



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HEDEFE YÖNELİK OLARAK GELİŞTİRİLEN TOKSİN
FÜZYONUNUN ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRELERİNDE *IN VITRO*
TEDAVİ EDİCİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

DAMLA ULUDAĞ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üye NİHAL KARAKAŞ

İSTANBUL 2021

TEZ ONAYI

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Tez Sahibi : Damla ULUDAĞ
Tez Başlığı : Hedefe Yönelik Olarak Geliştirilen Toksin Füzyonunun
Çeşitli Kanser Hücrelerinde İn Vitro Tedavi Edici Etkisinin
İncelenmesi
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 11.01.2021

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

<u>Danışman</u>	<u>Kurumu</u>	<u>İmza</u>
Dr.Öğr.Üyesi Nihal KARAKAŞ	İstanbul Medipol Üniversitesi	
<u>Sınav Jüri Üveleri</u>		
Prof.Dr. Hasan KÖRKAYA	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Prof.Dr.Ülkan KILIÇ	Sağlık Bilimleri Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Damla ULUDAĞ



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimime kabul sürecimden bu yana, farklı bir alandan geçiş yapmama rağmen bana inanan ve bu alanda başarılı olabilmem için daima yüreklendiren; bilgi ve tecrübelerinden birebir faydalanma imkanını sunan, yeri geldiğinde bir abla yeri geldiğinde bir anne özverisi ile benimle her konuda iletişimde olan, en sevdiğim alanda yetişmemde ve bilim insanı olabilme yolumda büyük katkıları olan saygıdeğer danışmanım Dr. Öğr. Üye. Nihal KARAKAŞ'a gönülden teşekkürlerimi iletmek isterim. Lisans eğitimim esnasında bilim ile beni tanıştıran ve heyecanımı benimle paylaşan, çeşitli bilimsel çalışmalarda aktif bir şekilde rol almamı sağlayan ve fikirlerine çok değer verdiğim sayın hocam Dr. Öğr. Üye. Muhammed İkbâl Alp'e; yüksek lisans eğitimime başladığımdan itibaren bu yana bana abilik eden, bilimsel tecrübelerini benimle paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen MSc. Sadık BAY'a ve eğitimim boyunca birlikte çalıştığımız ekip arkadaşım MSc. Ozan TOPCU'ya desteklerinden ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, lisans eğitimimin ardından radikal bir karar alıp, alan değiştirmemde bana son derece destek olan ve yanımda olan sevgili ailem; Zeynep ULUDAĞ, Mehmet ULUDAĞ ve Mert ULUDAĞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	x
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	7
4.1 Kanser Hastalığı ve Geleneksel Kanser Tedavileri.....	7
4.2 Kanserlerde Hedefe Yönelik Tedavi Yaklaşımları.....	7
4.2.1 İmmün Kontrol Noktası İnhibitörleri.....	8
4.2.2 Nanopartiküller.....	9
4.2.3 Apoptoz Agonistleri: Ölüm Reseptörlerinin (Death Receptors) Hedeflenmesi.....	10
4.2.4 Anjiyogenez İnhibitörleri.....	11
4.3 Hedefe Yönelik Toksinler.....	13
4.3.1 Toksin Konjugatlarının Oluşturulması.....	13
4.3.2 Pseudomonas Ekzotoksin.....	14
4.4 Çeşitli Kanser Tedavilerinde Hedeflenen Reseptör ve Ligandlar.....	15
4.4.1 Tümör Nekroziz Faktör Bağımlı Apoptozu İndükleyen Ligand.....	15
4.4.2 Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü.....	15
4.4.3 IL13 Reseptörü.....	16
4.5 Hedefe Yönelik Toksin Füzyonlarının Kanser Tedavisinde Kullanımı.....	17
4.5.1 GMCSF Reseptörünü Hedefleyen İmmünotoksinler.....	17
4.5.2 IL-2 Reseptörünü Hedefleyen İmmünotoksinler.....	18
4.5.3 EGFR' ı Hedefleyen İmmünotoksinler.....	18

4.5.4	IL-13 Reseptörünü Hedefleyen İmmünotoksinler	18
4.6	Terapötik Protein Üretiminde Kök Hücre Yaklaşımı.....	19
4.7	Hedefe Yönelik Toksinlerin Klinik Öncesi ve Klinik Çalışmalarda Kullanımı	20
5.	Yöntem ve Gereçler	22
5.1	Kullanılan Malzemeler	22
5.2	Hücrelerin Büyütülmesi ve Saklanması	23
5.3	Biyogörüntülenebilir Kanser Hücre Hatlarının Oluşturulması.....	25
5.3.1	Lentiviral Vektörlerin Hazırlanması	26
5.3.2	Kompetent Hücrelerin Hazırlanması.....	26
5.3.3	Transformasyon.....	27
5.3.4	Plazmid DNA İzolasyonu	28
5.3.5	Plazmid DNA Miktar Tayini.....	30
5.3.6	Restriksiyon Haritalama.....	30
5.4	Lentivirüs Üretimi	32
5.5	Tersine Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR).....	32
5.5.1	RNA İzolasyonu.....	32
5.5.2	cDNA Sentezi.....	33
5.5.3	Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	34
5.5.4	Agaroz Jel Elektroforezi	36
5.6	HEK-293DT Hücrelerinden IL13-PE Toksininin Eldesi	36
5.6.1	HEK-293DT Hücrelerinin IL13-PE ile Transfeksiyonu ve Medyumdan IL13-PE' nin Konsantre Edilmesi.....	36
5.6.2	Dot Blot Yöntemi ile IL13-PE Varlığının Gösterilmesi	38
5.6.3	ELISA Yöntemi İle IL13-PE Miktarının Tayin Edilmesi.....	38
5.7	Hücre Canlılığının Tespit Edilmesi.....	39
5.8	Hücre Ölümünün Analizi	40
5.8.1	Annexin V-PI Boyaması	40
5.8.2	Western Blot.....	41
5.8.3	Protein İzolasyonu.....	41

5.8.4	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi	42
5.8.5	İmmünoablottama	43
5.9	Mutant EF-2 Kodlayan ssODN ile iMKH' lerin Toksine Dirençli Hale Getirilmesi.....	44
5.10	İstatistiksel Analizler	45
6.	BULGULAR.....	46
6.1	Çeşitli Kanser Hücre Hatlarında IL13R α 2 Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	46
6.2	Hedef Reseptörü Eksprese Eden Kanser Hücre Hatlarının Biyogörüntülenebilir Hale Getirilmesi.....	48
6.3	IL13-PE Toksinine Karşı Dirençli HEK293-DT Hücrelerinin Transfeksiyonu ve Medyumun Konsantre Edilmesi	52
6.4	Hedefli Toksin Füzyonunun Çeşitli Kanser Hücreleri Üzerindeki <i>In Vitro</i> Tedavi Edici Etkisinin Belirlenmesi	57
6.5	Mutant EF-2 Kodlayan ssODN ile Kök Hücrelerde Toksin Direncinin Oluşturulması	62
7.	TARTIŞMA VE SONUÇ	65
8.	KAYNAKLAR	70
9.	ÖZGEÇMİŞ	78

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.2.1 Kanserde Hedefe Yönelik Tedavi Yaklaşımları	8
Şekil 4.2.2.1 Kanser Tedavisi İçin Pre-Klinik Çalışmalarda Kullanılan Nanopartikül Çeşitleri	10
Şekil 4.2.4.1 Çeşitli kanser türlerinde seçici olarak fazla eksprese edilen hedef reseptörler.....	12
Şekil 4.3.1.1 Hedefe yönelik toksin füzyonlarının oluşturulması.....	14
Şekil 4.6.1 Hedefe yönelik toksinlerin hücresel etki mekanizması	20
Şekil 5.3.3.1 IL13-PE'yi kodlayan plazmidin DH10B'ye transforme edilmesi	27
Şekil 5.3.4.1 Bakterilerden büyük ölçekli plazmid DNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi	29
Şekil 5.6.3.1 Standardın serial dilüsyon halinde hazırlanması.....	39
Şekil 6.1.1 RT-PZR ile kanser hücre hatlarındaki IL13R α 2 ekspresyonunun mRNA düzeyinde tespit edilmesi.....	47
Şekil 6.2.1 Restriksiyon enzimleri ile pDNA fragmentlerinin doğrulanması.....	49
Şekil 6.2.2 GFP/Fluc plazmidi aktarılan HEK-293T hücrelerinin mikroskop görüntüsü.....	50
Şekil 6.2.3 Lentiviral transdüksiyon ile oluşturulan biyogörüntülenebilir kanser hücre hatları.....	52
Şekil 6.3.1 Toksine dirençli HEK-293DT hücreleri ve toksin direnci olmayan HEK-293T hücrelerinin toksin muamelesinin ardından hücre canlılığının analizi	53
Şekil 6.3.2 Toksine Dirençli HEK-293DT hücrelerinde transfeksiyon için kullanılan vektörlerin haritası.	54
Şekil 6.3.3 IL13-PE ve GFP/Fluc pDNA'larının restriksiyon enzimleri ile boyutlarının doğrulanması.. ..	54
Şekil 6.3.4 LV-IL13-PE pDNA'sı ile transfekte edilen HEK-293DT hücreleri.....	55
Şekil 6.3.5 HEK-293DT hücrelerinden elde edilen kondisyon medyumda IL13-PE toksininin dot blot yöntemi ile saptanması.	56
Şekil 6.3.6 PE toksini için standart okutmasının yapılması ile oluşturulan absorbans eğrisinin gösterimi.....	56
Şekil 6.4.1 Hedefe yönelik IL13-PE toksin füzyonunun yol açtığı hücre ölüm mekanizması.....	57

Şekil 6.4.2 Hedefe yönelik toksin füzyonu IL13-PE' nin kanser hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	59
Şekil 6.4.3 DT ile muamele edilen NCI-H460 hücresinin canlılık analizi.	60
Şekil 6.4.4 Annexin V-PI yöntemi ile hücre ölümünün analizi	61
Şekil 6.4.5 Hücre ölümünün western blot ile tespit edilmesi.....	62
Şekil 6.5.1 GFP/Fluc eksprese eden iMKH'lerin elde edilmesi	63
Şekil 6.5.2 DT ile muamele edilen iMKH'lerin hücre canlılık yüzdeleri.....	63
Şekil 6.5.3 DT ile muamele edilen normal iMKH ve EF-2 mutant iMKH'nin hücre canlılık analizi.	64



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 5.1.1 Kullanılan Sarf Malzemeler.....	22
Tablo 5.2.1 Çalışmada kullanılan kanser hücre paneli	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Tablo 5.3.1.1 LB-Broth Hazırlama	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Tablo 5.3.1.2 LB-Agar Hazırlama	26
Tablo 5.3.6.1 Plazmid DNA Kesim Bölgeleri	30
Tablo 5.3.6.2 VSVG Reaksiyon.....	31
Tablo 5.3.6.3 CMV Δ Reaksiyon-1	31
Tablo 5.3.6.4 CMV Δ Reaksiyon-2	31
Tablo 5.5.2.1 cDNA Sentezi İçin Gerekli Bileşenler.....	34
Tablo 5.5.2.2 cDNA Sentez Aşamaları.....	34
Tablo 5.5.3.1 RT-PZR Bileşenleri	35
Tablo 5.6.1.1 Transfeksiyon Bileşenleri	37
Tablo 5.8.4.1 Resolving Jel Hazırlama	42
Tablo 5.8.4.2 Stacking Jel Hazırlama	42
Tablo 5.8.4.3 Resolving Buffer Hazırlanışı	43
Tablo 5.8.4.4 4X Stacking Buffer Hazırlanışı.....	43
Tablo 5.8.4.5 10X Running Buffer Hazırlanışı.....	43
Tablo 5.8.5.1 10X Blotting Buffer Hazırlanışı	44
Tablo 5.8.5.2 1X Blotting Buffer Hazırlanışı	44

KISALTMALAR VE SİMGELER

- APS : Amonyum persülfat
AKT/PKB : Protein kinase B
APO2L : Accumulation of photosystem I protein 2 ligand
B-ME : Beta-mercaptoethanol
AML : Akut miyeloid lösemi
CD95 : Cluster of differentiation 95
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4
CTCL : Cutaneous T-cell lymphoma
CaCl₂ : Kalsiyum Klorür
CMVdelta : Cytomegalovirus delta
cDNA : Complementary deoxyribonucleid acid
DR : Death Receptor
DMSO : Dimethyl sulfoxide
ECM : Extracellular Matrix
EF-2 : Elongatin Factor-2
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
FDA : Food and Drug Administration
FBS : Fetal Bovine Serum
GBM : Glioblastoma Multiforme
GFP/Fluc : Green flüoresan protein/ Firefly luciferase
HIV : Human immunodeficiency virüs
HEPES : 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1.
HER2 : Human epidermal growth factor receptor 2
HER3 : Human epidermal growth factor receptor 3
HER4 : Human epidermal growth factor receptor 4
IL13 : İnterlökin 13
IL4Ra : İnterlökin 4 reseptör alfa
IL13Ra1 : İnterlökin 13 reseptör alfa 1
IL13Ra2 : İnterlökin 13 reseptör alfa 2

IL13-PE : İnterlökin 13-Psödomonas Ekzotoksin
IGF-1 : Insulin like growth factor-1
IGF1-R : Insulin like growth factor-1 receptor
LB : Luria-Bertani Broth
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
NP : Nanopartikül
OD : Optical density
PBS : Phosphate buffer saline
PSMA : Prostate-specific membrane antigen
PE : Psödomonas Ekzotoksin
PD1 : Programmed cell death-1
PDL1 : Programmed cell death-1 ligand
PI : Propidium iyodür
PDNA : Plasmid Deoxribonucleic acid
PVDF : Polivinilidin Florür
RIPA : Radioimmunoprecipitation assay buffer
TNF : Tumour necrosis factor
TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R : TRAIL-Receptor
TGFa : Tumor Growth Factor-alpha
TBST : Tris buffer saline-tween 20
TEMED : N,N,N,N-tetrametiletildiamin
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VSVG : Vesicular stomatitis virus G

1. ÖZET

HEDEFE YÖNELİK OLARAK GELİŞTİRİLEN TOKSİN FÜZYONUNUN ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRELERİNDE *IN VITRO* TEDAVİ EDİCİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Kanser hastalığı, tüm toplumlarda yaygın olarak görülmesine rağmen; pre-klinik tedavi yaklaşımlarının da klinik faz çalışmalarında ilerleyememesindeki en önemli nedenlerinden biri mevcut tedavilerin kanser hücrelerine özgü olmamasıdır. Bu çalışmada, seçici olarak kanser hücrelerinde eksprese edilen bir reseptör olan IL13R α 2'yi hedeflemek üzere toksin füzyonu kullanılmıştır. Bu amaçla; IL13 ligandına entegre edilen *Pseudomonas ekzotoksini*'nin (IL13-PE) çeşitli kanser türleri üzerindeki *in vitro* tedavi edici etkisi incelenmiştir. İlk olarak, çeşitli kanser türlerine ait hücre hatlarında, IL13R α 2 ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Bu doğrultuda, pankreas kanseri hücresi; PANC-1, akciğer kanseri hücresi; NCI-H460, prostat kanseri hücresi; PC-3, melanoma kanseri hücreleri; MeWo, SKMEL-2 ve meme kanseri MDA-MB-157 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında IL13R α 2 transkriptlerinin varlığı tespit edilmiştir. Ardından; IL13R α 2 transkripti tespit edilen hücreler, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarında kullanmak üzere floresan ve biyoluminesan proteinlerini birlikte kodlayan lentivirüsler ile biyogörüntülenebilir hale getirilmiştir. Daha sonra, toksine dirençli HEK-293T hücre hattından IL13-PE toksinini içeren medyumlar toplanmıştır. Kanser hücrelerinin, IL13-PE toksini ile muamelesinin ardından hücre canlılığının analizi yapılmıştır. IL13-PE toksinine karşı en iyi yanıtı veren kanser hücre hattının NCI-H460 akciğer kanser hücresi olduğu belirlenmiştir ve bu hücrelerde IL13-PE'ye bağlı hücre ölümü analiz edilmiştir. Sonuç olarak, IL13-PE toksininin farklı kanser türlerinde hedef reseptör seviyeleri ile uyumlu bir şekilde anlamlı derecede hücre ölümüne yol açtığı ve IL13-PE toksininin IL13R α 2 eksprese eden çeşitli kanser hücrelerini hedefleyebildiğini göstermiştir. Böylece bu çalışma ile, seçici bir şekilde kanser hücrelerini hedefleyen IL13-PE toksininin, birçok kanser türü için *in vitro* tedavi edici etkisi saptanmış olup, pre-klinik ve klinik çalışmalarda uygulanabilecek potansiyel bir terapötik aday olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler; Hedefe Yönelik Toksin Füzyonu, IL13R α 2, IL13-PE, Kanser, *Pseudomonas Ekzotoksin*

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF *IN VITRO* THERAPEUTIC EFFECTS OF THE TARGETED TOXIN FUSION IN VARIOUS CANCER CELLS

Although cancer disease is common in all societies; One of the most important reasons why pre-clinical treatment approaches do not progress in clinical phase studies is that existing treatments are not specific to cancer cells. In this study, toxin fusion was used to target IL13R α 2, a receptor that is selectively expressed on cancer cells. For this purpose; The in vitro therapeutic effect of Pseudomonas extoxin (IL13-PE) integrated into IL13 ligand on various types of cancer has been investigated. First, IL13R α 2 expression levels in cell lines belonging to various cancer types were determined. In this direction, pancreatic cancer cell; PANC-1, lung cancer cell; NCI-H460, prostate cancer cell; PC-3, melanoma cancer cells; The presence of IL13R α 2 transcripts was detected in MeWo, SKMEL-2 and breast cancer MDA-MB-157 and MDA-MB-231 cell lines. Next; Cells detected with IL13R α 2 transcript were made bioimageable with lentiviruses encoding fluorescent and bioluminescent proteins for use in in vitro and in vivo studies. Subsequently, media containing IL13-PE toxin were collected from the toxin resistant HEK-293T cell line. Analysis of cell viability was performed following treatment of cancer cells with IL13-PE toxin. It was determined that the cancer cell line that gave the best response to IL13-PE toxin was NCI-H460 lung cancer cell and cell death due to IL13-PE was analyzed in these cells. As a result, it has been shown that IL13-PE toxin induces significant cell death in different cancer types, consistent with target receptor levels, and that IL13-PE toxin can target a variety of cancer cells expressing IL13R α 2. Thus, with this study, IL13-PE toxin, which selectively targets cancer cells, has been found to have an in vitro therapeutic effect for many types of cancer and has been shown to be a potential therapeutic candidate that can be applied in pre-clinical and clinical studies.

Keywords; Cancer, IL13, IL13R α 2, IL13-PE, Targeted Toxin Fusion

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser oluşum sürecinin, normal fizyolojik koşullar altında hücrelerin hayatta kalma ve migrasyon yeteneğini regüle eden kontrol mekanizmalardan kaçması ve hücrelerin kontrolsüz olarak proliferasyonuna izin veren genetik-epigenetik değişiklikler tarafından yönlendirildiği kabul edilmektedir. Bu değişiklikler genellikle; hücre büyümesini ve bölünmesini, hücre kaderini (cell fate), hücre hareketliliğini (cell motility) ve hücre ölümünü kontrol eden sinyal yolları ile ilişkilendirilmektedir. Bu süreç doğrultusunda, tümör oluşumunun başlatılmasında kilit rol oynayan önemli gen sınıfları bulunmaktadır. Bunlar; pro-onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım mekanizmalarında yer alan genler olarak bilinmektedir. Çoğu durumda, onkogenlerin aktivasyonu ve /veya tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, kontrolsüz hücre döngüsünün ilerlemesine ve apoptotik mekanizmaların devre dışı kalmasına yol açmaktadır. Bununla birlikte, kanserin ilerlemesi; tümör hücreleri ve çevresindeki neoplastik olmayan hücreler ile hücre dışı matris (ECM) arasındaki dinamik etkileşimlerle de ilişkilidir. Tümör bölgesinde oluşan lokal mikro çevredeki değişiklikler; inflamatuvar yanıtların baskılanması, tümör metastazına olanak sağlanması, artan besin ve oksijen ihtiyacının karşılanması için anjiyogenezin harekete geçirilmesi gibi tümör progresyonuna katkı sağlayan süreçleri de beraberinde getirir.

Çeşitli kanser türlerinde geleneksel tedaviler olarak kabul gören yaklaşımlar genel olarak; cerrahi rezeksiyon (solid tümörlerde), radyoterapi ve adjuvant kemoterapidir. Geleneksel tedavilerin uygulandığı kanser hastalarında bu tedavilerdeki ciddi yan etkilerinin varlığı rapor edilmiştir. Uygulanan tedavilerde tamamıyla ortadan kaldırılamayan kanser hücrelerinin, bu tedavilere karşı direnç kazandığı bilinmektedir. Bu durum, ilaçlara direnç gösteren kanser hücre kolonilerinin çoğalması ile birlikte tedavilere karşı geliştirilen yanıtların azalması ile sonuçlanır. Bu nedenlerle, tedavi edilemeyen kanser hücre popülasyonu tümörün nüks etmesi ile sonuçlanmakta ve hastalık remisyonu yeterli başarıya ulaşmamaktadır.

Bu bağlamda, kanser hücrelerini hedefleyen tedavilere yönelim oldukça gelişmekte olan bir alan olmuştur. Aynı zamanda kanser spesifik hedefli tedaviler, geleneksel tedavilerle kombine olarak da kullanılabilir ve sinerjistik etki

sağlayarak uygulamaların geliştirebilmesi için oldukça avantajlı bir yaklaşım olarak bilinmektedir. Hedefe yönelik tedavilerde en iyi bilinen yaklaşımlardan biri immünotoksinlerin klinik öncesi ve klinik çalışmalarda kullanılmasıdır. İmmünotoksinlerin kullanımındaki temel amaç; kanser hücrelerinde spesifik olarak eksprese edilen reseptörlerin ve/veya antijenlerin hedeflenebilmesidir. Bu doğrultuda, *Pseudomonas Aeruginosa* bakterisi tarafından üretilen Pseudomonas Ekzotoksin (PE), difteri toksini ve ricin yaygın olarak çalışılan toksinler arasındadır. Pseudomonas Ekzotoksini'nin kanser hücrelerinde spesifik olarak eksprese edilen reseptörlere yönlendirilmesi ile PE'nin, güçlü sitotoksik aktivitesinin yalnızca malign hücreler üzerinde etki göstermesi sağlanmaktadır. Bu sayede, geleneksel tedavi yöntemlerinde eradike edilmek istenen yan etkilerin ortadan kaldırılabilmesi için avantajlı bir yaklaşım oluşturur. Rekombinant DNA teknolojilerinden faydalanarak oluşturulan toksin füzyonları, toksinin 3 fonksiyonel alanından ilki olan doğal bağlanma bölgesi yerine hedeflenmek istenen kanser hücrelerine bağlanacak şekilde oluşturulmaktadır. Bu sayede, hedefli toksin kanser hücre yüzeyinde eksprese edilen reseptör için uygun bir ligand-toksin füzyonu haline gelmektedir. PE'nin hedeflenen kanser hücre yüzeyindeki reseptöre bağlanmasının ardından translokasyon bölgesi ile intrasellüler alana girişi sağlanır. Ardından ADP-ribilizasyonunun gerçekleşmesi ile birlikte elongasyon faktörü-2 (elongation factor-2; EF-2)'nin inaktivasyonuna neden olur. Böylece, hücredeki protein sentezinin translasyon seviyesinde engellenmesi ile birlikte hücre ölümü gerçekleşmektedir.

Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada, hedefe yönelik toksin stratejisi için çeşitli kanser türlerinde spesifik olarak veya malign olmayan hücrelere göre daha çok eksprese edilen reseptörler hedeflenerek PE toksininin potansiyel bir anti-kanser ajan olarak çalışılabileceği rapor edilmiştir. Hedeflenen bu reseptörler arasında en çok çalışılanlardan biri de interlökin-13 reseptörü (IL13-R) olmuştur. Bu çalışmaların temelinde, rekombinant olarak hazırlanan PE toksininin bağlayıcı bölgesi interlökin 13 (IL13) ligandı ile değiştirilmiştir. Normal fizyolojik koşullar altında IL13, IL13 reseptör alfa 1 (IL13R α 1) ve IL13 reseptör alfa 2 (IL13R α 2) reseptörlerinden IL13R α 2'ye çok daha yüksek afinite ile bağlanmaktadır. IL13R α 1'in malign olmayan hücrelerdeki ekspresyonunun IL13R α 2'ye göre çok daha fazla olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, IL13R α 2 ise birçok kanser

türünde aşırı eksprese edildiği bilinen ve normal hücrelerde eksprese edilmediği ya da seviyesinin çok az olduğu farklı araştırmacılarca tespit edilmiştir. Bu avantaj, hedefli toksin PE'nin kanser hücresi spesifik reseptör olan IL13R α 2'yi hedefleyebilmesi açısından potansiyel bir hedef haline getirmiştir. Birçok klinik öncesi ve klinik çalışmalarda hedeflenen bu reseptörün özellikle glioblastoma gibi agresif ve invazif solid tümörlerde, kanser hücreleri üzerinde önemli sitotoksik aktive varlığı bildirilmiştir.

Diğer taraftan rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak hazırlanan toksin füzyonlarından IL13-PE, en ölümcül kanser olan glioblastoma beyin tümörü sistemik toksisite, molekülün kısa yarı ömürlü olması, yetersiz doku penetrasyonu, hedef dışı yönelim gibi sebepler nedeniyle faz 3 aşamasından öteye gidememiştir. Buradan hareketle, tümör dokusuna tropizma göstererek terapötik moleküller üretecek şekilde tasarlanmış kök hücrelerin toksin taşıyıcı olarak kullanılması fikri gündeme gelmiştir. Toksine dirençli hale getirdikten sonra IL13-PE üretebilecek şekilde gen mühendisliği uygulanan terapötik nöral kök hücrelerin, infüzyon ile verilen IL13-PE'ye kıyasla GBM modeli SCID farelerde anlamlı derecede sağ kalım sürelerini uzattığı gösterilmiştir. Dolayısıyla farklı kanser türleri için de IL13-PE toksin uygulamalarına yönelik olarak uygun kök hücrelerin tedavi edici özelliklerinden faydalanmak hedefe yönelik kanser tedavilerinde önemli bir yol açabilecektir.

Günümüze kadar elde edilen bu bilgiler doğrultusunda bu çalışma ile, rekombinant DNA teknolojisi ile oluşturulan IL13-PE toksin füzyonunun etkisinin pek çok farklı kanser türü üzerindeki *in vitro* tedavi edici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, kanser hücre panelinde belirtildiği üzere, farklı kanser türlerine ait hücre hatları öncelikle floresan ve/veya biyoluminesan işaretli olarak oluşturulmuştur. Ardından, kanser hücre panelinde belirtilen tüm hücre hatlarında IL13 reseptörü olan IL13R α 2'nin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Bu sayede, çeşitli kanser türlerine ait hücrelerde IL13-PE toksin füzyonu ile hedeflenebilecek hücreler tespit edilebilmiştir. Sonrasında reseptör ekspresyonu tespit edilen hücreler üzerinde toksin füzyonunun hücre canlılığı üzerindeki etkisi *in vitro* yöntemlerle analiz edilmiştir. Ayrıca, toksin füzyonunun yol açtığı hücre ölümü, apoptoz/nekroz yönüyle incelenmiştir. Sonuç olarak, IL13-PE toksin füzyonunun farklı kanser hücre

hatlarında reseptör seviyeleriyle uyumlu bir şekilde anlamlı derecede hücre ölümüne sebep olduğu gösterilmiştir. Ayrıca toksine dirençli kök hücrelerin oluşturulması çalışmaları başlatılarak, devam çalışmalarında hem *in vitro* hem *in vivo* yöntemlerle tedavi etkisinin klinik perspektifte detaylı analiz edilmesi hedeflenmiştir.



