



İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LENTİVİRAL MERTK ÜRETİMİ, ÇOĞALTILMASI VE
İLETİMİ**

ASLI GÜNER ÖZTÜRK DEMİR

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. SÜLEYMAN YILDIRIM

İSTANBUL – 2018

TEŞEKKÜR

Eğitimim ve tez çalışmam süresince bana bilgi ve deneyimleri ile yardımcı olan, öneri ve desteğini esirgemeyen, çalışmaya fiili olarak önemli katkılar sunan, beni yönlendiren, danışman hocam Doç. Dr. Süleyman YILDIRM' a,

Fiili olarak çalışmama önemli katkılar sunan, öneri ve desteğini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ' a,

Çalışmanın gerçekleştirilmesi için gerekli malzemelerin temininde bana yardımcı olan, desteklerini esirgemeyen Hilmi Kaan ALKAN ve Mehtap ŞİMŞEK' e,

Çalışmayı gerçekleştirirken hem manevi hem de fiili olarak yanımda olan arkadaşlarım Aysun DİLDEN' e,

Üzerimdeki emeklerini ve haklarını hiçbir şekilde ödeyemeyeceğim annem Leyla ÖZTÜRK ve babam İsmail ÖZTÜRK' e,

Manevi desteklerini her daim hissettiğim kardeşlerim Fatma Sezer ÖZTÜRK ve Recep Bahadır ÖZTÜRK' e ve sevgili eşim Murat DEMİR' e,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI FORMU	i
-----------------------	---

BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
RESİMLER LİSTESİ	x
1.ÖZET	1
2.ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	9
4.1. Gen Tedavisi	9
4.2. Geçmişten Günümüze Gen Tedavisi	9
4.3. Gen Tedavisinin Sınıflandırılması	11
4.3.1. Eşey Hücre Gen Tedavisi:	12
4.3.2. Somatik Hücre Gen Tedavisi	12
4.4. Gen Tedavi Stratejileri.....	13
4.4.1. <i>Ex vivo</i> Gen Tedavisi	13
4.4.2. <i>In vivo</i> Gen Tedavisi	14
4.5. Vektörler	15
4.5.1. Viral Olmayan Vektörler	15
4.5.1.1. Viral olmayan gen tedavisi için fiziksel vektörler	16
4.5.1.1.1. İğne	16
4.5.1.1.2. Balistik DNA	16
4.5.1.1.3. Elektroporasyon	17
4.5.1.1.4. Sonoporasyon.....	17
4.5.1.1.5. Fotoporasyon	18
4.5.1.1.6. Magnetofeksiyon	18
4.5.1.1.7. Hidroporasyon	18

4.5.1.1.8. Mekanik Masaj	19
4.5.1.2. Viral olmayan gen tedavisi için kimyasal vektörler	19
4.5.1.2.1. İnorganik parçacıklar	19
4.5.1.2.2. Sentetik / doğal biyolojik parçacıklar	20
4.5.1.2.2.1. Katyonik lipozomlar	21
4.5.1.2.2.2. Katyonik polimerler	21
4.5.2. Viral Vektörler	22
4.5.2.1. Retroviral vektörler	22
4.5.2.2. Adenoviral vektörler	24
4.5.2.3. Adeno-asosiye viral vektörler (AAV).....	26
4.5.2.4. Herpes simplex virüs (HSV) vektörleri	26
4.5.2.5. Lentiviral vektörler	27
4.6. <i>MERTK</i> Geni.....	31
4.6.1. <i>MERTK</i> Mutasyonu ve Hastalıkla İlişkisi	34
5. MATERYAL VE METOT	35
5.1. Materyaller	35
5.2. Kullanılan Kimyasallar	35
5.3. Kullanılan Ekipman ve Cihazlar	36
5.4. Yöntem.....	36
5.4.1. Reaktiflerin Hazırlanması5.4.1.1. 23 HEPES-buffered saline (HBS) çözeltisi (50 mM HEPES, 1.5 mM	36
Na ₂ HPO ₄ , 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 12 mM şükros).....	36
5.4.1.2. 2 M CaCl ₂ stok çözeltisi	37
5.4.1.3. DNaseI	37
5.4.1.4. BL + TG Buffer	37
5.4.1.5. Column Wash Solution	37
5.4.1.6. RNA Wash Solution	37

5.4.2. MERTK klonlama	5.4.2.1. cDNA'dan PCR yöntemiyle full length MERTK amplifikasyonu	37
(amplification of MERTK gene).....		37
5.4.2.2. Jelde yürütme/Kesme/Temizleme.....		40
5.4.2.3. Restriksiyon enzimi ile çift yönlü kesim		41
5.4.2.4. Ligasyon.....		41
5.4.2.5. Plazmid üretimi ve Transformasyon.....		42
5.4.2.7. Koloni seçimi ve doğrulaması		43
5.4.3. Pseudovirüs Üretimi		44
5.4.3.1. Lentiviral vektörlerin üretilmesi		44
5.4.5. Viral Transdüksiyon		45
6. BULGULAR.....		47
6.1. cDNA'dan PCR yöntemiyle full length <i>MERTK</i> amplifikasyonu		47
6.2. Üretilen plazmidlerin transformasyonu sonucu koloni seçimi ve doğrulaması...		47
6.3. Koloni doğrulama		48
7. TARTIŞMA ve SONUÇ.....		50
8. KAYNAKLAR		54
7. ÖZGEÇMİŞ		72

SİMGELER VE KISALTMALAR

CaCl₂ Kalsiyum klorür

ADA Adozin deaminaz

UV UltraViyole

DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
AAV2	Adeno ilişkili virüs tip 2
Ad5	Adenovirüs tip 5
CF	Kistik fibroz
CRISPR	Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar
FIX	Pıhtılaşma faktörü IX
LPL	Lipoprotein lipaz
OTC	Ornitin transkambamilaz
RNAi	RNA inhibisyonu
RPE65	65 kilo-Dalton retinal pigment epitel proteini
RV	Gamaretrovirüs
SCID-ADA	Adenosin deaminaz eksikliğine bağlı ciddi kombine bağışıklık yetersizliği
TIL	Tümör sızdıran lenfositler
PEI	Polietilenimin
PLA	Poli (DL-Laktid)
PBS	Fosfat tampon solüsyonu (Phosphate Buffered Saline)
PLGA	Poli (DL-Laktid-ko-glikozid)
LTR	Uzun terminal tekrarlar
μ L	Mikrolitre
rpm	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
HSV	Herpes simplex virüs

LV	Lentiviral vektörler
PR	Proteaz
MA	Matris
CA	Kapsid
NC	Nükleokapsid
RT	Ters transkriptaz
IN	İntegrazdan
SU	Yüzey
TM	Transmembran
SIV	Simian immunodeficiency virus
FIV	Feline immunodeficiency virus
EIAV	Caprine arthritis encephalitis virus
HIV	İnsan immün yetmezlik virüs
Vif	Viral Infectivity Factor,
Vpr	Viral protein R
Tat	TranscripTion factor
Rev	Regulatory Viral protein
Vpu	Viral protein U
Nef	Negatif faktör
Vpx	Viral protein X
ORF-2	Open reading frame-2
PIC	Önceden entegrasyon kompleksi

ATP	Adenozin trifosfat
TAM	Tirozin kinaz reseptörü
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T
RP	Retinitis pigmentosa
HOS	İnsan osteosarkom
HBS	HEPES-buffered saline
PBS	Phosphate buffered saline
MnCl ₂	Mangan II klorür
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
H ₂ O	Su
TAE	Tris/Asetik asit/ EDTA

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.2.1 İnsan gen tedavisinin tarihsel gelişimi.	11
Şekil 4.4.1.1 <i>Ex vivo</i> gen tedavisinin adım adım uygulanış şekli	13
Şekil 4.4.2.1 <i>In vivo</i> gen tedavisi.	14
Şekil 4.5.2.1.1 Retroviral vektörlerin gen tedavisinde çalışma prensibi	23

Şekil 4.5.2.2.1 Adenoviral vektörlerin gen tedavisinde çalışma prensibi	25
Şekil 4.5.2.5.1 Lentivirüs vektör tasarımı için kullanılan HIV-1, SIV/HIV2 ve FIV virüslerinin genom yapıları	29
Şekil 4.6.1 <i>MERTK</i> gen yapısı	31
Şekil 4.6.2 Mer (<i>MERTK</i>) sinyal yolları trombosit agregasyonu, hücre hayatta kalımı, proinflatuvar sitokin üretiminin regülasyonu ve aktin sitoskeletonunun düzenlenmesine yol açtığını gösteren şekil	33
Şekil 5.4.2.5.1 Lentiviral vektör plazmidi.....	42
Şekil 5.4.3.1.1 Lentiviral vektör plazmidi.....	44

RESİMLER LİSTESİ

Resim 6.1.2 Full length <i>MERTK</i> amplifikasyonunun jel görüntüsü.	46
Resim 6.2.1 Plazmid kolonilerinin görüntüsü	46
Resim 6.3.1 Transformasyon işleminden sonra seçilen koloniden elde edilen plazmid DNA'nın jel görüntüsü.	47
Resim 6.4.1 Virüs üretmeye uygun HEK 293T hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü.	48
Resim 6.4.2 Virüs üreten hücrelerin görüntüsü	48

