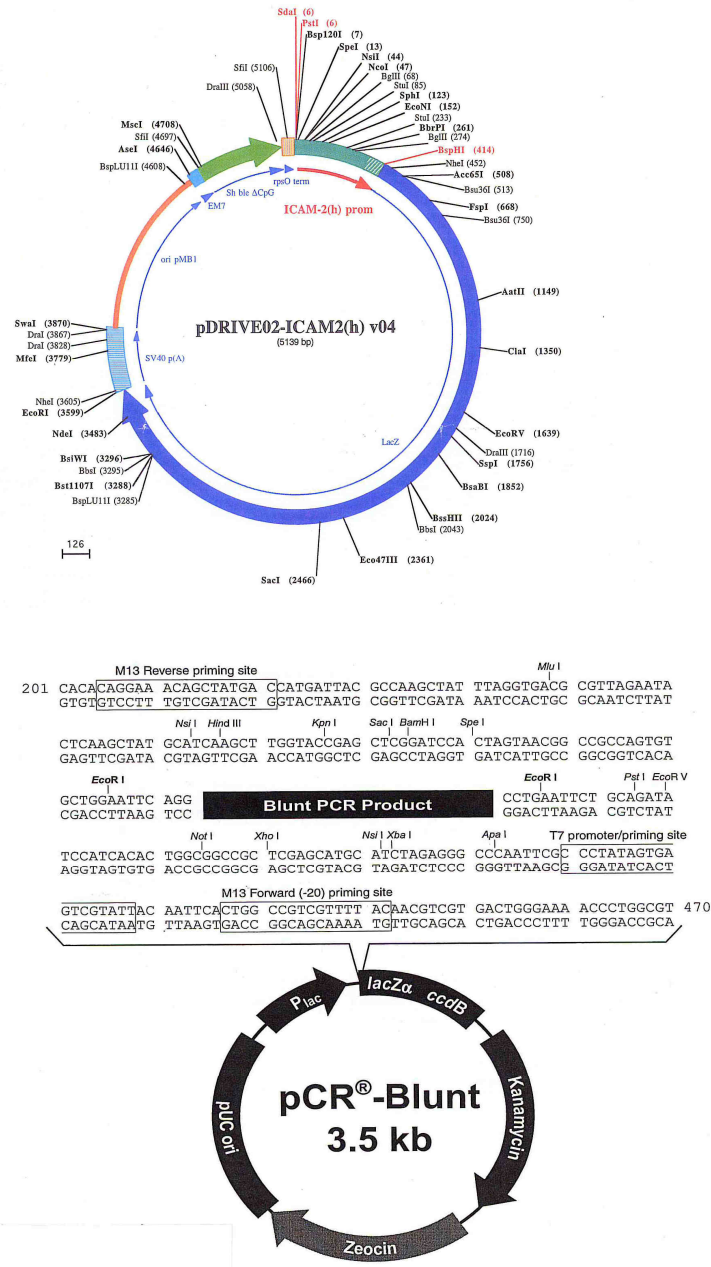
2.7. İstatistiksel Analiz

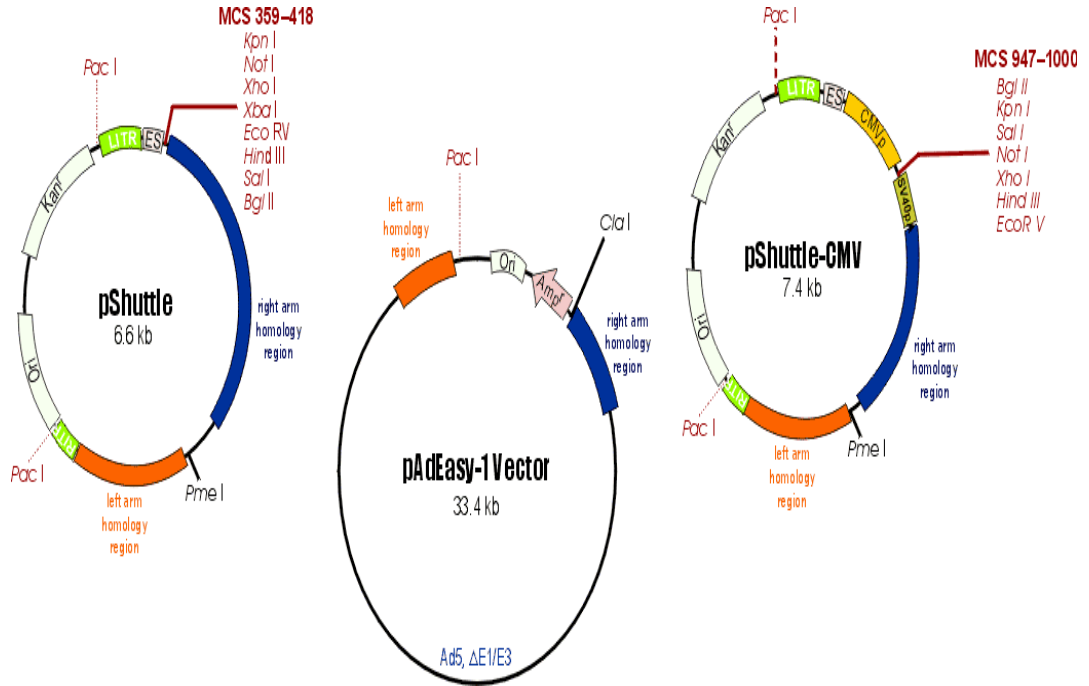
MTT testi ile yaşayan hücrelerin yüzdesi açısından kontrol ve tümör hücreleri arasında anlamlı fark olup olmadığı X^2 ve Mann Whitney U testi ile kontrol edildi. GM-CSF düzeyleri ise Student-T testi ile değerlendirildi.

3. BULGULAR

3.1. AdICAMCDIRESGM-CSF Transgenik Virusun Elde Edilmesi

pCR-Blunt vektör, shuttle vektörler, transgenik virusta olmasını istediğimiz genler ve Adenoviral plazmid önceki bölümde açıklandığı üzere çok sayıda PCR ürününün klonlanması ya da uygun restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu elde edildi. İşlemler sırasında genel olarak Şekil 3.1’de haritaları görülen vektörler kullanıldı.





Şekil 3.1. pDRIVE02-ICAM2(h)v04, pCR-Blunt, pShuttle, pShuttle-CMV ve pAdEasy-1 vektör haritaları (sırasıyla).

Her ürünün doğruluğu, ürünün eldesinden sonra, hem dizi analizi yaptırarak, hem de uygun restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra agaroz jel elektroforeziyle görüntülenerek kontrol edildi.

Son aşamada da istenilen transgenik virus AdICAM2CDIRESGM-CSF elde edildi.

3.2. TCID₅₀ Sonuçları

$$T \text{ (titrasyon)} = 10^{1+d(S-0,5)}$$

d= Log 10 dilüsyonu (10 kat dilüsyon için 1'dir.)

S= oranların toplamı (her zaman 10^{-1} dilüsyondan başlar.)