4. GENEL BİLGİLER

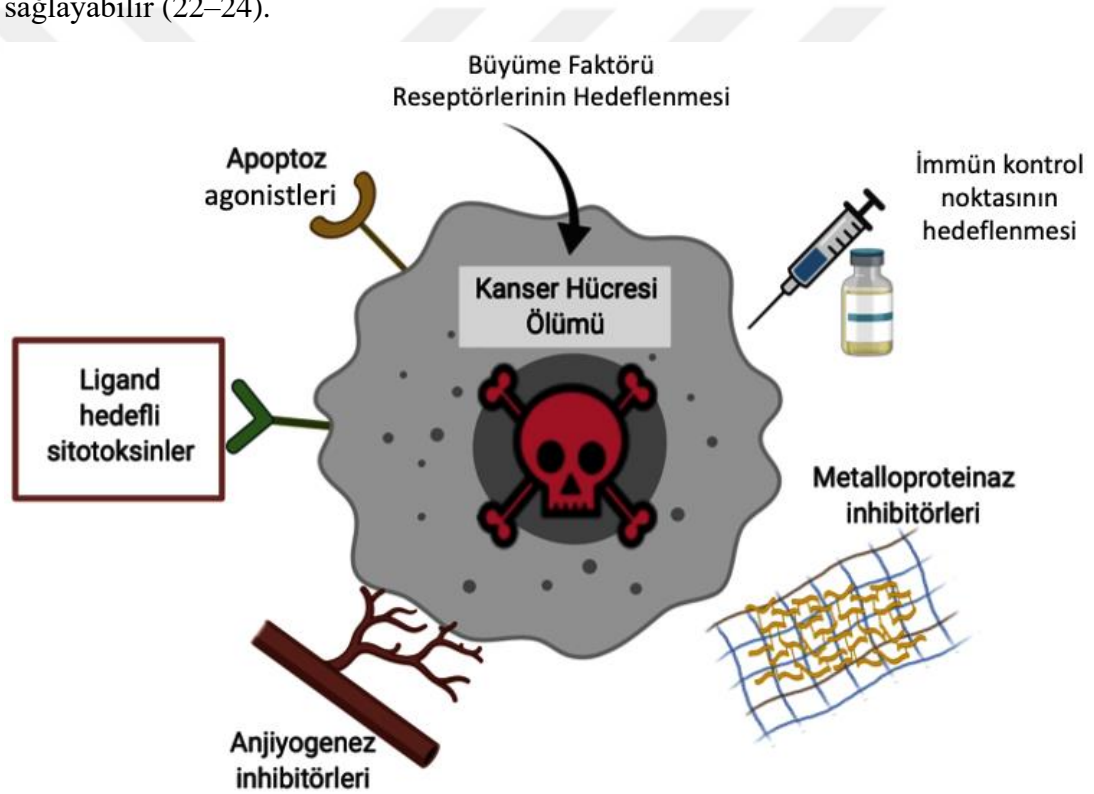
4.1 Kanser Hastalığı ve Geleneksel Kanser Tedavileri

Kanser hastalığı, görülme sıklığı ve ölüm oranı yüksek olan küresel bir sağlık sorunudur. Kanser türüne bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte, tedavi için genellikle başvuru geleneksel uygulamalar; cerrahi rezeksiyona, lokalize tümör mikro-ortamı içindeki tüm hücreleri hedef alan radyasyon tedavisine ya da hızla büyüyen ve bölünebilen hücreleri hedef alan kemoterapiye dayanmaktadır (1–6). Geleneksel kanser tedavisi tümör hücrelerine özgü olmayan hedeflere yönelik sitotoksik ajanlar içermektedir ve bu da hastalarda geniş bir yan etkiye sebep olmaktadır. Kanser tedavisindeki bu uygulamaların en önemli yan etkilerinden biri uygulanan tedavilerin kanser hücresine spesifik olmamasından kaynaklanan sağlıklı hücre, doku ve organlarda oluşturduğu hasarların varlığıdır (7,8). Aynı zamanda, bu uygulamalar ile hedeflenmeyen ve ortadan kaldırılamayan kanser hücrelerinin tedaviye direnç kazanması ve sonuçta daha agresif bir kanserle sonuçlanması klinikte oldukça yaygın olarak görülen bir durumdur. Birçok kanser türünün geleneksel tedavi uygulamalarının ardından bu tedavilere karşı direnç geliştirme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (9–11). Tedavilere karşı direnç gösteren kanserlerin artan prevalansı, uygulanan geleneksel tedavilerin ciddi sitotoksik yan etkilerinin de göz önüne alınması ile yeni ve kanser spesifik stratejilerin geliştirilmesine ve uygulanabilir hale getirilmesine olan ihtiyacı açıkça göstermektedir.

4.2 Kanserlerde Hedefe Yönelik Tedavi Yaklaşımları

Kanserde hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının öncelikli amacı; çeşitli kanser türlerinde kanser hücrelerinin proliferasyonunu, invazif kapasitesini ve metastaz yeteneği gibi özelliklerini indükleyen belirli moleküler hedefleri bloke etmek ya da engellemek üzerinedir (12,13). Gıda ve İlaç Yönetimi (Food and Drug Administration; FDA) tarafından onaylanan birçok hedefe yönelik tedavi; meme, glioblastoma, lösemi, kolorektal ve akciğer kanserleri de dahil olmak üzere sayısız kanser türünün tedavisinde dikkate değer başarı göstermiştir (14–18). Kanser tedavisinde kullanılan moleküler hedefli terapötik ajanlar farklı işlevler ve özellikler gösterebilir. Hedeflere göre; hücre döngüsü ilerlemesi, hücre ölümü, metastaz ve anjiyogenezi düzenleyen hücre yüzeyi antijenleri, büyüme faktörleri-reseptörleri veya sinyal iletim yolları

üzerinde hareket ederler. Moleküler hedefli tedavide kullanılan ajanlar küçük moleküller (small molecules), monoklonal antikolar, immünoterapötik kanser aşılı ve gen terapisi olarak sınıflandırılabilir (13,19–21). Moleküler hedefli tedavide kullanılan ilaçlar, kanser hücresi büyümesinin teşvik edilmesini destekleyen, hücre döngüsünün düzenlenmesine müdahale eden ve / veya kanser hücrelerini öldürmek için hücre ölümüne neden olan sinyalleri bloke edebilir. Bu ilaçlar, bağışıklık sistemini aktive etmek için kanser hücrelerini ve tümör mikro-ortamı içindeki bileşenleri hedefleyebilir. Spesifik işlevleri ile ilgili olarak ilaçlar, ayrıca kemoterapi ile birlikte kullanıldığında tümör ilerlemesini ve invazyonu baskılanmasını/durdurulmasını veya dirençli tümörlerin diğer tedavi gruplarına karşı yeniden duyarlı hale getirilmesini sağlayabilir (22–24).



Şekil 4.2.1 Kanserde Hedefe Yönelik Tedavi Yaklaşımları

4.2.1 İmmün Kontrol Noktası İnhibitörleri

Kanser büyümesi ve progresyonu immün baskılama (suppression) ile yakından ilişkilidir. Kanser hücreleri, immünsupresif fonksiyonları barındıran farklı immün kontrol noktası yolaklarını aktive etme yeteneğine sahiptir. Bu sebeple, immün kontrol noktalarını hedefleyen monoklonal antikoların tasarlanması, kanser tedavilerinde potansiyel bir tedavi yaklaşımı olarak kabul görmüştür (25–27). Bu yaklaşımda

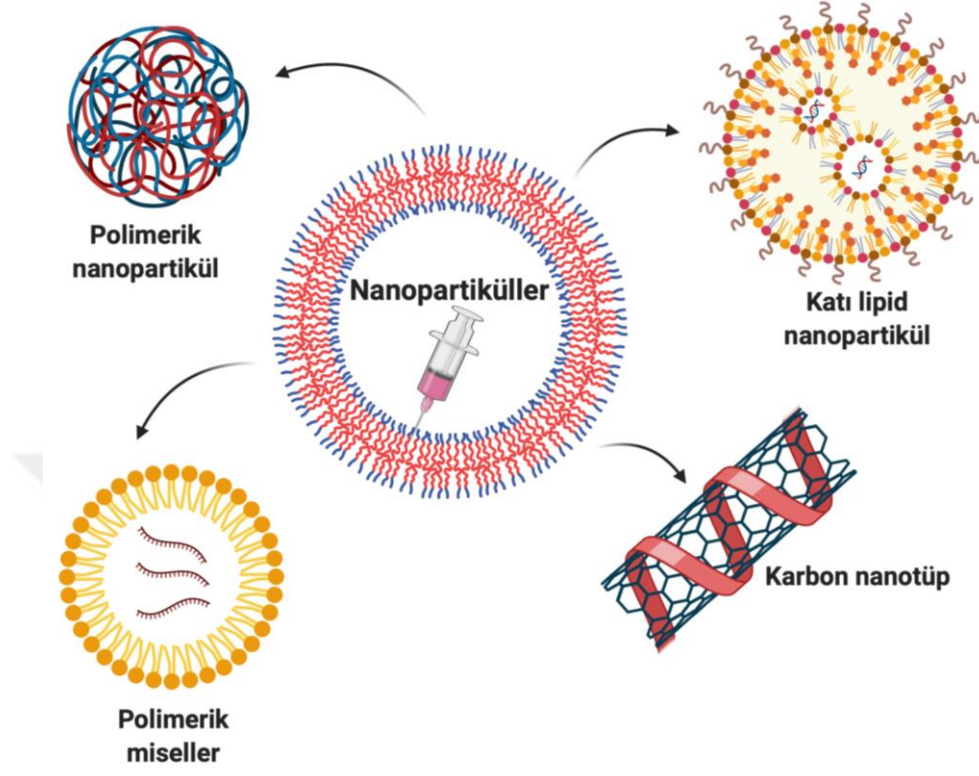
kontrol noktası inhibitörleri, immünsupresif kontrol noktasını regüle eden yolları antagonize ederek bir anti-tümör bağışıklık tepkisi indükler. Son çalışmalarda, immün kontrol noktası inhibitörleri arasında en yaygın olarak bilinenler; Programlanmış hücre ölüm proteini-1 (programmed cell death protein-1; PD-1), programlanmış hücre ölüm proteini ligand-1 (programmed cell death protein ligand-1; PD-L1) ve sitotoksik T-lenfosit ilişkili protein-4'ü (cytotoxic T-lymphocyte associated protein-4; CTLA-4) hedefleyen inhibitörlerdir (28–30).

CTLA-4'ü anti-tümör immün yanıtlarında önemli bir kontrol noktası molekülü olarak destekleyen *in vitro* çalışmaların ardından, anti-CTLA-4 bloke edici antikör tedavisi başlangıçta meme, prostat ve melanoma dahil olmak üzere birçok hayvan modelinde test edilmiştir (31–33). Ancak elde edilen sonuçlar doğrultusunda, immün kontrol noktası inhibitörlerinin diğer kanser türlerine nazaran katı tümörlerde beklenen yanıt ve başarıya ulaşamadığı görülmüştür (34–36). Yapılan ilk çalışmalarda, CTLA-4 blokajının anti-tümör immün yanıtını arttırdığı gösterilmiştir. Ancak bu anti-tümör yanıt, hücrel aşı üreten GM-CSF ile kombine edildiğinde sadece CTLA-4'e yanıt veren birkaç kanser hücre hattı (melanoma, prostat ve T-lenfoma gibi) ile sınırlı olmuştur. Bu bulgular, CTLA-4 blokajının, doğal veya aşya bağlı tümöre özgü T hücrelerinin güçlendirilmesi yoluyla önemli bir anti-tümör aktivitesi ile sonuçlanabileceğini düşündürmektedir. Son olarak, sınırlı bir endojen immün tepkisi olan tümörlerde, CTLA-4 antikörünün bir aşı ile kombinasyonunun, tümör büyümesini engellemek ve tümör gerilemesine yol açmak için bir bağışıklık tepkisi oluşturma potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir (37,38).

4.2.2 Nanopartiküller

Nanopartiküller (NP), kemoterapötik ilaçların kan dolaşımında kalış süresini uzatmak ve kanser dokularına hedefli iletim sağlamak için kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Nanopartiküller, pasif veya aktif hedefleme ile tümörlere uygulanabilir. Pasif hedefleme, nanopartikülün fizikokimyasal özelliklerine ve tümör bölgelerinde gelişmiş geçirgenlik ve tutma (enhanced permeability and retention; EPR) etkisine dayanırken; aktif hedefleme, partiküllerin tümöre özgü ligand barındırmak üzere tasarlanmasının ardından bir kez tümör bölgesine yerleştirildikten sonra bu ligandın tümör hücre reseptörlerine yönlendirilmesine dayanmaktadır (39–41). Kanser tedavisinde ilaç dağıtım sistemleri olarak kullanılabilen nanopartiküller; polimer-ilaç

konjugatları, polimerik miseller, altın nanopartiküller (gold nanoparticles), lipozomlar, viral nanopartiküller ve karbon nanotüpler olarak sınıflandırılabilir.



Şekil 4.2.2.1 Kanser Tedavisi İçin Pre-Klinik Çalışmalarda Kullanılan Nanopartikül Çeşitleri

Nanopartiküllerin kanser tedavisinde etkili olması için ilk olarak, kan dolaşımındaki hacim veya aktivitelerinin minimum kaybı ile vücuttaki bariyerlere nüfuz etmesi yoluyla hedeflenmek istenen tümör dokularına ulaşabilmeleri gerekmektedir. Tümör dokusuna ulaştıktan sonra ilaçlar, aktif formun kontrollü bir salınım mekanizması ile normal hücreleri etkilemeden tümör hücrelerini seçici bir şekilde öldürme yeteneğine sahip olmalıdır. Bu iki temel strateji aynı zamanda ilaçların hücre içi konsantrasyonunu arttırarak ve aynı zamanda doz sınırlayıcı toksisiteleri azaltarak hastanın sağ kalım süreci ve yaşam kalitesindeki iyileşmelerle ilişkilidir. Nanopartiküllerin, etkili ilaç taşıyıcı sistemler için bu gerekliliklerin her ikisini de karşılama potansiyeli olduğu düşünülmektedir (42,43).

4.2.3 Apoptoz Agonistleri: Ölüm Reseptörlerinin (Death Receptors) Hedeflenmesi

Apoptoz mekanizması, kanser patofizyolojisi altında sıklıkla düzensizleşmektedir (dysregulate). Bunun en iyi bilinen nedenlerinden biri ise kanser

hücrelerinin apoptotik yolları hücre ölümünden kaçış mekanizması olarak aktive edebilme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Programlanmış hücre ölüm yollarının regülasyonu konusundaki son gelişmeler, malign hücrelerde apoptozu etkinleştirmek için yeni ajanların geliştirilmesi düşüncesini beraberinde getirmiştir. Bu gelişmeler doğrultusunda, apoptoz sürecinin gerçekleştiği intirinsik ve ekstrinsik yollardaki proteinler üzerindeki çalışmalar geliştirilmiştir (44). Şimdiye kadar, en iyi karakterize edilmiş ölüm reseptörleri (death receptor; DR); CD95 (Fas / Apo1), TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand reseptörü (TRAIL-R) ve tümör nekroz faktörü reseptörüdür (TNF-R). Bu sürecin, Apo2L/TRAIL ve DR agonistleri tarafından aktivasyonu, ekstrinsik yolağın aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır ve tümör hücrelerinde apoptozu teşvik etmek için önemli bir terapötik stratejiyi temsil eder. Apo2L / TRAIL aracılı apoptozun kanser hücrelerine karşı seçici olarak indüklenmesi ve neoplastik olmayan hücrelerde toksisite oluşturmamasından dolayı kanser tedavisinde potansiyel bir yaklaşım olarak kabul görmektedir (45–48).

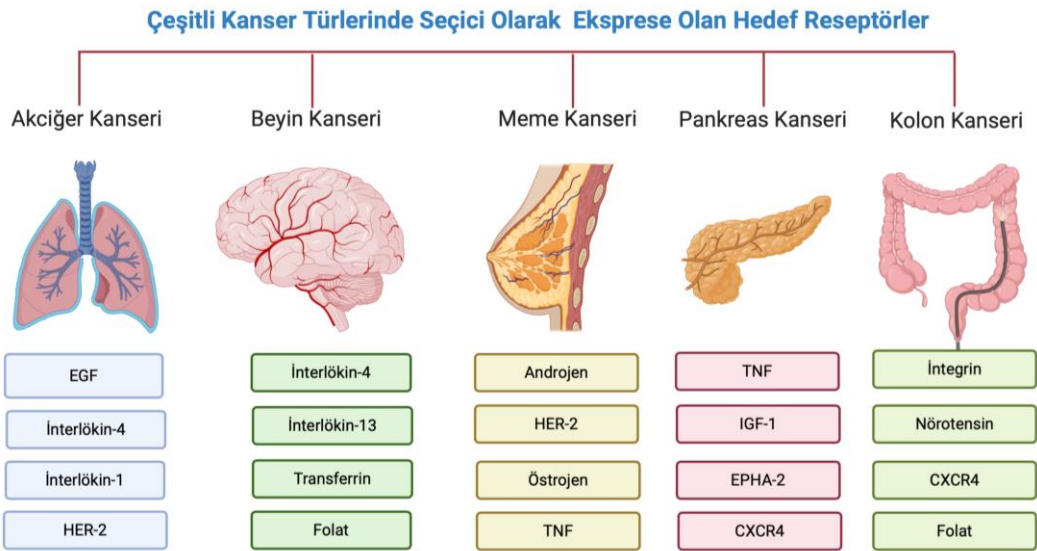
4.2.4 Anjiyogenez İnhibitörleri

Yeni kan damarlarının oluşum süreci olarak bilinen anjiyogenez, tümörün büyüme sürecinde yüksek proliferasyon kapasitesine sahip hücrelere yeterli miktarda oksijen ve metabolit kaynağı sağlamak için yeni kan damarlarının oluşumunu gerektirir (49). Anjiyogenez tümör ilerlemesinde önemli bir mediyatör olarak bilinmektedir. Bu süreç; tümör progresyonu, migrasyonu ve metastazına katkıda bulunabilir ve genellikle tümör prognozunun bir göstergesi olarak kabul edilir. Bu nedenle, tümör anjiyogenezinin hedeflenmesi klinik açıdan potansiyel tedavi seçenekleri arasında kabul gören bir strateji olmuştur (50). Anjiyogenez inhibitörleri, endotel hücrelerini hedefleyen doğrudan inhibitörler veya anjiyogenez indükleyicilerinin ekspresyonunu önleyen / aktivitesini bloke eden in-direkt inhibitörler olarak sınıflandırılır. Bu inhibitörler, monoterapi olarak veya diğer anti-kanser ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılabilir. Bu bağlamda, birçok klinik öncesi ve klinik çalışma, kombine tedavilerin bireysel tedavilere kıyasla daha yüksek terapötik etkinliği olduğunu ortaya koymuştur (51).

Günümüzde, birçok anjiyogenez inhibitörü klinik çalışmalarda test edilmektedir. Şu anda, VEGF yolağı için kullanılan inhibitörler klinik olarak en gelişmiş olanlardır. FDA, kanseri tedavi etmek için bir dizi anjiyogenez inhibitörünü

onaylamıştır. Bunların çoğu, VEGF'yi, VEGF reseptörünü veya anjiyogenezde yer alan diğer spesifik molekülleri hedeflemek için özel olarak geliştirilen hedefe yönelik tedavilerdir. Onaylanmış anjiyogenez inhibitörleri için: Bevacizumab (Avastin®), Axitinib (Inlyta®), Ramucirumab (Cyramza®), Sunitinib (Sutent®) ve Vandetanib (Caprelsa®) örnek olarak verilebilir. VEGF'yi hedefleyen anjiyogenez inhibitörleri ile tedavinin ardından; kanama, arterlerde pıhtılaşma, hipertansiyon ve yara iyileşmesinde bozulma gibi yan etkilerin meydana geldiği rapor edilmiştir (52,53).

Bu stratejilere ek olarak, ligand hedefli tedavilerin kullanımı pek çok farklı kanserde hedefli terapi yaklaşımı açısından oldukça potansiyel bir tedavi seçeneğidir. Ligand hedefli tedavi yaklaşımlarındaki esas ilke, kanser türüne spesifik olarak aşırı eksprese olan reseptörlerin hedeflenebilmesidir. Bu yaklaşımda ki amaç kanser hücrelerinde aşırı eksprese olan ancak neoplastik olmayan vücut hücrelerinde çok az ya da hiç ekspresyonu bulunmayan reseptörleri hedefleyebilmektir. Bu sayede; geleneksel tedavilerin prensibi ile karşılaştırıldığında bu tedavilerin sebep olduğu sistemik toksisite, tedavi kaynaklı sitotoksik ajanların sebep olduğu neoplastik olmayan hücrelerin görmüş olduğu zarar eradike edilebilmektedir.



Şekil 4.2.4.1 Çeşitli kanser türlerinde seçici olarak fazla eksprese edilen hedef reseptörler

Ligand hedefli tedavilere; kanser hücrelerinde seçicilik gösteren ligandların siRNA'lar ile hedeflenmesi, nanopartikül sistemleri, ligand hedefli lipozomların tasarlanması ve kullanılması, immünpolimerler ve **immüntoksinler** gibi pek çok tedavi seçeneği örnek verilebilir. Çeşitli sistemlerin içerisinde ligand

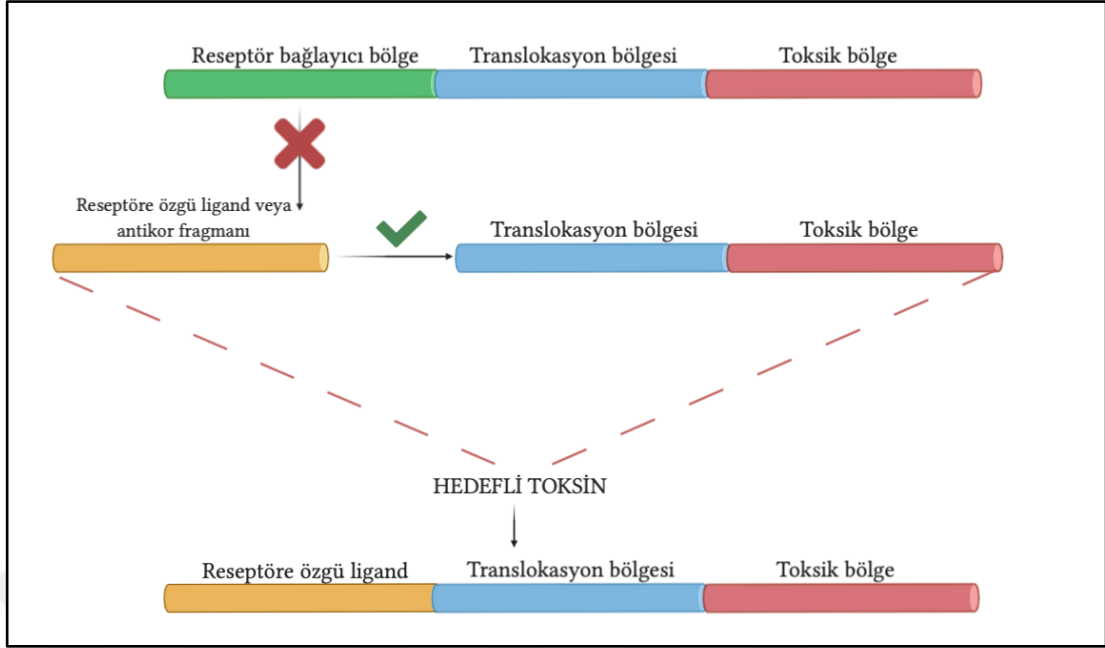
hedefli immüntoksinler birçok kanser tedavisinde olumlu gelişmeler göstermektedir.

4.3 Hedefe Yönelik Toksinler

İmmünotoksinler olarak bilinen hedefe yönelik toksinler, spesifik yüzey reseptörleri veya antijenleri eksprese eden hücreleri hedefledikleri için kanser tedavisinde önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. İmmünotoksinler; bir büyüme faktörü, monoklonal antikor veya antikor fragmanı gibi bir ligand içermektedir. Ligand alt birimi hedef hücrenin yüzeyine bağlandıktan sonra molekülün hücre içine endositoz aracılığı ile internalizasyonu gerçekleşir ve toksin molekülü hücredeki protein sentezini inhibe ederek kanser hücrelerinin ölümüne neden olur. Kanser hücrelerine hedeflendirilmiş bakteriyel toksinler arasında; rekombinant tek zincirli veya çift zincirli toksin füzyonları oluşturmak için çok uygun olan *Pseudomonas* ekzotoksin, difteri toksini ve bitki toksinlerinden ise risin (ricin) bulunmaktadır (54–57).

4.3.1 Toksin Konjugatlarının Oluşturulması

Bakteriyel ve bitkisel kaynaklı toksinler ana hatları ile 3 temel bölgeden oluşmaktadır. Bu bölgeler; reseptör bağlayıcı bölge (bölge I), translokasyon bölgesi (bölge II) ve enzimatik olarak aktif olan sitotoksik bölgeyi (bölge III) kapsamaktadır. Bu organizmalardan elde edilen toksinlerin hedefe yönelik toksinler olarak oluşturulabilmesi için rekombinant DNA teknolojilerinden yararlanılır. Böylece, toksinlerde var olan reseptör bağlayıcı bölge çıkartılarak kanser hücresinde spesifik olarak hedeflenecek bölge için uygun bir ligand ile değiştirilir. Bu sayede, sağlıklı dokuya zarar verilmeden ve sistemik toksisiteye sebep olmadan uygulanacak tedavi yalnızca hedeflenen kanser hücresi ile etkileşime girdiği için sonuç olarak kanser hücrelerinin ölümüne yol açmaktadır.



Şekil 4.3.1.1 Hedefe yönelik toksin füzyonlarının oluşturulması

4.3.2 Pseudomonas Ekzotoksin

Pseudomonas ekzotoksin (PE), *Pseudomonas Aeruginosa* bakterisinin ürettiği 613 amino asit uzunluğundan oluşan tek zincirli bir proteindir. PE'nin hücreler üzerinde oluşturduğu fonksiyonel etkiyi sağlayan 3 bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgeler; N terminalinde bulunan reseptör bağlayıcı bölge (bölge Ia; 1-252 a.a), toksin molekülünün sitozole taşınmasından sorumlu olan translokasyon bölgesi (bölge II; 253-364 a.a) ve C terminalinde bulunan sitotoksik bölge III (405-613 a.a)'ten oluşmaktadır(58). Sitotoksik bölge III, ADP ribozilyasyonu ve elongasyon faktörü-2 (EF-2)'nin inaktivasyonunu katalize eder. Bu sayede, protein sentezinin inhibisyonuna yol açarak hücre ölümünün gerçekleşmesine neden olur. PE, birçok hücre tipinde eksprese edilen a-2-makroglobulin reseptörüne bağlanır ve klatri aracılı endositoz yoluyla hücre içine alınır. 279-280 amino asitleri arasındaki proteolitik kesilmenin (proteolytic cleavage) gerçekleşmesi ve 265-287 rezidülerini bağlayan disülfid bağının azaltılmasının ardından, C terminalinden türetilen 37 kDa'lık bir fragman (280-612 amino asitleri) endoplazmik retikulum'a taşınır. Ardından sitoplazmaya geçtikten sonra EF-2'yi inaktive ederek hücre ölümünün gerçekleşmesine yol açar (59,60).

4.4 Çeşitli Kanser Tedavilerinde Hedeflenen Reseptör ve Ligandlar

4.4.1 Tümör Nekroziz Faktör Bağımlı Apoptozu İndükleyen Ligand

Tümör nekroz faktörü (TNF) ile ilgili apoptozu indükleyen ligand (TNF-related apoptosis-inducing ligand), TNF sitokin ailesinin bir üyesidir. Genellikle malign olmayan hücreleri korurken, çok çeşitli kanser hücrelerinde seçici olarak apoptozu indüklemeye yeteneğine dayanarak TRAIL, kanser tedavisi için potansiyel bir anti-kanser ajandır. Çeşitli kemoterapi ajanlarının TRAIL'in sitotoksik etkilerini arttırdığı gösterilmiştir. Bir anti-kanser tedavisi olarak TRAIL'in potansiyel faydaları, radyoterapinin etkinliğini artırma kabiliyeti ile de gösterilmiştir. Klinik öncesi çalışmalar, kanser tedavisi için TRAIL ölüm reseptörlerini seçici olarak bağlayan agonistik monoklonal antikörlerin potansiyel kullanımını göstermiştir. TRAIL reseptörlerini hedefleyen bir dizi farklı bileşiğin klinik öncesi çalışmalarda ilerlemeyi garanti etmek için klinik öncesi çalışmalarda yeterince etkili olduğu kanıtlanmıştır (61). Faz I denemeleri büyük ölçüde gelişmiş katı tümörleri olan hastalar üzerinde gerçekleştirilmiştir ve çözünür TRAIL (dulanermin), TRAIL-R1 mAb agonist mapatumumab ve TRAIL-R2 mAb agonistleri tigatuzumab, lexatumumab ve Apomab'ı içerir. Bu bileşikler büyük ölçüde iyi tolere edilmelerine rağmen, anti-kanser tepkileri zayıftır ve hastaların büyük çoğunluğunda remisyon görülmemiştir. Bugüne kadar, en umut verici monoterapi Hodgkin dışı lenfoma hastalarında Faz II klinik çalışmasına giren hastaların neredeyse üçte biri yanıt veren ve bir tanesi tam iyileşme gösteren mapatumumab olmuştur (62,63).

4.4.2 Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

EGFR; HER2, HER3, HER4'ü içeren HER ailesinin bir üyesidir. EGFR'ın hücre ekstrasellüler alanına, epidermal büyüme faktörü (EGF) ve transforme edici büyüme faktörü- α (Transforming Growth Factor- α ; TGF- α) gibi ligandlar bağlandığında, EGFR veya diğer HER ailesi üyeleri ile dimerler oluşturur ve tirozin rezidülerinde oto-fosforilasyona uğrar. Böylece proliferasyon, hayatta kalma ve apoptoz gibi çoklu hücrel süreçleri düzenleyen protein kinaz B (AKT / PKB) ve mitojenle aktive edilen protein kinazlar (Mitogen-Activated Protein Kinases; MAPK) gibi yollar üzerinden sinyal kaskadının başlatılmasını aktive eder (64).