1.ÖZET

LENTİVİRAL MERTK ÜRETİMİ, ÇOĞALTILMASI VE İLETİMİ

Gen tedavisi; hastalığın gelişmesinden sorumlu olan kalıtsal ya da sonradan kazanılan genetik bozuklukların düzeltilmesi amacıyla hücrelere faydalı genler ve kısa oligonükleotid dizilerinin aktarımı olarak tanımlanır. Gen tedavisinde sağlıklı hücrelere genleri vermek ve gen hasarlarını onarmak için gen ilavesi, gen değişimi, gen ifadesinin baskılanması, insersiyon ve özel hücrelerin öldürülmesi yöntemleri kullanılmaktadır. Genlerin alıcı hücreye aktarılması laboratuvar ortamında ya da doğrudan hastanın vücudunda gerçekleştirilebilmektedir. Hücre içine genin eklenmesinde viral (transdüksiyon olarak) ve viral olmayan (transfeksiyon olarak) iki genel yaklaşım bulunmaktadır. Viral vektörler viral olmayan vektörlere göre daha etkili bir gen tedavi yöntemidir. Gen tedavisi uygulamalarında birçok viral vektör sistemi geliştirilmiştir. Ancak, çoğu vektör transgenezin yararlılığını sınırlamaya neden olan bütünleşmeyi yapamamaktadır. En iyi karakterize edilmiş viral vektör, genomik DNA'ya entegre olabileme özelliğinden dolayı *Retroviridae* ailesidir. Fakat, onkoretroviral vektörler, bütünleşmeyi gerçekleştirebilmesi için hücre replikasyonu gereksinimi bulunmaktadır. Bu nedenden dolayı da sınırlı bir başarı göstermektedir. Lentiviral vektörler bölünmeyen hücrelerde de transdüksiyon yeteneğini sahip olduğu için onkoretroviral vektörler ile karşılaştırıldığında daha etkili bir transgen ifadesi oluşturabilmektedir. *MERTK*; *LGALS3*, *TUB*, *TULP1* ve *GAS6* gibi çeşitli ligandlara bağlanarak hücre dışı matrinden gelen sinyalleri sitoplazmaya yönlendiren tirozin kinaz reseptörüdür ve *MER/AXL/TYRO3* reseptör kinaz ailesinin bir üyesidir. Apoptotik hücrelerin hücre sağkalım, göç, farklılaşma ve fagositoz dâhil birçok fizyolojik sürecinde düzenleyici olarak görev almaktadır. *MERTK* geninde meydana gelen mutasyon sonucunda retina bozukluğu, kanser tipleri, melonama, çeşitli sklerotik lezyonlar meydana gelmektedir. Bu tezin amacı, çeşitli hastalıkların (retina bozukluğu, melonamo, çeşitli kanser türleri vb.) iyileştirilmesi için *MERTK*'yi lentiviral yöntemler kullanarak üretebilmek, çoğaltmak ve bir hücre hattına iletimini sağlayabilmektir. Bu tez çalışmasında; SH-SY5Y hücre hattından elde edilen *MERTK* geninin pLentiCMV-GFP-2A-Puro vektörüne klonlanıp uygun paketleme plazmidleri ile birlikte 293T hücre hattına verilerek lentivirüs vektörü üretilmiş, inkübasyona bırakılarak

çoğaltılmış ve hedeflenen hücreye iletimi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen *MERTK* geninin lentiviral vektör ile hücre hattına aktarılma metodunu ileride yapılmasını planlanan *MERTK* geni ile ilgili gen tedavisi çalışmalarında kullanılabilir.

ANAHTAR KELİMELEER: Gen tedavi, Lentiviral vektörler, *MERTK* geni



2.ABSTRACT

LENTIVIRAL MERTK PRODUCTION, MULTIPLICATION AND TRANSMISSION

Gene therapy is described as transfer of short oligonucleotides and genes, which are beneficial for curing genetics disorders that are responsible for development of illness. In gene therapy, many methods are utilized. These methods include adding gene to cure gene disorders, changing gene, repressing gene expression, killing special cells and insertion. Transfer of genes' to receiver cells occurs directly in human body or in laboratory. There are two methods in adding gene to intracellular. These are viral (transduction) and non- viral (transfection) methods. Viral method is more efficient than non- viral method in gene therapy. Many viral vector systems have been developed in implementation of gene therapy. However, unification that limits beneficial of transgenez couldn't be achieved by vast majority of these vector systems. *Retroviridae* family is most characterized viral vector due to its aspect of being able to integrate genomic DNA. But, onkoretroviral vectors need cell replication to make unification. It shows limited success because of that. Lentiviral vectors shows better transgen expression than onkoretroviral vectors due to its ability to show transduction in non-diving cells. MER/ AXL/ TYR03 is a member of receptor kinase family and *MERTK* is tyrosine kinase receptor, which directs signals coming from matrix of extracellular to cytoplasm by connecting many ligands (LGALS3, TUB, TULP1 AND GAS6). It takes duty for survival, migration, differentiation and phagocytosis of apoptotic cells as a regulatory. Mutation in *MERTK* gene results in retina disorders, cancer, melonama and various sclerotic lesions. The aim of the theisis is to produce, propagate and transmit *MERTK* to a cell line by using lentiviral methods for the treatment of various diseases (retinopathy, melonamo, various cancers, etc.). In this thesis study; The *MERTK* gene obtained from the SH-SY5Y cell line was cloned into the pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vector and given to the 293T cell line together with appropriate packaging plasmids, the lentivirus vector was produced, amplified by incubation, and the targeted cell transduction was successfully performed. The method of transferring the obtained *MERTK* gene into the cell line with the lentiviral vector can be used in

gene therapy studies related to the *MERTK* gene which is planned to be performed in the future.

KEYWORDS: Gene therapy, Lentiviral, *MERTK* gene



3. GİRİŞ VE AMAÇ

Gen, fonksiyonel polipeptidlerin sentezi için gerekli nükleik asit dizileri olarak tanımlanmaktadır [1]. Bir organizmanın gelişimi ve işlevi büyük oranda genler tarafından kontrol edilmektedir. Genlerin meydana getirdiği kodlanmış bir proteinin yapısında değişikliğe veya onun ifadesinde kayba mutasyonlar yol açmaktadır [2]. Bu mutasyonlar gamet hücrelerinde ya da somatik hücrelerde olabilmektedir [1]. Hücrelerde meydana gelen ve mutasyon sonucunda oluşan eksik ya da kusurlu genler hastalığa yol açmaktadır. Hastalığın iyileştirilmesi için geleneksel ilaç bileşenlerinin yanında tedavisel molekül olarak faydalı genler ya da kısa oligonükleotidlerin kullanıldığı yeni tedavi metotları kullanılmaktadır [3,4,5]. Bu metotlar gen tedavisi olarak tanımlanmaktadır. Gen tedavisinin temel amacı, hücrelerde hastalığa yol açan eksik ya da kusurlu gen ve ya genlerin yerine sağlam kopyalarının hücreye yerleştirilmesidir [3,6].

Gen tedavisine 1870 ile 1880 yıllarının başlarında iki deneme ile başlanmıştır. İlk deneme, Arjinaz eksikliği sendromuna sahip iki genç kıza arjinaz enzimini kodlayan gen verilmesiyle gerçekleştirilmiştir. İkinci denemede ise, β -talesimi hastalığı için *ex vivo* gen tedavisi iki hastaya uygulanmıştır. Halk tarafından uygun bulunmadığı için her iki denemede durdurulmuştur. Ancak tedavi esnasında hastalarda olumlu ya da olumsuz herhangi bir sonuç alınamamıştır [7,8]. 1989 yılında French Anderson'un, savunma sisteminin normal fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için gerekli Adenozin deaminaz (ADA) geni tarafından üretilen enzimin eksikliğine sahip bireylere uyguladığı gen tedavisi başarıyla sonuçlanmıştır [9]. 1989'da insan üzerinde ilk gen tedavisinden bu yana geçen 28 yıl içinde önemli ölçüde değişiklikler meydana gelmiştir [10].

Gen tedavisinde kullanılan sağlıklı genin aktarımı ya hücreler hastadan alınıp hücre kültürü ortamında çoğaltılarak klonlanan (*ex vivo*) ya da doğrudan hastanın vücuduna verilmesiyle (*in vivo*) gerçekleştirilmektedir [11].

Gen tedavisinde gen aktarımı için iki vektör sistemi mevcuttur. Bunlardan biri viral olmayan vektörler; hücre membranına karşı fiziksel kuvvet uygulanarak yapılan fiziksel vektörler (iğne, balistik DNA, elektroporasyon, sonoporasyon, fotoporasyon, magnetofeksiyon, hidroporasyon ve mekanik masaj) [12] ve kimyasal vektörlerdir (Katyonik lipid (Lipopleks), DNA / kationik polimer (Poliplexler) ve DNA / kationik Polimer / Katyonik Lipid (Lipopolyplexes)) [13].

Bir diğeri de viral vektörlerdir (retroviral vektörler, adenoviral vektörler, adeno-asosiyal viral vektörler, herpes simplex virüs (HSV) vektörler, lentiviral vektörler) [14]. Viral vektörler viral olmayan vektörler ile kıyaslandığında viral vektörlerin gen transdüksiyon verimliliği daha yüksektir [12,15,16,17,18].

Gen tedavisi uygulamalarında birçok viral vektör sistem geliştirilmiş olmasına rağmen çoğu vektör transgenезin yararlılığını sınırlamaya neden olan bütünleşmeyi yapamamaktadır. En iyi karakterize edilmiş viral vektör, genomik DNA'ya integre olabilme özelliğinden dolayı *Retroviridae* ailesidir. Ancak, onkoretroviral vektörler, bütünleşmeyi gerçekleştirebilmesi için hücre replikasyonu gereksinim duyduğundan gen aktarımında sınırlı başarı göstermektedir. *Retroviridae* ailesinin bir üyesi olan lentiviral vektörler, bölünmeyen hücrelerde de transdüksiyon yeteneğini sahip olduğu için onkoretroviral vektörler ile karşılaştırıldığında daha etkili bir transgen ifadesi oluşturmaktadır [19]. Lentiviral vektörler, konak hücre genomuna istikrarlı bir şekilde integre olabilmekte [20,21], çok yönlü, bir veya daha fazla gen içerisinde organize edebilmekte ve 9 Kbp'ye kadar heterolog DNA verebilmektedir. Dahası, lentivirüsler, hücre hızlandırıcılardan uzaklaşmaya eğilimli oldukları için eklemeli mutagenез ve onkojenite riski düşüktür [22,23]. Ayrıca Lentiviral vektörler, düşük immünojeniteye sahiptir [24]. Bu nedenlerden dolayı tez için viral vektörler içerisinde lentiviral vektörü seçtik.