Çalışmamızın sonuçlarına göre:

$$S = 8$$

$$d = 1$$

$$T = 10^{1+1(8-0,5)} = 10^{8,5} = 6 \times 10^8$$

$$\text{PFU/uL} = 6 \times 10^8$$

3.3. Elde Edilen Transgenik Virusun Tümör Hücre Serilerinde Sitotoksik Etkisi

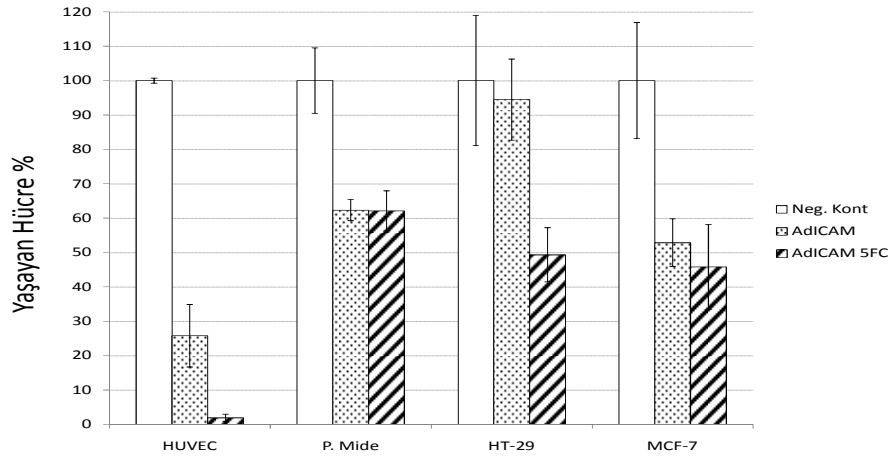
AdICAMCDIRESGM-CSF transgenik virusu elde edildikten sonra virusun hücre serileri üzerindeki etkinliğini saptamak amacıyla farklı testler uygulandı.

3.3.1. MTT Testi Sonuçları

Elde edilen transgenik virusun tümör hücreleri üzerinde öldürücü etkisinin olup olmadığının saptanması amacıyla HUVEC, HT-29, MCF-7 ve primer mide kanseri hücre serileri kullanıldı. 10^8 pfu vektör (AdICAMCDIRESGM-CSF) ile enfekte edilen hücrelere 24 saat sonra 500 μ M 5-FC eklendi. 72 saat sonra hücrelerdeki ölüm oranları MTT testiyle hesaplandı.

HUVEC hücre serisinde virusun tek başına ve 5-FC verilmesini takiben hücreleri anlamlı derecede öldürdüğü gözlemlendi ($p < 0.05$). Bu hücrelere 5-FC verilmesi sitotoksik etkiyi anlamlı olarak arttırdı ($p < 0.05$) (Şekil 3.2). Buna karşılık HT-29 hücrelerinde virus tek başına verildiğinde hücrelerde anlamlı bir ölüm oranı izlenmedi ($p > 0.05$) (Şekil 3.2). Bu hücrelerde vektör enfeksiyonunu takiben 5-FC verilen grupta anlamlı bir hücre ölümü izlendi (Şekil 3.2).

Primer mide kanseri ve MCF-7 hücrelerinde ise virus tek başına anlamlı bir hücre ölümüne yol açarken virusla enfekte hücrelere 5-FC eklenmesi sitotoksik etkiyi arttırmadı (Şekil 3.2).

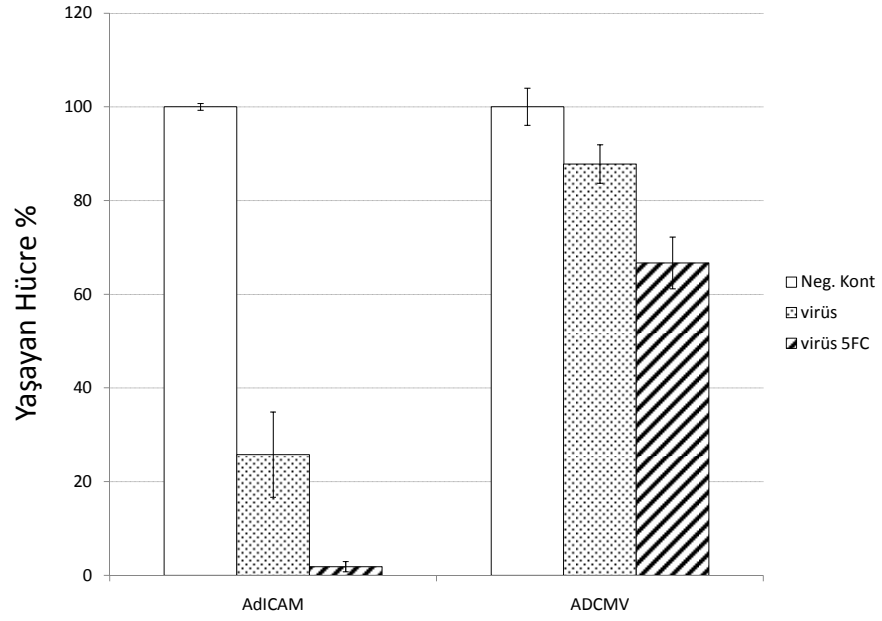


Şekil 3.2. HUVEC, primer mide kanseri, HT-29 ve MCF-7 hücre serilerinde AdICAM *in vitro* sitotoksik etkileri.

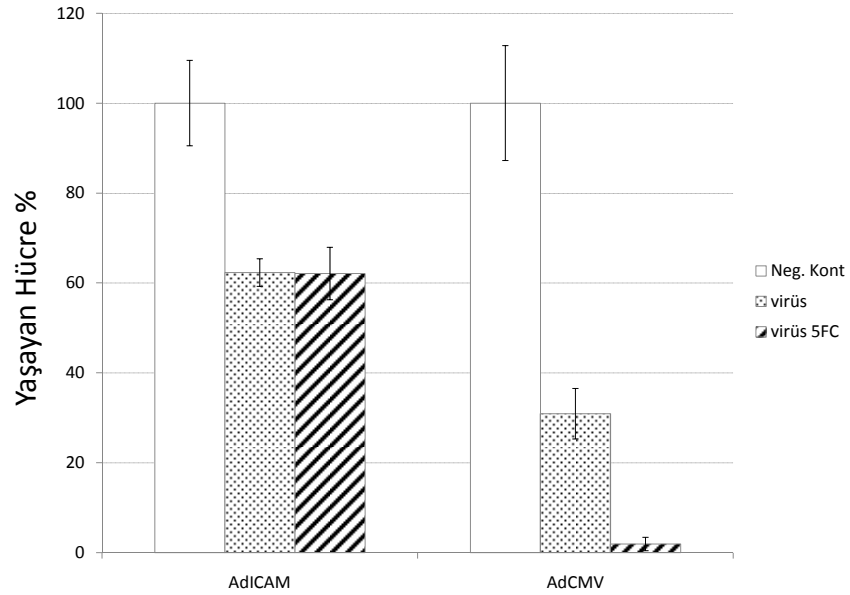
3.3.2. AdCMVCDE1A Virusu ile Karşılaştırma

ICAM2 promotoru taşıyan transgenik vektörün hücreyi enfekte etme etkinliğini başka promotor taşıyan bir vektörle karşılaştırmak amacıyla, HUVEC ve primer mide kanseri hücre serileri CMV promotoru taşıyan farklı bir transgenik virusla enfekte edildikten sonra yaşayan hücre yüzdeleri MTT testiyle hesaplandı ve her hücre grubu kendi içinde karşılaştırıldı (CMV promotoru taşıyan vektör Dr. Hakan Akbulut hediyesidir).

Her iki hücre serisinde de sadece vektör enfeksiyonu ile anlamlı bir sitotoksik etki izlenirken sadece HUVEC hücre serisinde 5-FC eklenmesi vektörlerin öldürücü etkisini anlamlı bir biçimde arttırdı ($p < 0.05$) (Şekil 3.3). Primer mide kanseri hücrelerinde ise 5-FC eklenmesi sadece AdCMVCDE1A vektörü ile enfekte edilen hücrelerde sitotoksik etkiyi artırırken AdICAM2CD vektörü ile enfekte hücrelerde sitotoksik etkiyi değiştirmedi (Şekil 3.4). Bu sonuç ICAM2 promotoru taşıyan virusun endotel hücrelerine daha spesifik olabileceğini göstermektedir.