EGFR'ın birçok hücrenel süreçteki fonksiyonel rolü göz önüne alındığında, EGFR aracılı etkileri hedefleyen çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. EGFR'ı hedeflemek için günümüzde kullanılan iki farklı terapötik yaklaşım; monoklonal antikoların ve küçük molekülü tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanılmasıdır. Yaygın olarak kullanılan monoklonal antikolar; Cetuximab ve Panitumumab'ı içerirken, en bilinen tirozin kinaz inhibitörü ise Gefitinib'tir. Monoklonal antikoların kullanımında anti-EGFR antikoları ekstrasellüler alana bağlanarak etki gösterirken, tirozin kinaz inhibitörleri ise intrasellüler tirozin kinaz alanını (domain) hedeflemektedir. Son çalışmalar, EGFR'nin gen düzeyinde aşağı regülasyonunda (down regulation) çeşitli kemopreventif ajanların kullanımını göstermiştir. Ayrıca, çeşitli çalışmalar kolorektal kanseri, baş-boyun kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve pankreas kanseri dahil olmak üzere çeşitli katı tümör türlerinde anti-EGFR ajanlarının hastaların genel sağ kalımı açısından anlamlı faydalarını kanıtlamıştır (65).

4.4.3 IL13 Reseptörü

IL-13, sadece normal fizyolojik koşullar sırasında değil, aynı zamanda kanserde de bağışıklık tepkilerinin ve bağışıklık mikro-çevresinin regülasyonunda önemli bir rol oynar. Birçok hücrede, IL-13 düşük afiniteli bir IL-13Ra1 monomerine bağlanır ve daha sonra IL4Ra'ya bağlanarak bir heterodimer kompleksi oluşturur. Bu kompleks Janus kinazları tetikleyebilir ve STAT (signal transducer and activator of transcription)'ın aşağı akış yolağında (downstream pathway) aktivasyonuna yol açar. Öte yandan, kanser hücrelerinde IL-13, yüksek afiniteli reseptörü olan IL-13Ra2'ye bağlanmaktadır. Mevcut araştırmalara göre IL-13, normal hücrelerde eksprese edilen IL-13Ra1 reseptörüne daha düşük afinite ile bağlanmaktayken, bazı kanser hücrelerinde seçici olarak aşırı eksprese olan IL-13Ra2 reseptörüne çok daha güçlü bir afinite ile bağlanır (66-68). Normal hücrelerde eksprese olan IL-13Ra1 ile kanser hücrelerinde seçici ekspresyonu bulunan IL-13Ra2, IL13 ligandı açısından rekabet içerisindedir. Sonuç olarak IL-13Ra2'ye çok daha yüksek afinite gösteren IL-13 ligandı bazı kanser türlerindeki hedefli terapiler için oldukça potansiyel bir ligand olarak belirlenmiştir. Bunlara ek olarak, aynı zamanda IL-13Ra2'nin belirli kanser türlerinde seçici olarak hedeflenmesi için toksin füzyonları oluşturulmuştur. Özellikle beyin tümörleri

içerisinde en agresif ve sağ kalım oranı çok düşük olarak bilinen glioblastomanın tedavisinde IL-13 ligandı *Pseudomonas Aeruginosa* bakterisi tarafından üretilen pseudomonas ekzotoksin ile füzyon proteini olarak birleştirilerek glioblastoma kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilen IL-13Ra2 reseptörüne hedeflendirilmiştir (69–71).

4.5 Hedefe Yönelik Toksin Füzyonlarının Kanser Tedavisinde Kullanımı

Toksinlerin antikora kimyasal olarak konjuge edilmesiyle hazırlanan birinci kuşak immünotoksinler, hayvan modellerinde genellikle etkili olmamıştır. Bunun sebebi, toksinin neoplastik olmayan hücreleri de öldürmüş olmasıdır. Hücre bağlanma alanının toksinden çıkarılması ve bu modifiye edilmiş toksinin çeşitli antikora bağlanması, hayvanlar tarafından daha iyi tolere edilen immünotoksinler olmuştur. Bu ikinci kuşak immünotoksinlerin bir kısmı kanser hastalarındaki faz I çalışmalarında değerlendirilmiştir. Üçüncü kuşak immünotoksinlerin üretiminde ise rekombinant DNA teknolojileri ve protein mühendisliği prensipleri kullanılarak immünotoksinler, artık sadece tümör hücrelerini tanımak ve öldürmek için gerekli elementleri içerecek şekilde tasarlanmıştır. Böylece birinci ve ikinci kuşak immünotoksinlerde yaşanan zorlukların üstesinden gelinmiştir. Kanser tedavisinde kullanıldığı bilinen hedefe yönelik toksin füzyonları arasında İnterlökin 2 (IL-2), transforme edici büyüme faktörü- α (Transforming growth factor- α ; TGF- α), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GMCSF) ve IL-13 bulunmaktadır.

4.5.1 GMCSF Reseptörünü Hedefleyen İmmünotoksinler

DT-GMCSF (DT-GM), akut miyeloid lösemi (AML) hücrelerinde bulunan GMCSF reseptörünü (GMCSFR) hedefleyen bir rekombinant toksindir. Ancak DT-GM'in AML tedavisi için kullanıldığı pre-klinik çalışmaların sonucunda, hepatositlere zarar veren küpffer hücreleri üzerinde eksprese edilen GMCSFR'yi de hedeflediği ve bu nedenle karaciğer toksisitesine neden olduğu görülmüştür(72,73). Aynı zamanda, AML hastalarını tedavi etmek için alternatif bir yaklaşım, rekombinant toksin DT388-IL3'ü kullanarak IL-3 reseptörünü hedeflemektir. IL-3'ün hedeflenmesindeki amaç ise bu füzyon proteinin makrofajları veya küpffer hücrelerini hedeflemiyor olmasıdır (74).

4.5.2 IL-2 Reseptörünü Hedefleyen İmmünotoksinler

IL-2 reseptörünün; Monoklonal antikorlar, tek zincirli antikor immünokonjugatları, radyoimmünokonjugatlar ve ligand füzyon toksinleri dahil olmak üzere kullanımının çeşitli maligniteler için potansiyel bir hedef olduğunu kanıtlamıştır. DAB389IL-2 (denileukin diftotox; Ontak^R), benzersiz bir etki mekanizmasına sahip, kliniğe ulaşan ilk genetik olarak yapılandırılmış füzyon proteindir(75). Bu molekülde, IL-2 geni, difteri toksininin enzimatik olarak aktif ve translokasyon alanlarına genetik olarak bağlanır. DAB389IL-2, endositoz ile IL-2 reseptör taşıyan hücrelere internalize edilir. Difteri toksininin ADP-ribozilasyon aktivitesi sonucunda EF-2 bloke edilerek protein sentezini inhibe edilir ve apoptoza yol açar. DAB389IL-2, B hücreli Hodgkin dışı lenfoma, kutanöz T hücreli lenfoma (CTCL), Hodgkin hastalığı, sedef hastalığı, romatoid artrit ve HIV enfeksiyonu gibi çeşitli hastalıklarda klinik aktivite göstermiştir. En yüksek yanıt oranları CTCL'de gözlenmiştir ve FDA tarafından bu hastalık için onaylanmasına yol açan klinik çalışmalara önderlik etmiştir (76,77).

4.5.3 EGFR' ı Hedefleyen İmmünotoksinler

TGF- α , kanser gelişiminde merkezi bir rol oynayan EGFR için doğal bir ligandır. EGFR eksprese eden malign tümörlerin tedavisi için (örneğin glioblastomada EGFR'in mutant formu olan EGFR-vIII ekspresyonu) TGF- α ve *Pseudomonas Aeruginosa*'dan türetilmiş bir modifiye Pseudomonas ekzotoksin A (PE38) içeren rekombinant immünotoksin geliştirilmiştir. Pseudomonas ekzotoksin A, memeli hücrelerinde protein sentezini inaktive ederek etki eder. Gerçek bir hücre bağlanma alanı olmayan PE38, rekombinant toksin içindeki TGF- α kısmı yoluyla EGFR ifade eden kanser hücrelerine bağlanır. TGF α -PE38 füzyon proteininin EGFR ifade eden tümör hücrelerine *in vitro* ve ksenograft fare modellerinde sitotoksik olduğu gösterilmiştir (78,79).

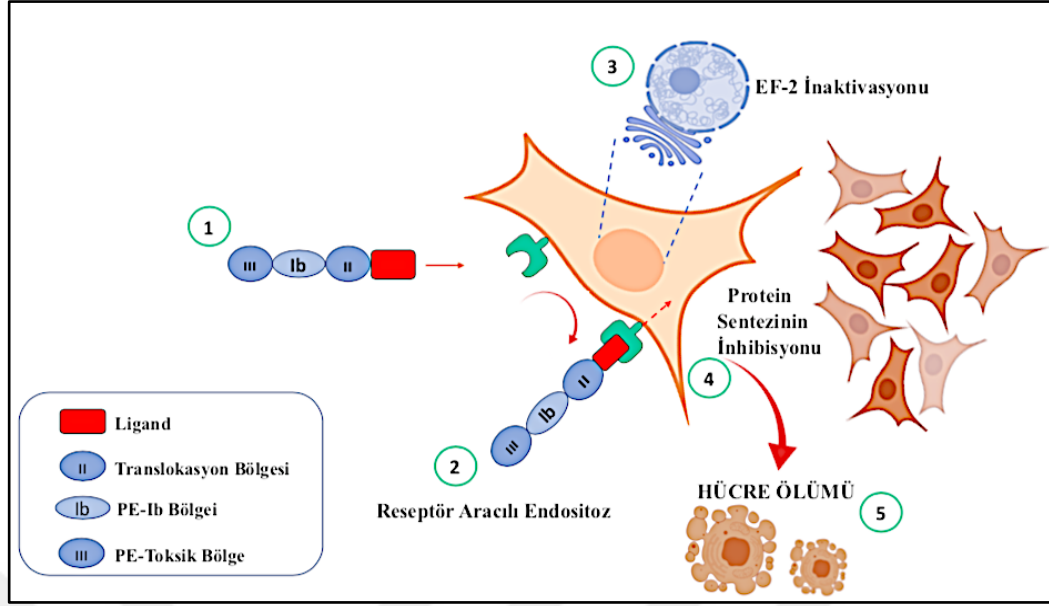
4.5.4 IL-13 Reseptörünü Hedefleyen İmmünotoksinler

Tip-2 T hücreleri ve mast hücreleri tarafından salgılanan IL-13, inflamatuvar sinyalleri ve bağışıklık tepkilerini düzenleyen pleiotropik bir sitokindir. Bu sitokin, insan monosit ve B hücre fonksiyonlarını düzenlerken T hücre fonksiyonlarını modüle etmemektedir. IL-13, üç zincire (IL-13Ra1, IL-13Ra2 ve IL-4Ra) bağlanır ve Jak sinyal ailesi tarafından STAT-6'nın fosforilasyonunu

indükler. IL-13 reseptörlerinin glioblastoma, renal hücreli karsinoma, kolon, over ve baş boyun kanserlerini içeren katı tümör hücrelerinde fazla eksprese edildiği bilinmektedir (68,80,81). IL-13'ün hedefe yönelik tedaviler için potansiyel bir ligand olarak görülmesinin sebebi birçok katı tümör hücresinde fazla eksprese olmasına rağmen, hedeflenen tek neoplastik olmayan hücre grubunun B hücreleri ve monositler olmasıdır. Şu anda; IL13-PE38 (*PE38QQR*) pre-klinik ve klinik çalışmalarda özellikle glioblastoma tedavilerinde kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra prostat ve renal hücreli karsinoma tedavilerinde de kullanılmaktadır(82). PE toksin ile birlikte aynı zamanda Difteri toksini (*DT390-IL13*) ile IL-13 reseptörünün hedeflendiği çalışmalarda bulunmaktadır. Her iki toksinin de çok düşük dozlarda hedeflendikleri kanser hücrelerinde etkili olmaları, doza bağımlı sistemik sitotoksik etkilerin tolere edilmesi açısından kanser tedavilerinde önemli bir avantaj oluşturmaktadır (83).

4.6 Terapötik Protein Üretiminde Kök Hücre Yaklaşımı

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), kemik iliği, yağ dokusu, diş özü ve plasenta / göbek kordonu kanı dahil olmak üzere farklı doku türlerinden izole edilebilen hematopoietik olmayan progenitor hücrelerdir. MKH'lerin hasarlı dokulara ve tümör bölgelerine olan tropizmi, onları tümörlere ve metastatik nişlere terapötik ajan iletimi için umut verici bir vektör haline getirmektedir. MKH'ler, tümör baskılayıcı genleri, immünomodüle edici sitokinleri ve bunların kombinasyonlarını kodlamak için genetik olarak modifiye edilebilmektedir (84). Böylelikle, terapötik özellik kazandırılmak için modifiye edilen kök hücreler, sadece tümör dokusu içerisine yönelmekle kalmayıp, tümör dokusu içindeki daha malign hücrelere de ulaşabilmektedir. Ayrıca uzun süre boyunca terapötik gen ifadesi veya terapötik ajan üretimi sağlamaktadır. Kök hücreler, doğrudan sitotoksik moleküller üretmek üzere ve intihar genleri (sitozin deaminaz veya HSV-timidin kinaz) ifade edecek şekilde de modifiye edilebilir. Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda çeşitli terapötikler kök hücreler aracılığı GBM tümörüne nakledilerek tümör kütledeki küçülme takip edilmiştir (69,85,86). Kök hücrelerin terapötik taşıyıcılar olarak kullanılması, standart tedavi yöntemlerine katkı sağlayan ve klinik çalışmalara öncülük edebilecek bir yaklaşım olarak gelişmektedir.



Şekil 4.6.1 Hedefe yönelik toksinlerin hüresel etki mekanizması

4.7 Hedefe Yönelik Toksinlerin Klinik Öncesi ve Klinik Çalışmalarda Kullanımı

Farklı tümörlerde aşırı eksprese edilen çeşitli yüzey antijenlerine yönelik çok sayıda PE bazlı immünotoksin, klinik öncesi çalışmalarda test edilmiştir. Bu immünotoksinler; primer tümör hücreleri ve tümör hücre hatları üzerinde antijen bağlanması, termostabilite, normal dokulara karşı olası çapraz reaktiviteler (cross reactivity), hedef tümör hücrelerine sitotoksosite ve *in vitro* apoptoz indüksiyonu açısından karakterize edilmiştir. Bu çalışmaların çoğunda ayrıca, tümör ksenografı taşıyan hayvanlarda *in vivo* anti-tümör etkileri ve maksimum tolere edilen dozları (MTD) incelemiştir.

A5-PE40:

Prostata özgü membran antijenine (PSMA) karşı geliştirilen ilk PE bazlı rekombinant immünotoksindir. PSMA, prostat kanseri hücrelerinde aşırı eksprese edilir ve metastaz ile birlikte bu antijen yukarı regüle (upregulation) edilir. Son çalışmalarda, hormona bağlı (hormone-dependent) ve hormona dirençli (hormone-resistant) prostat kanseri hücreleri üzerindeki etkileri 20 ila 220pM arasında oldukça düşük bir IC50 değerleri ile *in vitro* olarak etkili olduğu saptanmıştır. Fare ksenografı modellerinde ise tümör büyümesinde önemli bir inhibisyona sebep olduğu gösterilmiştir (87,88).

OVB3-PE:

Solid bir tümöre karşı birinci kuşak bir immünotoksin örneğidir ve PE molekülüne bağlı over kanseri antijenini hedefleyen bir monoklonal antikordan oluşur. Bu füzyon molekülün, over kanseri hücre hatlarında in vitro etkisinin test edilmesinin ardından hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak insan over kanserini taşıyan fare modellerinde, farelerin sağ kalım sürelerinin uzadığı bildirilmiştir (89,90).

TGF α -PE (TP-38):

TP-38, transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF- α) ile PE38'in rekombinant olarak birleştirilmesi ile oluşturulan bir immünotoksindir ve epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) hedeflemektedir. TP-38 toksin füzyonu, glioblastoma teşhisi konulmuş olan 20 hastada pre-klinik çalışmalar dahilinde test edilmiştir. Bu çalışmadaki 20 hastadan 15'inde tümör nüksü gerçekleşmiştir. TP-38'in 50 saat süre içerisinde beyne enjeksiyonunun ardından tümör nüksü gerçekleşmemiş hastaların 2'sinde hastalıkta gerileme gözlenmiştir. İlk hastanın TP-38 ile tedavisinin ardından 198. haftasında hayatta olduğu bildirilirken diğer hastanın 211. haftada hayatta olduğu rapor edilmiştir (91,92).

5. Yöntem ve Gereçler

Bu çalışmada, IL13-PE toksinin çeşitli kanser türlerine ait 21 farklı hücre hattında tedavi edici etkisini çalışmadan önce IL13R α 2reseptörünün ekspresyon seviyesi RT-PZR ile belirlenmiştir. Bu doğrultuda, IL13R α 2 ekspresyonunun varlığı tespit edilen kanser hücre hatları, TÜBİTAK 117S421 nolu proje kapsamında *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kullanılmak üzere biyogörüntülenebilir hale getirilmiştir. Bunun için, GFP/Fluc kodlayan lentiviral vektörler kullanılarak lentivirüs üretimi gerçekleştirilmiştir. IL13R α 2 eksprese eden kanser hücre hatları hazırlanan lentivirüsler ile transdükte edilmiştir. Daha sonra, biyogörüntülenebilir hale getirilen hücrelerin IL13-PE hedefe yönelik toksinine karşı vermiş olduğu terapötik yanıtın belirlenmesi hedeflenmiştir. Bunun için, toksine dirençli olan HEK-293DT hücreleri kullanılmıştır. LV-L13PE-IRES-GFP vektörü ile hücrelerin transfekte edilmesinin ardından, transfeksiyon başarısı GFP ekspresyon takibi ile gözlemlenmiştir. Daha sonra transfeksiyon yöntemi ile IL13-PE salgılanması sağlanan HEK-293DT hücrelerinden tüm medyum toplanmıştır ve Dot Blot yöntemi ile IL13-PE varlığı tespit edilmiştir. IL13-PE'nin hedefindeki kanser hücre hatları IL13-PE içeren medyumlar ile farklı dilüsyonlarda muamele edilmiştir. Buradan elde edilen sonuçlar ile, toksine karşı en iyi yanıtı veren kanser hücre hattı üzerinde çalışılmaya devam edilmiştir. Bu kapsamda, IL13-PE toksininin hücre canlılığı ve hücre ölümü üzerindeki etkileri Annexin V-PI ve Western Blot yöntemleri ile saptanmıştır. Tez çalışmasının tüm deneylerinde kullanılan malzemeler ve yöntemler aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

5.1 Kullanılan Malzemeler

Tablo 5.1.1 Kullanılan Sarf Malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biosera	1101/500
Hücre Medyumları	Gibco	Çeşitli
Penisilin/Streptomasin	Gibco	15140163
%0.25 Trypsin/Edta	Gibco	25200-056
Phosphate Saline Buffer (PBS)	Gibco	10010023
5-10 ml serolojik	Capp	SP-5-C, SP-10-C
T-25/T-75/T-175 flask	Nest	4306414
150 mm petri	Corning	430599
96 kuyulu siyah plate	Corning	3904

Cell Titer Glo Reaktifi	Promega	G7570
15-50 ml falkon	Nest-Capp	601002
50 ml filtreli falkon	Milipore	UFC901024
Cryovial	Thermo Fisher	377267
RNA izolasyon kiti	Qiagen	74104
cDNA sentez kiti	Thermo Fisher	4368814
RT-PZR kiti	Thermo Fisher	EP0752
LB-Broth ve Agar kimyasalları	Sigma	Çeşitli
Ampisilin	Sigma	69-53-4
Plazmid DNA izolasyon kiti	Qiagen	12143
Restriksiyon Enzimleri	NEB	Çeşitli
Agaroz	Sigma	9012-36-6
Red Safe	Intron	21141
Puromisin	Gibco	A11138-03

5.2 Hücrelerin Büyütülmesi ve Saklanması

Tez çalışmasında kullanılmak üzere belirlenen çeşitli kanser hücrelerine ait panel tabloda gösterilmiştir (Tablo 5.2.1).

Tablo 5.2.1 Çalışmada kullanılan kanser hücre paneli

Kanser Türü	Hücre hattı	Hücre Kültürü Medyaları
Akciğer	NCI-H460	RPMI-1640 medium + % 10 FBS
Karaciğer	Hep 3B	EMEM medyum + % 10 FBS
	Hep G2	EMEM medyum + % 10 FBS
Mide	MKN-45	RPMI-1640 medyum + % 20 FBS
	AGS	RPMI-1640 medyum + % 10 FBS
Pankreas	Capan-1	IMDM medyum + % 20 FBS
	AsPC-1	RPMI-1640 medyum + % 10 FBS
	PANC-1	DMEM medyum + % 10 FBS
Göğüs	MDA-MB-231	EMEM medyum + % 10 FBS + 0,01 mg/ml insülin
	MDA-MB-157	L-15 medyum + % 10 FBS
	MDA-MB-468	L-15 medyum + % 10 FBS
Over	SK-OV-3	Mc Coy's 5a medyum + %10 FBS
	OVCAR-3	RPMI-1640 medyum + % 20 FBS + 0,01 mg/ml insulin
Prostat	PC-3	F-12K medyum + % 10 FBS
	DU-145	EMEM medyum + % 10 FBS
	LNCaP	RPMI-1640 medyum + % 10 FBS
Kolon	HCT-15	RPMI-1640 medyum + % 10 FBS
	Colo-205	RPMI-1640 medyum + % 10 FBS

Belirtilmiş olan bu hücrelerin kültürleri tabloda gösterilen medyumlar ile gerçekleştirildi (Tablo 5.2.1). Bu koşullara ek olarak tüm hücre hatlarının kültürü % 10 FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco) ve % 1 Penisilin/Streptomisin (Multicell) varlığında yapıldı. Tüm hücrelerin inkübasyonu %5 CO₂ ve 37°C' de sağlandı. Hücrelerin alt kültürleri aşağıdaki basamaklara uygun olarak gerçekleştirildi.

1. Hücrelerden tüm medyum uzaklaştırıldı.
2. Hücreler 1X PBS (phosphate buffer saline) (Gibco) ile yıkandı.
3. PBS yıkamasının ardından tüm hücrelere yüzey adhezyon kuvvetlerine bağlı olacak miktarda %0.25 Tripsin/Edta (Gibco) ile muamele edildi.

4. Tripsin/Edta varlığında hücrelerin %5 CO₂ ve 37°C'de 3 dakika inkübasyonu sağlandı.
5. Flask yüzeyinden kaldırılan hücrelere Tripsin/Edta inaktivasyonu için 10ml %10 FBS içeren medyumlar eklendi.
6. Hücreler, 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrasında tekrar 10ml %10 FBS içeren medyum eklenerek 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
8. Ardından, hücreler %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren medyumları ile yeni flasklara ekildi ve bir diğer alt kültürlenmeye kadar %5 CO₂ ve 37°C ortamda inkübe edildi.

Tüm hücreler daha sonraki deneylerde kullanılabilmesi adına dondurularak muhafaza edildi. Bunun için hücreler Tripsin/Edta ile yüzeyden kaldırılıp 1000 rpm'de 2 kez santrifüj edildi. Santrifüjlerin ardından elde edilen hücre pelletleri saf FBS içerisinde süspanse edildi. 900µl FBS içerisinde süspanse edilen hücrelere 100µl olacak şekilde (%10 oranında) DMSO (BioFfox) eklemesi yapıldı. Ardından hücreler 24 saat boyunca Mr. Frosty'de bekletildikten sonra -80°C'de muhafaza edildi. Daha uzun süreli koruma için hücrelerin bir kısmı sıvı azot tankına (-150°C) kaldırıldı.

5.3 Biyogörüntülenebilir Kanser Hücre Hatlarının Oluşturulması

Floresan ve/veya biyoluminesan işaretli kanser hücre hatlarının oluşturulmasının temel amacı TÜBİTAK 117S421 nolu proje kapsamında, bu hücrelerde hedefe yönelik toksinin etkinliğinin yol açtığı hücre ölümünü *in vitro* çalışmalarda saptayabilmektir. Aynı zamanda, biyogörüntülenebilir kanser hücre hatlarının oluşturulması ilerleyen çalışmalarda *in vivo* tümör modellerinde anti-tümör etkinin görüntülenmesi için kullanılacaktır. Bu amaçla, yeşil floresan proteini (GFP) ile biyoluminesan görüntüleme ajanlarından Firefly lusiferazı (Fluc)

birlikte içeren lentiviral vektörler kullanıldı. Böylelikle, floresan/biyoluminesan ajanlarını eksprese eden kanser hücre hatları oluşturuldu.

5.3.1 Lentiviral Vektörlerin Hazırlanması

Lentiviral paketleme ve transdüksiyon çalışmalarını gerçekleştirmek üzere öncelikle lentivirüsler aşağıda belirtilen aşamalar doğrultusunda hazırlandı.

LB-Broth ve LB-Agar Hazırlanması

LB-Broth ve LB-Agar tablo 5.3.1.1 ve tablo 5.3.1.2’de gösterildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 5.3.1.1 LB-Broth Hazırlama

LB-Broth Hazırlama	
5 gram Yeast Extract	
10 gram NaCl	
10 gram Trypton	
ddH ₂ O ile 1 litre olacak şekilde hazırlandı.	

Tablo 5.3.1.2 LB-Agar Hazırlama

LB-Agar Hazırlama	
5 gram Yeast Extract	
10 gram NaCl	
10 gram Trypton	
20 gram Agar	
ddH ₂ O ile 1 litre olacak şekilde hazırlandı.	

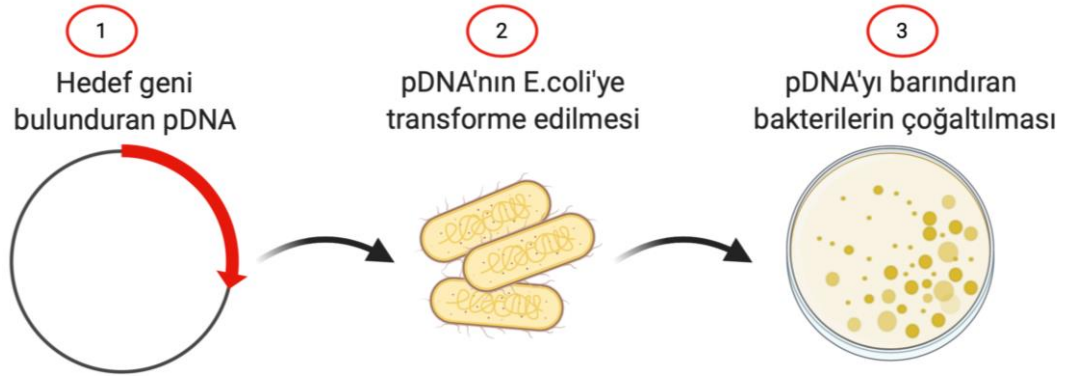
5.3.2 Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

Kompetent hücrelerin hazırlanması için E.coli bakteri suşlarından biri olan DH10B bakterisi kullanıldı. DH10B bakteri hücrelerinin çoğaltılması için 20ml LB sıvı kültür içerisine aktarılan bakteriler gece boyunca 37°C sıcaklıkta ve 220 rpm hız ile çalkalanarak büyütüldü. 16-18 saat süren inkübasyonun ardından çoğaltılan bakteriler 1 litre olarak hazırlanan LB medyumun içerisine eklendi ve 2-3 saat boyunca yine 37°C sıcaklıkta ve 220 rpm hız ile çalkalanarak çoğaltıldı. 2. Saatten itibaren kompetent hücrelerin transformasyon verimliliği açısından literatür ile optimize edilen OD değerinin ölçülmesi adında 96 kuyulu plakalara 1 litre kültür içinden alınan bakteri süspansiyonu 200 µl olarak eklendi. OD değerinin kontrol okutmasının yapılması için ise yine 96 kuyulu plakalara içerisinde bakteri bulunmayan saf LB eklendi ve OD

değeri Spektromax cihazında okutuldu. OD değeri 595 nm’de 0.3-0.4 aralığındaki değerlere ulaşıncaya kadar aynı işlemlere devam edildi. Ardından 1 litre içerisinde çoğaltılan bakteriler 4000 rpm’de ve +4°C’de 10 dakika boyunca sıvı kültürün tamamı bitinceye kadar çöktürüldü. Elde edilen pelletler 10 ml soğuk 0.1 M CaCl₂ solüsyonu içerisinde yavaşça süspansiyon edildi. Bu işlemin ardından süspansiyon edilen pelletler 2500 rpm’de 5 dakika boyunca +4°C’de santrifüj edildi. Daha sonra, elde edilen pellet tekrar 10 ml soğuk 0.1 M CaCl₂ solüsyonu içerisinde süspansiyon edildi ve 30 dakika buz üzerinde inkübasyonu sağlandı. 2500 rpm’de 5 dakika boyunca +4°C’de santrifüj koşulları tekrar sağlanarak elde edilen tüm pellet 2 ml soğuk 0.1 M CaCl₂ içerisinde süspansiyon edildi ve 50 µl alikotlar olmak üzere ependorflara aktararak -80°C’de muhafaza edildi. Özellikle tüm bu işlemlerin buz üzerinde gerçekleştirilmesine dikkat edildi.

5.3.3 Transformasyon

Transformasyon için hazırlanmış olan E.coli bakteri suşlarından DH10B kompetent hücreleri kullanıldı.