MERTK (UniProt katılım Q12866), reseptör tirozin kinaz (TAM (Tyro3, Axl ve *MERTK*) ailesine ait tek geçişli bir transmembran reseptördür. *MERTK*; monosit / makrofajlar, dendritik hücreler, NK hücreleri, NKT hücreleri, megakaryositler, trombositlerde ve retinal pigment epitelyumu dâhil olmak üzere epitelyal hücrelerde yüksek ölçüde eksprese olmaktadır [25-29]. İnsan *MERTK* geni, 2. kromozom

(2q14.1) üzerinde bulunur [30,31] ve tahmini olarak 110 kDa'lık bir molekül ağırlığına sahiptir. 999 amino asit proteini kodlayabilen 19 ekzondan oluşmaktadır [25]. *MERTK* reseptörü, iki immunoglobulin benzeri C2 (IgGC2) ve iki fibronektin tip III (FN-III) alanına sahip hücre dışı bir bölgeye, oldukça korunumlu bir tirozin kinaz alanını içeren bir hücre içi bölgeye ve transmembran bölgesine sahiptir [27,32]. *MERTK*, protoonkojen gibi davranır ve NIH / 3T3 ve B-lenfosit hücrelerinin hücrenel transformasyonunda rol oynamaktadır [33,34]. Monositlerde, makrofajlarda ve retinal pigment epitel hücrelerinde oluşan fagositik süreçleri yönlendirmektedir [35-38]. Ayrıca, *MERTK*'nin aktivasyonu ve PI3K / Akt, PLCGamma, VAV1 ve MAPK / ERK yoluyla aşağı akışlı sinyalleşme; hücre sağ kalımı, proinflamatuvar sitokin üretimi ve aktin yeniden yapılanma / hücre göçünde *MERTK* hücrenel işlevlere aracılık etmektedir [25,39].

MERTK geninde otozomal resesif geçişli mutasyon sonucunda retinal bozuklukların meydana geldiği gözlemlenmiştir [26,40,41,42]. İlk olarak bir protoonkojen olarak tanımlanmaktadır [27]. *MERTK*; lösemi [25,27,43], lenfoma [25,44], kolorektal kanser [45], prostat kanseri [46] meme kanseri [47], gastrik kanser [48], rabdomiyosarkoma [49], Astrocytoma/Glioblastoma [50,51] ve hipofiz adenomu [52] gibi çeşitli kanser türleri ile ilgisi bulunmaktadır. Ayrıca; Melanomda (p.Pro802Ser) [53,54], multipl miyelomda (p.Thr690Ile, p.Glu823Gln) [55], böbrek kanseri ve karsinomda (p.Ala446Gly, p.Ala708Ser) [56] somatik değişiklikler bulunmaktadır. Ek olarak, çeşitli sklerotik lezyonlarda *MERTK* ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir [57,58]. Ayrıca, *MERTK* geninde ki bozukluk sonucunda ramotoid artrit ve lopus gibi otoimmün hastalıklar, fagositozda bozukluk ve apoptotik hücrelerin aralığında bozukluklar meydana gelmektedir [25,26,59].

Farklı yollarda (hücre canlılığı, farklılaşma gibi) önemli rol oynayan ve gen üzerinde meydana gelen bozukluklar sonucunda oluşan çeşitli hastalıklar (retina bozukluğu, melonamo, çeşitli kanser türleri vb.) yol açan *MERTK* geninin lentiviral yöntemler kullanarak üretilmesi, çoğaltılması ve bir hücre hattına iletilmesi bu tez kapsamında gerçekleştirilmiştir.

MERTK geninin çoğaltılmasında, transgenезin yararlılığını sınırlamaya neden

olan bütünleşme işleminin tam olarak gerçekleştirebilen ve ayrıca bunu gerçekleştirmek için replikasyon gereksinimi duymayan lentiviral vektör tercih edilmiştir.

Bu tez çalışmamızın nedeni; apoptotik hücrelerin hücre sağ kalımı, göç, farklılaşma ve fagositoz dâhil birçok fizyolojik süreçte düzenleyici role sahip *MERTK* geninin uğradığı mutasyon sonucunda oluşabilecek retina bozukluklar, çeşitli kanser tipleri, otoimmün hastalıklar, melonama, çeşitli sklerotik lezyonlar gibi hastalıkların etkin olarak uygulanabilecek uygun gen tedavisi yöntemini oluşturmaktır. Bu neden *MERTK* geninin lentiviral yöntemler kullanarak üretilmesi, çoğaltması ve bir hücre hattına iletilmesi bu tezde hedeflenmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Gen Tedavisi

Gen, fonksiyonel polipeptidlerin sentezi için gerekli nükleik asit dizileri olarak tanımlanmaktadır [1]. Bir organizmanın gelişimi ve işlevi büyük oranda genler tarafından kontrol edilmektedir. Genlerin meydana getirdiği kodlanmış bir proteinin yapısında değişikliğe veya onun ifadesinde kayba mutasyonlar yol açmaktadır [2]. Bu mutasyonlar gamet hücrelerinde ya da somatik hücrelerde olabilmektedir [1]. Hücrelerde meydana gelen ve mutasyon sonucunda oluşan eksik ya da kusurlu genler hastalığa yol açmaktadır. Hastalığın iyileştirilmesi için geleneksel ilaç bileşenlerinin yanında tedavisel molekül olarak faydalı genler ya da kısa oligonükleotidlerin kullanıldığı yeni tedavi metotları kullanılmaktadır [3,4,5]. Bu metotlar gen tedavisi olarak tanımlanmaktadır. Gen tedavisin temel amacı, hücrelerde hastalığa yol açan eksik ya da kusurlu gen ve ya genlerin yerine sağlam kopyalarının hücreye yerleştirilmesidir [3,6]. Gen tedavisi, hücrelerde üretilen eksik ya da hatalı enzim veya proteinlerden kaynaklanan monojenik veya onkogenik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Kistik fibroz, Adenozin deaminaz (ADA) yetersizliği, ailesel hiperkolesterolemi gen tedavisinin kullanıldığı hastalıklara örnektir [3,60,61].

4.2. Geçmişten Günümüze Gen Tedavisi

Yaklaşık 10000 yıl öncesinde insanlar anne-babaların özelliklerinin yavrularına aktarabileceklerini anlamışlardır. Bu özelliklerin nasıl aktarıldığı hakkında spekülasyonları eski Yunan bilim adamları yapmıştır ve onların teorilerinin bazıları birkaç yüzyıl boyunca favori olarak kalmıştır. Genetik üzerine bilimsel araştırmalar 1850'li yıllarda Avusturya keşifi Gregor Mendel' in yeşil bezelyeler ile yaptığı bir dizi deney ile başlamıştır; bu deneyler kalıtımı açıklamaya yardımcı olmuştur. Mendelin çalışmaları daha sonraki bilimsel başarıların temelini oluşturmaktadır. Gen olarak bildiğimiz ayrı ünitelerin aracılığıyla kalıtımın gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Ancak; 1850 yılına kadar, genin fiziksel yapısı hakkında yeterli bilgi bulunmamaktaydı. Amerikan biyokimyacı James Watson ve İngiliz fizikçi Francis

Crick' in devirli çift zincirli sarmal DNA modelini geliştirmesi ile genin fiziksel yapısı ile ilgili fikir sahibi olunmaya başlandı [62,63].

1958 yılında Medawar adlı araştırmacı fareler üzerinde yaptığı deneyde deri nakli sırasında baskın geni taşıyan DNA dizilerini gözlemlemiştir. İlk kez 1966 yılında teorik olarak gen tedavisi ortaya çıkmıştır. 1966 ile 1969 yılları arasında hücrelerde hastalığa neden olan eksik ya da hatalı genlerin yerine sağlam genin virüs aracılığıyla aktarılabileceği tartışmaları başlamıştır [64].

1970 yılında Martine Cline tarafından ilk kez gen tedavisi fikri ortaya atılmıştır. Martine Cline, virüslerin transformasyon mekanizmalarını incelediği sırada virüslerin genetik materyallerini konak hücre genomuna aktardığını gözlemlemiştir. Bunun üzerine hücrelere gen transferini gerçekteştirmek için araç olarak virüslerin kullanılabilceği fikrini ortaya çıkmıştır [7,65].

1970 ile 1980 yıllarının başlarında gen tedavisi uygulamalarına iki deneme ile başlanmıştır. İlk deneme, Arjinaz eksikliği sendromuna sahip iki genç kıza arjinaz enzimini kodlayan gen verilmesiyle gerçekteştirilmiştir. İkinci denemede ise, β talesimi hastalığı için *ex vivo* gen tedavisi iki hastaya uygulanmıştır. Halk tarafından uygun bulunmadığı için her iki deneme de durdurulmuştur. Ancak tedavi esnasında hastalarda olumlu ya da olumsuz herhangi bir sonuç alınamamıştır [7,8].

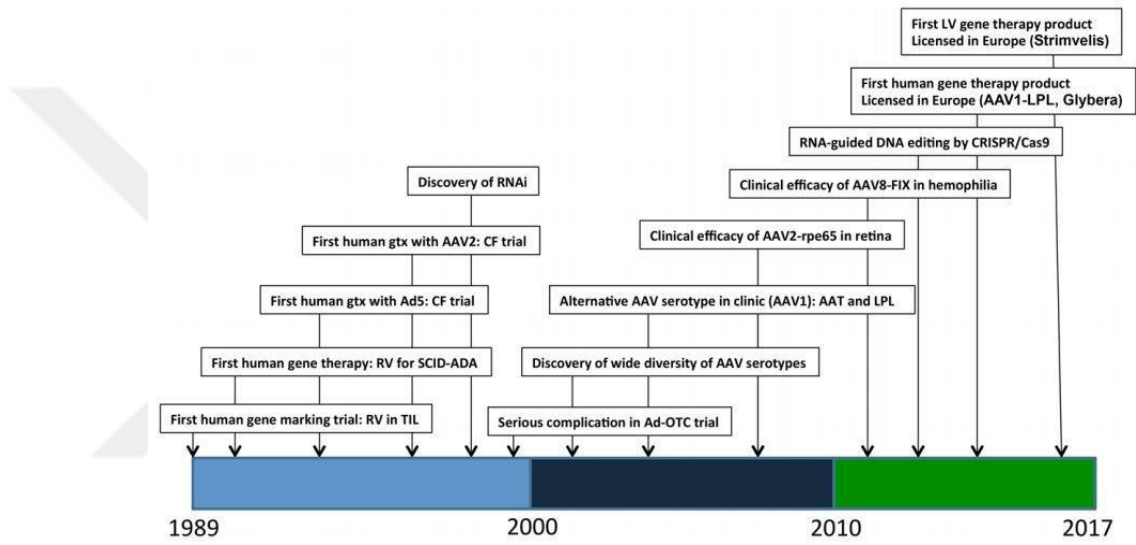
1989 yılında French Anderson'un, savunma sisteminin normal fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için gerekli Adenozin deaminaz (ADA) geni tarafından üretilen enzimin eksikliğine sahip bireylere uyguladığı gen tedavisi başarıyla sonuçlanmıştır [9].