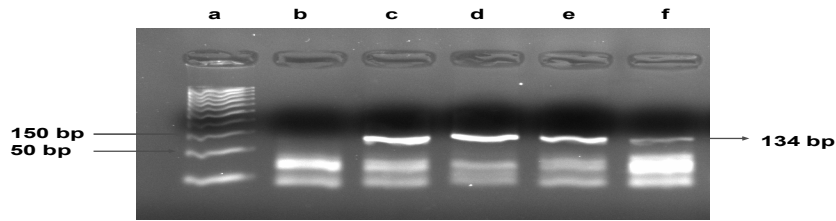
Şekil 3.3. HUVEC hücre serisinde ICAM ve CMV promotorları taşıyan virusların *in vitro* sitotoksik etkileri.



Şekil 3.4. Primer mide kanseri hücre serisinde ICAM ve CMV promotorları taşıyan virusların *in vitro* sitotoksik etkileri.

3.3.3. RT-PCR Yöntemiyle Hücre Serilerinde ICAM2 Varlığının Gösterilmesi

HUVEC, HT-29, MCF-7 ve primer mide kanseri hücre serilerinde ICAM2 geninin transkribe olduğunu göstermek amacıyla öncelikle bu hücre serilerinden RNA izole edildi ve sonrasında c-DNA sentezlendi. Sentezlenen c-DNA'lardan ICAM2 primerleri kullanılarak PCR analizi gerçekleştirildi. Sonrasında yapılan agaroz jel elektroforeziyle ICAM2'ye ait bandlar gösterildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. ICAM2 PCR'ı sonrası agaroz jel görüntüsü. **a:** Marker, **b:** Negatif kontrol (DNA yok), **c:** HUVEC, **d:** HT-29, **e:** MCF-7, **f:** Primer mide kanseri.

3.3.4. ELISA Testi Sonuçları

HUVEC, HT-29, MCF-7 ve insan primer mide tümörü hücrelerinde transgenik vektörün aktardığı GM-CSF'nin protein sentezi yaptırıp yaptırmadığını saptamak amacıyla transgenik virus verilmeden (kontrol) ve transgenik virus verildikten sonra uygun şartlarda toplanan örnekler ile “fare GM-CSF ELISA” testi yapıldı. Test sonuçları deneyde kullanılan tüm hücrelerde vektör ile enfekte edildiklerinde GM-CSF sentezi yapıldığını gösterdi (Çizelge 3.1):

Çizelge 3.1. ELISA sonuçları.

HÜCRE	Negatif kontrol (pg/ml)	Vektör (pg/ml)
HUVEC	0	1.13
HT-29	0	2.96
P. MİDE	0	3.99
MCF-7	0	20.9

4. TARTIŞMA

İnsan gen tedavisi çalışmaları ilk olarak 1970’li yıllarda olası hale geldiğinde, kalıtsal tek gen hastalıklarının bu tedavinin hedefi olacağı düşünülmüştü. Fakat daha sonraları başta kanser olmak üzere diğer pek çok hastalık için gen tedavisinin temel ilkesi olan “tamir etme” veya “yerine koyma” çalışmalarının uygulanabileceği gösterilmiştir (Brenner, 2005). Özellikle onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin kanser gelişiminde ve metastazdaki rolleri nedeniyle bu genlerin hedef olarak seçilmesi kanserde gen tedavi çalışmalarına büyük ivme kazandırmıştır. Bunların yanı sıra memeli hücrelerinde bulunmayan sitozin deaminaz gibi bir takım enzimlerin gen tedavisi yoluyla tümör hücrelerine iletilmesi ve bu enzimlerin hücre için nispeten zararsız maddelerden dönüştürdüğü toksik maddelerin yaptığı hücre ölümü (intihar geni tedavisi) de popüler yöntemlerden biri haline gelmiştir (Greco ve Dachs, 2001). Yine son yıllarda immün sistemin uyarılmasına yönelik gen tedavisi çalışmaları özellikle metastatik hastalığın tedavisine yönelik çalışmalarda popülerite kazanmıştır (Li ve ark., 2005).

Gen tedavisinin en önemli sorunlarından birisi olan terapötik genlerin hedef dokulara ulaştırılması problemini yenmek için sık başvuru stratejilerden birisi de tümöre veya dokuya özgü promotorlar kullanmaktır. Bu amaçla gen tedavisi vektörlerine terapötik genin aktivitesini düzenleyen spesifik promotorlar eklenerek, bu genlerin sadece hedef dokularda protein sentezi yapılabilmesi sağlanmaktadır.

Anjiyogenez pek çok büyüme faktörünü, onların reseptörlerini, sitokinleri, proteazları, adezyon moleküllerini içermesi yönüyle gen tedavisi için çoklu bir hedef oluşturur. Tümör endoteline spesifik adenoviral vektörler oluşturmak kanser anti-anjiyogenik tedavisinde yeni bir yaklaşımdır.

Nicklin ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada, vasküler gen tedavisi için endotel hücrelere spesifik promotorlar arasında en uygun iki promotordan birisinin ICAM2 olduğunu saptamışlardır. Yine ICAM2 promotoruna ilişkin yapılmış hayvan çalışmalarında da bu uygunluk doğrulanmış (Cowan ve ark., 2006) ve aktiviteyi etkileyen bağlantı bölgeleri tespit edilmiştir (Cowan ve ark., 1998). Bu çalışmamızda

biz de proliferen olan endotel hücrelerinde aktif bir gen olan ICAM2'nin promotor bölgesini gen tedavisi vektörümüzde terapötik genlerimizin (sitozin deaminaz/GM-CSF) ifadesini düzenleyen tümöre özgü promotor olarak seçtik.

Vektörümüzün endotel hücrelerine spesifik olup olmadığını test etmek amacıyla non-spesifik etkili benzer intihar geni taşıyan başka bir vektörle (AdCMVCDE1A) karşılaştırmalı olarak endotel hücreleri ve primer mide tümörü hücrelerinde test ettik. ICAM2 promotoru taşıyan vektörümüzün (AdICAM2CDGMCSF) HUVEC endotel hücrelerinde 5-FC verildiğinde sitotoksik etkisinin belirgin olarak arttığını, buna karşılık mide kanseri hücrelerinde 5-FC eklenmesinin hücre ölümünü arttırmadığını bulduk (Şekil 3.3 ve 3.4). 5-FC eklenmesi kontrol vektörü ile enfekte edilen her iki hücre grubunda da sitotoksiteyi belirgin olarak arttırmıştır (Şekil 3.3 ve 3.4). Bu deneylerde ICAM2 veya CMV promotorları taşıyan viral vektörlerle enfekte edilen (5-FC uygulanmayan) gruplarda izlenen belirgin hücre ölümü büyük olasılıkla kullanılan vektörün toksisitesinden kaynaklanmış olabilir. 5-FC eklendikten sonra izlenen ilave hücre ölümü ise hücre içinde ifade edilen (eksprese edilen) sitoizin deaminaz geninin dönüştürdüğü 5-florourasilin etkisinden kaynaklanmaktadır.