Şekil 5.3.3.1 IL13-PE'yi kodlayan plazmidin DH10B'ye transforme edilmesi

1. Lentivirüslerin oluşturulması için kullanılan VSVG ve CMVΔ konstraktları ve hazırlanan DH10B kompetent hücreleri buz üzerine alındı.
2. DNA miktarlarına bağlı olarak pDNA'lar, buz üzerinde bekletilen 50µl DH10B kompetent hücrelerine aktarıldı.
3. Ardından 30 dakika süre ile buz üzerinde inkübasyonu sağlandı.
4. 30 dakika sonra tüm örnekler 42°C ısıtıcıda 45 saniye boyunca ısı şoku yapıldı.

5. 45 saniyenin sonunda tüm örnekler buz üzerine alındı ve 2 dakika süre ile bekletildi.
6. Örnekler ateş etrafında, final konsantrasyonu 100µg/ml Ampisilin varlığında hazırlanan LB-Agar petrilere yayıldı.
7. Gece boyunca tüm petrilere 37°C’de inkübe edildi.

Gece boyunca inkübasyonu devam eden örneklerden diğer gün yeterli miktarda büyümüş olan koloniler seçilerek yeni bir LB-Agar petriye çizildi. Tüm örneklerden tek bir koloni seçimi yapıldı. Çizilen petrilere 37°C’de inkübasyona bırakılırken koloni seçimi yapmak için kullanılan tip LB-Broth içine bırakılarak bakterilerin 5 ml sıvı kültürü içerisinde büyümesi, plazmid DNA izolasyonu yapılabilmesi adına sağlandı. Sıvı kültürde aynı şekilde olmak üzere gece boyunca 37°C’de ve 220 rpm hızla çalkalandı.

5.3.4 Plazmid DNA İzolasyonu

Küçük ölçekli plazmid DNA izolasyonu (Mini-prep İzolasyonu)

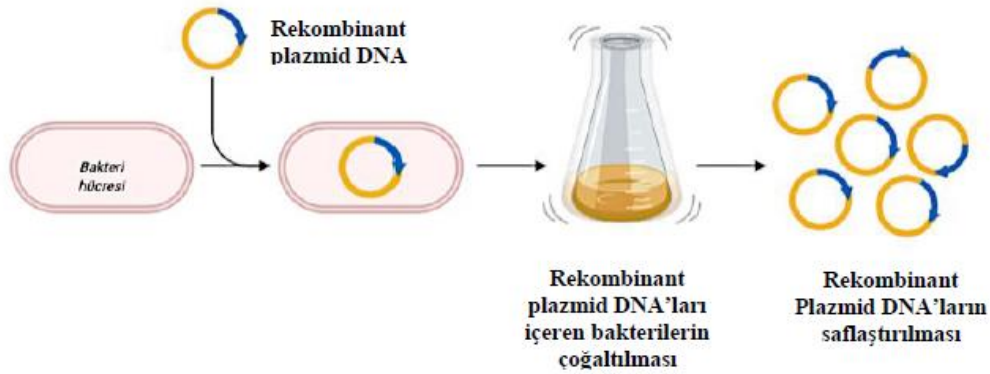
Gece boyunca inkübasyona bırakılmış olan 5 ml bakteri sıvı kültürü diğer gün miniprep plazmid izolasyonu yapılmak üzere hazırlandı. İzolasyon için Qiagen miniprep izolasyon kiti kullanıldı. Plazmid DNA izolasyonu aşağıdaki aşamalara uygun olarak gerçekleştirildi.

1. 5 ml sıvı bakteri kültüründen 3 ml alınarak eppendorf tüplere aktarıldı.
2. Örnekler 13.000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonrasında LB-Broth pelletten uzaklaştırıldı.
4. Elde edilen pellete 250µl P1 Buffer (suspension buffer) eklenerek pellet süspanse edildi.
5. P1 Buffer’ın üzerine 250µl P2 Buffer (lysis buffer) eklendi ve eppendorf tüpler 4-6 kez ters düz edildi.
6. Ardından en fazla 5 dakika olacak şekilde oda sıcaklığında inkübasyonu sağlandı.
7. 5 dakika sonunda örnekler 350µl N3 Buffer (neutralization buffer) eklendi ve 4-6 kez ters düz edildi.
8. 13.000 rpm’de 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
9. Santrifüjün ardından supernatant toplandı ve spin kolonlara aktarılarak 13.000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüj edildi.

10. 750µl PE Buffer (wash buffer) eklendi ve 13.000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Etanol uzaklaştırması için santrifüj işlemi tekrarlandı.
11. Sonrasında 50µl EB Buffer (elution buffer) eklenerek 1-5 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi ve 13.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
12. Elde edilen pDNA stokları -20°C’de muhafaza edildi.

Büyük ölçekli plazmid DNA izolasyonu (Maxi-prep İzolasyonu)

Miniprep izolasyonu ardından elde edilen plazmid DNA’ların boyutlarının restriksiyon enzimleri ile doğrulanmasının ardından deneylerde kullanılmak üzere yeterli miktarda pDNA eldesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebepten dolayı 5 ml sıvı bakteri kültüründen elde edilip stoklanarak -80°C’de muhafaza edilen bakterilerden 10 µl alınarak büyük ölçekli DNA izolasyonu yapılabilmesi için 200 ml sıvı kültüre bakteriler aktarıldı ve gece boyunca çoğaltıldı. Ardından takip edilen prosedür aşağıda gösterilen şekilde yapıldı (ZymoPURE™ II Plasmid Maxiprep Kit Catalog Nos. D4202 & D4203).



Şekil 5.3.4.1 Bakterilerden büyük ölçekli plazmid DNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi

1. 200 ml sıvı kültürü yapılan bakteriler (GFP/Fluc, IL13-PE, VSVG, CMVΔ) 4000 g’de 10 dakika santrifüj edildi ve bakteri pelleti çöktürüldü.
2. Sıvı kısmı uzaklaştırılan pellete 14 ml P1 Buffer (suspension buffer) eklendi ve vortekslenerek homojen hale getirildi.
3. Ardından 14 ml P2 Buffer (lysis buffer) tamponu eklenerek 50 ml’lik tüpler 6 kez ters-düz edildi ve 2-3 dk süre ile oda sıcaklığında bekletildi.
4. 2-3 dk sonra 14 ml P3 Buffer (nötralizasyon buffer) tamponu eklenerek 50 ml’lik tüpler hafifçe çalkalandı.

5. 50 ml'lik tüplerin içindeki sıvı kitin filtre-şırınga aparatına aktarıldı ve 5-8 dk süre ile oda sıcaklığında bekletildi.
6. Ardından sıvı kısım filtrelenerek içeriğindeki lizattan arındırıldı.
7. 14 ml Binding Buffer (bağlanma bufferı) eklenerek tüpler 10 kere ters-düz edildi.
8. Filtrelenmiş olan sıvı kısım kolon aparatına takılarak 500 g'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi ve kolondan süzdürüldü.
9. Süzdürülen sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra 5 ml yıkama tamponu 1 ile 500 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
10. Sonrasında 5 ml yıkama tamponu 2 ile 500 g'de 2 dakika olmak üzere 2 kez santrifüj edildi.
11. Kolonda kalan rezidüleri uzaklaştırmak için 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
12. Son olarak 400 µl EB tamponu (elution buffer) eklenerek 2 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12.00 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
13. Elde edilen plazmid DNA'ların bir kısmı DNA miktar tayini ve boyutlarının doğrulanması için ayrılırken geriye kalan stoklar -20 C'de muhafaza edildi.

5.3.5 Plazmid DNA Miktar Tayini

Elde edilen plazmid DNA'ların miktarları Nanodrop (Thermo Scientific) cihazında tayin edildi. Miktar tayini sırasında blank (kontrol okutma) olarak plazmid DNA'ların elute edildiği EB tamponu kullanıldı.

5.3.6 Restriksiyon Haritalama

Lentivirüslerin yapılması için hazırlanmış olan VSVG ve CMVΔ konstraktlarının restriksiyon bölgelerinden gerekli enzimler aracılığıyla kesimleri yapılarak elde edilen plazmid DNA'ların boyutlarının doğrulanması gerçekleştirildi. Restriksiyon bölgeleri ile doğrulama tablo 5.3.6.1-5.3.6.4' de gösterildiği şekilde yapıldı.

Tablo 5.3.6.1 Plazmid DNA Kesim Bölgeleri

VSVG Restriksiyon Bölgeleri	
BamHI-EcoRI	1.5 kb
NheI-EcoRI	2.2 kb

CMVΔ Restriksiyon Bölgeleri	
BamHI	1.7 kb

Restriksiyon enzimleri ile kesim bölgelerinin doğrulanması aşağıda belirtilen reaksiyon ile gerçekleştirildi.

Tablo 5.3.6.2 VSVG Reaksiyon

VSVG Reaksiyon	
Plazmid DNA	1 µl
BamHI	1 µl
Cutsmart	2 µl
ddH ₂ O	16 µl
Total Reaksiyon volümü	20 µl

Tablo 5.3.6.3 CMVΔ Reaksiyon-1

CMVΔ Reaksiyon-1	
Plazmid DNA	1 µl
BamHI	1 µl
EcoRI	1 µl
Cutsmart	2 µl
ddH ₂ O	15 µl
Total Reaksiyon volümü	20 µl

Tablo 5.3.6.4 CMVΔ Reaksiyon-2

CMVΔ Reaksiyon-2	
Plazmid DNA	1 µl
NheI	1 µl
EcoRI	1 µl
Cutsmart	2 µl
ddH ₂ O	15 µl
Total Reaksiyon volümü	20 µl

5.4 Lentivirüs Üretimi

Plazmid DNA izolasyonları yapılan VSVG ve CMVΔ konstraktları lentiviral paketleme için kullanıldı. Lentiviral paketleme aşağıda gösterildiği gibi gerçekleştirildi. Lentivirüs üretimi için HEK-293T hücreleri kullanıldı. HEK-293T hücrelerinin kültürü %10 FBS, yüksek glikozlu DMEM ve %1 Penisilin/Streptomisin ile yapıldı.

1. HEK-293T hücreleri lentiviral paketlemeye başlamadan 24 saat önce 150mm petrilere 24 saat sonrasında %80-%90 yoğunlukta olacak şekilde ekildi.
2. 20. saatte ekilen tüm hücrelerin medyumunu uzaklaştırılarak yeni medyum ile değiştirildi.
3. 150 mm petride lentiviral paketleme yapmak için karışım hazırlandı.
4. Hazırlanan karışım vortekslendi. Karışım vorteks üzerindeyken 2.5 mM HEBS buffer eklendi.
5. 2.5 mM HEBS buffer eklendikten sonra elde edilen karışım vortekslendi ve aseptik koşullara uygun bir şekilde luminar akımlı kabin içerisinde bekletildi.
6. Elde edilen karışım HEK-293T hücrelerinin üzerine yavaşça eklendi.
7. Ertesi gün hücrelerin medyumları uzaklaştırıldı ve %5 FBS, yüksek glikozlu DMEM ve %1 Penisilin/Streptomisin ilaveli medyum ile değiştirildi.
8. 17 saat sonra hücrelerden tüm medyum toplandı ve falkonlara aktarılarak 500 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrasında tüm supernatant toplandı ve -80C'de muhafaza edildi.

5.5 Tersine Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

5.5.1 RNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan tüm hücreler IL13R α 2 ekspresyon düzeyleri açısından incelendi. Tüm hücreler altı kuyulu kaplara ikişer kuyu olmak üzere ekildi. Hücre ekiminden 24 saat sonra hücreler RNA izolasyonu için aşağıdaki basamaklara uygun olarak hazırlandı. RNA izolasyonu için Qiagen total RNA izolasyon kiti kullanıldı.

1. Hücrelerin bulunduğu kaplar buz üzerine alındı.
2. Her kuyu 1 ml 1X PBS ile yıkandı ve yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırıldı.

3. 300 µl Qiagen Lysis Buffer her kuyuya eklendi ve hücre kazıyıcı ile yüzeyden kaldırılması sağlandı.
4. Yüzeyden kaldırılarak süspansiyon haline getirilen hücreler eppendorf tüplere aktarıldı ve lizis oluncaya kadar vortekslendi.
5. Tüm karışım RNeasy spin column'a aktarıldı ve 12.000g'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi.
6. Santrifüjün ardından RNeasy spin column'un altında biriken sıvı alınarak eppendorf tüplere alındı ve sıvı miktarı ile aynı oranda (1:1) %70 etanol eklemesi yapılarak vortekslendi.
7. Eppendorf tüpteki tüm sıvı RNeasy spin column'a aktarıldı ve 12.000g'de 30 saniye santrifüj edildi.
8. Ardından 700 µl RW1 Buffer (wash buffer) her bir örneğe eklenerek 12.000g'de 30 saniye santrifüj edildi.
9. Santrifüj edildikten sonra her bir örnek için 80 µl DNase Buffer ve 10 µl DNase eklendi ve 15 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
10. Tüm örnekler 350 µl RW1 Buffer eklendi ve 12.000g'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Devamında 500 µl RPE buffer eklendi ve 12.000g'de 1 dakika santrifüj edildi. 10 ve 11. basamak 2 kez tekrar edildi.
12. Tüm örnekler 30 µl nükleazlardan yoksun su eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 2 dakika süre ile 12.000g'de santrifüj edildi.
13. Örneklerden bir miktar RNA miktar tayini için ayrıldı ve geri kalan tüm örnekler hızlı bir şekilde -80°C'ye kaldırılarak muhafaza edildi.

5.5.2 cDNA Sentezi

Tüm RNA örnekleri 1000 ng olacak şekilde hazırlanarak örneklerden cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi Thermo High Capacity DNA reverse transcriptase kiti (Cat no: 4368814) ile gerçekleştirildi. cDNA reaksiyonu tablo 5.5.2.1'de gösterildiği şekilde yapıldı.

Tablo 5.5.2.1 cDNA Sentezi İçin Gerekli Bileşenler

Reaksiyon Bileşenleri	Miktarlar
10X RT Buffer	2 µl
100mM dNTP Mix	0.8 µl
10X RT Random primer	2 µl
Tersine transkriptaz	1 µl
Nükleaz'dan yoksun ddH ₂ O	4.2 µl
Total volüm	10 µl

cDNA sentezinin gerçekleştirdiği sıcaklıklar tablo 5.5.2.2'de gösterildiği gibi Biorad thermal cycler cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 5.5.2.2 cDNA Sentez Aşamaları

1. aşama	2. aşama	3. aşama	4. aşama
25°C	37°C	85°C	4°C
10 dakika	120 dakika	5 dakika	sonsuz

cDNA sentezi tamamlandıktan sonra tüm cDNA'lar -20°C'de muhafaza edildi. Deneylerde kullanılmak üzere tüm cDNA'lar eşit miktarlarda hazırlanarak RT-PZR deneyleri gerçekleştirildi. RT-PZR deneylerinde tüm örneklerin IL13Rα2 ekspresyonu ve house keeping gen olarak bilenen GAPDH ekspresyonları tespit edildi. RT-PZR deneylerinde kullanılan primerlerin dizileri aşağıdaki gibidir. RT-PZR bileşenleri tablo 5.5.3.1'de gösterildiği gibi kullanıldı.

5.5.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RT-PZR Primer Sekansları

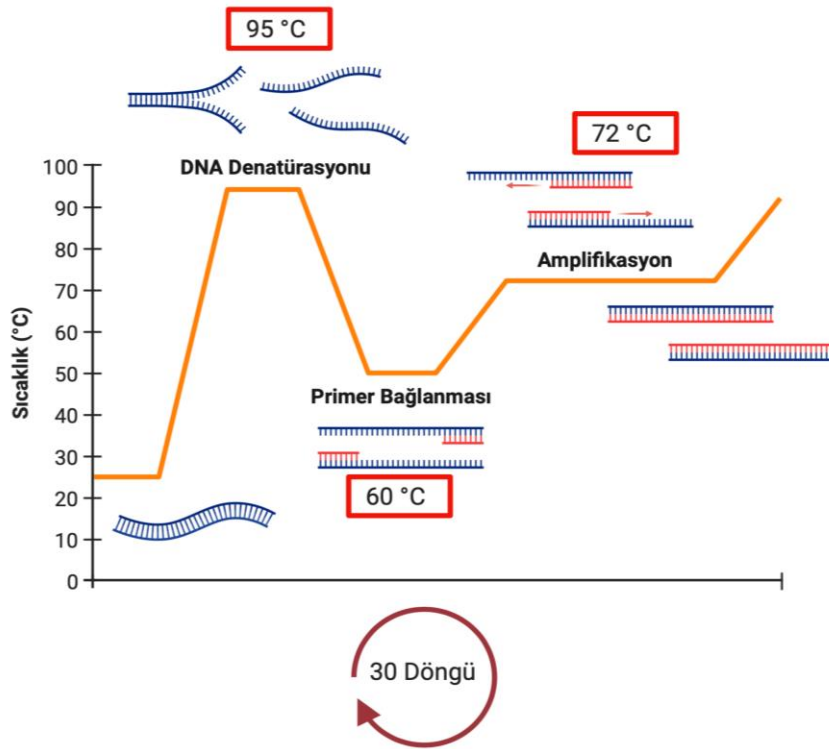
	İleri Primer	Geri Primer	Uzunluk
IL13Rα2	5'-ATGGCTTTTCG TTTGCTTGGCT-3'	5'-TGATCCAAGCCC TCATACCAG 3'	534 bç
GAPDH	5'-GTCAGTGGT GGACCTGACCT-3'	5'-TGCTGTAGCCAA ATTCGTTG-3'	245 bç

Tablo 5.5.3.1 RT-PZR Bileşenleri

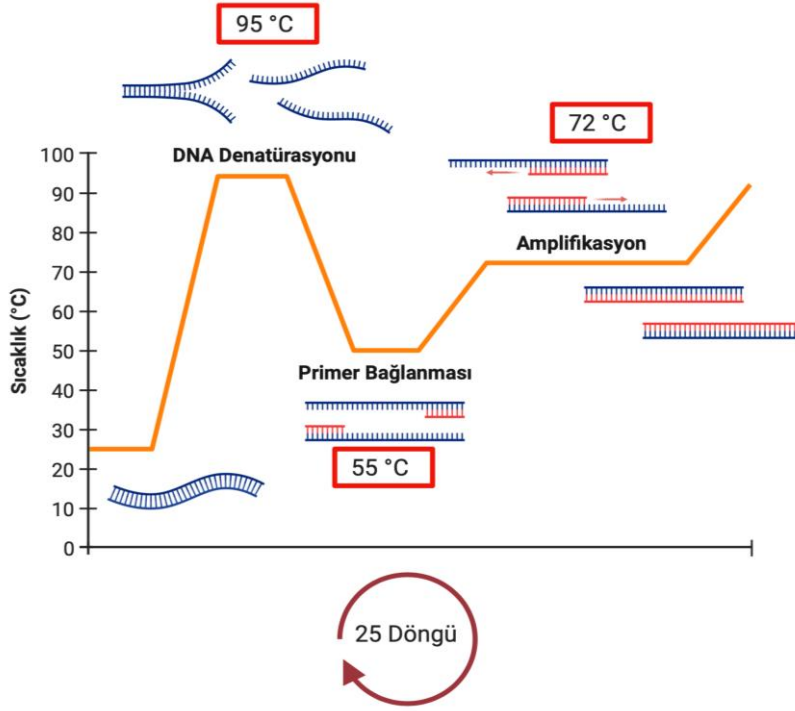
RT-PZR Bileşenleri	
10uM İleri primer	1 µl
10uM Geri primer	1 µl
10mM Dntp	0.5 µl
25X MgCl ₂	1 µl
10X Taq Buffer	2.5 µl
Taq DNA Polimeraz	0.5 µl
ddH ₂ O	17.5 µl

RT-PZR Reaksiyon Koşulları

IL13Ra2 için:



GAPDH için:



5.5.4 Agaroz Jel Elektroforezi

RT-PZR bitiminde tüm örnekler jel elektroferez sisteminde yürütülmek üzere hazırlandı. Jel elektroferez sisteminde yürütülmek için öncelikle %1'lik agaroz jel (1 gram agaroz + 100 ml TAE Buffer) hazırlandı ve jel soğutulduktan sonra 5 µl Red-Safe (İntron/21141) eklenerek elektroferez tankına aktarıldı. Hazırlanan agaroz jelin donması için 30 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Ardından tüm örnekler 6X yükleme boyasından (Thermo Scientific) finalde 1X olacak şekilde ekleme yapıldı. Örneklerin hazırlanmasından sonra jele 1kb Gene Ruler (6X) (Thermo) DNA belirtecinden 6 µl yüklenerek tüm örnekler belirlenen sıralar ile jele yüklendi. Jel 100V'da 40 dakika süre boyunca yürütüldü ve ChemidoC (Biorad) cihazında örneklerin görüntülemeleri yapıldı.

5.6 HEK-293DT Hücrelerinden IL13-PE Toksininin Eldesi

5.6.1 HEK-293DT Hücrelerinin IL13-PE ile Transfeksiyonu ve Medyumdan IL13-PE' nin Konsantre Edilmesi

RT-PZR deneylerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda IL13R α 2 ekspresyonu olan kanser hücre hatları belirlendi. Bu hücrelerde hedefli toksin IL13-PE muamelesinin ardından hücre canlılığı sonuçlarının değerlendirilmesi açısından

öncelikle HEK-293DT (IL13-PE toksinine dirençli hat) hücrelerinden IL13-PE elde edilmesi için bu hücelere ayrı ayrı IL13-PE ve GFP/Fluc transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. HEK-293DT hücrelerine uygulanan transfeksiyon yöntemi ve kondisyon medyumun toplanması aşağıdaki basamaklar ile gerçekleştirildi.

1. Hek-293 DT hücrelerinin transfeksiyon işleminden 24 saat önce 150mm petrilere ekimi yapıldı.
2. Transfeksiyon işlemine başlamadan 4 saat önce tüm hücrelerin medyumları %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomasin içeren yüksek glikozlu DMEM medyum ile değiştirildi.
3. Transfeksiyon için gerekli olan karışım aşağıda gösterildiği gibi hazırlandı.

Tablo 5.6.1.1 Transfeksiyon Bileşenleri

Karışım Bileşenleri
IL13-PE ve GFP/Fluc pDNA
2.5 mM HEPES
2M CaCl ₂

1. Karışım hazırlandıktan sonra vortekslendi ve vorteks üzerindeyken 780 µl 2X HEBS Buffer eklenerek 2 dakika boyunca vortekslendi.
2. Karışım IL13-PE ve GFP/Fluc transfeksiyonu yapılacak hücre gruplarına ayrı ayrı eklendi.
3. Hücrelerin 18 saat boyunca %5 CO₂ ve 37°C'de inkübasyonu sağlandı.
4. Ardından hücrelerdeki medyum değiştirilerek FBS'den yoksun %1 Penisilin/Streptomasin içeren yüksek glikozlu DMEM medyum eklendi.
5. 24 saatin ardından hücrelerden tüm medyum toplanarak IL13-PE ve kontrol olarak kullanılmış olan GFP/Fluc medyumunun konstantre edilebilmesi için filtreli falkonlara (Amicon/UFC901024) aktarıldı.
6. Tüm örnekler 4000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edilerek konsantre edildi.
7. Elde edilen kondisyon medyumlarının bir kısmı Dot Blot ile IL13-PE varlığının tespit edilebilmesi için ayrılırken, geri kalan medyumlar ependorf tüplere alikotlanarak -80°C'de muhafaza edildi.

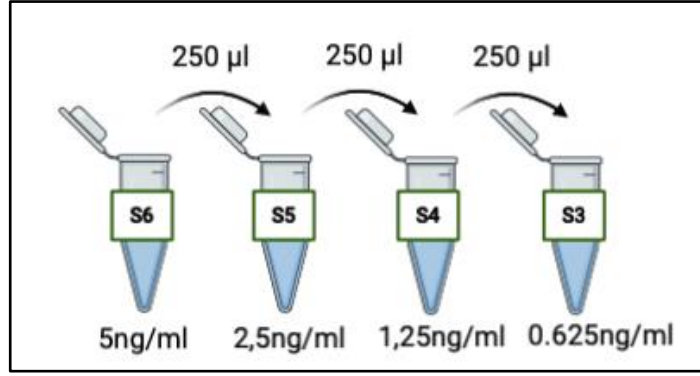
5.6.2 Dot Blot Yöntemi ile IL13-PE Varlığının Gösterilmesi

HEK-293DT hücrelerinden elde edilen kondisyon medyumlarında IL13-PE varlığının tespit edilmesi için Dot Blot analizi gerçekleştirildi. Kontrol grubu olarak kullanılan GFP/Fluc transfeksiyonu sonrasında elde edilen medyumlar ile kıyaslamalı olarak karşılaştırıldı. Hücrelerin kültür ortamında IL13-PE hedefli toksininin medyum ortamına salındığını tespit etmek üzere yapılan deney aşağıdaki basamaklara uygun olarak gerçekleştirildi.

1. Örneklerin damlatılacağı PVDF membran öncesinde %100 metanol ile aktive edildi.
2. Ardından PVDF membran üzerine IL13-PE ve GFP/Fluc kondisyon medyumlarından 0.5 µl, 1 µl ve 3 µl olacak şekilde membrana damlatıldı ve kuruması beklendi.
3. Örnekler kuruduktan sonra 1X TBST solüsyonu içerisinde hazırlanan %5 süt tozu ile 45 dakika boyunca 20 rpm'de oda sıcaklığında bloklandı.
4. Ardından anti-PE primer antikoru ile (1:10.000) (Sigma/ P08571) 30 dakika boyunca oda sıcaklığında 20 rpm'de shake edildi.
5. Primer muamelesinin ardından membran 3 kez 5 dakika 1X TBST solüsyonu ile yıkandı.
6. Primer kaynağına uygun olan sekonder antikor (1:2000) (GenDepot/ SA001) eklenerek 30 dakika boyunca oda sıcaklığında 20 rpm'de shaker ile çalkalandı.
7. Devamında 3 kez 5 dakika boyunca 1X TBST solüsyonu ile yıkandı.
8. PVDF membranın görüntüsü ChemidoC (Bio-Rad) cihazında alındı.

5.6.3 ELISA Yöntemi İle IL13-PE Miktarının Tayin Edilmesi

HEK-293DT hücrelerinin IL13-PE ile transfeksiyonunun ardından toplanan kondisyon medyumunda Dot Blot yöntemi ile IL13-PE toksininin varlığının tespit edilmesinin ardından, miktar tayinin yapılması için ELISA tekniği kullanıldı. Bunun için PE toksininin saptanması için tasarlanmış olan ELISA kiti (Mybiosource; Cat No: MBS701988) ile çalışıldı. Öncelikle standartlar kitte referans edildiği şekilde seri dilüsyona tabi tutuldu (Şekil 5.6.3.1).



Şekil 5.6.3.1 Standardın serial dilüsyon halinde hazırlanması

Ardından konstantre edilen IL13-PE medyumunu 1:100 oranında sample diluent ile dilüe edildi. Deneye başlanmadan önce; Biotin antikoru, Biotin dilüent ile 1X olmak üzere, HRP-Avidin, HRP-Avidin dilüent ile 1X olmak üzere ve Yıkama tamponu da dH₂O ile dilüe edilerek 1X olacak şekilde hazırlandı. Standart ve tüm örnekler 3'er kuyu olmak üzere çalışıldı. Kontrol okutması için standartın ve örneklerin dilüsyonunda kullanılan sample dilüent tek başına kuyulara eklendi. Standart ve örnekler kuyulara eklendikten sonra 2 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. Ardından kuyulardaki tüm sıvılar çekildi ve 100 µl Biotin antikoru eklendikten sonra 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Biotin antikoru tüm kuyulardan çekildi ve kuyular 200 µl yıkama tamponu ile 3 kez 2 dakika süre ile yıkandı. Daha sonra, HRP-Avidin tüm kuyulara 100 µl eklendi ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Tüm sıvı çekilerek kuyular yıkama tamponu ile 3 kez 2 dakika boyunca yıkandı. 90 µl TMB substratı tüm kuyulara eklendi ve 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Son olarak durdurma solüsyonu tüm kuyulara 50 µl olmak üzere eklendi ve SpectroMax cihazında 570 nm'de absorbans okutması gerçekleştirildi.

5.7 Hücre Canlılığının Tespit Edilmesi

HEK-293 DT hücrelerinden elde edilen ve konsantre edilen hedefli toksin IL13-PE kondisyon medyumları ve aynı şekilde elde edilen GFP/Fluc kondisyon medyumları hücre canlılığı deneylerinde kullanılmak üzere hazırlandı. Elde edilen GFP/Fluc kondisyon medyumları her hücrede kontrol grubu olarak kullandı. IL13-PE ve GFP/Fluc kondisyon medyumun muamelesinden önce hücreler hazırlandı. Hücreler 24 saat önce 96 siyah kuyulu plakalara 5×10^3 oranında ekildi ve 24 saat süre ile %5 CO₂ ile 37°C varlığında inkübasyonu sağlandı. 24 saatin ardından hücrelere IL13-PE kondisyon medyumundan total volüm 100 µl olacak şekilde 5 µl,

10 µl ve 25 µl miktarları ile dilüsyonlar hazırlandı. Eski medyumlar değiştirilerek, hazırlanan bu dilüsyonlar her kanser hücre hattı için 3'er kuyu olacak şekilde eklendi. Aynı şekilde tüm kanser hücrelerinin kontrol gruplarına GFP/Fluc kondisyon medyumundan total volüm 100 µl olacak şekilde 5 µl, 10 µl ve 25 µl miktarları ile dilüsyonlar hazırlandı. Eski medyumlar değiştirilerek, her kanser hücrelerinin kendinde ait kontrol gruplarına bu dilüsyonlar eklendi. Her kontrol grubu tüm dilüsyonlardan 3'er kuyu olacak şekilde çalışıldı. IL-13PE ve GFP/Fluc kondisyon medyum dilüsyonlarının eklenmesinin ardından tüm plakalar 48 saat süre boyunca %5 CO₂ ve 37°C varlığında inkübe edildi. 48 saatin ardından hücre canlılık oranını tespit etmek üzere total metabolik aktivite ölçümüne dayanan Cell Titer glo reaktifi kullanılarak hücreler Spectromax cihazında okutuldu.