Elde edilen umut verici sonuçların ardından klinik denemeler için hazırlanan 300'den fazla protokol onaylanmış ve hastalara gen tedavisi uygulanmıştır.

2002 yılında yapılan gen tedavisi sırasında 3 yaşındaki bir çocukta lösemi benzeri bir durumun gelişmesi ve yapılan 10 kişilik gen tedavisi denemesinde bireylerinde hayati tehlike yaşaması gen tedavisinin gerilemesine neden olmuştur. Gen tedavisi alanında yaşanılan gerilemenin önüne geçmek için yeni stratejiler geliştirilmiş ve oluşabilme ihtimali olan risklerin araştırılıp ortan kaldırılmasına çalışılmıştır [66].

2017 yılında Eichler ve arkadaşları, *ABCD1* genindeki değişimi ile ALD proteininin kaybı sonucunda görülen X'e bağlı adrenolökodistrof hastalığının iyileştirilmesi için yapılan lentiviral gen tedavisi çalışması serebral adrenolökodistrofi tedavisi için uygun olduğu görülmüştür [67].

1989'da insan üzerinde ilk gen tedavisinden bu yana geçen 28 yıl içinde önemli ölçüde değişmiştir [10].



Şekil 4.4.1 İnsan gen tedavisinin tarihsel gelişimi.

Şekil 4.2.1' de insan gen tedavisinin tarihsel gelişiminde önemli bazı olaylar şekilde gösterilmiştir. Şekilde bulunan kısaltmalar: AAV2; adeno ilişkili virüs tip 2, Ad5; adenovirüs tip 5, CF; kistik fibroz, CRISPR, kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar, FIX; pıhtılaşma faktörü IX, LPL; lipoprotein lipaz, OTC; ornitin transkambamilaz, RNAi; RNA inhibisyonu, RPE65; 65 kilo-Dalton retinal pigment epitel proteini, RV; gamaretrovirüs, SCID-ADA; adenosin deaminaz eksikliğine bağlı ciddi kombine bağışıklık yetersizliği, TIL; tümör sızdıran lenfositler [10].

4.3. Gen Tedavisinin Sınıflandırılması

Gen tedavisi iki şekilde sınıflandırılmaktadır.

4.3.1. Eşey Hücre Gen Tedavisi:

Eşey hücre gen tedavisi, eşey hücre içine fonksiyonel gen girdikten sonra eşey hücrenin genomu ile fonksiyonel genin bütünleşmesi sağlanılarak yapılan gen tedavi yöntemidir. Hedeflenen eşey hücrelerdeki genetik ve kalıtsal hastalıkların tedavisi yapılmakta ve yeni nesillere tedavi kalıtsal olarak aktarılmaktadır. Genetik tedavi yüksek verimlilikte olmasına rağmen, etik ve teknik nedenlerden dolayı eşey hücrelerinde gen tedavisi şu anda insanlar üzerinde denenmemektedir [6,15,68,69].

İnsanlar üzerinde neredeyse hiçbir zaman test edilmemesine rağmen, diğer türler üzerinde bazı farklı transgenik teknikler kullanılarak eşey hücre gen tedavisi denenmiştir [70]. Bunlara örnek olarak:

- Metafaz evresindeki somatik hücrelerden alınan çekirdeklere gen aktarımı [71,72].
- Yumurta hücrelerinin *ex vivo* değiştirilmesi ve devamında *in vitro* fertilizasyon [73,74].
- Farklı gen verme sistemleri ile *in vitro* kültür esnasında farenin embriyonik kök hücre manipülasyonu [74,75].
- Bir cam iğne ile eksojen DNA solüsyonunun pronükleer mikroenjeksiyonu [76].
- Testis ya da diğer genital sistemlere doğrudan veya dolaylı olarak enjeksiyon ile sperm hücrelerinin içine transgenin verilmesi [77,78].

4.3.2. Somatik Hücre Gen Tedavisi

Somatik hücre gen tedavisi, genetik hastalığa sahip somatik hücrelerin içindeki genoma fonksiyonel genlerin aktarılması işlemidir. Somatik hücreye uygulanan genetik tedavi sonucunda oluşan her değişim ve her etki bireysel hastalar ile sınırlıdır, hastanın dölüne veya gelecek nesillere aktarılmaz. Somatik hücre gen tedavisi kısa sürmektedir. Çünkü çoğu dokunun hücreleri belirli yaşam sürecini tamamladıktan sonra ölmekte ve yerine yeni hücreler geçmektedir. Somatik gen tedavisinde hedef hücrelere fonksiyonel genin verilmesinde problemler olmasına rağmen somatik hücre gen tedavisi çoğu hastalık için uygun bulunmaktadır [6,15,68,70,79,80].

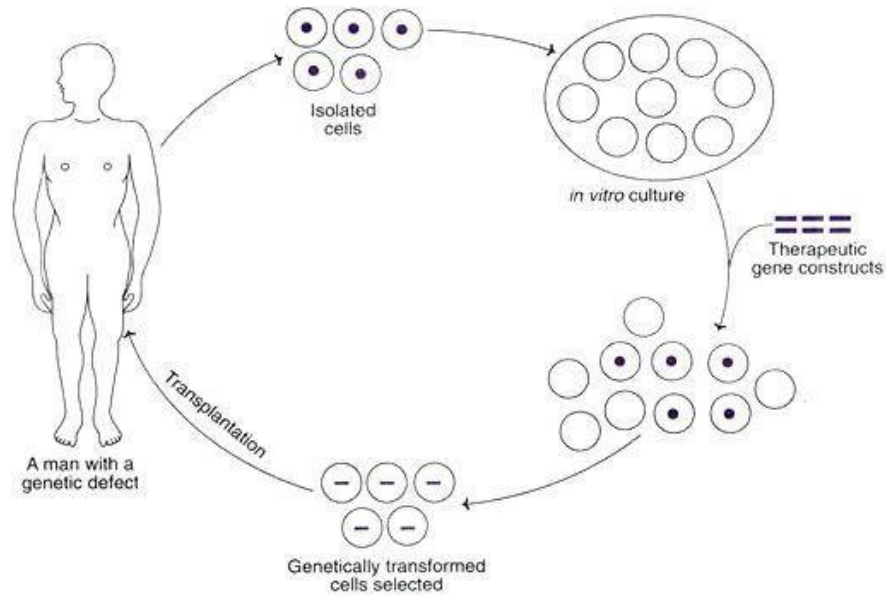
Bazı bilim adamları somatik gen tedavisinin eşey hücre gen tedavisinden daha iyi olduğuna inanmaktadırlar. Somatik gen tedavisi eşey hücre tedavisiyle kıyaslandığında daha kolay uygulanmaktadır. Somatik gen tedavisi eşey hücrelerine etki etmediği için herhangi bir değişime ve dolaylı olarak zarara neden olmamaktadır. Hastalığa neden olan genetik bozuklukların sebep olduğu semptomları tedavi edebilmektedir [61,81,82].

4.4. Gen Tedavi Stratejileri

Gen tedavi alanında ilerlemede iki farklı strateji geliştirilmiştir [11].

4.4.1. *Ex vivo* Gen Tedavisi

Genetik bozukluğa sahip hücre hastadan alınır, hücre kültürü ortamında çoğaltılarak klonlanan gen aktarılır. Daha sonra gen aktarımının gerçekleştiği hücreler seçilerek hücre kültüründe *in vitro* olarak çoğaltılarak hastaya verilme şeklinde yapılan gen tedavisi stratejisidir [6,15,83,84].



Şekil 4.4.1.1 *Ex vivo* gen tedavisinin adım adım uygulanış şekli [85].

Şekil 4.4.1.1’de görüldüğü üzere, uygulanma şekli sırasıyla; bir hastadan genetik kusurlu hücreler izole edilir, kültüre alınan hücreler büyütülür, gen bozukluğunu düzeltmek için tedavisel gen tanıtılır, genetik olarak düzeltilmiş hücreler seçilir (kararlı transformanlar) ve büyütülür, değişikliğe uğramış hücreler hastaya nakledilerek tedavi tamamlanır [85].

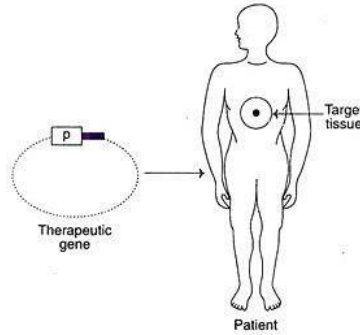
Bu stratejide, hastanın bağışıklık sistemi tarafından gen tedavisi için kullanılan hücrelerin vücut tarafından reddedilmemesi için mümkün olduğunca hastanın kendi hücreleri (otolog hücreler) tercih edilmektedir. Hastadan alınabilecek hücrelere hematopoetik ve deri hücreleri örnek oluşturmaktadır.

Ex vivo gen tedavisi uygulaması sadece özel organlara hedeflenen tedavisel stratejidir [86].

Ex vivo gen tedavisi akciğer, beyin ve kalp gibi iç organlar hedeflendiğinde daha az kullanışlı olmaktadır. İmmün yanıt yokluğunda *ex vivo* gen tedavisi avantajlı olmaktadır [61,87]. Ayrıca, hedef hücrelerde protein salınım kaynağı olarak veya kanser tedavisi için aşı olarak kullanılmaktadır [88,89].

4.4.2. *In vivo* Gen Tedavisi

Genetik bozukluğa sahip hücrenin *in vitro* kültürünün yapılamadığı veya kültürü yapılabilen hücrelerin re-implantının etkin bir şekilde yapılamadığı durumlarda uygulanan gen tedavi stratejisidir. Bu strateji, hedeflenen hücrelere fonksiyonel genin doğrudan aktarılması şeklinde uygulanır [15,61].



Şekil 4.4.2.1 Tedavisel genin hastanın belirli bir dokusunun hedef hücrelerine doğrudan gönderilmesi şeklinde uygulanan *in vivo* gen tedavisi [90].

In vivo gen tedavisinde kullanılan fonksiyonel gen hücrenin kromozomuna girer ya da epizom olarak kalır. Kromozom içine entegre olması hücrenin bölünerek çoğalması aşamasında fonksiyonel geninde çoğalması için tercih edilmektedir. Kromozomda istenilen noktanın dışında bir noktaya entegre olması beklenmeyen etkilere ve gen ifadesinin hatalı ya da eksik olmasına yol açmaktadır.