Kanserde damar endoteline yönlendirmenin yanı sıra, oluşturulan vektöre 5-FC ile birlikte verildiğinde sitotoksik etki oluşturması için CD geni; immün sistem hücrelerini uyarak tümör eradikasyonunu arttırmak için de GM-CSF geni takılmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız rekombinant virus endotel hücrelerine spesifik olarak dizayn edilmiştir. Fakat HUVEC hücre serisinin yanı sıra transgenik virusla enfekte edilen diğer tümör hücre serilerinde de (HT-29, MCF-7 ve primer mide) ICAM2 promotoruna sahip transgenik virus genlerinin de transkribe olduğu GM-CSF ELISA testiyle gösterilmiştir. Virusla enfekte edilmemiş hücrelerde GM-CSF saptanmamış olması, GM-CSF transkripsiyonunun sadece transgenik virus genleriyle gerçekleştiğine işaret etmektedir. HUVEC'in yanı sıra tümör hücrelerinde de virus transgenik genlerinin ifade buluyor olması bu hücrelerde de ICAM2'nin ekspresyonu olabileceğini düşündürmektedir. ICAM2 ekspresyonunun zayıf olarak monositler,

lenfositler, plateletler, megakaryositler ve kuvvetli olarak endotel hücrelerle sınırlı olduğu bilinmekle birlikte (Cowan ve ark., 1996); gastrointestinal tümörler (Tanaka ve ark., 2004), skuamöz hücreli tümörler (Takizawa ve ark., 1999) ve pankreas tümörleri (Liu ve ark., 2009) gibi tümörlerde de eksprese olduklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Çalışmamızda, ICAM2'nin HUVEC'in yanı sıra HT-29, MCF-7 ve primer mide tümörü hücre serilerinde transkribe olduğu RT-PCR tekniğiyle gösterilmiştir (Şekil 3.5). Mevcut çalışmamızda inşa ettiğimiz vektörün HT-29 kolon kanseri hücrelerinde 5-FC eklenmesi ile sitotoksosite artışının izlenmesi bu hücrelerde de ICAM2 ekspresyonu nedeni ile vektörümüzün aktive olabileceğini göstermektedir (Şekil 3.2). Fakat bu hücre grubunda 5-FC eklenmesi ile izlenen sitotoksosite artışı endotel hücrelerindeki kadar belirgin değildir (Şekil 3.2). Bu durum tümör hücrelerinde ICAM2 ekspresyonunun endotel hücrelerindeki nazaran çok daha zayıf olması ile açıklanabilir. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde vektör ile enfeksiyonu takiben 5-FC verilmesiyle sitotoksitede bir miktar artış olmakla birlikte bu artışın belirgin olmaması vektörün taşıdığı genlerin zayıf ekspresyonu ile açıklanabilir. Ayrıca mide kanseri ve MCF-7 hücrelerinin 5-florourasile dirençli olma olasılıklarının da göz ardı edilmemesi gerekir. Fakat bu hücrelerle daha önce laboratuvarımızda 5-florourasil ile yapılan sitotoksosite deneylerinde bu hücrelerin 5-FU'e hassas oldukları bulunmuştur (Sedef Hande Aktaş, Yüksek Lisans Tezi 2010).

Buna karşılık HT-29 hücre serisi, diğer hücre serilerinden farklı olarak, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında sadece virusla enfekte edildiğinde (5-FC uygulanmadan) sitotoksitede artış izlenmemiştir ($p>0.05$). Bu sonuç, inşa ettiğimiz vektörün HT-29 hücrelerine toksik olmadığını göstermektedir.

Vektörümüzün farklı hücre tiplerinde farklı etkilerinin olması promotor aktivitesi ile de ilişkili olabilir. Adenoviral genomda yer alan bir takım cis-elementlerin doku spesifitesini ve promotor aktivitesini değiştirebildiği Shi ve ark. yaptıkları çalışmayla gösterilmiştir (1997).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

- AdICAMCDIRESGM-CSF virusunun konstriküsüyonu gerçekleştirilmiştir.
- Elde edilen virus HUVEC, HT-29, MCF-7 ve primer mide tümörü hücre serilerine uygulanmış, virus transgenlerinin bu hücre serilerinde transkribe olduğu gösterilmiştir.
- Vektör sahip olduğu ICAM2 promotörü nedeniyle endotel hücrelerine spesifik olarak tasarlanmıştır. Fakat bu çalışmada kullanılan tümör hücre serilerinde de virus genleri ifade edilmiştir; çünkü bu hücrelerde de HUVEC'te olduğu gibi ICAM2 ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir.
- Transgenik virus HUVEC, MCF-7 ve primer mide tümör hücre serilerinde tek başına toksik etki göstermiştir. Fakat bu hücre serilerinde 5-FC eklenmesi de hücre ölümünü belirgin olarak arttırmıştır.
- HUVEC hücreleri çalışmada yer alan diğer tüm hücre serilerine göre virus ve virus + 5-FC enfeksiyonundan daha fazla etkilenmiş gözükmektedir. Sonuç olarak, AdICAMCDIRESGM-CSF en çok HUVEC hücre serisine spesifiktir. Bu endotel hücre spesifik virusun, endotel hücre migrasyonu ve tüp oluşumu üzerinde etkili olup olmadığı bundan sonraki araştırma basamağını oluşturmaktadır.
- Bu çalışmada inşa ettiğimiz CD ve GM-CSF genleri taşıyan vektörün bundan sonraki aşamada hayvan modellerinde test edilerek tümör etkinliğinin *in vivo* olarak da gösterilmesi gerekmektedir. Ayrıca immünokompetan hayvan modellerinde vektörün anti-tümoral etkinliğinde GM-CSF geninin rolünün immünolojik testlerle araştırılması önem taşımaktadır.

ÖZET

Kanserde Damar Endoteline Yönelik Gen Tedavisi Ajanları Geliştirilmesi

Yeni damar oluşumu anlamına gelen anjiyogenez, bazı fizyolojik olaylar için gerekli bir işlem olmasının yanı sıra tümör hücrelerinin büyüüp gelişmesi için de zorunlu bir süreçtir. Bu sürecin çok fazla sayıda molekül, protein ve yolak içeriyor olması onu gen tedavisinin hedeflerinden biri haline getirmiştir. Anti-anjiyogenik gen tedavisinde, kanser damar endoteline yönelik ajanlar geliştirmek yeni stratejiler arasındadır. Bu çalışmanın amacı, damar endoteline spesifik vektör dizayn ederek anjiyogenezi önleyebilmektir. Damar endoteline spesifik yönlendirme amacıyla, ICAM2 geni promotörü kullanılmıştır. Bu promotora ilave olarak, 5-FC'yi 5-FU'ya dönüştüren CD geni ile tümör hücrelerine karşı gelişen immüniteyi arttırmak amacıyla önemli bir sitokin olan GM-CSF geni de oluşturulan adenoviral genoma yerleştirilmiştir. Oluşturulan AdICAM2CDIRESGM-CSF transgenik virus insan umbilikal damar endotel hücresi (HUVEC), insan kolon kanseri (HT-29), insan meme kanseri (MCF-7) ve primer mide kanseri hücre serilerine uygulanmıştır. Tüm hücrelerde ICAM2 gen transkripsiyonu olmasına karşın, virusun en çok endotel hücrelerine spesifik olduğu görülmüştür. Virusun *in vivo* etkinliğini saptamak bundan sonraki araştırma basamağını oluşturmaktadır.

Anahtar kelimeler: CD, damar endoteli, gen tedavisi, GM-CSF, ICAM2, kanser

SUMMARY

Designing Gene Therapy Vectors Targeting Tumor Cell Endothelium

Angiogenesis is essential for tumor growth and metastasis as well as for some physiological processes. Making tumor endothelium specific vectors is one of the new strategies for anti-angiogenic gene therapy. In this study we aimed to design a tumor endothelium specific adenoviral vector carrying cytosine deaminase and GM-CSF transcription units. We used ICAM2 promoter to target proliferating endothelial cells. Cytosine deaminase, which converts 5-fluorocytosine to 5-Fluorouracil, gene was inserted to the vector as a suicide gene. Moreover, GM-CSF cytokine gene which stimulates immun system against tumor cells, was included in the construct. The newly constructed vector showed a specific activity in endothelial cells (HUVEC). However, we observed some cytotoxic activity in human colon cancer cell line (HT-29). No significant cytotoxic activity was seen in MCF-7 breast cancer and primary gastric cancer cell lines when 5-FU added to the vector infected cells. Despite the ICAM2 gene expression in all cell lines used in the current study, it was seen that virus is more specific to endothelial cells. Testing the *in vivo* effectiveness of the vector will be the next step.