5.8 Hücre Ölümünün Analizi

5.8.1 Annexin V-PI Boyaması

Hedefe yönelik toksinin, IL13Rα2 ekspresyonu açısından pozitifliği belirlenen kanser hücre hatlarından, IL13-PE hedefli toksinine karşı en iyi yanıtı gösteren hücre hattının belirlenmesinin ardından; apoptotik-nekrotik hücre ölümüne yol açıp açmadığını saptamak üzere; apoptoz sırasında hücre yüzeyine transloke olan fosfotidilserin rezidülerine karşı, kalsiyum bağımlı olarak güçlü bir afiniteye sahip olan Annexin V boyaması ve nekrotik hücre belirteci olan propidium iyodür (PI) boyaması birlikte gerçekleştirilerek hücre ölümü tespit edildi. Annexin V-PI boyaması yapılmadan 24 saat önce hücreler; hedefli toksin uygulanan ve kontrol grupları olmak üzere 10 cm petrilere ekildi. 24 saatin ardından hedefli toksin uygulanan hücre grubuna IL-13PE dilüsyonu total volüm 10 ml olacak şekilde eklendi. Kontrol grupları olan hücrelerin ise yalnızca medyumları değiştirildi. Hedefli toksin uygulanan hücre ve kontrol grubu 48 saat boyunca %5 CO₂ ve 37°C'de inkübe edildi. 48 saatin ardından hücreler buldukları petriden 0.25'lik Tripsin ile kaldırıldı ve falkon tüplere aktararak 1600 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen hücre pelletleri soğuk 1X PBS ile yıkandı ve tekrar 1600 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Annexin V-PI tespiti ve kontrol grupları aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi dizayn edildi. Annexin V-PI ile apoptoz-nekroz tespiti yapılacak hücrelere 200 µl 1X Annexin V Binding Buffer eklendi ve pelletler süspanse edildi. Süspanse edilen pelletlerin her birinden 96 µl olacak şekilde her bir

hücre için ayrı ayrı olmak üzere flow tüplerine eklendi. Daha sonra hücre gruplarına 1µl Annexin V-FITC ve 10µl PI eklenerek 10 dakika boyunca buz üzerinde bekletildi. Hücrelere 10 dakika sonra 1ml 1X PBS eklendi ve 1600 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Flow tüplerine 250µl 1X Annexin V Binding Buffer ve 2.5 µl DNase eklenerek akım sitometrisinde hücre ölümünün analizi gerçekleştirildi.

5.8.2 Western Blot

IL13-PE ile muamele edilen hücrelerin, hücre ölüm analizlerinin yapılması için apoptozun son basamağında kesilime uğrayan cPARP (poly(ADP-ribose) polymerase cleavageve)) ve kontrol yüklemesi olarak kullanılan B-actin'e karşı antikorlar kullanılarak bu proteinlerin western blot analizi yapıldı.

5.8.3 Protein İzolasyonu

Hücreler western blot için hazırlandı. Bunun için öncelikle belirlenen hücreler 6 kuyulu platelere 2'şer kuyu olmak üzere ekildi. Ekimden 24 saat sonra hücrelere hedefli toksin IL13-PE uygulandı. IL13-PE muamelesinin ardından hücreler 48 saat süre ile %5 CO₂ ve 37°C'de inkübe edildi. 48 saat bitiminde tüm hücrelerin olduğu plateler buz üzerine alındı ve protein izolasyonları için hazırlandı. Tüm hücreler 1 ml soğuk 1X PBS ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı. Ardından hücre yoğunluğuna bağlı olarak her hücre için her kuyuya 50 µl RIPA buffer eklendi ve hücreler hücre kazıyıcısı ile yüzeyden kaldırılarak eppendorf tüplere aktarıldı. Devamında RIPA buffer eklenen tüm örnekler +4°C'de 25 rpm'de 20 dakika boyunca çalkalandı. 20 dakika sonra tüm örnekler 12.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar toplandı. Elde edilen örneklerin bir kısmı protein miktar tayini için ayrıldı. Örnekler SDS muamelesi yapılana kadar -80°C'de muhafaza edildi. Protein konsantrasyonlarının belirlenmesinin ardından tüm örnekler aynı miktarlara eşitlenecek şekilde hesaplandı ve SDS muamelesi yapıldı. SDS muamelesi için 4X laemli buffer içinde %10 oranında beta-mercaptoethanol (900 µl 4X laemli buffer + 100 µl β-ME) olacak şekilde hazırlanan karışım tüm örnekler belirlenen miktarlar doğrultusunda eklendi. Ardından örnekler 100°C'de 5 dakika boyunca ısıtıldı ve SDS muamelesi gerçekleştirildikten sonra tüm örnekler çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

5.8.4 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi

Hazırlanan tüm örnekler için öncesinde %6-10' luk jel hazırlamada gerekli solüsyonlar hazırlandı. Hazırlanan solüsyonlar ve jel polimerizasyonu şekil 5.8.4.1' den 5.8.4.5' e kadar olan tablolarda gösterildiği şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 5.8.4.1 Resolving Jel Hazırlama

Solüsyonlar	Miktarlar
%40 Akrlamid/Bis	1500 µl
4X Resolving Buffer	1500 µl
%10 APS	10 µl
TEMED	5 µl
dH ₂ O	2850 µl
Total volüm	6 ml

Tablo 5.8.4.2 Stacking Jel Hazırlama

Solüsyonlar	Miktarlar
%40 Akrlamid/Bis	250 µl
4X Stacking Buffer	500 µl
%10 APS	30 µl
TEMED	5 µl
dH ₂ O	1.215 µl
Total volüm	2 ml

Tablo 5.8.4.3 Resolving Buffer Hazırlanışı

4X Resolving Buffer Hazırlanışı	
SDS	0.4 gram
Trizma Base	18.15 gram
Total volüm	100 ml

Tablo 5.8.4.4 4X Stacking Buffer Hazırlanışı

4X Stacking Buffer Hazırlanışı	
SDS	0.4 gram
Trizma Base	6.05 gram
Total volüm	100 ml

Hazırlanan jeller polimerize olduktan sonra örnekler 30ug olacak şekilde her bir kuyuya yüklendi ve protein belirteci marker 6 µl olacak şekilde yükleme yapıldı. Örneklerin yüklendiği jel dikey elektroferez tankında 120V 60 dakika olacak şekilde Running Buffer ile yürütüldü. Running Buffer aşağıda gösterildiği gibi hazırlandı.

Tablo 5.8.4.5 10X Running Buffer Hazırlanışı

10X Running Buffer Hazırlanışı	
Trizma Base	30.3 gram
Glisin	144 gram
SDS	10 gram
Total volüm	1 litre

5.8.5 İmmünoblotlama

Jel yürütüldükten sonra transfer aşaması için hazırlandı. Öncelikle PVDF membran 1-5 dakika boyunca %100 metanol içerisinde bekletildi. Kullanılan filtre kağıtları ve jel blotting buffer içerisine alındı ve 1-5 dakika boyunca bekletildi. Metanolden çıkartılan membran 1 dakika süre ile blotting buffer içerisinde bekletildi. Ardından Biorad Semidry sistemde transfer edilmek üzere hazırlandı ve 1.5 Amper, 25Volt, 10 dakika protokolü uygulanarak jeldeki proteinlerin membrana transfer olması sağlandı. Burada kullanılan blotting buffer tablo 5.8.5.1 ve 5.8.5.2’de gösterildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 5.8.5.1 10X Blotting Buffer Hazırlanışı

10X Blotting Buffer Hazırlanışı	
Trisma Base	30.3 gram
Glisin	144 gram
Total volüm	1 litre

Tablo 5.8.5.2 1X Blotting Buffer Hazırlanışı

1X Blotting Buffer Hazırlanışı	
% 100 metanol	400 ml
10X Blotting Buffer	200 ml
Total volüm	2 litre

Jeldeki proteinlerin membrana transferinin ardından membran 1 saat boyunca oda sıcaklığında %5 süt tozu ile (1.5 gram süt tozu + 30 ml 1X TBST) bloklandı. Ardından apoptoz tespiti için belirlenen primer antikorlar eklenerek gece boyunca +4°C’de 20 rpm’de shaker üzerinde inkübasyonu sağlandı. Diğer gün primer antikorlar uzaklaştırıldı ve 1X TBST solüsyonu ile 3 kez 5’er dakika olmak üzere membran yıkandı. Ardından 1:2000 oranında uygun sekonder antikorlar eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat süre ile 20 rpm’de shaker üzerinde inkübe edildi. 1 saat sonunda membranlar tekrar 3 kez 5’er dakika olacak şekilde 20 rpm’de shaker üzerinde yıkandı. Görüntüleme ajanları 1:1 oranlarında kullanılarak ChemidoC (Biorad) cihazında membranların görüntülenmesi yapıldı.

5.9 Mutant EF-2 Kodlayan ssODN ile iMKH’ lerin Toksine Dirençli Hale Getirilmesi

Mezenkimal Kök Hücrelere (MKH) toksin direnci kazandırmak üzere, ssODN teknolojisi kullanılarak 2 farklı tek zincir oligonükleotid dizayn edildi ve ticari olarak satın alındı. EF-2 geninin 717. kodonunda G’ den A’ ya mutasyonun hücrelere toksin direnci kazandırdığı bilinmektedir. Her 2 tek zincir oligonükleotid de EF-2 geninin 717. kodonunda G nükleotidinden A nükleotidine nokta mutasyonu gerçekleştirmek üzere dizayn edildi ve aşağıda gösterildi.

EF-2PE₁:5’-

GTCACCCTGCACGCCGACGCCATCCACCGCAGAGGGGGCCAGATCATCC
CCACAGCACGGC-3’

EF-2PE₂:5'-

CTGCACGCCGACGCCATCCACCGCAGAGGGGGCCAGATCATCCCCACAG-
3'

MKH'ler transfeksiyonu zor hücreler olduğu için bir elektroporasyon metodu olan ve son yıllarda geliştirilen 4D-Nucleofector (Lonza / AAF-1002B) cihazı ile direkt nükleus içine transfeksiyon gerçekleştirildi. Bu amaçla öncelikle MKH'ler tripsinizasyon ile kaldılıp ışık mikroskobu altında hemocytometer ile sayımları gerçekleştirildi. Her kuyu için 1-2x10⁵ hücre olacak şekilde hücreler ayrıştırılmak üzere SE Cell Line 4D X Kit S (Lonza / V4XC-1032) içerisinde bulunan SE transfeksiyon solüsyonu ile çözüldü. Çözülen hücreler kit içerisindeki 16 kuyulu aparata ayrıştırıldı. Çeşitli impulslarla puromisin ve GFP/Fluc raportör içeren plazmid transfeksiyonu gerçekleştirildikten sonra hücreler 6 kuyulu plakelere ekildi. MKH'lerde en verimli çalışan elektriksel parametrelerin cihazın C2 opsiyonunda mevcut olduğu gözlemlendi. Transfeksiyonun başarısı florasan mikroskop altında GFP ışımalarının takibiyle belirlendi. GFP/Fluc pozitif hücreleri pozitif olarak seçmek üzere 1-10 µg / ml arasında puromisin hücrelere uygulandı. %100 GFP/Fluc pozitif hücre popülasyonuna erişilince yukardaki yöntem tekrar edilerek EF-2PE₁ ve EF-2PE₂ tek zincir oligonükleotidleri 4D-Nucleofector C2 opsiyonuyla kuyu başına 2 şer µg olacak şekilde transfekte edildi. Transfeksiyonun ardından 6 kuyulu plakelere ekilen hücreler Difteri toksini ile konsantrasyonlarda muamele edilmeden önce normal iMKH hücrelerine 48 saat boyunca DT muamelesi gerçekleştirildi. Bu sayede GFP/Fluc eksprese eden ve ssODN verilen iMKH'lerin DT muamelesinin doz aralığı belirlendi. Ardından, toksine dirençli hale getirilmek üzere hazırlanmış olan hücrelere DT muamelesinin gerçekleştirilmesi deneyleri planladı.

5.10 İstatistiksel Analizler

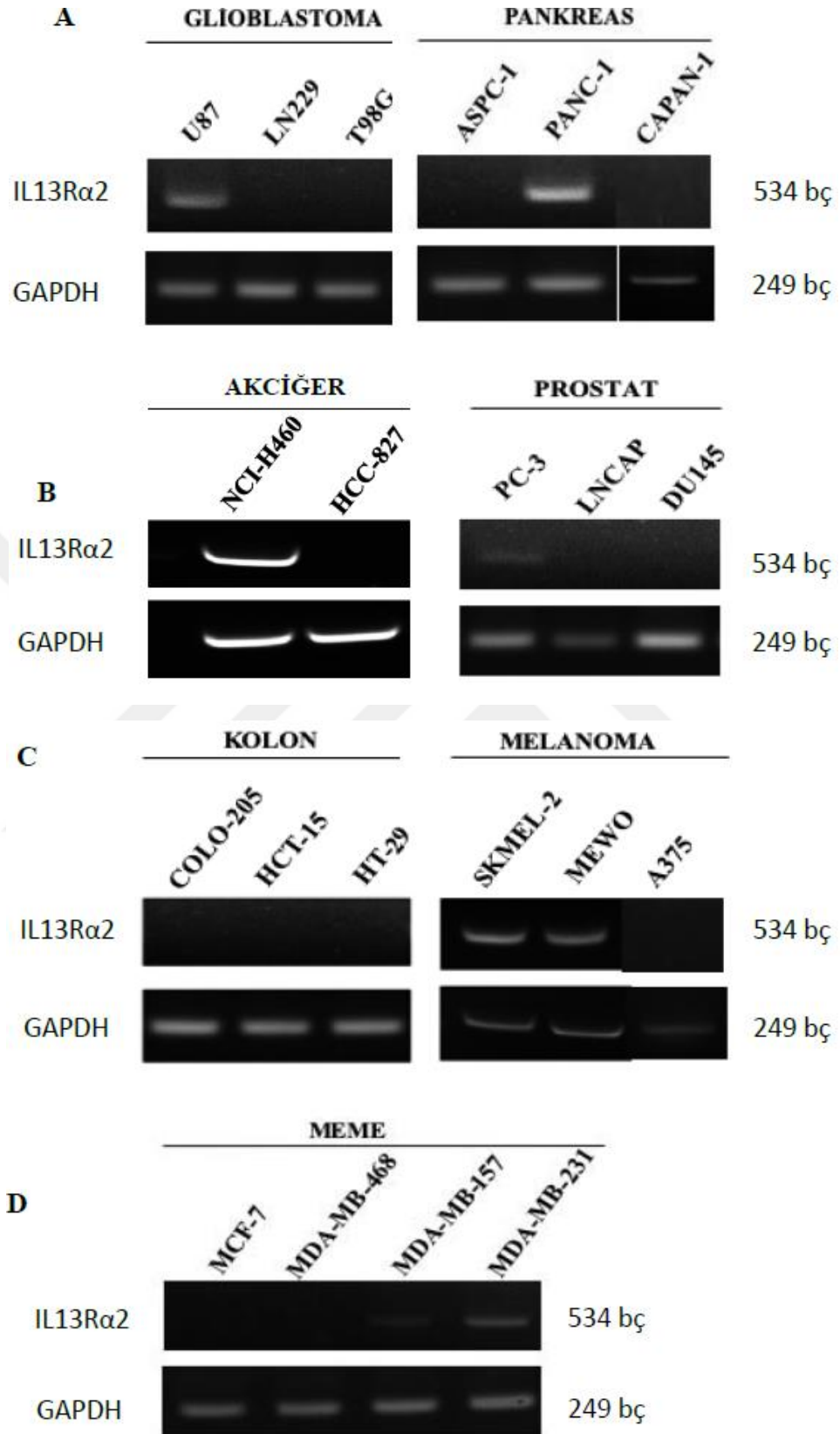
Veriler, iki grup karşılaştırıldığında Student's T-test ile analiz edildi. Veriler +/- SEM ile ifade edildi ve farklılıklar p*<0.05 ve p**<0.001 olacak şekilde belirlendi.

6. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, lentiviral vektörler kullanılarak geliştirilmiş olan *Pseudomonas Ekzotoksinini* (PE) içeren ve IL13 yönelimli IL13-PE hedefe yönelik toksini kullanılmıştır. Bu sayede, IL13'ün yüksek afinite ile bağlandığı IL13R α 2 reseptörünü eksprese eden çeşitli kanser hücrelerinin IL13-PE ile hedeflenebilirliği incelenmiştir. IL13-PE yönelimli çeşitli kanser hücre hatlarının belirlenmesinin ardından bu rekombinant toksinin hücreler üzerindeki *in vitro* tedavi edici etkisi araştırılmıştır.

6.1 Çeşitli Kanser Hücre Hatlarında IL13R α 2 Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

IL13-PE toksini ile hedeflenebilecek hücrelerinin belirlenmesi amacıyla 21 farklı hücrenin IL13R α 2 ekspresyon düzeyleri RT-PZR yöntemi ile tespit edildi. IL13R α 2 eksprese eden U87 hücresi pozitif kontrol olarak, reseptörü eksprese etmeyen LN229 hücresi ise negatif kontrol olarak kullanıldı (69). Elde edilen RT-PZR sonuçları doğrultusunda; Akciğer kanseri hücresi; NCI-H460, Pankreas kanser hücresi; Panc-1 ve Meme kanseri hücreleri; MDA-MB-157 ve MDA-MB-231, Melanoma kanser hücreleri; SK-MEL-2 ve Mewo ile son olarak Prostat kanser hücresi PC-3'nin IL13R α 2 ekspresyonu açısından transkripsiyonel düzeyde pozitif olduğu tespit edildi (Şekil 6.1.1).



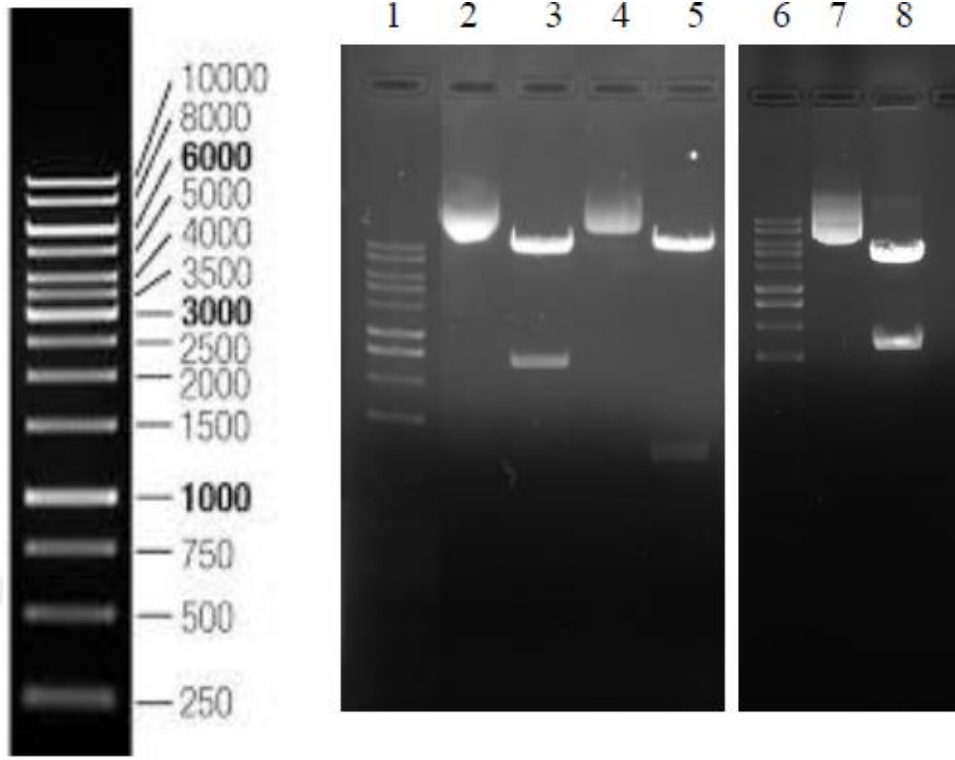
Şekil 6.1.1 RT-PZR ile kanser hücre hatlarındaki IL13R α 2 ekspresyonunun mRNA düzeyinde tespit edilmesi. Çalışmada oluşturulan kanser hücre panelleri RT-PZR tekniği kullanılarak IL13R α 2 ekspresyonu açısından değerlendirildi. Pankreas kanserinde PANC-1 (A) Akciğer kanserinde NCI-

H460, Prostat kanserinde PC3 (B), Melanoma kanserinde SKMEL-2 ve MEWO (C) Meme kanserinde MDA-MB-157 ve MDA-MB 231 (D) hücre hatlarında IL13R α 2 ekspresyonu saptandı. GBM hücre hatlarından U87 pozitif, LN229 ve T98G hücre hatları ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Tüm hücreler için, housekeeping gen olarak bilinen GAPDH yükleme kontrolü olarak ve RT-PZR metodunun başarısını göstermek üzere kullanıldı.

Bununla birlikte, Pankreas kanser hücresi ASPC-1 ve CAPAN-1, Akciğer kanser hücresi HCC-827, Prostat kanser hücresi LNCAP ve DU145, Kolon kanser hücresi COLO-205, HCT-15, HT29, Melanoma kanser hücresi A375 ve son olarak Meme kanser hücresi MCF7 ve MDA-MB-468'de IL13R α 2 ekspresyonuna rastlanmadı ve IL13-PE açısından hedeflenebilir olmadıkları belirlendi. Sonuç olarak, çalışmada IL13-PE'nin hedefleyebileceği kanser hücreleri saptanmakla beraber ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere biyogörüntülenebilir hale getirecek hücreler tespit edilmiş oldu.

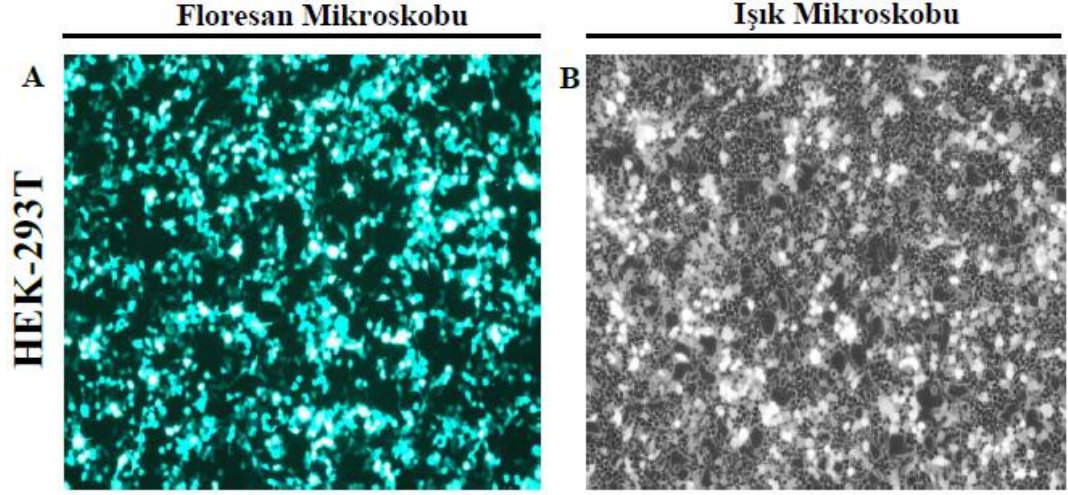
6.2 Hedef Reseptörü Eksprese Eden Kanser Hücre Hatlarının Biyogörüntülenebilir Hale Getirilmesi

IL13R α 2 ekspresyonu tespit edilen kanser hücrelerinin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kullanılabilmesi için hücreler biyogörüntülenebilir hale getirildi. Bunun için, virüs üretiminde kullanılan plazmidler (GFP/Fluc: lentiviral vektörü, CMV Δ ve VSVG (virüs paketlenme plazmidleri) çoğaltıldı ve konstraktlara özel restriksiyon bölgeleri ile kesim yapılarak pDNA fragmentleri doğrulandı (Şekil 6.2.1).



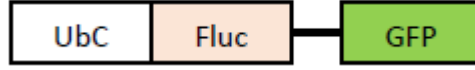
Şekil 6.2.1 Restriksiyon enzimleri ile pDNA fragmentlerinin doğrulanması. Restriksiyon enzimleri ile pDNA'ların boyutlarının doğrulanması, 1) 1kb Gene Ruler (Thermo/SM0311), 2) mCherry-Fluc kesilmemiş, 3) mCherry-Fluc BamHI/EcoRI enzimleri ile kesimi 3.1 kb, 4) GFP-Fluc kesilmemiş, 5) GFP-Fluc BamHI/BspI enzimleri ile kesimi 2.4 kb, 6. CMVΔ kesilmemiş, 7. CMVΔ BamHI/EcoRI enzimleri ile kesimi 9 kb-1.5kb. Elde edilen sonuçlar ile pDNA'ların boyutları doğrulandı.

pDNA boyutlarının doğrulanması ile birlikte, HEK-293T hücrelerindeki transfeksiyon başarısı GFP ekspresyonu ile gözlemlendi (Şekil 6.2.2).



Şekil 6.2.2 GFP/Fluc plazmidi aktarılan HEK-293T hücrelerinin mikroskop görüntüsü.