In vivo gen tedavisinin başarılı olması;

1. Fonksiyonel genin hedeflenen hücreler tarafından alınacak şekilde veya sadece hedeflenen hücrelerde gen ifadesi olacak şekilde tasarlanmış olmasına, 2. Gen aktarımı ve ifadesinin (ekspresyonunun) etkinliğine,

3. Hücre içine giren genin bozulmamasına, bağlıdır [15].

4.5. Vektörler

Hücre içine gen aktarılmasında iki temel yaklaşım vardır.

4.5.1. Viral Olmayan Vektörler

Virüs olmayan vektörler, viral vektörler haricindeki tüm fiziksel ve kimyasal vektörleri kapsamaktadır [12,15,16,17,18]. Viral olmayan vektörlerin klinik araştırmalarda kullanılması, 2004 yılından 2013 yılına kadar artarak ilerlemektedir. Verimlilik, özgüllük, gen ekspresyon süresi ve güvenlikteki gelişmelerden dolayı viral olmayan vektörler klinik araştırmalara girmiştir [12]. Viral olmayan vektörler viral vektörler ile kıyaslandığında; hedef hücrelere transfekte etme etkinliği nispeten yüksek olması, immunojenite ve sitotoksosite açısından kullanımda elverişli olması, daha uygun maliyette olması ve transgenik DNA'nın boyutunda sınır olmaması gibi özelliklerinden dolayı daha kullanışlı olduğunu göstermektedir. Ancak; gen transdüksiyonunda verimliliğin düşük olması gen tedavisi çalışmalarında viral vektörlerin kullanılmasına yönlendirmiştir. [12,15,16,17,18].

4.5.1.1. Viral olmayan gen tedavisi için fiziksel vektörler

Gen tedavisi araştırmacıları, daha basit olduğu için gen materyalini nakletmek için fiziksel araçlara daha fazla ilgi duymaktadırlar. *In vitro* ve *in vivo* gen iletimi için uygulanan fiziksel yöntemler, hücre membranına karşı fiziksel kuvvet uygulanarak yapılmaktadır. Böylece genetik materyalin hücre içi iletimi kolaylaşmış olmaktadır [12].

4.5.1.1.1. İğne

Fonksiyonel genetik materyal şırınga kullanılarak hedeflenen dokuya verilmektedir. Gen aktarımında herhangi bir taşıyıcıya ihtiyaç duyulmadan uygulan bir yöntem olduğu için basit ve güvenlidir. Uygulama alanı olarak; kas, cilt, karaciğer, kalp kası ve katı tümörlerdir. Serum içinde nükleazlar tarafından hızla bozulma ve mononükleer fagosit sistemi ile temizlenme etkinlerinden dolayı etkinliği düşüktür [91,92,93].

Çıplak DNA; cilt, timus, kalp kası, iskelet kası ve karaciğer hücrelerine direkt olarak enjekte edilmektedir [94,95]. Çıplak DNA enjeksiyonu güvenli ve basit bir yöntem olmasına rağmen, gen aktarımı için verimi düşük olduğundan DNA aşılması gibi bazı uygulamalar için uygundur.

4.5.1.1.2. Balistik DNA

Parçacık bombardımanı, mikro mermi gen aktarımı veya gen tabancası balistik DNA için kullanılan diğer terimlerdir. Bu yöntem ilk olarak bitkiler için gen transferi tekniği olarak kullanılmıştır. Yöntemin uygulanma şekli; metal partiküller ile kaplı DNA'nın hedef dokuya belirli bir hızla verilmesine dayanır. Metal partikül kaplı DNA'nın hedef dokuya ulaşması için gerekli hıza; yüksek voltajlı elektronik deşarj, kıvılcım deşarjı veya helyum basınç deşarjı ile sağlamaktadır. Bu yöntemin gen aktarım etkinliğinin belirleyen kritik parametreler; gaz basıncı, parçacık boyutu ve doz frekansdır. DNA'nın kaplanması için kullanılan metal partiküller; altın, tungsten veya gümüşdür ve bunlar genellikle 1 µm çapında olmaktadır. Gen tabancasının en büyük

avantajı, DNA dozlarının tam olarak verilmesidir. Genellikle over kanserinde gen tedavisi araştırmalarında kullanılmaktadır [91,92,96].

4.5.1.1.3. Elektroporasyon

Gen elektro enjeksiyonu, gen elektro transferi, elektriksel olarak aracılık edilen gen tedavisi ve elektro gen aktarımı elektroporasyon için kullanılan diğer terimlerdir. Elektroporasyon; hücre yüzeyinin belirli bir noktasına membranın elektrik kapasitesinden daha büyük bir elektrik alan uygulanarak oluşturulan potansiyel fark ile gen tedavisi için kullanılan fonksiyonel genin hücre sitoplazmasına ve nükleoplazmasına geçmesini sağlayabilecek delik açılarak yapılan yöntemdir. Elektroporasyon plazmid DNA'yı aktarmak için güvenilir bir fiziksel yöntem olarak ortaya çıkmıştır [91,92,96,97,98,99]. Bu yöntemde; iç dokulara elektrot yerleştirilmesinde cerrahi zorlukların bulunması, dokuya uygulanan yüksek gerilim nedeniyle organlara zarar verme ihtimalinin olması ve genomik DNA stabilitesini gibi sorunlar yaşanmaktadır [100].

4.5.1.1.4. Sonoporasyon

Sonoporasyon, ultrason dalgaları kullanılarak hücre zarı geçirgenliğinin arttırılarak genetik tedavi için uygulanacak fonksiyonel genin aktarılmasını sağlayan naninvaziv bir tekniktir. Bu teknikte; fonksiyonel genetik materyal mikro kabarcığa dâhil edilip sistemik dolaşıma verilmektedir. Bunu ultrason uygulaması takip etmektedir. Ultrason dalgası, hedef dokunun mikro sirkülasyonundaki mikro kabarcıkları kavite eder ve tedavisel genin hedeflenen transfeksiyonunun çökelmesine yol açan biyolojik etkileri üretir. Mikro kabarcıklar, perflorokarbon veya sülfür hekzaflüorür gibi yüksek moleküler ağırlıklı gaz dolu çekirdekten [hava / azot / inert gaz] oluşmaktadır. Dış kabuk; lipid, protein veya sentetik biopolimer gibi biyolojik olarak uyumlu bileşiklerden oluşmaktadır. Mikro kabarcıklar dolaşımda kırmızı kan hücrelerine benzemektedir (ortalama çap 2-4 µm). Sonoporasyon tekniği genellikle beyin, kornea, böbrek, periton boşluğu, kas ve kalp dokusunda kullanıla bilmektedir [101].

Bu teknikte; plazmid DNA'nın boyutu ve konsantrasyonu sistemin etkinliği için büyük rol oynamaktadır [102,103]. Tekniğin özellikle *in vivo* verimliliği düşüktür.

4.5.1.1.5. Fotoporasyon

Bu fiziksel yöntem, gen tedavisi için kullanılması hedeflenen genetik materyalin hücreye girmesini sağlamak için hücre zarı üzerinde geçici gözenekler oluşturmaktadır. Bunun için tek lazer palsı kullanılmaktadır. Bu yöntemde kullanılan lazerin odak noktası ve darbe frekansı yöntemin verimliliğini kontrol etmektedir [104].

4.5.1.1.6. Magnetofeksiyon

Magnetofeksiyon, bir sistemde nonviral biyokimyasal (katyonik lipidler veya polimerler) ve fiziksel (elektroporasyon, gen tabancası) transfeksiyon sistemlerinin avantajlarına sahip olan basit, etkili, düşük verimlilik ve toksisite gibi sakıncalarını ortadan kaldıran bir transfeksiyon yöntemidir. Bu yöntemde kullanılan manyetik alanlar, nükleik asit içeren parçacıkları hedef hücrelere aktarmak için kullanılır [105,106]. Yöntem, tedavisel genin manyetik nanoparçacıkla birleştirilmesine dayanmaktadır. Bu teknik manyetik parçacıklarla tedavisel genin birleşmesiyle yapılmaktadır. Hücre kültüründe kullanılmaktadır. Hücre kültürünün altına yerleştirilen toprak elektromıknatısın ürettiği gradient alan ile sedimentasyon ve transfeksiyon hızı arttırılmaktadır. *In vivo* durumda tedavisel gen-manyetik parçacık kompleksi intravenöz olarak uygulanır. Bu kompleksin yakalanıp hedefe gönderilmesinde yüksek gradientli harici mıknatıslar kullanılmaktadır. Gen tedavisinde kullanılan fonksiyonel genetik materyal; çapraz bağlı moleküllerin enzimatik bölünmesi, yük etkileşimi ve makriks bozulması esnasında serbest kalmaktadır. Bu teknik primer hücreleri transfekte etmek için ve diğer yollar ile transfekte edilmesi zor olan hücreleri transfekte etmek için uygulanmaktadır [107,108,109].

4.5.1.1.7. Hidroporasyon

Hidrodinamik gen aktarımı olarak da adlandırılır. Bu teknik, gen tedavisi için kullanılacak fonksiyonel genetik materyalin hücre membranına girebilmesi için hidrodinamik basınç uygulanarak yapılmaktadır. Hidrodinamik, suda çözünür bileşiklerin ve parçacıkların iç organlara doğrudan intraselüler olarak verilmesi için basit ve etkili bir yöntemdir [92,110,111].

Bu basit yöntemin *in vivo* verimliliği, herhangi bir nonviral sisteme göre daha yüksektir. Ayrıca, fare ve sıçan gibi kemirgen hayvanlar üzerinde yapılan

çalışmalarda; hayvanların karaciğerine yapılan gen transplantasyonu sonucunda hemofili faktörlerinin [112], sitokinlerin [113], eritropoietin [114] ve hepatik büyüme faktörlerinin [115] ekspresyonlarında başarı elde edilmiştir. Ancak aynı başarı insanlarda elde edilememiştir.

4.5.1.1.8. Mekanik Masaj

Gen tedavisinin uygulanacağı hedef organdaki hücreye plasmid DNA'nın difüzyon yoluyla girmesini kolaylaştıran ve hücre zarında geçici bozulmalar meydana getirilerek uygulanan bir yöntemdir. Bu metot ile gen tedavisi çalışmaları azdır [116].