Key words: cancer, CD, gene therapy, GM-CSF, ICAM2, vascular endothel

KAYNAKLAR

- AKBULUT H., ZHANG L., TANG Y., DEISSEROTH A. (2003). The cytotoxic effect of replication competent adenoviral vectors carrying L-plastin promoter regulated E1A and cytosine deaminase genes in cancers of the breast, ovary and colon. *Cancer Gene Ther.*, **10**: 388-395.
- AKBULUT H., TANG Y., MAYNARD J., ZHANG L., PIZZORNO G., DEISSEROTH A. (2004). Vector targeting makes 5-fluorouracil chemotherapy less toxic and more effective in animal models of epithelial neoplasms. *Clin Cancer Res.*, **10**: 7738-7746.
- AKBULUT H. Kanserde Gen Tedavisi. Tıbbi Onkoloji ders Kitabı. Ankara: ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları; 2007.
- ARBISER J.L. (2004). Molecular regulation of angiogenesis and tumorigenesis by signal transduction pathways: evidence of predictable and reproducible patterns of synergy in diverse neoplasms. *Semin Cancer Biol.*, **14**(2): 81-91.
- AZZAM E.I., deTOLEDO S.M., LITTLE J.B. (2003). Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. *Oncogene*, **22**:7050-57.
- BAUERSCHMITZ G.J., NETTELBECK D.M., KANERVA A., BAKER A.H., HEMMINKI A., REYNOLDS P.N., CURIEL D.T. (2002). The flt-1 promoter for transcriptional targeting of teratocarcinoma. *Cancer Res.*, **62**(5): 1271-4.
- BAUM C., OSTERTAG W., STOCKING C., VON LAER D. Retroviral vector design for cancer gene therapy. In: Gene Therapy of Cancer, Ed.: E. C. Lattime, S. L. Gerson. USA, Academic Press, Chapter 1, p.: 21-22.
- BLEZINGER P., WANG, J., GONDO M., QUEZADA A., MEHRENS D., FRENCH M., SINGHAL A., SULLIVAN S., ROLLAND A., RALSTON R., MIN W. (1999). Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene. *Nat. Med.*, **17**: 343-48.
- BRENNER M.K. Cancer gene therapy: Historical perspective. In: Curiel D, Douglas JT, eds. Cancer Gene Therapy. Totowa NJ: Humana Pres Inc., Chapter 1. 2005: 1-8.
- BRUNS C.J., LIU W., DAWIS D.W., SHAHEEN R.M., MCCONKEY DJ., WILSON M.R., BUCANA C.D., HICKLIN DJ., ELLIS L.M. (2000). Vascular endothelial growth factor is an in vivo survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma liver metastases. *Cancer*, **89**(3): 488-499.
- CALVO A., FELDMAN A.L., LIBUTTI S.K., GREN J.E. (2002). Adenovirus-mediated endostatin delivery results in inhibition of mammary gland tumor growth in C3(IVSV40) T antigen transgenic mice. *Cancer Res.*, **62**: 3934-38.
- CAO Y., O'REILLY M.S., MARSHALL B., FLYNN E., JI R.W., FOLKMAN J. (1998). Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long term dormancy of metastases. *J. Clin. Invest.*, **101**: 1055-63.
- CARMELIET P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, **438**: 932-36.
- CHADA S., RAMESH R., MHASHILKAR A.M. (2003). Cytokine and chemokine based gene therapy for cancer. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*. **5**(5): 463-74.
- CHEN Q.R., KUMAR D., STASS S.A., MIXSON A.J. (1999). Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice. *Cancer Res.*, **59**: 3308-12.

- CHUNG-FAYE G.A., CHEN M.J., GREEN N.K., BURTON A., ANDERSON D., MAUTNER V., SEARLE P.F., KERR D.J. (2001). In vivo gene therapy for colon cancer using adenovirus-mediated, transfer of the fusion gene cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase. *Gene Therapy*, **8**: 1547-54.
- COWAN P.J., SHINKEL T.A., WITORT E.J., BARLOW H., PEARSE M.J., d'APICE A.J.F. (1996). Targeting gene expression to endothelial cells in transgenic mice using the intercellular adhesion molecule 2 promoter. *Transplantation*, **62**(2): 155-60.
- COWAN P.J., TSANG D., PEDIC C.M., ABBOTT L.R., SHINKEL T.A., D'APICE A.J.F., PEARSE M.J. (1998). The human ICAM-2 promoter is endothelial cell-specific in vitro and in vivo and contains critical Sp1 and GATA binding sites. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**(19):11737-44.
- COWAN P.J., SHINKEL T.A., FISICARO N., GODWIN J.W., BERNABEU C., ALMENDRO N., RIUS C., LONIE A.J., NOTTLE M.B., WIGLEY P.L., PAIZIS K., PEARSE M.J., D'APICE A.J. (2003). Targeting gene expression to endothelium in transgenic animals: a comparison of the human ICAM-2, PECAM-1 and endoglin promoters. *Xenotransplantation*, **10**(3): 223-31.
- DAVIDOFF A.M., NG C.Y., BROWN P., LEARY M.A., SPURBECK W.W., ZHOU J., HORWITZ E., VANIN E.F., NIENHUIS A.W. (2001). Bone marrow derived cells contribute to tumor neovasculture and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice. *Clin Cancer Res.*, **7**: 2870-79.
- DAVIDOFF A.M., NATHWANI A.C., SPURBECK W.W., NG C.Y., ZHOU J., VANIN E.F. (2002). rAAV-mediated long term liver-generated expression of an angiogenesis inhibitor can restrict renal tumor growth in mice. *Cancer Res.*, **62**: 3077-83.
- DE PALMA M., VENNERI M.A., ROCA C., NALDINI L. (2003). Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat. Med.*, **9**: 789-95.
- DORONIN K., KUPPUSWAMY M., TOTH K., TOLLEFSON A.E., KRAJCSI P., KROUGLIAK V., WOLD W.S.M. (2001). Tissue-specific, tumor-selective, replication-competent adenovirus vector for cancer gene therapy. *Journal of Virology*, **75** (7): 3314-24.
- EVERTS M., KIM-PARK S.A., PREUSS M.A., PASSINEAU M.J., GLASGOW J.N., PEREBOEV A.V., MAHASRESHTI P.J., GRIZZLE W.E., REYNOLDS P.N., CURIEL D.T. (2005). Selective induction of tumor-associated antigens in murine pulmonary vasculature using double-targeted adenoviral vectors. *Gene Ther.*, **12**(13): 1042-8.
- FERRANTINI M., CAPONE I., BELARDELLI F. (2008). Dendritic cells and cytokines in immune rejection of cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **19**: 93-107.
- FOLKMAN J. (1998). Anti-angiogenic gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 9064-66.
- FOLKMAN J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.*, **29**(6 Suppl 16):15-8.
- FOLKMAN J. (2006). Angiogenesis. *Annu Rev Med.*, **57**:1-18.
- GODWIN J.W., FISICARO N., D'APICE A.J.F., COWAN P.J. (2006). Towards endothelial cell-specific transgene expression in pigs: characterization of the pig ICAM-2 promoter. *Xenotransplantation*, **13**:514-21.
- GORY S., DALMON J., PRANDINI M.H., KORTULEWSKI D., deLAUNOIT Y., HUBER P. (1998). Requirement of a GT box (Sp1 site) and two Ets binding sites for vascular endothelial cadherin gene transcription. *J Biol Chem.*, **273**: 6750-6755.