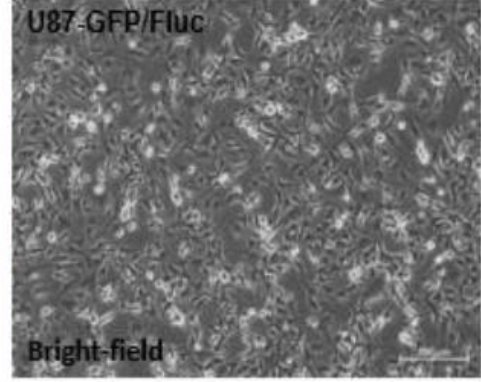
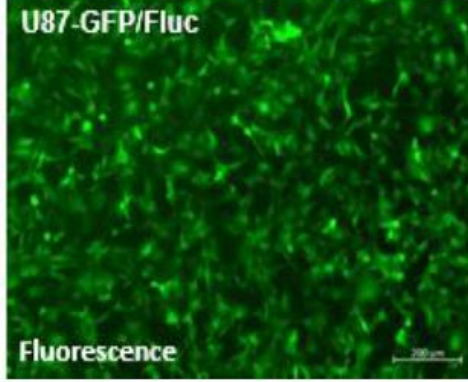
HEK-293T hücrelerinden elde edilen virüslerin konsantre edilmesinin ardından reseptör ekspresyonu tespit edilen hücelere lentiviral transdüksiyon uygulandı. Transdüksiyonun ardından tüm kanser hücrelerindeki enfeksiyon başarısı GFP ekspresyonun takibi ile gerçekleştirildi. Daha sonra enfekte olan hücrelerin, enfekte olmayan hücreler arasından seçici olarak ayırt edilebilmesi için lentiviral vektörde bulunan püromisin direnç geni sayesinde püromisin ile artan dozlarda muamelenin ardından GFP ekspresyonu bulunmayan hücrelerden arınması sağlandı. Bu sayede, tüm hücrelerin %90-%100 oranında biyogörüntülenebilir hale getirilmesi gerçekleştirildi. (Şekil 6.2.3)



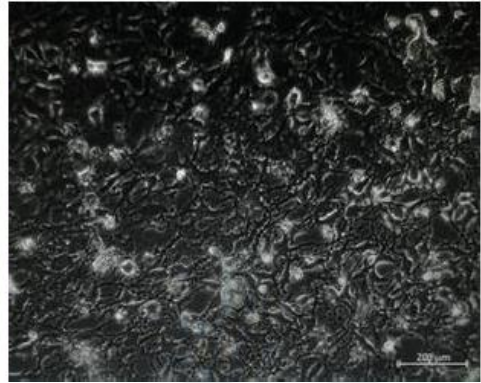
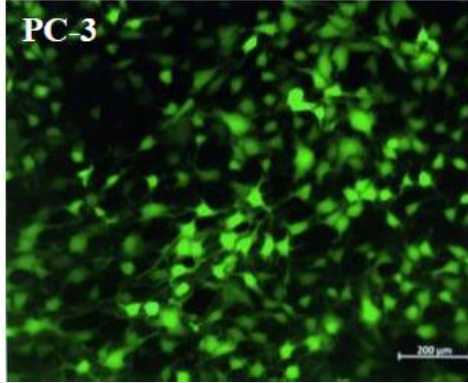
FLORESAN MİKROSKOBU

IŞIK MİKROSKOBU

A



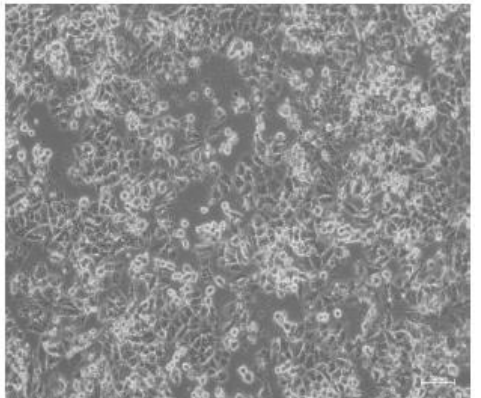
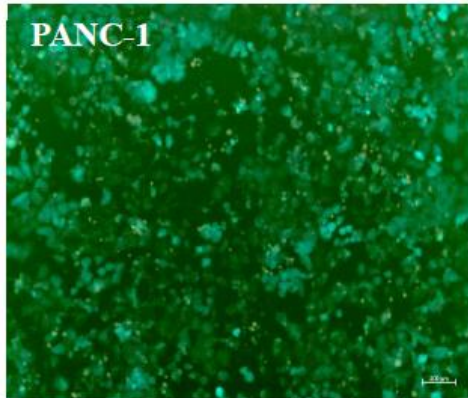
B

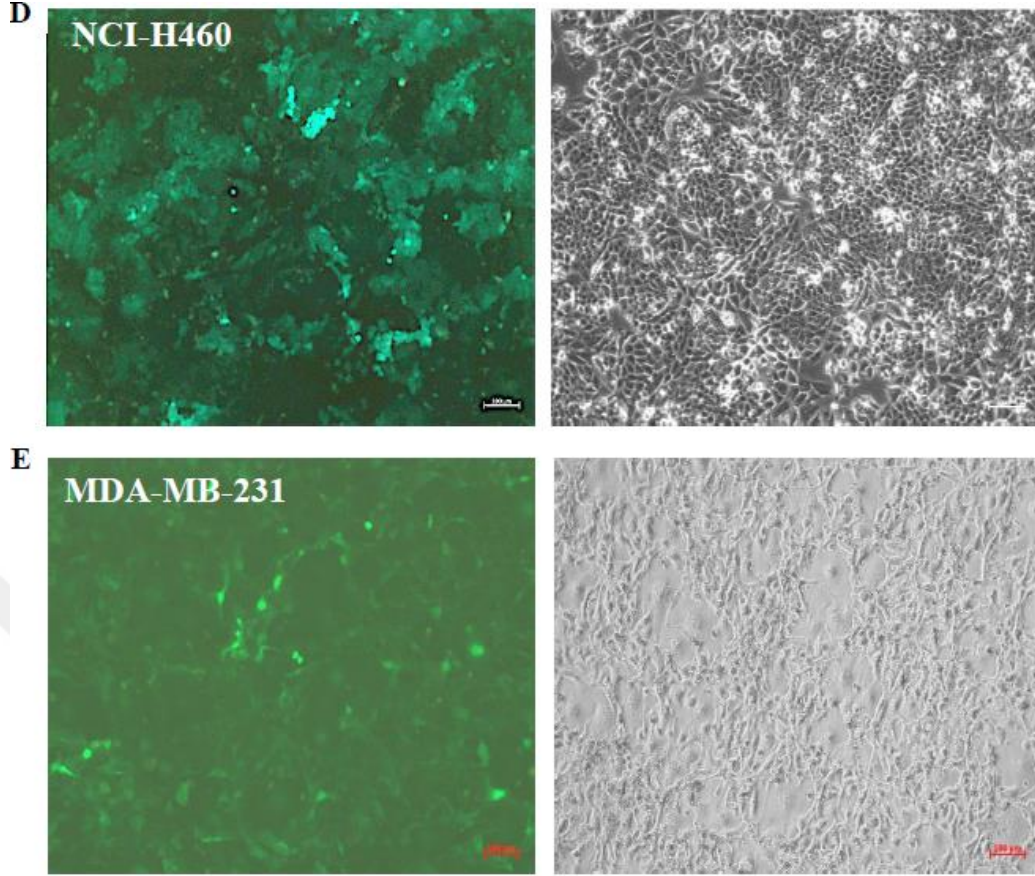


C

FLORESAN GÖRÜNTÜ

IŞIK MİKROSKOBU

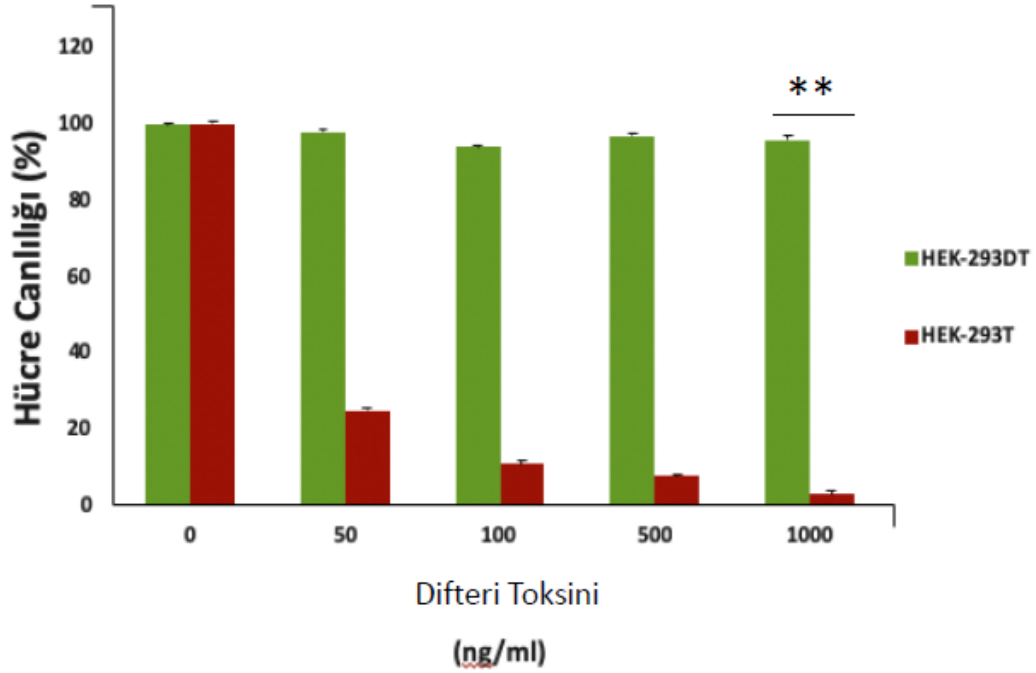
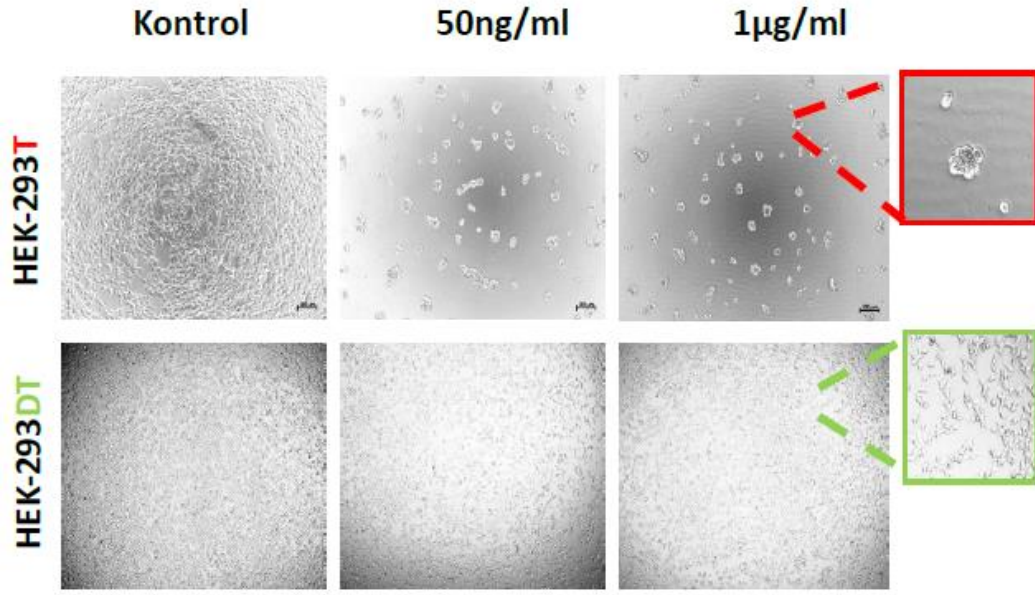




Şekil 6.2.3 Lentiviral transdüksiyon ile oluşturulan biyogörüntülenebilir kanser hücre hatları. Kanser hücre hattı panelinde bulunan ve IL13R α 2 eksprese ettiği tespit edilen hücre hatları biyogörüntülenebilir hale getirildi. A) Glioblastoma; U87, B) Prostat kanseri; PC-3, C) Pankreas kanseri; Panc-1, D) Akciğer kanseri; NCI-H460, E) Meme Kanseri; MDA-MB-231.

6.3 IL13-PE Toksinine Karşı Dirençli HEK293-DT Hücrelerinin Transfeksiyonu ve Medyumun Konsantre Edilmesi

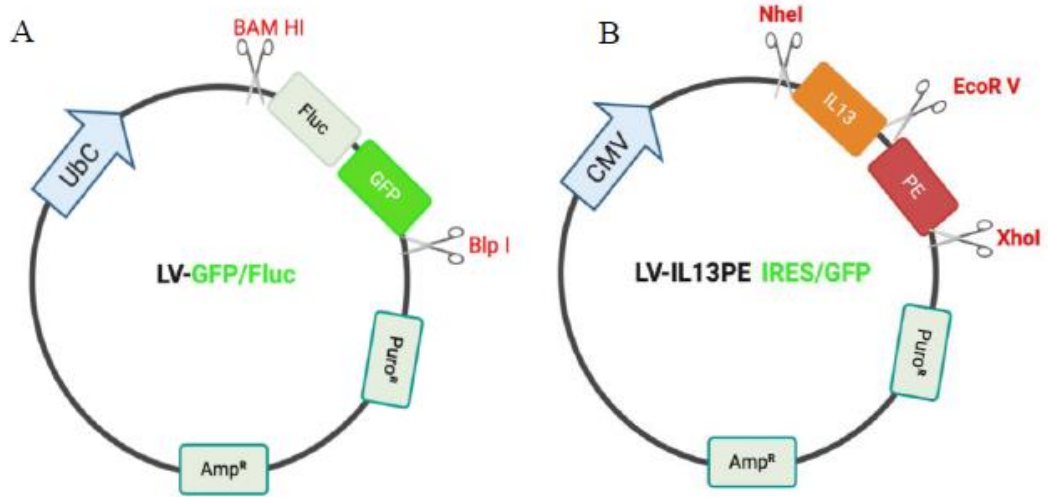
IL13R α 2 eksprese eden kanser hücrelerinin biyogörüntülenebilir hale getirilmesinin ardından IL13-PE'nin bu hücrelerdeki in vitro tedavi edici etkilerinin incelenmesi için toksine dirençli HEK-293DT hücrelerinin LV-IL13-PE-IRES-GFP vektörü ile transfeksiyonunun ardından IL13-PE içeren medyumlar hazırlandı. Bunun için öncelikle, IL13-PE toksinine karşı dirençli olarak oluşturulan HEK-293DT hücrelerine LV-IL13-PE-IRES-GFP transfeksiyonundan önce hücrelerin ticari Difteri Toksini (DT) muamelesine karşı yanıtları incelendi. Artan dozlarda DT uygulaması yapılan HEK-293DT hücre hatları, toksine dirençli hale getirilmeyen HEK-293T hücrelerine kıyasla uygulanan en yüksek dozda dahi (1000ng/ml) %90-100 oranında canlılıklarını koruduğu tespit edildi. HEK-293T'lerin ise kullanılan en yüksek dozda hücre canlılık oranının %20'nin altında olduğu tespit edildi (Şekil 6.3.1).



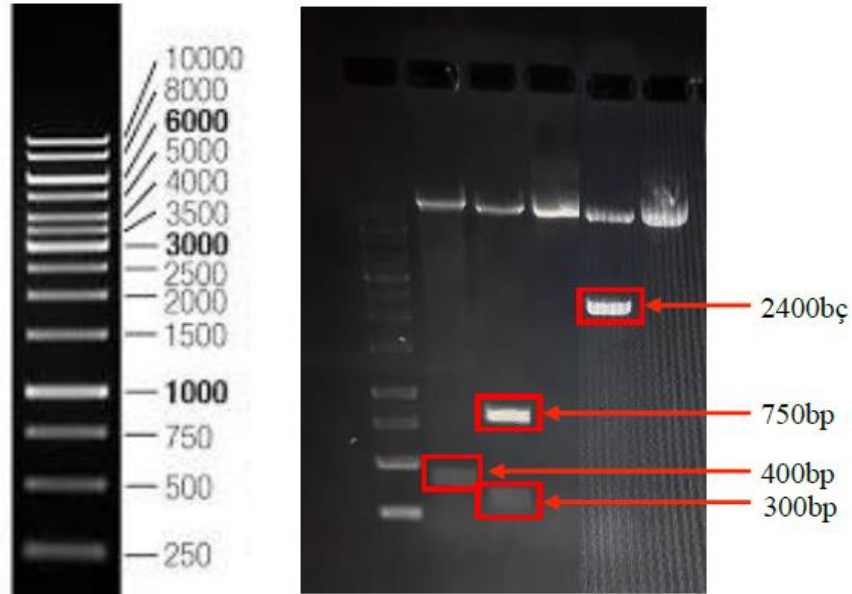
Şekil 6.3.1 Toksine dirençli HEK-293DT hücreleri ve toksin direnci olmayan HEK-293T hücrelerinin toksin muamelesinin ardından hücre canlılığının analizi. HEK-293T ve HEK-293DT hücrelerinin 48 saat süre ile hedefe yönelik toksin ile muamelesinin ardından kontrol ve en yüksek doz (1000ng/ml) uygulanan grupların ışık mikroskobu görüntüsü. B) 48 saat hedefe yönelik toksin ile muamele edilen hücrelerin canlılık yüzdeleri ($0.0001 < p < 0.001$ (**), $0.001 < p < 0.005$ (*)).

Bu sayede, toksine dirençli olarak tasarlanan HEK-293DT'lerin toksine karşı dirençlerini koruduğu tespit edildi. Böylece, LV-IL13-PE-IRES-GFP pDNA'sı ile transfeksiyonu gerçekleştirilecek HEK-293DT'lerin toksin salgılamaları sonucunda bu toksinin hücrelerin ölümüne neden olmayacağı saptanmış oldu. Ardından, IL13R α 2

eksprese eden kanser hücrelerinde, IL13-PE toksin muamelesinin etkilerini inceleyebilmek amacıyla öncelikle HEK-293DT hücresinin transfeksiyonu gerçekleştirildi. Kontrol grubu olarak ise GFP/Fluc ile transfeksiyon yapıldı. Bunun için, IL13-PE ve GFP/Fluc pDNA'sının, vektör haritasında gösterilen (Şekil 6.3.2) restriksiyon bölgelerinden kesimler yapılarak DNA fragmentlerinin boyutları doğrulandı (Şekil 6.3.3).



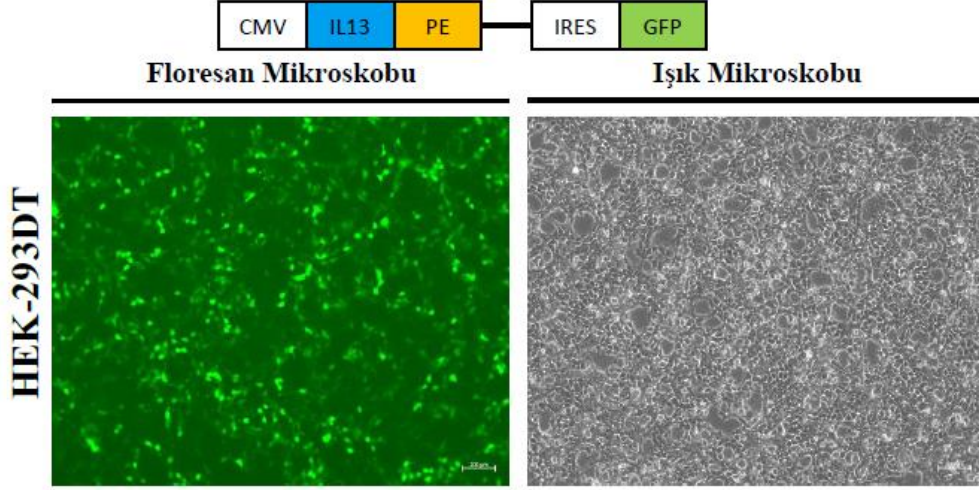
Şekil 6.3.2 Toksine Dirençli HEK-293DT hücrelerinde transfeksiyon için kullanılan vektörlerin haritası. A) LV-GFP/Fluc B) LV-IL13-PE IRES-GFP



Şekil 6.3.3 IL13-PE ve GFP/Fluc pDNA'larının restriksiyon enzimleri ile boyutlarının doğrulanması. Restriksiyon enzimleri kesim doğrulamaları; 1) 1kb DNA marker. 2) IL13-PE'nin Nhe-I ve EcoRV restriksiyon enzimleri ile kesimi; 400bp 3) IL13-PE'nin EcoRV ve Xho-I restriksiyon enzimleri ile kesimi; 750bp ve 300bp 4) IL13-PE restriksiyon enzimleri ile kesim

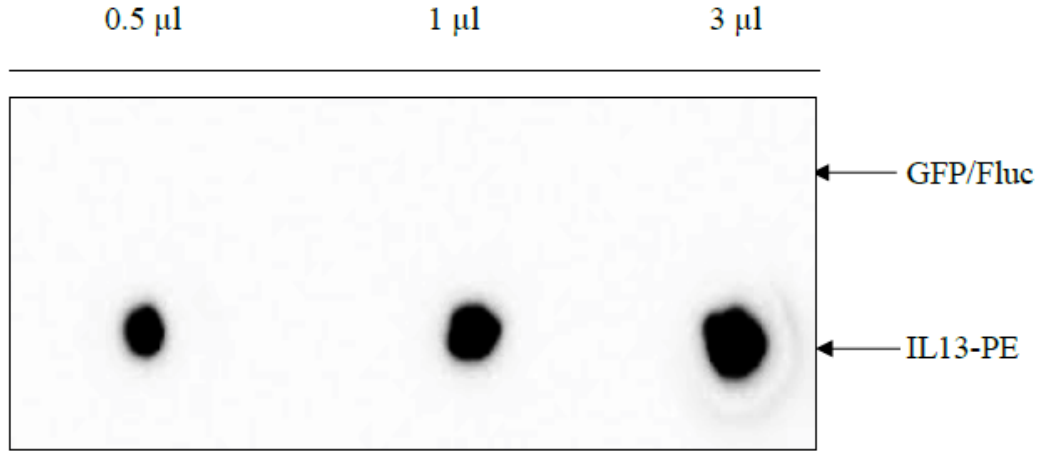
yapılmayan DNA kontrolü. 5) GFP/Fluc BAMH-I ve BLPI restiriksiyon enzimleri ile kesimi; 2.4 kb
6) GFP/Fluc restiriksiyon enzimleri ile kesim yapılmayan DNA kontrolü.

Hücrelerin transfeksiyon verimi GFP ekspresyonunun takibi ile tespit edildi ve %60-70 oranında transeksiyon başarı gözlemlendi (Şekil 6.3.4).



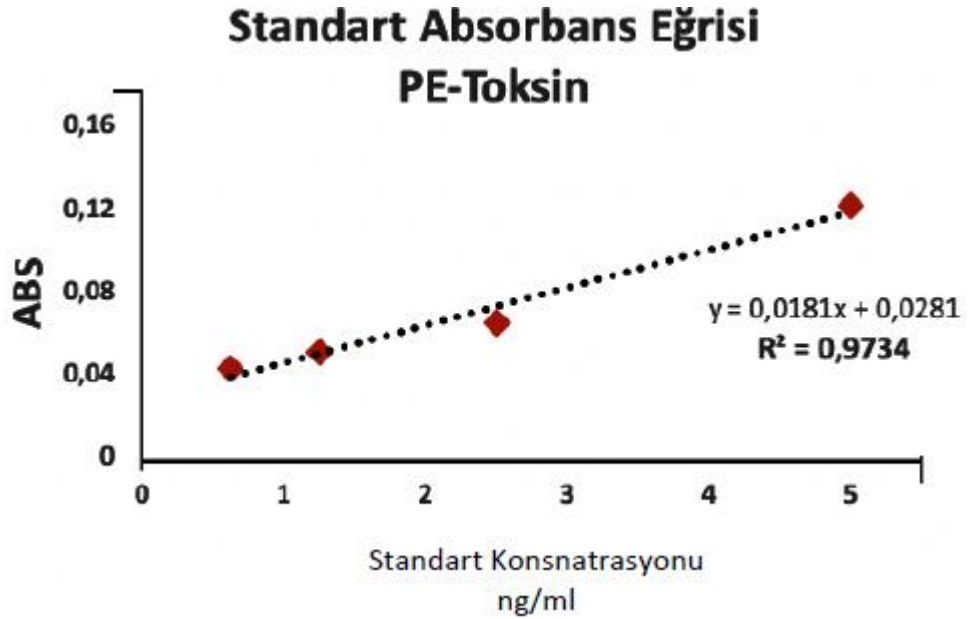
Şekil 6.3.4 LV-IL13-PE pDNA'sı ile transfekte edilen HEK-293DT hücreleri. Toksine dirençli HEK-293DT hücrelerinin LV-IL13-PE plazmidi ile transfeksiyonu şekilde gösterilmiştir (10X Büyütme).

Transfeksiyonun ardından IL13-PE'nin medyuma salınıp salınmadığının tespit edilmesi amacıyla Dot Blot yapıldı. Dot blot sonuçları doğrultusunda kontrol olarak kullanılan GFP/Fluc medyumunda toksik bir birleşene rastlanmaması ile birlikte IL13-PE'nin medyuma salındığının gösteren proteinin varlığı tespit edildi (Şekil 6.3.5). Bu sonuçlar doğrultusunda, IL13-PE içeren medyum öncelikle hücre canlılığının analizi yapılması için kullanıldı.



Şekil 6.3.5 HEK-293DT hücrelerinden elde edilen kondisyon medyumunda IL13-PE toksininin dot blot yöntemi ile saptanması. IL13-PE toksin füzyonu ve GFP/Fluc ile transfekte edilen HEK-293DT hücrelerinden toplanıp konsantre edilen medyumlar ile Dot Blot analizi yapıldı. Analizde GFP/Fluc kondisyon medyumunu IL13-PE kondisyon medyumunu için kontrol olarak kullanıldı. Sonuç olarak, HEK293-DT hücrelerinin IL13-PE transfeksiyonunun ardından hücrelerin toksin füzyonunu salgılamış olduğu tespit edildi. GFP/Fluc kondisyon medyumunda toksik bir bileşen saptanmadı. Bu analiz HEK-293DT hücrelerinden toksinin salgıladığını gösterdi.

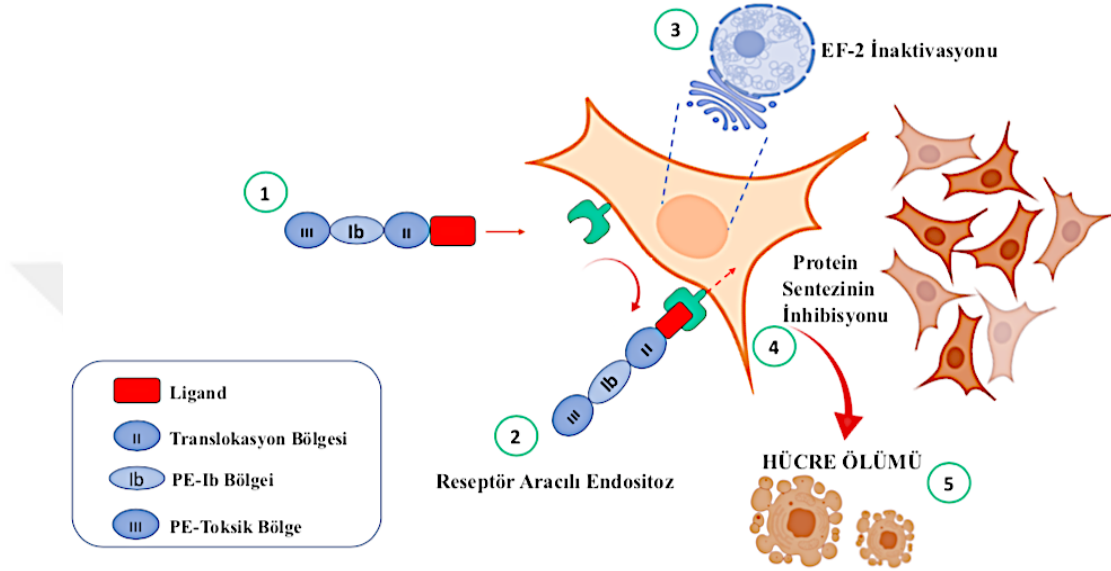
HEK-293DT hücrelerinden elde edilen ve konsantre edilen IL13-PE'nin varlığının Dot Blot ile tespit edilmesi sonucunda, miktarının belirlenmesi için ELISA yöntemi kullanıldı (Şekil 6.10). Standart okutmasının ardından, IL13-PE toksinin miktarı tayin edildi. Bu sayede, *in vitro* hücre canlılığı ve hücre ölümü üzerindeki etkileri incelemek için uygulanacak konsantrasyon miktarları bu sonuçlar referans alınarak belirlenmiş oldu.



Şekil 6.3.6 PE toksini için standart okutmasının yapılması ile oluşturulan absorbans eğrisinin gösterimi.

6.4 Hedefli Toksin Füzyonunun Çeşitli Kanser Hücreleri Üzerindeki *In Vitro* Tedavi Edici Etkisinin Belirlenmesi

Hedefli toksin IL13-PE'nin yol açtığı hücre ölüm mekanizması (Şekil 6.4.1) üzerinden kanser hücreleri üzerinde etkisini gösteren toksin füzyonunun belirlenen kanser hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri incelendi.

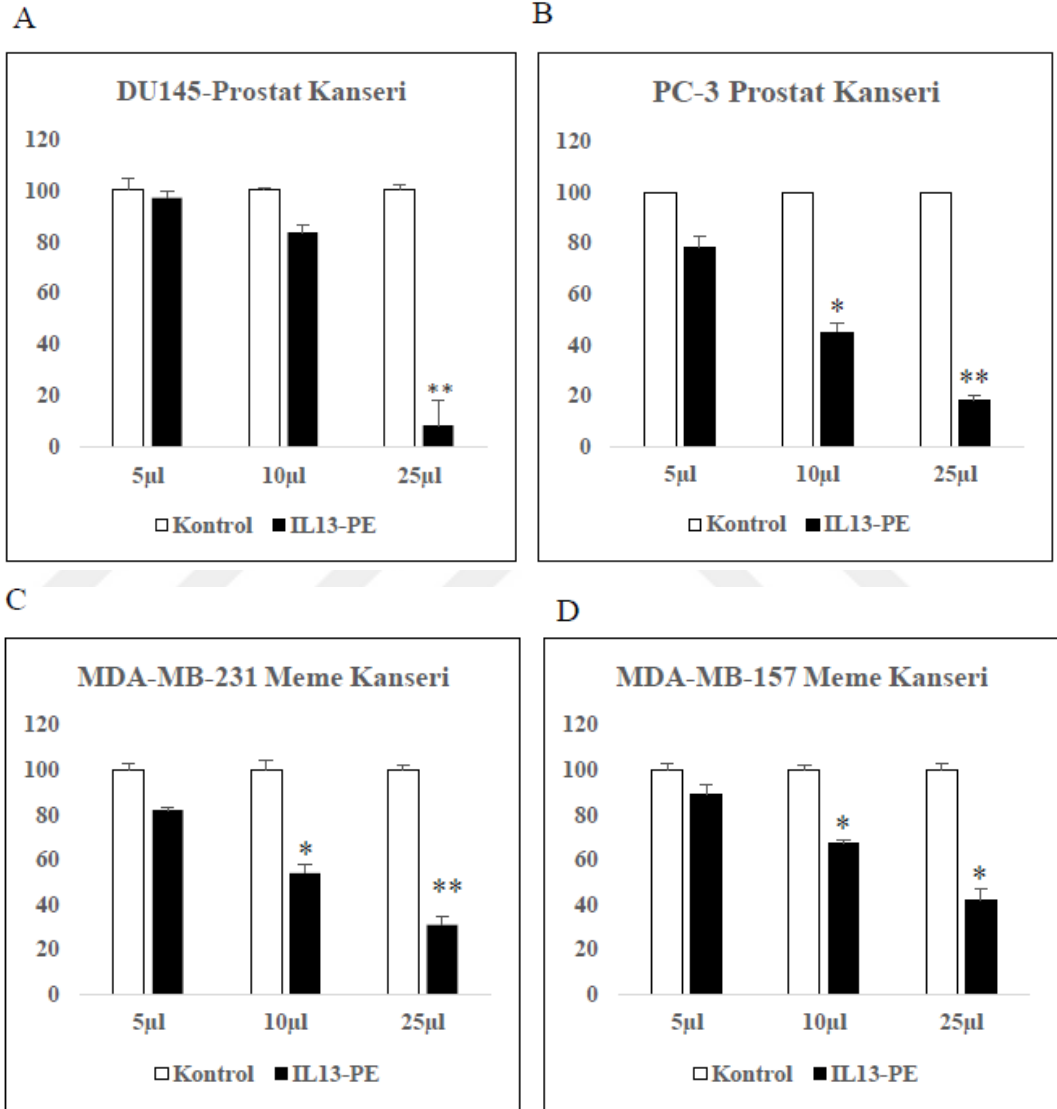


Şekil 6.4.1 Hedefe yönelik IL13-PE toksin füzyonunun yol açtığı hücre ölüm mekanizması. Reseptör aracılı endositoz ile hücre içine alınan IL13-PE toksin füzyonu enzimatik kesime uğradıktan sonra EF-2 inaktivasyonu ile IL13R α 2 açısından pozitif kanser hücrelerinin spesifik olarak protein sentezinin inhibe edilmesine neden olur ve hücre ölümü gerçekleşir.