4.5.1.2. Viral olmayan gen tedavisi için kimyasal vektörler

Kimyasal sistemler fiziksel yöntemlerden daha yaygındır. Genellikle aşağıdaki şekilde;

1. Nükleazlar ve diğer kan bileşenlerinden korunan tedavisel genleri içeren yoğun kompleks tasarımlar,
2. Belirli hücreleri hedef alanlar,
3. Genetik materyalin sitozol veya çekirdeğe verilmesini arttırmak için tasarımlar,
4. Sitozol'deki DNA / RNA'dan ayrışmak üzere tasarımlar,
5. Dokulardaki terapötik genin sürekli veya kontrollü salınması için tasarlanmaktadır [116,117].

4.5.1.2.1. İnorganik parçacıklar

Genellikle, retikulo endotel sistemden kaçabilmesi veya bozulmadan bağlanabilmesi için boyut, şekil ve porozite değişiklikleri tasarlanarak hazırlanan parçacıklardır. Bu inorganik nanoparçacıkların yüzeyi genetik materyal ile kaplanıp küçük parçacık boyutuna getirilerek fizyolojik ve hücrel engellerin çoğunu etkili bir şekilde aşabilmektedir. Bu yöntemin transfeksiyon etkinliği yüksektir. İnorganik parçacık olarak ilk kullanılan kalsiyum fosfat parçacığıdır. Bu parçacık biyolojik olarak uyumludur ve parçalanabilmektedir. Kalsiyum, endositozda hayati bir rol oynamaktadır. Ayrıca kolaylıkla emilme avantajına ve yüksek bağlanma afinitesi

sahiptir. Ancak, kalsiyum fosfat nano kristalleri zamanla büyür ve depolama kapasitesi azalır. Bu daha sonra magnezyum ilave edilerek giderilmeye çalışılmıştır. Diğer inorganik parçacık olarak silika; işlevsel ve kullanım kolaylığı sağlamaktadır. Ancak; serum proteinleri arasındaki etkileşime bağlı olarak serum içeren ortam varlığında veriminin azalması önemli bir sınırlayıcı faktördür. Bir diğer inorganik parçacık olarak altın; hazırlanma kolaylığı, sınırsız yüzey karakterizasyonu, kızıl ötesi bölgeye yakın ışığın kuvvetli emilimi ve atıl doğa gibi özellikleri araştırmacıları altın nanopartiküllerin kullanımına yöneltmiştir. Ancak altının yüksek kimyasal kararlılığı sahip olması hücrede kolay çözünmemesine ve dolayısıyla hücre büyümesine zarar vermektedir. İnorganik parçacık olarak; manyetik nanopartiküller (süper manyetik demir oksit çoğunlukla manyetit), fullerenler (çözünür karbon molekülleri), karbon nanotüpleri (silindirik fullerenes), kuantum noktaları (yarı iletken nanomateryal) ve supramoleküler sistemler, *in vitro* olarak hayvan modellerinde umut verici sonuçlar vermiştir [107].

4.5.1.2.2. Sentetik / doğal biyolojik parçacıklar

Katyonik lipozom / katyonik polimere ait polikatyonik nanomerik parçacıklara sıkıştırılmış negatif yüklü nükleik asitleri içeren nanomerik komplekslerdir. Nanomerik komplekslere lipoplex / poliplex denilmektedir. Hücre içine endositoz yoluyla nanomerik kompleks bileşenlerin alınmasıyla nükleik asit boncukları yeterli miktarda üretilmektedir [118]. Katyonik vektör; diğer viral olmayan vektörlere ve viral vektörler ile kıyaslandığında toksisite ve antijeniklik açısından avantajlıdır. Fakat bu sistemin verimliliği düşüktür.

Katyonik lipidlerin sınıflandırılması;

- Monovalent katyonik lipidler,
- Çok değerli katyonik lipidler,
- Guanidin içerenler,
- Kolesterol türevi bileşikler,
- Katyonik polimerler,

- Lipid-polimer melezi, şeklinde sınıflandırılır [119].

Katyonik partiküllerin gen aktarma mekanizması; katyonik partiküller ile hücre yüzeyi arasındaki spesifik olmayan etkileşimin ardından endositoz veziküllerinin yardımıyla endositoz şeklinde olur. Oluşan endozom içerisindeki genetik materyal endozomdan bırakılır ve membran reseptörleri tarafından çekirdeğe translokasyonu gerçekleşir ve transgenik ifade oluşur [120].

4.5.1.2.2.1. Katyonik lipozomlar

Katyonik lipozomlar, nanomerik komplekslerin oluşumuna neden olan kompakt negatif yüklü nükleik asitler olan mevcut nonviral polikatyonik sistemlerden daha önemlidir. Katyonik lipozomlar; düşük toksisite, bağışıklık sisteminin aktivasyonu olmaması ve biyoaktif bileşiklerin etki alanına hedeflenmiş olarak verilmesi gibi hidrofilik ve hidrofobik ilaçları dâhil etme kabiliyeti gibi kendine özgü özellikleri vardır [121,122]. Hem retiküloendotelial sisteme bağlı lipozomların hızla bozulması hem de uzun vade de ilaç vermenin başarısızlığa uğraması gen verme sistemlerinin dezavantajlarıdır [126,124].

Katyonik lipozomlar, akciğer, iskelet kasları, dalak, böbrek, karaciğer, testis, kalp ve deri hücrelerinin gen iletiminde kullanılmaktadır [125,126].

4.5.1.2.2.2. Katyonik polimerler

DNA'ya sahip katyonik polimer karışımı polipleks olarak adlandırılan kompleksin nano boyutundaki oluşumudur. Lipopleks yapılardan daha karardır. Polietilenimin (PEI), *in vivo* ve *in vitro* gen transferi için altın bir standart olarak kabul edilmektedir. Katyonik polimerler, yüksek yoğunluklu amin grubu içermektedir. Bu, ozmotik basınç alan içinde klorür akışkanlığına yol açmaktadır. Endozom membranın kopmasına ve şişmesine neden olmaktadır. Çitosan, katyonik polisakarit esaslı doğal bir polimerdir. En çok çalışılan viral olmayan vektörlerden biridir. Yüksek konsantrasyonlarda bile zehirsizdir. Glukozaminden oluşan doğrusal bir katyonik polisakarittir. Çitosanın pozitif yükü, negatif yüklü DNA ile elektrostatik olarak bağlanır. Muko yapışkan özelliğine sahip çitosan / DNA polipleksler oral ve burun gen terapisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Poli DL-Laktid (PLA) ve Poli DL-Laktidko-glikozid (PLGA) bulk hidrolize maruz kalarakbiyolojik olarak

parçalanabilen poliestерlerdir. Bozulan ürünler sitrik asit döngüsü ile giderilir. PLGA, protein verilmesi için araç olarak FDA tarafından onaylanmıştır. 10 µm'den daha küçük boyutta, antijen sunan hücre tarafından kolaylıkla fagositize olabilmeye ve bağışıklık reaksiyonu indükleyebilmektedir [127].

4.5.2. Viral Vektörler

Başarılı gen tedavi yöntemlerinden biri de viral vektörlerdir [128]. Viral vektörler; etkin gen veriminde replikasyon ve ekspresyon gibi virüslerin evrimsel mekanizmalarından dolayı gen tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [129]. DNA ve RNA virüslerinin genomlarında değişiklik yapılarak gen tedavisinde kullanılmaktadır. Böylece vektör amacıyla kullanılan virüsler daha güvenli hale getirilmiştir. Ancak gen tedavisinde viral vektörler belirgin immünojenite, toksin üretimi, insersiyonel mutagenesi ve ölüm gibi bazı problemler oluşturmaktadır. Ayrıca viral vektörlerin transgenik kapasite boyutu da sınırlıdır [14,130]. Viral vektör sistemleri; *in vitro*, *ex vivo* ve *in vivo* gen transferi için geliştirilmiştir. Viral vektörler; enfeksiyon, hücre tipine özel ekspresyon, güvenilirlik, enfekte edebilme yeteneği ve hücre popülasyonunda hızla büyüme özelliklerine göre seçilmektedirler. Bu vektörler ile yapılan çalışmalarda transgenlerin verimli bir şekilde ekspresyona tabi tutulması için onların güvenliğini artırmak ve gen transferinin hedeflenmesini iyileştirmek gereklidir [14,131].

4.5.2.1. Retroviral vektörler

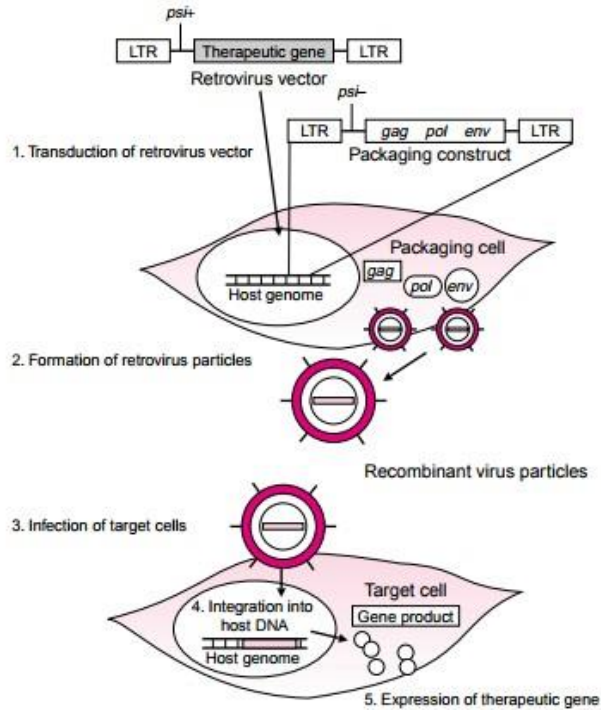
Retrovirüsler, 7-11 Kbp'lik pozitif iplikçikli iki kopya halinde tek sarmal şekilde bulunan RNA genomuna sahip, kapsid içeren zarflı virüslerdir.

Retroviral genomun da 5 've 3' uçlarında iki uzun terminal tekrarlar (LTR) bölgeleri ve gag, pol, env adlı üç büyük okuma bölgelerini bulundurmaktadır. LTR; sırasıyla kapsid proteinleri, replikasyon enzimleri ve zarf glikoproteinlerini kopyalayan gag, pol ve env ifadelerini teşvik edici ve düzenleyici olarak hareket etmektedir. Viral yaşam döngüsü ile ilgili olarak, kapsid konakçı hücrenin içine girdiğinde, viral RNA genomu ters transkriptaz enzimi sayesinde çift zincirli DNA'ya dönüşür. Oluşan çift zincirli DNA (Çift zincirli DNA'nın kromozoma ulaşması için

çekirdek membranının kaybolması gerekmektedir ve bu da bölünebilen hücrelerde gerçekleşir) molekülü çekirdeğe taşır, çekirdek içinde daire şekli alır ve sonunda konakçı hücre genomu ile integre olmaktadır [132].