- GRECO O., DACHS G.U. (2001). Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future prospectives. *Journal of Cellular Physiology*, **187**: 22-36.
- GYORFFY S., PALMER K., GAULDIE J. (2001). Adenoviral vector expressing murine angiostatin inhibits a model of breast cancer metastatic growth in the lungs of mice. *Am. J. Pathol.*, **159**: 1137-47.
- GYORFFY S., GAULDIE J., STEWART K.A., WEN X. (2005). Antiangiogenic Gene Therapy of Cancer. In: *Cancer Gene Therapy*, Ed.: D. Curiel, J. Douglas. Humana Pres, Totowa, New Jersey.
- HALL E.J. (2003). The bystander effect. *Health Physics*, **85**(1): 31-35.
- HART I.R. (2001). The Spread of Tumours. In: *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer* (3rd edn). Oxford University Press, London.
- HE T.C., ZHOU S., DA COSTA L.T., YU J., KINZLER K.W., VOGELSTEIN B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 2509-14.
- HEISE C., KIRN D.H. (2000). Replication-selective adenoviruses as oncolytic agents. *The Journal of Clinical Investigation*, **105**(7): 847-51.
- HILL J.M., ZALOS G., HALCOX J.P., SCHENKE W.E., WACLAWIW M.A., QUYYUMI A.A., FINKEL T. (2003). Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.*, **348**: 593-600.
- HUANG M.T., LARBI K.Y., GERWIN N., NOURSHARGH S. (2005). ICAM-2 mediates PECAM-1-independent neutrophil transmigration in vivo [abstract]. *FASEB J.*, **854**: A1504.
- HUBER B.E., AUSTIN E.A., RICHARDS C.A., DAVIS S.T., GOOD S.S. (1994). Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**: 8302-8306.
- INOUE K., SLATON J.W., DAVIS D.W., HICKLIN DJ., MCCONKEY DJ., KARASHIMA T., RADINSKY R., DINNEY C.P. (2000). Treatment of human metastatic transitional cell carcinoma of the bladder in a murine model with the anti-vascular endothelial growth factor receptor monoclonal antibody DC101 and paclitaxel. *Clin Cancer Res.*, **6**: 2635-2643.
- ISHIGAMI T., UZAWA K., FUSHIMI K., SAITO K., KATO Y., NAKASHIMA D., HIGO M., KOUZU Y., BUKAWA H. (2008). Inhibition of ICAM2 induces radiosensitization in oral squamous cell carcinoma cells. *British Journal of Cancer*, **98**:1357-65.
- KALIBEROY S.A., KALIBEROYA L.N., STOCKARD C.R., GRIZZLE W.E., BUCHBAUM DJ. (2004). Adenovirus-mediated FLT1-targeted proapoptotic gene therapy of human prostate cancer. *Mol Ther.*, **10**(6):1059-70.
- KONG H.L., CRYSTAL, R.G. (1998). Gene therapy strategies for tumor anti-angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, **90**: 273-86.
- KOYAMA F., SAWADA H., HIRAO T., FUJII H., HAMADA H., NAKANO H. (2000). Combined suicide gene therapy for human colon cancer cells using adenovirus-mediated transfer of E. coli cytosine deaminase gene and E. coli uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Cancer Gene Therapy*, **7**(7): 1015-22.

- KUO C.J., FARNEBO F., YU E.Y., CHRISTOFFERSON R., SWEARINGEN R.A., CARTER R., VON RECUM H.A., YUAN J, KAMIHARA J, FLYNN E, D'AMATO R, FOLKMAN J, MULLIGAN R.C. (2001). Comparative evaluation of the anti-tumor activity of anti-angiogenic proteins delivered by gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 4605-10.
- LAMAGNA C., AURRAND-LIONS M., IMHOF B.A. (2006). Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.*, **80**: 705-13.
- Li C., Huang Q., Kung H. (2005). Cytokine and immuno-gene therapy for solid tumors. *Cellular & Molecular Immunology*, **2**(2): 81-91.
- LIU Y., DEISSEROTH A. (2006). Tumor vascular targeting therapy with viral vectors. *Blood*, **107**(8):3027-33.
- LIU Z., GUO B., LOPEZ R.D. (2009). Expression of ICAM-1 or ICAM-2 is critical in determining sensitivity of pancreatic cancer cells to cytolysis by human gammadelta T cells: implications in the design of gammadelta T cell based immnotherapies for pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol.*, **24**(5):900-11.
- MA H.I., LIN S.Z., CHIANG Y.H., LI J., CHEN S.L., TSAO Y.P., XIAO X. (2002). Intratumoral gene therapy of malignant brain tumor in a rat model with angiostatin delivered by adeno-associated viral (AAV) vector. *Gene Ther.*, **9**: 2-11.
- MACHEIN M.R., RISAU W., PLATE K.H. (1999). Anti-angiogenic gene therapy in a rat glioma model using a dominant-negative vascular endothelial growth factor receptor 2. *Hum. Gene Ther.*, **10**: 1117-28.
- McLAUGHLIN F., LUDBROOK V.J., KOLA I., CAMPBELL C.J., RANDI A.M. (1999). Characterisation of the tumour necrosis factor (TNF)-(alpha) response elements in the human ICAM-2 promoter. *J Cell Sci.*, **112**: 4695-4703.
- McLAUGHLIN F., LUDBROOK V.J., COX J., von CARLOWITZ I., BROWN S., RANDI A.M. (2001). Combined genomic and antisense analysis reveals that the transcription factor Erg is implicated in endothelial cell differentiation. *Blood*, **98**: 3332-3339.
- MIYAGI T., KOSHIDA K., HORI O., KONAKA H., KATOH H., KITAGAWA Y., MIZOKAMI A., EGAWA M., OGAWA S., HAMADA H., NAMIKI M. (2003). Gene therapy for prostate cancer using the cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide system. *The Journal of Gene Medicine*, **5**: 30-37.
- NETTELBECK D.M. (2003). Virotherapeutics: conditionally replicative adenoviruses for viral oncolysis. *Anti-Cancer Drugs*, **14**: 577-84.
- NGUYEN J.T., WU P., CLOUSE P.E., HLATKY L., TERWILLIGER E.F. (1998). Deno-associated virus mediated delivery of anti-angiogenic factors as an anti-tumor strategy. *Cancer Res.*, **58**: 5673-77.
- NICKLIN S.A., REYNOLDS P.N., BROSNAN M.J., WHITE S.J., CURIEL D.T., DOMINICZAK A.F., BAKER A.H. (2001). Analysis of cell-specific promoters for viral gene therapy targeted at the vascular endothelium. *Hypertension*, **38**(1): 65-70.
- OGAWA T., KUSUMOTO M., MIZUMOTO K., SATO N., NAGAI E., IKUBO A., AOKI Y., TANAKA M. (2000). GM-CSF gene therapy using adenoviral vector in hamster pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.*, **7**: 306-11.
- PAN P., LI Y., LI Q., GU P., MARTINET O., THUNG S., CHEN S.H. (2004). In situ recruitment of antigen-presenting cells by intratumoral GM-CSF gene delivery. *Cancer Immunol Immunother.*, **53**:17-25.