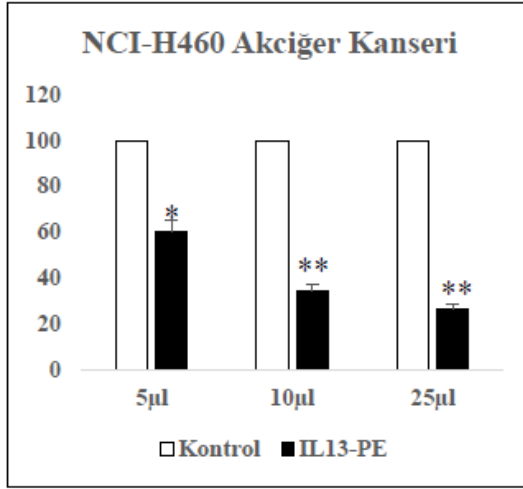
HEK-293DT kondisyon medyumundan elde edilen IL13-PE toksininin Dot Blot analizi ve miktar tayininin belirlenmesi ile reseptör ekspresyonu bulunan hücrelere çeşitli dilüsyonlarda IL13-PE medyumunu ile muamele edildi. Kontrol olarak GFP/Fluc medyumundan da aynı dilüsyonlarda kullanıldı. Hücrelerin toksin medyumunu ve kontrol medyumunu ile muamelesinden 48 saat sonra canlılık analizleri gerçekleştirildi.

PC-3, U87 ve özellikle NCI-H460 hücrelerinde IL13-PE toksininin 10 μ l dilüsyon kullanılan grupta önemli ölçüde ve anlamlı derecede canlılık oranlarında azalma tespit edildi. PC-3 hücresinde 10 μ l toksin dilüsyonundaki canlılık oranının %48 (Şekil 6.4.2 B), U87 hücresinde 10 μ l toksin dilüsyonundaki canlılık oranının %43 (Şekil 6.4.2 F) ve NCI-H460 (Şekil 6.4.2 E) hücresinde ise canlılık oranının %40'ın altına düştüğü sonucuna ulaşıldı. 25 μ l dilüsyonun hücre canlılığı oranının azalması üzerindeki yüksek etkisi bu dilüsyonun hücrelere toksik gelebileceğini

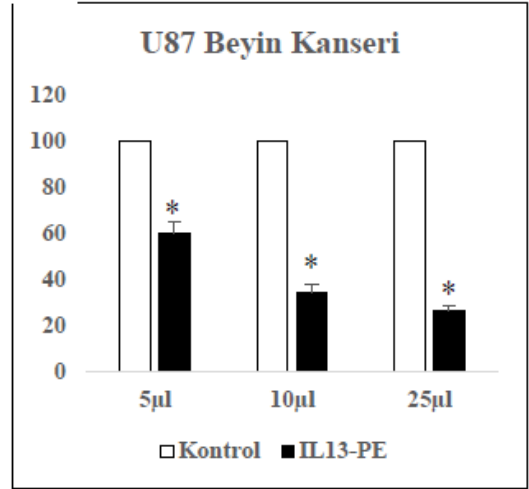
düşündürdü. Bununla birlikte, IL13R α 2 eksprese etmeyen DU-145 hücresinin toksin ile muamelesinde, ekspresyonu olan hücelere kıyasla canlılık oranının önemli derecede azaldığı dilüsyonlarda bile canlılık yüzdesinin %80'den fazla olduğu tespit edildi (Şekil 6.4.2 A). Bu sonuçlar doğrultusunda, IL13-PE toksininin hücrelerde hedefe yönelik olarak etki gösterdiği belirlenmiş oldu. İstatiksel veriler *student-t test* ile analiz edildi ($0.0001 < p < 0.001$ (**), $0.001 < p < 0.005$ (*)).



E

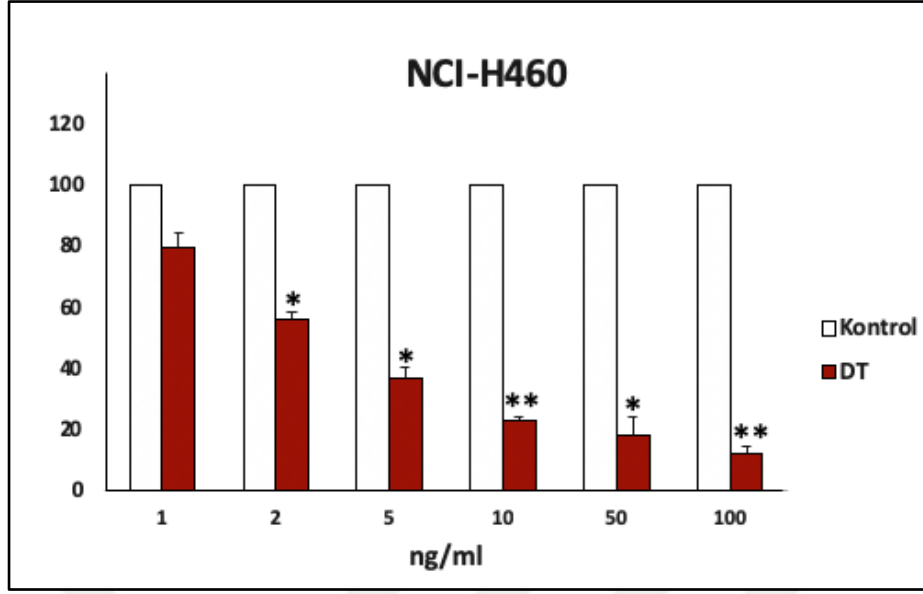


F



Şekil 6.4.2 Hedefe yönelik toksin füzyonu IL13-PE' nin kanser hücre canlılığı üzerindeki etkileri. Hedefe yönelik IL13-PE toksin kondisyon medyumu ile değışen miktarlarda (5-25 µl) 48 saat boyunca IL13-PE kondisyon medyumu ile muamele edilen hücreler; A) DU-145 (Prostat Kanseri), B) PC-3 (Prostat Kanseri), C) MDA-MB-231(Meme Kanseri), D) MDA-MB-157 (Meme Kanseri), E) NCI-H460 (Akciğer Kanseri), F) U87 (Beyin Kanseri). İstatiksel veriler student-t test ile analiz edildi (0.0001<p<0.001 (**), 0.001<p<0.005 (*)).

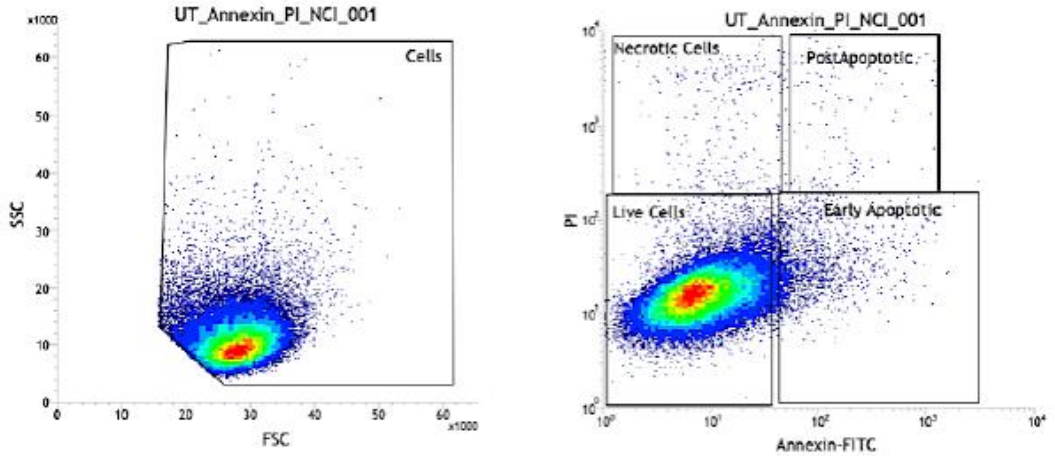
Çeşitli kanser hücrelerinde, hedefe yönelik IL13-PE toksininin hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin incelenmesinin ardından, toksinin en iyi etki gösterdiği NCI-H460 hücreesindeki hücre ölümündeki etkileri Annexin V-PI ve Western Blot yöntemleri ile incelendi. Bu yöntemler için, öncesinde NCI-H460 hücrelerinde hedefe yönelik olmayan ticari DT muamelesi 48 saat boyunca uygulandı ve hücre canlılığı üzerindeki etkileri belirlendi. Artan dozlarda DT ile muamele edilen NCI-H460 hücresi için uygulama dozu 2ng/ml olarak belirlendi ve devam deneylerinde bu doz kullanıldı (Şekil 6.4.3).



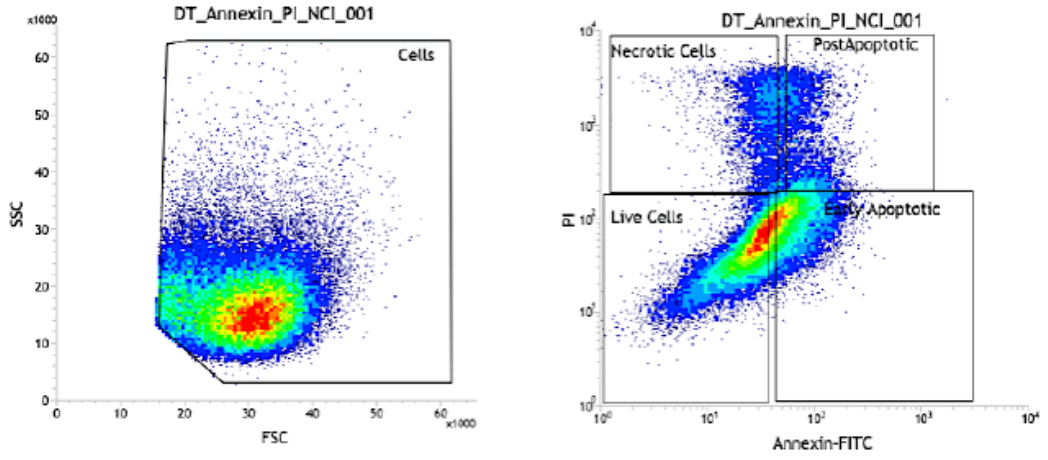
Şekil 6.4.3 DT ile muamele edilen NCI-H460 hücresinin canlılık analizi. 48 saat boyunca artan dozlarla muamele edilen NCI-H460 hücresinin artan dozlarla paralel olarak hücre canlılığında belirgin ve anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. İstatiksel veriler student-t test ile analiz edilmiştir ($0.0001 < p < 0.001$ (**), $0.001 < p < 0.005$ (*)).

Bu sayede, rekombinant olarak üretilen IL13-PE ile ticari DT arasında hücre ölümü üzerindeki etkilerinin kıyaslanabilmesi sağlanmış oldu. NCI-H460 hücreleri, 48 saat süre ile 2ng/ml konsantrasyonda DT ile ve 48 saat süreyle 1 ng/ml IL13-PE medyumunu ile muamele edildi. Kontrol grubuna hiçbir uygulama yapılmadan 48 saat boyunca kültürde inkübe edildi. Sonuç olarak, hücrelerin kontrol hücrelerine kıyasla erken apoptotik süreçte olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6.4.4).

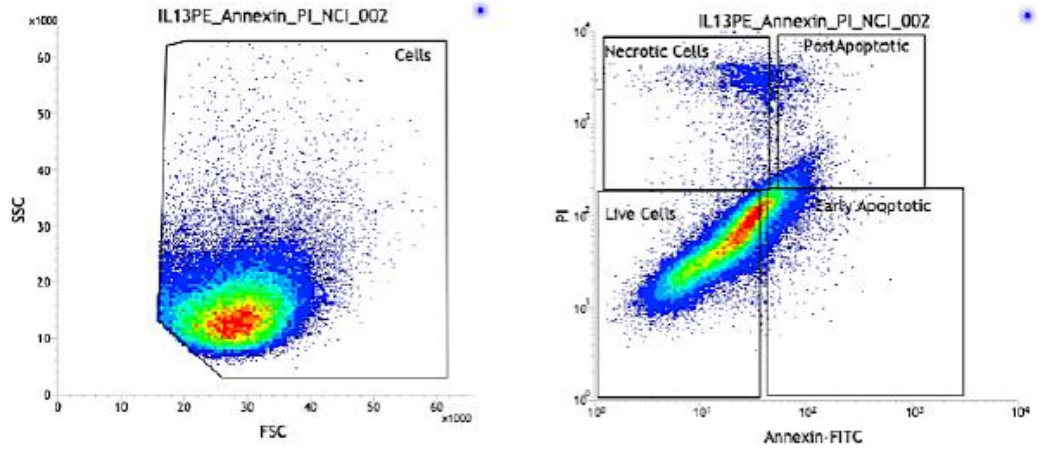
NCI-H460 (Kontrol)



NCI-H460 (Difteri Toksin)

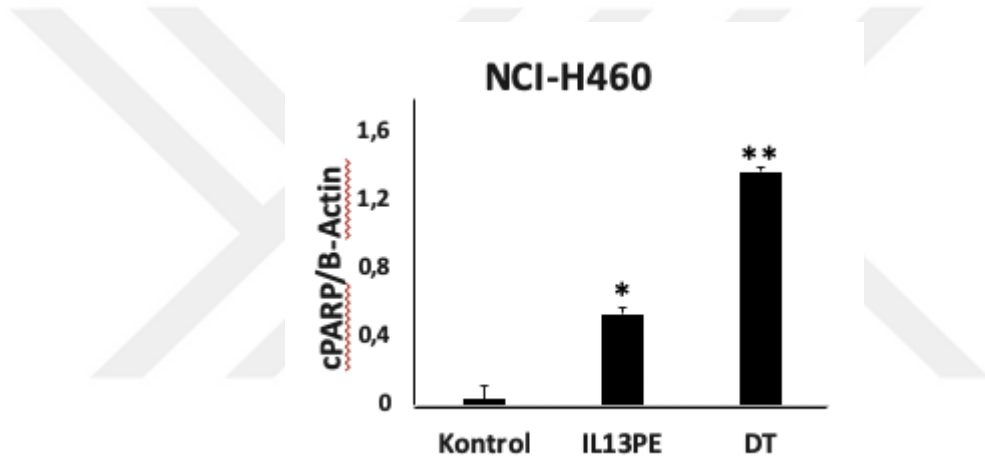
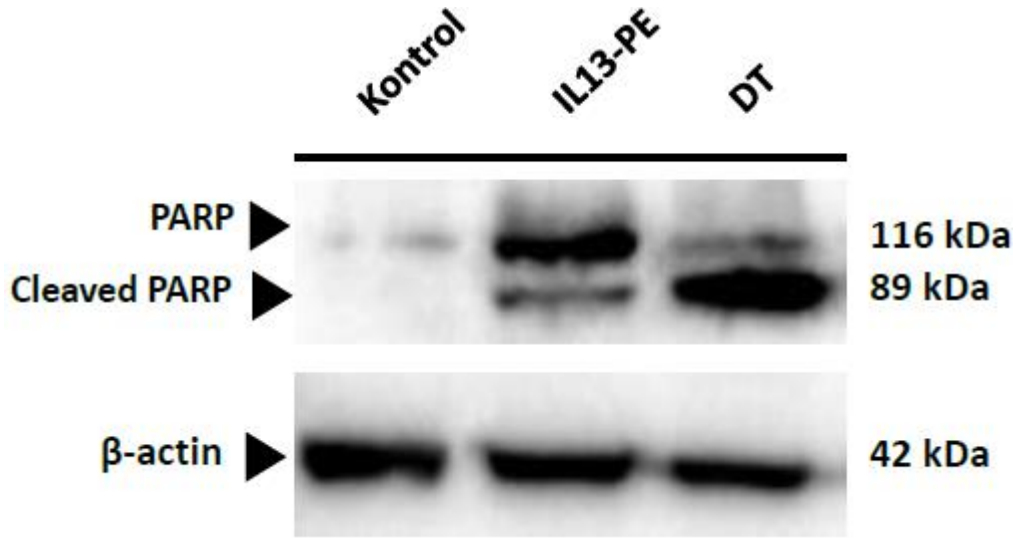


NCI-H460 (IL13-PE)



Şekil 6.4.4 Annexin V-PI yöntemi ile hücre ölümünün analizi

Son olarak, hücre ölümünün analizi Western Blot yöntemi ile yapıldı. Difteri toksini (2ng/ml) ile 48 saat süre ile ve IL13-PE kondisyon medyumunu (1ng/ml) ile 48 saat boyunca muamele edilen NCI-H460 hücresinde apoptozun son basamaklarında kesilime uğrayan cPARP seviyesinde kontrole kıyasla anlamlı derecede artış tespit edildi (Şekil 6.4.5). Bant yoğunluklarının analizi Image J yazılımı kullanarak yapıldı (6.4.5).

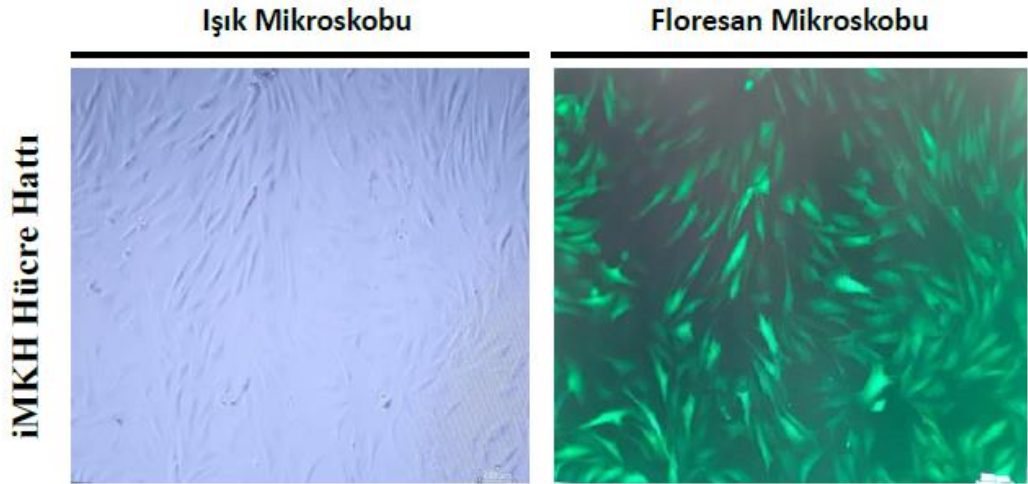


Şekil 6.4.5 Hücre ölümünün western blot ile tespiti

Kontrolle kıyas ile IL13-PE ve DT muamelesinin ardından tespit edilen cPARP görüntüsü ve cPARP seviyelerin kontrol yüklemesi olan β-actin'e oranlarını gösteren grafik.

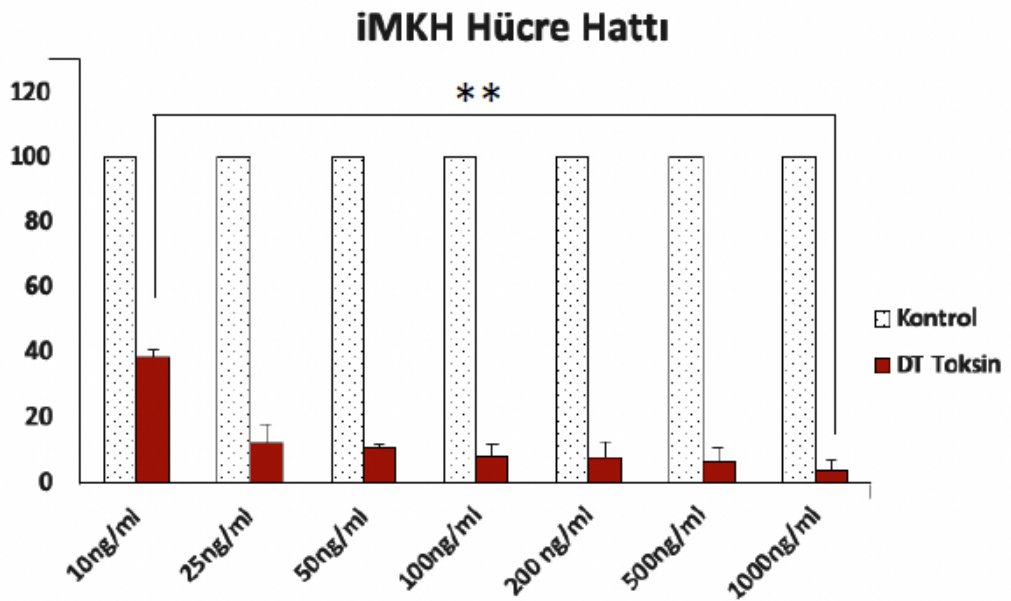
6.5 Mutant EF-2 Kodlayan ssODN ile Kök Hücrelerde Toksin Direncinin Oluşturulması

Hedefli toksinleri eksprese eden insan mezankimal kök hücre hattını (iMKH-IL13-PE) oluşturmak üzere, öncelikle GFP/Fluc pDNA'sı ile transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerin puromisin ile seleksiyonu gerçekleştirildi ve %90-%100 GFP/Fluc eksprese eden hücre popülasyonu başarı ile elde edildi (Şekil 6.5.1).



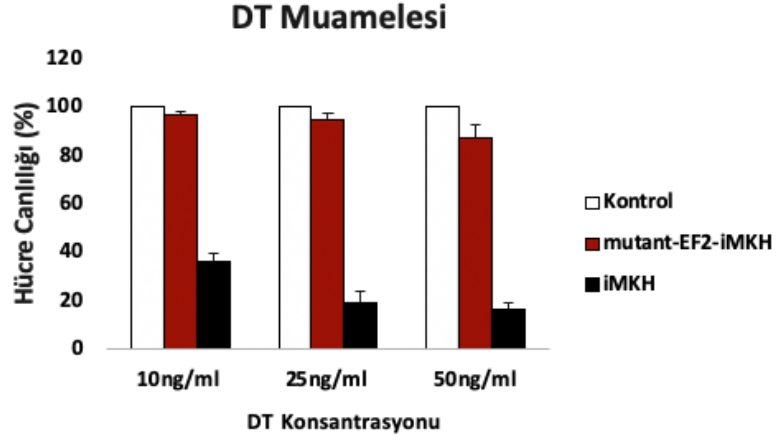
Şekil 6.5.1 GFP/Fluc eksprese eden iMKH'lerin elde edilmesi

Ardından, iMKH'lerden toksine dirençli hatların oluşturulması için ssODN'ler nucleofection yöntemi ile hücelere verildi. Nucleofection ile ssODN aktarılan iMKH'lerin, DT ile muamelesinin öncesinde herhangi bir işleme tabii tutulmamış normal iMKH hücrelerin DT toksini ile muamelesine karşı oluşturduğu yanıt incelendi. DT ile 48 saat süre ile muamele edilen iMKH'lerin hücre canlılık oranı aşağıda gösterildiği gibidir (Şekil 6.5.2). Bu sayede, ssODN aktarılan GFP/Fluc işaretli iMKH'lerin DT ile muamelesi için başlangıç dozu 10ng/ml olacak şekilde belirlenmiş oldu.



Şekil 6.5.2 DT ile muamele edilen iMKH'lerin hücre canlılık yüzdeleri. Artan dozlar ile muamele edilen iMKH hücre hatlarının, DT'ye karşı göstermiş olduğu hücre canlılık yanıtları. İstatistiksel veriler student-t test ile analiz edilmiştir ($0.0001 < p < 0.001$ (**), $0.001 < p < 0.005$ (**)).

Son olarak, mutant-EF2 kodlayan ssODN'lerin aktarıldığı iMKH'ler ve kontrol iMKH'ler 10-25 ve 50ng/ml DT toksini ile 48 saat boyunca muamele edildi. Kontrol iMKH'lere kıyasla ssODN aktarılan iMKH'lerin canlılık oranlarını koruduğu tespit edildi (Şekil 6.5.3).



Şekil 6.5.3 DT ile muamele edilen normal iMKH ve EF-2 mutant iMKH'nin hücre canlılık analizi. DT toksini ile 48 saat boyunca muamele edilen normal iMKH'lere (A) kıyasla, EF-2 mutant iMKH'lerde (B) anlamlı derecede hücre canlılığının korunduğu tespit edilmiştir. İstatiksel veriler student-t test ile analiz edilmiştir ($0.0001 < p^{**} < 0.001$).

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, kanser hücrelerini hedefleyen IL13-PE toksin füzyonunun çeşitli kanser hücrelerindeki tedavi edici etkisi *in vitro* yöntemlerle araştırılmıştır. Sonuç olarak, IL13-PE'nin hedefindeki mutant reseptör IL13R α 2'yi eksprese eden kanser hücrelerinde, IL13-PE'nin anlamlı derecede hücre ölümüne yol açtığı ve hücre ölümünün apoptotik ve nekrotik olarak gerçekleştiği gösterilmiştir. Böylece elde edilen *in vitro* sonuçların, hedefe yönelik toksinlerin *in vivo* tedavi edici etkisinin çeşitli kanser türlerinde araştırılmasını anlamlı kılacak derecede etkili olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca, insan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iMKH) IL13-PE toksin füzyonuna karşı dirençli hale getirilmesi için çalışmalar başlatılmıştır. iMKH'lerde toksin direnci oluşturmak için ssODN teknolojisi kullanılmıştır. Böylelikle, toksin direnci kazandırılan iMKH'ler IL13-PE toksinini üretmek için kullanılacaktır. Bu sayede, terapötik taşıyıcı niteliğinde bir araç olarak kullanılacak iMKH'lerin sürdürülebilir şekilde hedefe yönelik toksini salgılaması sağlanacaktır. Normal iMKH hatlarının difteri toksini (DT) ile muamelesinde; 10-25-50 ng/ml doz uygulamalarında hücrelerin ölümüne yol açarken, toksin direnci oluşturmak için tasarlanan mutant EF-2 kodlayan iMKH'lerin uygulanan bu dozlarda canlılıklarını koruduğu tespit edilmiştir. Bu doğrultuda, uygulanan dozların yükseltilmesi ile birlikte tek hücre koloni seçimi deneyleri yapılarak toksine karşı dirençli hatların eldesi sağlanabilecektir.

Bilindiği gibi kanser hastalarının tedavisinde büyük sıklıkla; kemoterapi ve radyoterapi gibi kanser hücresi seçiciliği bulunmayan geleneksel tedaviler uygulanmaktadır. Bu tedaviler sonucunda, proliferatif her hücrede etkisini gösterebilecek kemoterapi uygulaması çeşitli yan etkilere sebep olmaktadır. Aynı zamanda, çoğalma kapasitesi mevcut olan örneğin kök hücreler gibi çeşitli hücrelere de toksik etkisini gösterme durumu ile karşılaşılmaktadır. Ancak hedefe yönelik toksin füzyonu ile neoplastik olmayan sağlıklı hücrelerde, anlamlı düzeyde toksik etki oluşturmayacak bir strateji uygulanmıştır. Bu yaklaşım ile öncelikle IL13-PE toksininin hedefleyebileceği kanser hücreleri, hedef reseptör ekspresyonlarını bulundurmaları yönüyle belirlenmiştir. Bu hücreler; pankreas kanseri hücre hattı; PANC-1, akciğer kanseri hücre hattı; NCI-H460, melanoma kanseri hücreleri; MeWo, SKMEL-2 meme kanseri hücre hatları; MDA-MB-157 ve MDA-MB-231 olarak tespit

edilmiştir. Bu sayede, daha öncesinde glioblastoma beyin tümöründe IL13-PE hedefe yönelik toksininin kök hücre aracılı bir biçimde kullanımının bu toksinin birçok farklı kanser türünde de uygulanabilecek bir yaklaşım olabileceği ön görülmüştür. Bu sonuçlar ile, hedefe yönelik IL13-PE toksininin tek bir kanser türünde değil IL13R α 2 reseptör ekspresyonu bulunan pek çok farklı kanser türünde olumlu sonuçlar alınabilecek bir yaklaşım olabileceği düşünülmüştür. Çeşitli kanser türüne ait hücre hatlarında, IL13R α 2 ekspresyonun tespit edilmesi ile birlikte bir yandan ayrıca göz önünde bulundurulması gereken durum tümör dokusunun heterojen yapısıdır. Bu çalışmada, örneğin meme kanseri için IL13R α 2 ekspresyonu açısından taranan farklı hücre hatlarında (MCF-7, MDA-MB-468, MDA-MB-157, MDA-MB-231) 4 farklı hücreden 2 hücre hattında (MDA-MB-157, MDA-MB-231) IL13R α 2 ekspresyonu pozitif olarak tespit edilmiştir. Ancak şu anda hedefe yönelik olarak geliştirilen tedavilerde de görüldüğü üzere tümör dokusunda var olan heterojen popülasyonun tamamen hedeflenebilmesi yaşanan en büyük zorluklardan birisi olmuştur. Bu doğrultuda ilk olarak toksine dayanan hedefe yönelik bu tedavi stratejisinde önemli olan, tümör popülasyonunda hedeflenebilecek hücrelerin belirlenebiliyor olmasıdır. Bu sayede heterojen popülasyonun varlığının olmasının yanı sıra bu popülasyonda yer alan hücrelerin hedeflenebilmesinin tümör yükünü azaltabileceğini düşündürmektedir. Bunun için, devam çalışmasında hedeflenen *in vivo* tümör oluşturma ve hedefe yönelik IL13-PE toksininin etkilerinin *in vivo* tümör dokusunda görülmesi ile birlikte pre-klinik çalışmalar açısından umut verici olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda tümör dokusunda var olan kanser hücrelerinin reseptör ekspresyonu varlığı ile hedeflenebilirliğinin tespit edilmesi ile *in vivo* çalışmalarda tümör yükünün azalabileceği öngörülmektedir.