Retroviral vektörler yabancı genlerin hedef hücrelere aktarmak için uygulanan etkin bir sistemdir. Bu vektörler gen tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [14].

Gen tedavisinde retroviral vektörlerin; konağın genomuna kararlı bütünleşme özelliği, verimli gen aktarımı için yeterli viral titrelerin üretilmesi ve makul boyutlarda yabancı genleri taşıma yeteneği [<8 kb] avantajlarını oluşturmaktadır. Bu özellikler, transgenin dönüştürülmüş hücrelerde ve onların soy hücrelerinde kalıcılığının temini için gerekli ön şarttır. Hastalık fenotipini düzeltmek ve tedavisel etkiler oluşturmak için transgenin uzun vadeli ve yüksek düzeyde ifade oluşturmasını sağlamaktadır [14]. Ancak, özellikle klinik uygulamalarda engeller yaratan dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar; bazı retroviral vektörlerin istikrarsızlığı, konakçı DNA'ya rasgele viral bütünleşme sonucu olası rastgele ekleme mutajenezi, düşük verimlilik, immünojenik problemler ve bölünmeyen hücrelerde kullanılamaması gibi nedenlerden dolayı başka virüsler ile çalışılmaya yönlendirmiştir [14,133,134].



Şekil 4.5.2.1.1 Retroviral vektörlerin gen tedavisinde çalışma prensibi.[14].

4.5.2.2. Adenoviral vektörler

Adenovirüsler; zarfsız, 100nm'lik ikozahedral kapside sahip, yaklaşık 36 kb'lık doğrusal çift zincirli DNA virüsüdür. 50'den daha fazla serotipi bulunmaktadır. Bu serotipler; hemaglutinasyon özelliğine dayanarak A'dan F'ye kadar alt gruplara ayrılmaktadır [132].

Adenoviral vektörler 7.5 kb'lık bir gen taşıma kapasitesine ve bölünebilen ve bölünmeyen hücrelere bulaşma özelliklerine sahiptir [135]. Bu özellikleri *in vivo* gen tedavisinde avantaj sağlamaktadır. Bu viral vektör konağın genomuna integre olamamaktadır [136].

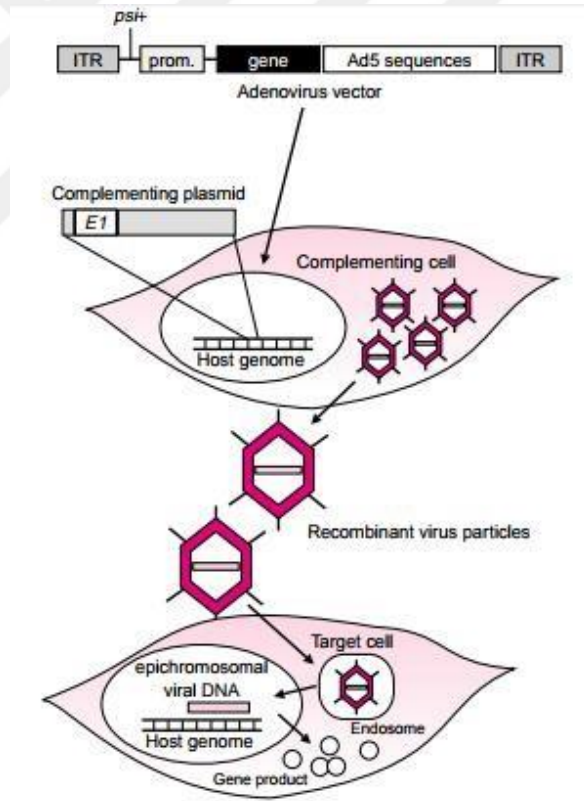
Adenoviral vektörlerin genomu büyük olduğundan dolayı genomda bazı değişiklikler yapılmıştır. Bu değişiklikler: birinci kuşak vektörlerde E1 bölgesi ikinci kuşak vektörler de E1'e ilaveten E2 ve E4 bölgeleri, üçüncü kuşak vektörler de viral genomu kodlayan kısmının büyük bölümü çıkarılarak oluşturulmuştur. Onkolitik vektörler de ise E1B geni dışında tüm viral genomu taşıyacak şekilde değiştirilmiştir. Bu değişikliklerin uygulandığı genlerin özellikleri:

- E1 geni: Erken fonksiyonları düzenler ve virüs replikasyonu için gereklidir.
- E2 geni: Replikasyonda rol oynayan proteinleri ve DNA polimerazı kodlamaktadır.
- E3 geni: Patojenitede önemlidir. Enfekte olmuş hücrelerin yüzeyine MHCI'in gelmesini engeller ve enfekte hücrelerin lizisini önlemektedir.
- E4 geni: Gen ekspresyonunu düzenleyen genleri kodlamaktadır.

Adenoviral vektör genomunda Erken (E ile gösterilir) ve diğer düzenleyici genler silinip, silinen genlerin yerine gen tedavisi için kullanılacak olan fonksiyonel gen aktararak değişime uğratılır. Daha sonra elde edilen virüsü hedef hücreye enfekte edilmektedir. Hedef hücre içinde viral partiküller sitoplazmik endozoma girer ve

sitoplazmik endozom da tedavisel geni barındıran viral DNA'yı çekirdeğe göndermektedir. Çekirdeğe ulaşan tedavisel geni barındıran viral DNA'nın gen ifadesi epikromozomal viral DNA'da gerçekleşmektedir [14,132,137].

Adenoviral vektörler; yüksek nükleer transfer etkinliği, geniş doku tropizmi ve düşük patojenite özellikleri açısından avantaj sağlamaktadır. Adenoviral vektörler uzun süreli ifade oluşturmamasından dolayı dezavantajlıdır. Adenovirüslere karşı doğal ve akut immünolojik yanıtların oluşmasından dolayı klinik uygulamaların birkaç doku ile sınırlı kalması da dezavantajlarındandır. Ayrıca, doğal adenovirüs enfeksiyonunun takipde ciddi hastalık riskinin nadir olması ve viral genomun hedef hücre genomuna entegre olamamasına rağmen; gen tedavisi sonucunda ciddi kötü yan etkilere ve hatta ölüm ile sonuçlanabilmektedir [138,139,140].



Şekil 4.5.2.2.1 Adenoviral vektörlerin gen tedavisinde çalışma prensibi [14].

4.5.2.3. Adeno-asosiy viral vektörler (AAV)

Adeno-ilişkili virüsler (AAV), *Parvovirüs* ailesine ait zarflı, tek iplikçikli bir DNA virüsüdür [141]. Adeno ilişkili vektörler (AAV) özellikleri açısından adenoviral vektörlere benzemektedir, ancak adenoviral vektörlerin replikasyonunda ve patojenitesinde bazı eksikliklere sahip olduğundan Adeno ilişkili vektörler (AAV) daha güvenlidir [142]. AAV'nin diğer bir özelliği, 19. kromozomdaki spesifik bir bölgeye integre olabilme yeteneğidir. AAV genomu küçük (5 Kbp'den az) ve sadece iki gen içermektedir. Bunlar: rep (replikaz, viral genom replikasyonu için gerekli) ve kap'tır (yapısal proteinlerini kodlar). Rep ve cap genleri, kısa ters terminal tekrarları (ITR'ler) içermektedir.

AAV'ler replikasyon döngüsünü tamamlamak için yardımcı virüslere ihtiyaç duymaktadır [132]. Bu yardımcı virüsler, adenovirüs veya herpes simpleks virüstür. İnsanlarda AAV'lerin herhangi bir hastalıkla ilişkisi bulunmamaktadır. Ayrıca, ciddi konak immün yanıtına neden olmamaktadır. AAV, bölünebilen ve bölünemeyen hücreler de uzun vadeli transgen ifadesi oluşturma bilmektedir [143,144]. Ayrıca; özel bir bölgeye spesifik integrasyonu, *in vitro* veya *in vivo* olarak bölünebilen ya da bölünemeyen hücreleri infekte edebilmesi gen aktarımı için cazip olduğunu göstermektedir [144]. Fakat klonlama kapasitesinin çoğu terapötik gen için sınırlı ve uygun olmaması, gen ifadesi oluşmadan önce tek sarmallı AAV DNA genomunun iki katına çıkarılmış DNA'ya dönüştürülmesine gerek duyması [145] ve özel integrasyon alanı olan rep delesyon işlemi kaybolması gibi dezavantajları bulunmaktadır [146].

4.5.2.4. Herpes simplex virüs (HSV) vektörleri

Herpes simpleks virüs 70-80 gen kopyalayabilen 152kb'lık doğrusal çift zincirli DNA'ya sahip virüstür. Viral replikasyonunun gereksinimlerine göre esas ve esas olmayan genlere kategorize edilmiş 80'den fazla geni kapsayan nörotopik büyük DNA virüsüdür [147]. Herpes simplex virüs (HSV) vektörü, yüksek bulaşıcılığa sahiptir. HSV vektörü; bölünebilen veya bölünemeyen hücrelere gen aktarımını yapılabilmektedir. Bu virüs, konağın genomuna integre olmaz ve bu da enfekte hücre popülasyonlarında geçici ifade oluşturmaya neden olmaktadır [148]. Nörojenik tümörler ve kanserler için uygulanabilecek gen tedavisinde kullanılan fonksiyonel

DNA'nın geniş yerleştirme kapasitesine sahip olması ve nöronal hücrelere yönelik doğal tropizmi Herpes simplex virüs (HSV) vektörünü ilgi odağı haline getirmiştir [148]. Fakat; sitotoksosite, konak hücre genomuna integre olamaması, transgenlerin geçici ifade oluşturması, Latents herpes simpleks virüsü ile enfekte olmuş hücrelerle rekombinasyon riski ve önceden var olan bağışıklığın yüksek seviyeleri gibi dezavantajları bulunmaktadır [132].