- POLVERINI J.P. (2002). Angiogenesis in health and disease: Insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Dental Education*, **66**(8): 962-75.
- POPE I.M., POSTON G.J., KINSELLA A.R. (1997). The role of bystander effect in suicide gene therapy. *European Journal of Cancer*, **33**(7): 1005-16.
- QIU Z., LAO M., WU C. (2001). Co-transfer of human wild-type p53 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genes via recombinant adenovirus induces apoptosis and enhances immunogenicity in laryngeal cancer cells. *Cancer Letters*, **167**: 25-32.
- REGE T.A., FEARS C.Y., GLADSON C.L. (2005). Endogenous inhibitors of angiogenesis in malignant gliomas: nature's antiangiogenic therapy. *Neuro-oncol.*, **7**(2):106-21.
- RIBATTI D. (2004). The involment of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J. Cell. Mol.*, **8**: 294-300.
- RICHARDSON T.B., KASPERS J., PORTER C.D. (2004). Retroviral hybrid LTR vector strategy: functional analysis of LTR elements and generation of endothelial cell specificity. *Gene Ther.*, **11**(9):775-83.
- RIGG A.S., LEMOINE N.R. (2001). Adenoviral delivery of TIMP1 or TIMP2 can modify the invasive behaviour of pancreatic cancer and can have a significant anti-tumor effect in vivo. *Cancer Gene Ther.*, **8**: 869-78.
- SACCO M.G., CANIATTI M., CATO E.M., FRATTINI A., CHIESA G., CERUTI R., ADORNI F., ZECCA L., SCANZIANI E., VEZZONI P. (2000). Liposome delivered angiostatin strongly inhibits tumor growth and metastazitation in a transgenic model of spontaneous breast cancer. *Cancer Res.*, **60**: 2660-65.
- SCAPPATICCI F.A., SMITH R., PATHAK A., SCHLOSS D., LUM B., CAO Y., JOHNSON F., ENGLEMAN E.G., NOLAN G.P. (2001). Combination angiostatin and endostatin gene transfer induces synergistic anti-angiogenic activity in vitro and anti-tumor efficacy in leukemia and solid tumors in mice. *Mol. Ther.*, **3**: 186-96.
- SCHMIDT-WOLF G., SCHMIDT-WOLF I.G.H. (1995). Cytokines and clinical gene therapy. *Eur. J. Immunol.*, **25**: 1137-40.
- SCHULZ W.A. (2005). Molecular Biology of Human Cancers. Springer, Netherlands.
- SHI Q., WANG Y., WORTON R. (1997). Modulation of the specifity and activity of a cellular promoter in an adenoviral vector. *Human Gene Therapy*, **8**:403-10.
- SRIDHAR S.S., SHEPHERD F.A. (2003). Targeting angiogenesis: a review of angiogenesis inhibitors in the treatment of lung cancer. *Lung Cancer*, **42** (Suppl 1):81-91.
- STEWART A.K., LASSAM N.J., GRAHAM F.L., GAULDIE J., ADDISON C.L., BAILEY DJ, DESSUREAULT S., DUBE I.D., GALLENGER S., KRAJDEN M., ROTSTEIN L.E., QUIRT I.C., MOEN R. (1997). A phase I study of adenovirus mediated gene transfer of interleukin 2 cDNA into metastatic breast cancer or melanoma. *Hum. Gene Ther.*, **8**: 1403-14.
- TAHARA H., LOTZE M.T. (1995). Antitumor effects of interleukin-12 (IL12): applications for the immunotherapy and gene therapy of cancer. *Gene Ther.*, **2**: 96-106.
- TAKIZAWA K., KAMIJO R., ITO D., HATORI M., SUMITANI K., NAGUMA M. (1999). Synergistic induction of ICAM-1 expression by cisplatin and 5-FU in a cancer cell line via a NF-KB independent pathway. *British Journal of Cancer*, **80**(7): 954-63.

- TANAKA T., MANOME Y., WEN P., KUFE D.W., FINE H.A. (1997). Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth. *Nat. Med.*, **3**: 437-42.
- TANAKA H., YASHIRO M., SUNAMI T., SAKATE Y., KOSAKA K., HIRAKAWA K. (2004). ICAM-2 gene therapy for peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma. *Clinical Cancer Research*, **10**:4885-92.
- TANDLE A., BLAZER D.G., LIBUTTI S.K. (2004). Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments. *Journal of Translational Medicine*, **2**: 22 .
- VORBURGER, S.A., HUNT K.K. (2002). Adenoviral Gene Therapy. *The Oncologist*, **7**: 46-59.
- WANEBO H.J., ARGIRIS A., BERGSLAND E., AGARWALA S., RUGO H. (2006). Targeting growth factors and angiogenesis; using small molecules in malignancy. *Cancer Metastasis Rev.*, **25**(2):279-92.
- WEN X.Y., BAI Y., STEWART A.K. (2001). Adenovirus-mediated human endostatin gene delivery demonstrates strain-specific anti-tumor activity and acute dose-dependent toxicity in mice. *Hum. Gene Ther.*, **12**: 347-58.
- WILDNER O., MORRIS J.C., MORRIS J.C., VAHANIAN N.N., FORD H.Jr., RAMSEY W.J., BLAESE R.M. (1999). Adenoviral vectors capable of replication improve the efficacy of HSV-Tk/GCV suicide gene therapy of cancer. *Gene Ther.*, **6**:57-62.
- WORK L.M., RITCHIE N., NICKLIN S.A., REYNOLDS P.N., BAKER A.H. (2004). Dual targeting of gene delivery by genetic modification of adenovirus serotype 5 fibers and cell-selective transcriptional control. *Gene Ther.*, **11**(16):1296-300.
- XU H., TONG I.L., DE FOUGEROLLES A.R., SPRINGER T.A. (1992). Isolation, characterization, and expression of Mouse ICAM-2 complementary and genomic DNA. *The Journal of Immunology*, **149**(8):2650-55.
- YU J.L., MAY L., KLEMENT P., WEITZ J.I., RAK J. (2004). Oncogenes as regulators of tissue factor expression in cancer: implications for tumor angiogenesis and anti-cancer therapy. *Semin Thromb Hemost.*, **30**(1):21-30.

ÖZGEÇMİŞ

I. BİREYSEL BİLGİLER

İsim : Pınar
Soyad : BAYDIN
Doğum yeri : Ankara
Doğum tarihi : 30 Mart 1979
Uyruğu : TC
Medeni durumu : Evli
e-posta : ozkal@medicine.ankara.edu.tr
Adres : 42. Cad. Çamlık Sitesi, No: 32/9 Çukurambar-Ankara /
TÜRKİYE

II. EĞİTİMİ

2004 - : Doktora öğrencisi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı, Ankara
2001 - 2004 : Yüksek lisans, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı, Ankara
1997 - 2001 : Lisans, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
Ankara

Yabancı dili : İngilizce

III. ÜNVANLARI

2003 - Araştırma Görevlisi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı, Ankara
2004- Bilim Uzmanı

IV. MESLEKİ DENEYİMİ

2004- Bilim Uzmanı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı, Ankara

V. ÜYE OLDUĞU BİLİMSEL KURULUŞLAR

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği
Tıbbi Genetik Derneği

VI. BİLİMSEL İLGİ ALANLARI

Yayınları

1. **Özkal P.**, Ilgın-Ruhi H., Akdoğan M., Elhan A.H., Kaçar S., Şaşmaz N. The genotoxic effects of hepatitis B virus to host DNA. *Mutagenesis*, 2005, 20(2): 147-150.
2. Pekkurnaz G., Gümüş G., Kutlay N., Akçay R., Kaya A., Aydos S., Burhan B., Özer L., **Özkal P.**, Rustamov A., Tükün A., Sunguroğlu A. Kronik myeloproliferatif hastalarda saptanan kromozomal anomaliler. *Klinik Laboratuvar Araştırma Dergisi, Kanseri Sitogenetiği Özel Sayısı*, 2002, 6:124-128.
3. **Özkal P.**, Özten-Kandaş N., Elhan A.H., Sunguroğlu A. Akut lösemilerde GSTT1 ve GSTM1 polimorfizmlerinin rolü. *Klinik Laboratuvar Araştırma Dergisi*. 2009; 13(1):11-15.
4. Avcı A., Sunguroğlu A., Ergüder İ.B., Akay-Gümüş G., Devrim E., **Özkal-Baydın P.**, Varol N., Durak İ. Effects of aqueous garlic extract on oxidant/antioxidant status in 32D and 32Dp210 cell lines. *Turkish Journal of Medical Science*, 2010, 40(6): 881-888.

Derlemeleri

1. **Özkal-Baydın P.**, Akbulut H. Kolon kanserinde gen tedavisi. *Türkiye Klinikleri Tıbbi Onkoloji- Özel*, 2009, 2(1): 83-90.

Yurt Dışı Kongrelerde Poster Sunumları

1. **Ozkal P.**, Ilgın-Ruhi H., Akdogan M., Elhan A.H., Kacar S., Sasmaz N. The genotoxic effects of hepatitis B virus to host DNA. Proceeding of the Digestive Disease Week 2005, 14-19 May 2005, M1231, Chicago, USA.
2. Sunguroglu A., Gumus-Akay G., **Ozkal P.**, Varol N., Akcora D., Altinok B., Gokmen D., Avcı A., Erguder IB., Devrim E., Durak I. Antiproliferative and apoptotic effects of garlic on chronic myeloid leukemia cell line. 54th Annual Congress on Medicinal Plant Research, 29 August-2 September 2006, Helsinki, Finland. *Planta Medica*.2006: 72: 1057.