Bununla birlikte, IL13R α 2 ekspresyonu tespit edilen çeşitli kanser türlerine ait hücre hatlarında IL13R α 2 reseptörünün yüzeydeki lokalizasyonunun da hedefe yönelik tedavi açısından oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. RT-PZR sonucunda ekspresyonun mRNA düzeyinde tespit edilmiş olmasının ardından reseptörün yüzeye lokalize olma oranının da bilinmesinin hedefe yönelik olarak tasarlanan yaklaşımımızı iki açıdan da güçlendirmiş olacaktır. Bu durumda, reseptör pozitif hücrelerde reseptörün yüzeyde lokalize olması oldukça önem kazanmaktadır. Bunun için düşünülen stratejimiz ise reseptör ekspresyonu tespit edilen hücrelerde yüzey

boyaması yapılarak hücre membranında lokalize olan reseptörlerin protein düzeyinde yüzdesel olarak oranının belirlenmesi olmaktadır. Bu sayede, hedefe yönelik IL13-PE toksininin çeşitli kanser türlerine ait hücrelerde gösterebileceği etkinlik hem reseptör ekspresyonunun RT-PCR ile olan tespiti ve hem de hücre membranında bulunan reseptör varlığının yüzdesel olarak belirlenmiş olması hedefe yönelik tedavi için kullanılabilir. Böylece, bu parametrelerin *in vivo* çalışmalara geçmeden önce belirlenmiş olması pre-klinik çalışmalar için oldukça önemlidir. Aynı zamanda bu çalışma translasyonel olarak düşünüldüğünde, hedefe yönelik IL13-PE toksini ile hedeflenebilecek kanser türlerinin belirlenmesi ile birlikte hastaya özel IL13R α 2 reseptör ekspresyon profilinin çıkarılması ve bu sayede tedavi için uygun olup olmadığının belirlenmesi ile geleceğin tıbbi yaklaşımında bireye özgü tedavi stratejisi olarak kullanılabilme potansiyeli pre-klinik çalışmaların ardından belirleyici olabilir.

Ayrıca, çalışmada hedefe yönelik IL13-PE toksininin IL13R α 2 reseptörüne karşı özgünlük göstermesi ve bu reseptörün varlığı doğrultusunda etkisini göstermiş olması oldukça önemli bir noktadır. IL13-PE toksininin oluşturulmasında klinik değeri olabilecek en önemli hususlardan bir tanesi PE toksininin doğal reseptör bağlanma bölgesinin çıkarılmış olması ve IL13 ligandının reseptör bağlayıcı bölgeye eklenmiş olmasıdır. Bu sayede PE'nin doğal reseptörü olan lipoprotein-related protein (LRP)'yi eksprese eden ve neoplastik olmayan hücrelere karşı etkisini gösteremeyecektir. Bununla birlikte çalışmada prostat kanser hücre hattı olan DU-145 hücresinde IL13R α 2 ekspresyonu tespit edilememiş olup bu hücreye IL13-PE toksin muamelesinin yapılması reseptör eksprese etmeyen bir hücre hattı üzerinde toksinin etki etmediğini göstermiştir. Bu durum her ne kadar tüm kanser hücrelerinde uygulanabilirliğini kısıtlasa da, tümör dokusunun %50 ve üzerinde hedef reseptör ekspresyonu gösterdiği durumlarda tedavide anlamlı etkinin elde edilebileceğini düşündürmektedir.

Ek olarak, *Pseudomonas Aeruginosa* bakterisinin bir yan ürünü olduğu bilinen doğal PE'nin toksik etkisine maruz kalan hücrelerde 35 dakika içerisinde 300 ribozomu geri-dönüşümsüz olarak inaktive ettiği ve protein sentezinin durdurulması aracılığıyla etkili bir şekilde hücre ölümüne yol açtığı bildirilmiştir. Tez çalışmasında, IL13-PE'nin çeşitli kanser hücrelerinde anlamlı hücre ölümünün varlığına yol

açığının gösterilmesinin yanında, IL13-PE'nin kanser hücrelerindeki sitotoksik etkisinin artırılması için ilerleyen çalışmalarda toksik bölge ile ilgili çeşitli stratejilere başvurulabilir. PE toksininin sitotoksik etkisinin artırılması gelişmekte olan bir alan olup özel dizilerin eklenmesiyle bu etkinin artırılacağı bazı çalışmalarda gösterilmektedir. Bu doğrultuda, öncelikle PE'nin karboksil terminalindeki Arg-Glu-Asp-Leu-Lys (REDLK) sekansının, sitotoksik aktivitesi için önemli olduğu gösterilmiştir. Devam eden araştırmalar dahilinde, PE'nin Lys-Asp-Glu-Leu (REDLK) ile biten sekansına kıyasla KDEL ile biten türevlerinin önemli ölçüde sitotoksik olarak daha aktif olduğu gösterilmiştir. Bu kapsamda, ilerleyen çalışmalarda IL13-PE'nin sitotoksik etkilerinin artırılması ile IL13R α 2 eksprese eden çeşitli kanser hücrelerindeki etkileri de artırılacaktır.

Sonuç olarak, çalışmamızda 21 farklı kanser hücresinin IL13R α 2 reseptör ekspresyon profili çıkarılmıştır. Böylelikle, IL13-PE toksini ile hedeflenebilecek çeşitli kanser hücre hatları tespit edilmiştir. Hedef reseptörü eksprese eden kanser hücrelerinde, IL13-PE toksin füzyonunun muamelesinin ardından en etkili yanıt gösteren hücre hattının NCI-H460 (akciğer kanseri) olduğu saptanmıştır. NCI-H460 hücresinde toksin uygulamasının ardından, hücre proliferasyonunda önemli bir düzeyde azalma ve hücre canlılığı üzerinde anlamlı derecede bir düşüş görülmüştür. Toksin füzyonu muamelesinin, hücrenin hem apoptotik hem de nekrotik ölümüne yol açtığı belirlenmiştir. Böylelikle, IL13-PE ile muamele edilen NCI-H460 hücresinde toksinin etkili bir şekilde hücre ölümüne yol açtığı görülmüştür.

Pre-klinik ve klinik çalışmalarda kök hücrelerin terapötik araçlar olarak kullanılabilmesi önemli bir yaklaşım olarak gelişmeye devam etmektedir. Terapötik özellik kazandırılmak için modifiye edilen kök hücreler, sadece tümör dokusu içerisine yönelmekle kalmayıp, tümör dokusu içindeki daha malign hücrelere de ulaşabilmektedir. Aynı zamanda, iMKH'lerdeki düşük immünojenik yanıt bu hücreleri önemli bir terapötik araç haline getirmiştir. Çalışmamızda, iMKH'lerin toksine karşı dirençli hale getirilmesi için deneyler başlatılmıştır. Kontrol iMKH'lere kıyas ile çeşitli dozlarda muamele edilen mutant EF-2 kodlayan iMKH'lerin hücre canlılıklarını koruduğu tespit edilmiştir. iMKH'lerin toksin ile yüksek dozlarda muamelesinin ardından, dirençli kolonlar seçilerek toksine dirençli iMKH hattının eldesi sağlanabilecektir. Böylelikle, toksine karşı dirençli iMKH'lerin oluşturulmasıyla,

hücreler IL13-PE hedefe yönelik toksin füzyonunu sürdürülebilir şekilde salgılayacak nitelikte olabilecektir. Böylelikle, çalışmamız kanser tedavilerinde ilacın hedefe ulaşmadan yarılanması, sistemik toksisite oluşması ve tedavilerin kanser hücrelerine özgü olmaması gibi engellerin önüne geçebilecek bir yaklaşım niteliğinde olabilecektir.



8. KAYNAKLAR

1. Ejlersen B. Adjuvant chemotherapy in early breast cancer. Danish medical journal. 2016.
2. Hervey-Jumper SL, Berger MS. Maximizing safe resection of low- and high-grade glioma. Journal of Neuro-Oncology. 2016.
3. Yokoi K, Taniguchi T, Usami N, Kawaguchi K, Fukui T, Ishiguro F. Surgical management of locally advanced lung cancer. General thoracic and cardiovascular surgery. 2014.
4. Podder TK, Fredman ET, Ellis RJ. Advances in radiotherapy for prostate cancer treatment. In: Advances in Experimental Medicine and Biology. 2018.
5. Boulos S, Mazhar D. The evolving role of chemotherapy in prostate cancer. Futur Oncol. 2017;
6. Brown S, Banfill K, Aznar MC, Whitehurst P, Finn CF. The evolving role of radiotherapy in non-small cell lung cancer. British Journal of Radiology. 2019.
7. Demaria M, O'Leary MN, Chang J, Shao L, Liu S, Alimirah F, et al. Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. Cancer Discov. 2017;
8. Ingrand I, Defossez G, Lafay-Chebassier C, Chavant F, Ferru A, Ingrand P, et al. Serious adverse effects occurring after chemotherapy: A general cancer registry-based incidence survey. Br J Clin Pharmacol. 2020;
9. Rivera E, Gomez H. Chemotherapy resistance in metastatic breast cancer: The evolving role of ixabepilone. Breast Cancer Research. 2010.
10. Rebucci M, Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. Biochemical Pharmacology. 2013.
11. Lu B, Morrison R, Schleicher SM, Sun Y, Niermann KJ, Kim S, et al. Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. Journal of Oncology. 2011.
12. Huang M, Shen A, Ding J, Geng M. Molecularly targeted cancer therapy: Some lessons from the past decade. Trends in Pharmacological Sciences. 2014.
13. Lee YT, Tan YJ, Oon CE. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. European Journal of Pharmacology. 2018.
14. Sul J, Blumenthal GM, Jiang X, He K, Keegan P, Pazdur R. FDA Approval

Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Patients With Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer Whose Tumors Express Programmed Death-Ligand 1. *Oncologist*. 2016;

15. Raynal NJM, Da Costa EM, Lee JT, Gharibyan V, Ahmed S, Zhang H, et al. Repositioning FDA-approved drugs in combination with epigenetic drugs to reprogram colon cancer epigenome. *Mol Cancer Ther*. 2017;
16. Danilov A V. Targeted therapy in chronic lymphocytic leukemia: Past, present, and future. *Clinical Therapeutics*. 2013.
17. Anjum K, Shagufta BI, Abbas SQ, Patel S, Khan I, Shah SAA, et al. Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2017.
18. Esteva FJ, Hubbard-Lucey VM, Tang J, Pusztai L. Immunotherapy and targeted therapy combinations in metastatic breast cancer. *The Lancet Oncology*. 2019.
19. Ke X, Shen L. Molecular targeted therapy of cancer: The progress and future prospect. *Front Lab Med*. 2017;
20. Li C. A targeted approach to cancer imaging and therapy. *Nature Materials*. 2014.
21. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015.
22. Martin M, Wei H, Lu T. Targeting microenvironment in cancer therapeutics. *Oncotarget*. 2016.
23. Clara JA, Monge C, Yang Y, Takebe N. Targeting signalling pathways and the immune microenvironment of cancer stem cells — a clinical update. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2020.
24. Ahmed K, Koval A, Xu J, Bodmer A, Katanaev VL. Towards the first targeted therapy for triple-negative breast cancer: Repositioning of clofazimine as a chemotherapy-compatible selective Wnt pathway inhibitor. *Cancer Lett*. 2019;
25. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2015.
26. Darvin P, Toor SM, Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Experimental and*

- Molecular Medicine. 2018.
27. Picardo SL, Doi J, Hansen AR. Structure and optimization of checkpoint inhibitors. *Cancers*. 2020.
 28. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: Mechanisms of action, efficacy, and limitations. *Frontiers in Oncology*. 2018.
 29. Andrews LP, Yano H, Vignali DAA. Inhibitory receptors and ligands beyond PD-1, PD-L1 and CTLA-4: breakthroughs or backups. *Nature Immunology*. 2019.
 30. Srinivasan P, Wu X, Basu M, Rossi C, Sandler AD. PD-L1 checkpoint inhibition and anti-CTLA-4 whole tumor cell vaccination counter adaptive immune resistance: A mouse neuroblastoma model that mimics human disease. *PLoS Med*. 2018;
 31. Liu L, Wang Y, Miao L, Liu Q, Musetti S, Li J, et al. Combination Immunotherapy of MUC1 mRNA Nano-vaccine and CTLA-4 Blockade Effectively Inhibits Growth of Triple Negative Breast Cancer. *Mol Ther*. 2018;
 32. Hurwitz AA, Foster BA, Kwon ED, Truong T, Choi EM, Greenberg NM, et al. Combination immunotherapy of primary prostate cancer in a transgenic mouse model using CTLA-4 blockade. *Cancer Res*. 2000;
 33. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science (80-)*. 2015;
 34. Reardon DA, Gokhale PC, Klein SR, Ligon KL, Rodig SJ, Ramkissoon SH, et al. Glioblastoma eradication following immune checkpoint blockade in an orthotopic, immunocompetent model. *Cancer Immunol Res*. 2016;
 35. Rao S V., Moran AE, Graff JN. Predictors of response and resistance to checkpoint inhibitors in solid tumors. *Annals of Translational Medicine*. 2017.
 36. Rossi S, Toschi L, Castello A, Grizzi F, Mansi L, Lopci E. Clinical characteristics of patient selection and imaging predictors of outcome in solid tumors treated with checkpoint-inhibitors. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2017.
 37. Bang A, Wilhite TJ, Pike LRG, Cagney DN, Aizer AA, Taylor A, et al.

- Multicenter Evaluation of the Tolerability of Combined Treatment With PD-1 and CTLA-4 Immune Checkpoint Inhibitors and Palliative Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2017;
38. Osipov A, Lim SJ, Popovic A, Azad NS, Laheru DA, Zheng L, et al. Tumor Mutational Burden, Toxicity, and Response of Immune Checkpoint Inhibitors Targeting PD(L)1, CTLA-4, and Combination: A Meta-regression Analysis. *Clin Cancer Res*. 2020;
 39. Sanna V, Pala N, Sechi M. Targeted therapy using nanotechnology: Focus on cancer. *International Journal of Nanomedicine*. 2014.
 40. Ahmad A, Khan F, Mishra RK, Khan R. Precision Cancer Nanotherapy: Evolving Role of Multifunctional Nanoparticles for Cancer Active Targeting. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2019.
 41. Goodall S, Jones ML, Mahler S. Monoclonal antibody-targeted polymeric nanoparticles for cancer therapy - future prospects. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2015.
 42. Shargh VH, Hondermarck H, Liang M. Antibody-targeted biodegradable nanoparticles for cancer therapy. *Nanomedicine*. 2016.
 43. Wang K, Kievit FM, Zhang M. Nanoparticles for cancer gene therapy: Recent advances, challenges, and strategies. *Pharmacol Res*. 2016;
 44. Poggi A, Zocchi MR. Mechanisms of tumor escape: Role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2006.
 45. Wiezorek J, Holland P, Graves J. Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer. *Clinical Cancer Research*. 2010.
 46. Mahmood Z, Shukla Y. Death receptors: Targets for cancer therapy. *Experimental Cell Research*. 2010.
 47. Frew AJ, Lindemann RK, Martin BP, Clarke CJP, Sharkey J, Anthony DA, et al. Combination therapy of established cancer using a histone deacetylase inhibitor and a TRAIL receptor agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;
 48. Waight JD, Gombos RB, Wilson NS. Harnessing co-stimulatory TNF receptors for cancer immunotherapy: Current approaches and future opportunities. *Hum Antibodies*. 2017;

49. Melero-Martin JM, Dudley AC. Concise review: Vascular stem cells and tumor angiogenesis. *Stem Cells*. 2011.
50. Rajabi M, Mousa SA. The role of angiogenesis in cancer treatment. *Biomedicines*. 2017.
51. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005.
52. Lin Z, Zhang Q, Luo W. Angiogenesis inhibitors as therapeutic agents in cancer: Challenges and future directions. *European Journal of Pharmacology*. 2016.
53. Liao D, Johnson RS. Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2007.
54. Alewine C, Hassan R, Pastan I. Advances in Anticancer Immunotoxin Therapy. *Oncologist*. 2015;
55. Kreitman RJ. Immunotoxins for targeted cancer therapy. *AAPS Journal*. 2006.
56. Potala S, Sahoo SK, Verma RS. Targeted therapy of cancer using diphtheria toxin-derived immunotoxins. *Drug Discovery Today*. 2008.
57. Tyagi N, Tyagi M, Pachauri M, Ghosh PC. Potential therapeutic applications of plant toxin-ricin in cancer: challenges and advances. *Tumor Biology*. 2015.
58. Allured VS, Collier RJ, Carroll SF, McKay DB. Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Angstrom resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;
59. Hwang J, Fitzgerald DJ, Adhya S, Pastan I. Functional domains of pseudomonas exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in *E. coli*. *Cell*. 1987;
60. Siegall CB, Chaudhary VK, FitzGerald DJ, Pastan I. Functional analysis of domains II, Ib, and III of *Pseudomonas* exotoxin. *J Biol Chem*. 1989;
61. Stuckey DW, Shah K. TRAIL on trial: Preclinical advances in cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine*. 2013.
62. Lemke J, Von Karstedt S, Zinngrebe J, Walczak H. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death and Differentiation*. 2014.
63. Deng D, Shah K. TRAIL of Hope Meeting Resistance in Cancer. *Trends in Cancer*. 2020.
64. Morgillo F, Della Corte CM, Fasano M, Ciardiello F. Mechanisms of resistance

- to EGFR-targeted drugs: Lung cancer. *ESMO Open*. 2016.
65. Yamaoka T, Ohba M, Ohmori T. Molecular-targeted therapies for epidermal growth factor receptor and its resistance mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017.
 66. Kawakami K, Kawakami M, Husain SR, Puri RK. Potent antitumor activity of IL-13 cytotoxin in human pancreatic tumors engineered to express IL-13 receptor $\alpha 2$ chain in vivo. *Gene Therapy*. 2003.
 67. Oh CK, Geba GP, Molino N. Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma. *European Respiratory Review*. 2010.
 68. Kawakami K, Taguchi J, Murata T, Puri RK. The interleukin-13 receptor $\alpha 2$ chain: An essential component for binding and internalization but not for interleukin-13-induced signal transduction through the STAT6 pathway. *Blood*. 2001;
 69. Stuckey DW, Hingtgen SD, Karakas N, Rich BE, Shah K. Engineering toxin-resistant therapeutic stem cells to treat brain tumors. *Stem Cells*. 2015;
 70. Suzuki A, Leland P, Joshi BH, Puri RK. Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. *Cytokine*. 2015.
 71. Thaci B, Brown CE, Binello E, Werbaneth K, Sampath P, Sengupta S. Significance of interleukin-13 receptor alpha 2-targeted Glioblastoma therapy. *Neuro Oncol*. 2014;
 72. Mathew M, Zaineb KC, Verma RS. GM-CSF-DFF40: A novel humanized immunotoxin induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Apoptosis*. 2013;
 73. Akbari B, Farajnia S, Ahdi Khosroshahi S, Safari F, Yousefi M, Dariushnejad H, et al. Immunotoxins in cancer therapy: Review and update. *International Reviews of Immunology*. 2017.
 74. Hall PD, Willingham MC, Kreitman RJ, Frankel AE. DT388-GM-CSF, a novel fusion toxin consisting of a truncated diphtheria toxin fused to human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, prolongs host survival in a SCID mouse model of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1999;

75. Foss FM. DAB389IL-2 (ONTAK): A Novel Fusion Toxin Therapy for Lymphoma. *Clinical Lymphoma*. 2000.
76. Foss FM. Interleukin-2 fusion toxin: Targeted therapy for cutaneous T cell lymphoma. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001.
77. Bacha P, Williams DP, Waters C, Williams JM, Murphy JR, Strom TB. Interleukin 2 receptor-targeted cytotoxicity: Interleukin 2 receptor-mediated action of a diphtheria toxin-related interleukin 2 fusion protein. *J Exp Med*. 1988;
78. Lim D, Kim KS, Kim H, Ko KC, Song JJ, Choi JH, et al. Anti-tumor activity of an immunotoxin (TGF α -PE38) delivered by attenuated *Salmonella typhimurium*. *Oncotarget*. 2017;
79. Srivastava S, Luqman S. Immune-O-Toxins as the magic bullet for therapeutic purposes. *Biomed Res Ther*. 2015;
80. Kawakami K, Kawakami M, Joshi BH, Puri RK. Interleukin-13 receptor-targeted cancer therapy in an immunodeficient animal model of human head and neck cancer. *Cancer Res*. 2001;
81. Bartolomé RA, García-Palmero I, Torres S, López-Lucendo M, Balyasnikova I V., Casal JI. IL13 receptor $\alpha 2$ signaling requires a scaffold protein, FAM120A, to activate the FAK and PI3K pathways in colon cancer metastasis. *Cancer Res*. 2015;
82. Kunwar S, Chang S, Westphal M, Vogelbaum M, Sampson J, Barnett G, et al. Phase III randomized trial of CED of IL13-PE38QQR vs Gliadel wafers for recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2010;
83. Ma X, Lv P, Ye S, Zhang Y, Li S, Kan C, et al. DT390-triTMTP1, a novel fusion protein of diphtheria toxin with tandem repeat tntp1 peptide, preferentially targets metastatic tumors. *Mol Pharm*. 2013;
84. Chulpanova DS, Kitaeva K V., Tazetdinova LG, James V, Rizvanov AA, Solovyeva V V. Application of Mesenchymal stem cells for therapeutic agent delivery in anti-tumor treatment. *Frontiers in Pharmacology*. 2018.
85. Redjal N, Zhu Y, Shah K. Combination of systemic chemotherapy with local stem cell delivered S-TRAIL in resected brain tumors. *Stem Cells*. 2015;

86. Choi SH, Tamura K, Khajuria RK, Bhare D, Lawler J, et al. Antiangiogenic variant of TSP-1 targets tumor cells in glioblastomas. *Mol Ther*. 2015;
87. Wolf P, Alt K, Bühler P, Katzenwadel A, Wetterauer U, Tacke M, et al. Anti-PSMA immunotoxin as novel treatment for prostate cancer? High and specific antitumor activity on human prostate xenograft tumors in SCID mice. *Prostate*. 2008;
88. Tagawa ST, Akhtar NH, Pail O, Saran A, Tyrell L. Prostate-specific membrane antigen-based therapeutics. *Advances in Urology*. 2012.
89. Pai LH, Bookman MA, Ozols RF, Young RC, Smith JW, Longo DL, et al. Clinical evaluation of intraperitoneal *Pseudomonas* exotoxin immunoconjugate OVB3-PE in patients with ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 1991;
90. Becker N, Benhar I. Antibody-Based Immunotoxins for the Treatment of Cancer. *Antibodies*. 2012;
91. Weldon JE, Pastan I. A guide to taming a toxin - Recombinant immunotoxins constructed from *Pseudomonas* exotoxin A for the treatment of cancer. *FEBS Journal*. 2011.
92. Jahangiri A, Chin AT, Flanigan PM, Chen R, Bankiewicz K, Aghi MK. Convection-enhanced delivery in glioblastoma: A review of preclinical and clinical studies. *Journal of Neurosurgery*. 2017.

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Damla	Soyadı	ULUDAĞ
Doğum Yeri	Şişli/İstanbul	Doğum Tarihi	07.12.1995
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	TC Kimlik No	
E-mail		Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi	2021
Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi	2017
Lise	Ayazağa Anadolu Lisesi	2013

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
Bursiyer	İstanbul Medipol Üniversitesi, TÜSEB	24 Ay
Bursiyer	İstanbul Medipol Üniversitesi, TÜBİTAK	8 Ay

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanım Becerisi
Microsoft Office	İyi
Image J	İyi
Image Lab	İyi
Graphpad Prism	Orta

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri

Ulusal Yayınlar

1. A novel insight into the anti-cancer effects of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. fruit extract on cancer cell lines. Mehmet Evren Okur^{1*}, Nihal Karakaş^{2,3}, Ayşe Esra Karadağ^{4,5}, **Damla Uludağ**³, Derya Çiçek Polat⁶, İstanbul journal of pharmacy, 2019

Bildiriler ve Sözlü Sunumlar

1. Ozan TOPCU, **Damla ULUDAĞ**, Aslı ÇAKIR, Ahmet BAŞAK, Nazlı ÇAKICI, Alican TAHTA, Nihal KARAKAŞ. Relation of SerpinB1 expression with glioma prognosis and IDH1 mutation. 3rd International Proteomics Congress, Turkey (oral presentation)

2. **Damla Uludağ**, Bilgesu Onur Sucu, Özgecan Şavluğ, Mustafa Güzel, Nihal Karakaş ‘‘Therapeutic Effects of Novel Methyl Jasmonate Derivatives on Brain Cancer Cell Lines’’. 7. International BAU Drug Design Congress

3. Nihal Karakaş, **Damla Uludağ**. ‘‘Hedefe Yönelik Tedaviler İçin Çeşitli Kanser Hücrelerinde IL13R α 2 Ekspresyonunun Belirlenmesi’’. 1. International Multidisciplinary Cancer Research Congress-**MOKAD**, Diyarbakır/Türkiye

4. **Damla Uludağ**, Ozan Topcu, Nihal Karakaş. ‘‘In vitro and in vivo analysis of anti-cancer activity with bioimable cancer cell lines’’. International Hippocrate Medicine and Health Sciences Congress, Ankara/Türkiye

5. Ozan TOPCU, **Damla ULUDAĞ**, Aslı ÇAKIR, Ahmet BAŞAK, Nazlı ÇAKICI, Alican TAHTA, Nihal KARAKAŞ. Expression levels and prognostic significance of SerpinB1 in gliomas. 3rd Neuroscience Congress, Turkey (oral presentation)

6. Mehmet Evren Okur, Nihal Karakaş, Ayşe Esra Karadağ, Damla Uludağ, Derya Çiçek Polat. “Cytotoxic effects and anti-oxidant activity of *Opuntia Ficus Indica (L.) Mill.* fruit extract on various cancer cell lines”, European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS), 6-8 Mart 2019, Frankfurt/Germany,
7. Nihal Karakaş, Ozan Topcu, Damla Uludağ. “Therapeutically engineered stem cells for treatment of cancer”, 7. Multidisipliner Kanser Araştırma ve 1.Temel Onkoloji Kongresi, İzmir/Türkiye
8. **Damla ULUDAĞ**, Ozan TOPCU, Nihal KARAKAŞ (2018). ‘‘Establishment of Bioimaggable Cancer Cell Lines for Therapeutic Approaches’’ Molecular Cancer Research Association (MOKAD), Türkiye
9. **Damla Uludağ**, Bilgesu Sucu, Özgecan Savluğ, Büşra Emine Yazıcı, Mustafa Güzel, Nihal Karakaş (2018). ‘‘Therapeutic effects of novel methyl jasmonate derivatives on brain cancer cell lines’’ 3rd Annual meeting | MuTaLig Cost Action, Malta/Italy
10. B. Emine Yazıcı, Bilgesu Onur Sucu, Özgecan Şavluğ, Şükran Özdatlı, **Damla Uludağ**, Nihal Karakaş, Mustafa Güzel (2018). ‘‘Targeting different types of cancers by Novel *Methyl Jasmonate* Derivatives’’, 3rd Annual Meeting MuTaLig COST Action Malta/Italy
11. **Damla Uludağ** ‘‘Hizmet Alan Popülasyonda Değişim’’ Koç Üniversitesi, 8. Ulusal Hemşirelik Öğrenci Kongresi, İstanbul/Türkiye

Bilimsel Kongre/Sempozyumlar

- 2019 7th International BAU Drug Design Congress, İstanbul/Turkey
- 2018 International Hippocrate Medicine and Health Sciences Congress
Ankara/Turkey
- 2018 7. Multidisipliner Kanser Araştırma ve 1.Temel Onkoloji
Kongresi,İzmir/Türkiye
- 2017 15. Ulusal Sinirbilim Kongresi, Sakarya/İstanbul
- 2017 Nadir Hastalıklar Sempozyumu, İstanbul Medeniyet Üniversitesi
- 2017 Koç Üniversitesi 8. Ulusal Hemşirelik Öğrenci Kongresi

Sertifikalar

1. “Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası”, İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi, 2017.