3. Durak I., Sunguroglu A., Avci A., Devrim E., Erguder IB., Gumus-Akay G., **Ozkal P.**, Varol N., Akcora D., Altinok B., Gokmen D. Effects of aqueous garlic extract on oxidant/antioxidant status in 32D and 32Dp210 cell lines. 54th Annual Congress on Medicinal Plant Research, 29 August-2 September 2006, Helsinki, Finland. *Planta Medica*.2006: 72: 1058.
4. Ruhi H.I., Akdogan M., Ozkal P., Elhan A.H., Kacar S., Sasmaz N. Does the genotoxic effect of lamivudine treatment in chronic hepatitis B to the host DNA? 2007. *Hepatology*, 46(4):664A.
5. Varol N., Ozkan T., Gumus Akcay G., Akcora D., Rustemoglu A., Taspınar M., **Ozkal P.**, Gokmen D., Ilhan O., Beksac M., Ozcan M., Sunguroglu A. The methylation analysis of DAP kinase (DAPK) gene in imatinib resistant chronic myeloid leukemia. XX International Congress of Genetics, July 12-17, Berlin, Germany, 2008: 319.
6. Akbulut H., Coleri A., Acikgoz N., Sahin G., **Ozkal P.**, Tang Y., Icli F., Deisseroth A. GM-CSF augments tumor-specific immune response and anti-tumoral efficacy when combined with suicide gene therapy. ASCO Annual Meeting, 29 May-2 Jun 2009, Orlando, FL.

Yurt İçi Kongrelerde Poster Sunumları

1. Yalçın B., Özer L., **Özkal P.**, Ruhi H., Bökesoy I. Sitogenetik laboratuvarında kullanılan metod ve kimyasalların kromozom kırıklarına etkisi.,V. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, 02-12 Eylül 2002, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, KONYA, TÜRKİYE
2. Gümüş G., **Özkal P.**, Varol N., Akçora D., Altınok B., Durak İ., Sunguroğlu A. Sarımsağın BCR-ABL (+) fare myeloid hücre serisi üzerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkisi. IX. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 24-27 Kasım 2005,MANİSA, TÜRKİYE. Bildiri Kitabı s:72.
3. **Özkal P.**, Özten-Kandaş N., Elhan AH., Sunguroğlu A. Akut lösemilerde GSTT1 ve GSTM1 polimorfizmlerinin rolü. X. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 6-9 Eylül 2007, ANTALYA, TÜRKİYE.
4. Taşpınar M., Düzen V., **Özkal P.**, Akpınar P., Öztuna D., Tutar E., Sunguroğlu A. Myeloperoksidaz (MPO) 129G/A polimorfizmi ve ateroskleroz. X. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 6-9 Eylül 2007, ANTALYA, TÜRKİYE.
5. Akay G.G., **Özkal P.**, Rüstemoğlu A., Varol N., Akçora D., Oskay S., Altınok B., Karadağ A., Özkan T., Öztuna D., Sunguroğlu A. İmatinib (Gleevec), kültüre edilmiş periferik kan lenfositlerinde kromozom kırığını indüklemektedir. X. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 6-9 Eylül 2007, ANTALYA, TÜRKİYE

6. Varol N., **Özkal P.**, Gümüş G., Yüksel S., Köroğlu R., Küçük Ö., İbiş E., Aras G., Sunguroğlu A. Kùltùre Edilmiş İnsan Lenfosit Hùcreleri Üzerine “Samarium”un Olası Genotoksik Etkisi. VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 6-9 Mayıs 2008, ÇANAKKALE, TÜRKİYE. Bildiri Kitabı s: 220.
7. **Özkal-Baydın P.**, Gümüş-Akay G., Varol N. , Rüstemoğlu A., Köroğlu R., Yüksel S., Küçük Ö., Aras G., İbiş E., Sunguroğlu A. Potential genotoxic effect of Rhenium-186 on human lymphocyte cells: *In vitro* evaluation with Micronucleus-FISH Analysis. 4. EORTC Pathobiology Group Annual Meeting 1. IMCRC, 21-24 Mayıs 2009, Antalya, Türkiye.

Sözlü Sunumlar

1. **Özkal P.**, Ruhi H, Akdoğan M, Kacar S, Sasmaz N. Hepatit B virusunun konak DNA’sına olan genotoksik etkileri. 21. Ulusal Gastroenteroloji Haftası, 31 Ağustos-5 Eylül 2004, ANTALYA, TÜRKİYE. The Turkish Journal of Gastroenterology. pg:9.

VII. BİLİMSEL ETKİNLİKLERİ

Yer Aldığı Projeler

1. Hepatit B Virusunun ve Tedavisinde Kullanılan Antiviral Ajanların Konak DNA’sına Olan Genotoksik Etkisi
2. İnsan Lenfosit Hùcreleri Üzerine Rheniumun Olası Genotoksik Etkileri: MN ve FISH Analizi ile Değerlendirme
3. Koroner Arter Hastalarında Myeloperoksidaz (MPO) Gen Polimorfizmi ve Enzim Aktiviteleri
4. Kalsifiye Meme Tümörü Dokusunda Nanobakter Varlığının Araştırılması
5. Rutin tedavi olarak Kapesitabin veya Kapesitabin kombinasyonu uygulanan metastatik kolon veya meme kanserli hastalarda tedavi yanıtını etkileyen faktörler

Verdiği Seminerler

Kasım, 2009	Keşfinden Günümüze Nanobakteriler
Aralık, 2008	Sitokinlerle Kanser Gen Tedavisi
Nisan, 2007	Adenoviral Gen Tedavisi
Mart, 2006	Kanser Gen Tedavisinde TNF
Mart, 2005	TNF ve Kanser
Ocak, 2004	Viral İnfeksiyonlarda İnterferonun Rolü
Aralık, 2003	Hepatit B Virus ve Kanser
Nisan, 2002	Ekstraselüler Matriks ve Kanser

VIII. DİĞER BİLGİLER

Katıldığı Bilimsel Toplantılar-Seminerler

- 13 Nisan 2010 : 3. Ankara Tıp Biyokimya Günü. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD.
- 28-31 Ekim 2009 : 11. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, BODRUM, TÜRKİYE
- 10-12 Eylül 2009 : BSO-3 Immunotherapy and Gene Therapy in Cancer, VOLOS, GREECE
- 23 Mayıs 2009 : Temel Onkolojide Güncel Gelişmeler Sempozyumu. Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü.
- 30 Nisan 2009 : 2. Ankara Tıp Biyokimya Günü. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD.
- 2-3 Kasım 2007 : Gene Therapy Symposium. Yeditepe Üniversitesi, İSTANBUL, TÜRKİYE.
- 6-9 Eylül 2007 : 10. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE.
- 24-27 Kasım 2005 : 9. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, MANİSA, TÜRKİYE.
- 31 Ağustos-5 Eylül 2004 : 21. Ulusal Gastroenteroloji Haftası, ANTALYA, TÜRKİYE.
- Nisan, 2004 : 6. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE.
- 9-12 Ekim 2002 : 5. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, Selcuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, KONYA, TÜRKİYE.

Katıldığı Kurslar

- 25-26 Haziran 2010 : I. Kök Hücre Kursu ve V. Kök Hücre Sempozyumu, Ankara.
- 21-29 Aralık 2009 : Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu VII. Gazi Üniversitesi, Ankara.
- 13 Haziran 2009 : Temel Onkoloji Kursu. İç Hastalıkları Mezuniyet Sonrası Eğitim Derneği, Ankara.