4.5.2.5. Lentiviral vektörler

Lentivirüsler, *Retroviridae* ailesinin yedi cinsinden biri olarak sınıflandırılmaktadır. Lentivirus cinsi, primat ve primat olmayan retrovirüsleri içeren dokuz virüs türü (Bovine immunodeficiency virus, Caprine arthritisencephalitis virüs, Equine infectious anemia virüs, Feline immunodeficiency virus, Human immunodeficiency virus 1, Human immunodeficiency virus 2, Puma lentivirüs, Simian immunodeficiency virus, Visna/maedivirüs) tarafından oluşmaktadır [149]. Tüm Retrovirüs ailesi; yapı, genetik organizasyon ve replikatif özellikleri bakımından birbirine benzemektedir. Lentivirüslerin çapı yaklaşık 80-120 nm'dir ve iki adet pozitif yüklü tek sarmallı RNA içeren bir genoma sahiptir. Ayrıca, viral RNA'nın, hücresel genoma integre edilmiş iki katlı DNA'ya ters transkribe edildiği benzersiz bir replikatif stratejiye de sahiptir [150]. Replikasyon ve nükleokapsidi oluşturan yapısal proteinler için gerekli olan enzimlere sahiptir. Ayrıca, çift lipid membran ile örtülü proteik kapside sahiptir [151].

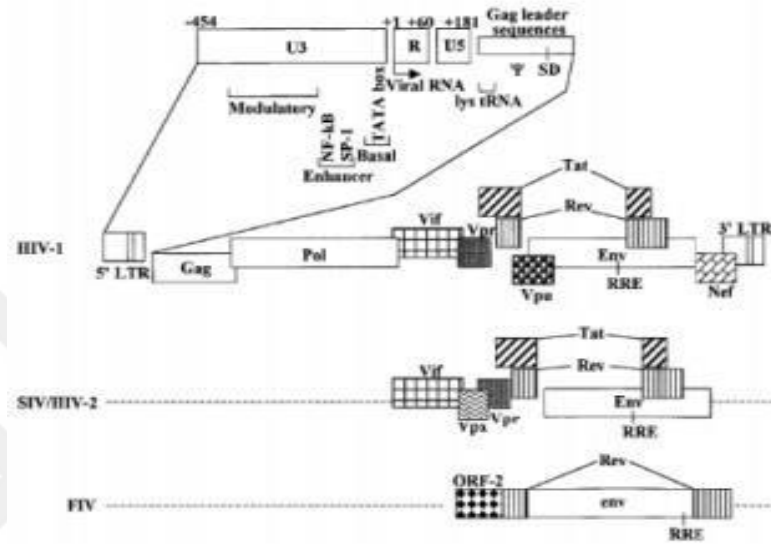
Lentivirüslerin genomlarında kanonik yaygın retroviral genlerin ötesinde çeşitli düzenleyici genlerin varlığı ile ileri veya daha karmaşık retrovirüsler olarak kabul edilmesine sebep olmuştur. Bu düzenleyici genler, konak hücre savunmalarını etkisiz hale getirme, bağışıklık tepkilerini köreltme ve viral replikasyonu düzenleme gibi farklı ve son derece özel işlevlere sahiptirler. Ayrıca; proteinlerin bir kısmı infekte olabilecek parçacıklar halinde paketlenip viral replikasyonun ilk evresinde sentezlenebilmektedir [152,153]. Lentiviral vektörler *in vivo* veya *in vitro* koşullarda bölünen ve bölünmeyen hücrelerin genomlarına integre olabilme yeteneğine sahiptir [154].

Lentivirüs'ün genomu yaklaşık olarak 9-10 kb'dır. Lentivirüslerin her iki ucunda, virus replikasyonu, integrasyonu ve ilgili genlerin ifadesi için gerekli 600-900 nükleotid uzunluğunda homolog bölgeleri (LTR: long terminal repeats) bulunmaktadır. Bu homolog bölgeler (LTR: long terminal repeats); U3, R ve U5 kısımlarına ayrılmaktadır. Ayrıca tüm retrovirüslerde ortak olan gag, pol ve env genlere ek olarak düzenleyici ve yardımcı protein kodlayan bazı dizileri de içermektedir. Gag geni, viral proteaz (PR) tarafından matris (MA), kapsid (CA) ve nükelokapsid (NC) olarak üç ana yapısal proteine proteolitik olarak parçalanabilen bir polipeptidi kodlamaktadır [155]. Pro gen; ters transkriptazdan (RT) ve integrazdan (IN) oluşmasında rol alan bir polipeptidi kodlamaktadır [155]. Env geni; SU (yüzey) ve TM (transmembran) (bu iki protein; konakçı hücrenin hücrel reseptörleri ile etkileşime girerek, virüsün hücrenin içine girmesini sağlayan Env proteininin yapısal birimlerini oluşturmaktadır) protein alt birimlerine hücrel proteaz yardımıyla ayrılabilen polipeptidi kodlamaktadır [156]. Bu enzimler viral polipeptidlerin (virüsün olgunlaşmasıyla da ilgilidir) bölünmesi, viral RNA'nın çift iplikli DNA'ya (provirus) ters transkripsiyonu ve lentivirüsün hücrel genoma bütünleşmesi gibi lentivirüslerin yaşam döngüsünde kritik rolleri bulunmaktadır [155]. Lentiviral genomun yapısı: R-U5-Genler-U3-R şeklindedir.

Gen tedavisi uygulamalarında birçok viral vektör sistemi geliştirilmiştir. Ancak, çoğu vektör transgenезin yararlılığını sınırlamaya neden olan bütünleşmeyi yapamamaktadır. En iyi karakterize edilmiş viral vektör, genomik DNA'ya integre olabilmeye özelliğinden dolayı Retroviridae ailesidir. Fakat onkoretroviral vektörlerin bütünleşmeyi gerçekleştirebilmeleri için hücre replikasyonuna gereksinimleri bulunmaktadır. Bu nedenden dolayı da sınırlı bir başarı göstermektedir. Lentiviral vektörler (LV), bölünmeyen hücrelerde de transdüksiyon yeteneğine sahip oldukları için onkoretroviral vektörler ile karşılaştırıldığında daha etkin bir transgen ifadesi oluşturmaktadır [19].

Lentiviral vektör olarak çoğunlukla HIV-2, simian immunodeficiency virus (SIV), feline immunodeficiency virus (FIV) ve HIV-1 virüsler kullanılmaktadır. EIAV, caprine arthritis encephalitis virus, bovine leukemia virus ve foamy virus gibi üyeleri ise daha az kullanılmaktadır. Lentiviral vektörlerden insan immün yetmezlik

virüs (HIV) türü etkin gen aktarım sisteminde oldukça sık kullanılmaktadır. Lentivirüs genomunda uygun değişiklikler yapılarak; hematopoietik prekürsörler, nöronlar, lenfoid hücreler, makrofajlar ve diğerleri gibi canlılığını kaybetmiş ve transdüksiyona zor hücreler de dâhil olmak üzere çok çeşitli hücreler hedeflenebilmektedir [144,157,158,159].



Şekil 4.5.2.5.1 Lentivirüs vektör tasarımı için kullanılan HIV-1, SIV/HIV2 ve FIV virüslerinin genom yapıları [160].

Şekil 4.5.2.5.1’ da görülen Vif (Viral Infectivity Factor): Viral replikasyonun hücresel inhibitörünü bloke edebilmektedir. Vpr (Viral Protein R): Sadece HIV-1’de bulunur ve preintegrasyon kompleksinin nükleusa göçünü sağlamaktadır. Ayrıca, hücrelerin G2 evresinde tutuklu kalmalarına neden olmaktadır. Tat (Transcription factor): henüz olgunlaşmamış viral transkriptlerin etkin elongasyonu için gereklidir. Rev (Regulatory Viral protein) RRE dizilerini bağlamayı ve viral RNA’ların sitoplazmaya taşınmasını sağlamaktadır. Vpu (Viral Protein U): Hücre membranında lokalize durumda olup viral salınımını sağlamaktadır. Nef (Negative Factor): viral salınımını ve infektiviteyi sağlamaktadır. Vpx (Viral Protein X): preintegrasyon kompleksinin nükleusa göçü ile ilgili bir proteindir. ORF-2 (Open Reading Frame-2): viral genom transkripsiyonunu sağlamaktadır [160].

Lentivirüslerin yaşam döngüsü

Lentiviral partiküllerin zarf glikoproteinleri ile hedeflenen hücrenin spesifik hücre reseptörlerine (primatlarda CD4, FIV için CD9 ve kemokin reseptörü, CXCR4, CCR5) bağlanmaktadır. Lentiviral partikülün kapsidi hedef hücreye gelip viral zarf ile hücre zarı kaynaşıp viral çekirdek hücrenin içine girmektedir. Hücrenin içine girdikten sonra kapsid çözülmeye başlamaktadır. Akabinde transkripsiyon süreci başlamakta ve çift iplikli viral DNA oluşmaktadır. Oluşan çift zincirli viral DNA ile viral proteinler (RT, IN, NC, Vpr ve MA) kompleks oluşturup (önceden entegrasyon kompleksi (PIC) olarak adlandırılan hücresel proteinlerdir) ATP'ye bağlı bir şekilde hücre çekirdeğine aktarılmaktadır. Retrovirüslerin aksine bölünmeyen hücreler de lentivirüslerin transdüksiyon işlemini yapmasına izin veren bu enerjiye bağlanma mekanizmasıdır. Çekirdekte doğrusal virüs, integras tarafından hücresel genoma integre olmaktadır. Artık yeni virüsler üretmek için gereken tüm şartlar sağlanmakta ve viral DNA, hücresel RNA polimeraz II tarafından mRNA'ya kopyalanmaktadır. Çekirdeğin içinde hala bazı transkriptler birleştirme olayına maruz kalmaktadırlar. mRNA transkriptleri, çekirdekten sitoplazmaya verilecek şekilde ihraç edilir ve iki tam uzunlukta RNA transkript yerleştirilerek viral parçacıkları oluşturulmaktadır. Viral proteinler ve viral RNA hücresel membranın yakınında (Lipid sallar olarak adlandırılan bu bölge, kolesterol ve sfingolipid bakımından zengindir) bir araya gelmektedir. Olgunlaşmamış viral partiküller tomurcuklanarak hücreden salınmaktadır. Hücreleri terk ettikten sonra, viral proteaz, nihayet olgun bir enfeksiyöz virion üretmek üzere Gag ve Pol protein öncüllerini parçalamaktadır [150,156].

Lentiviral vektörlerin avantajları

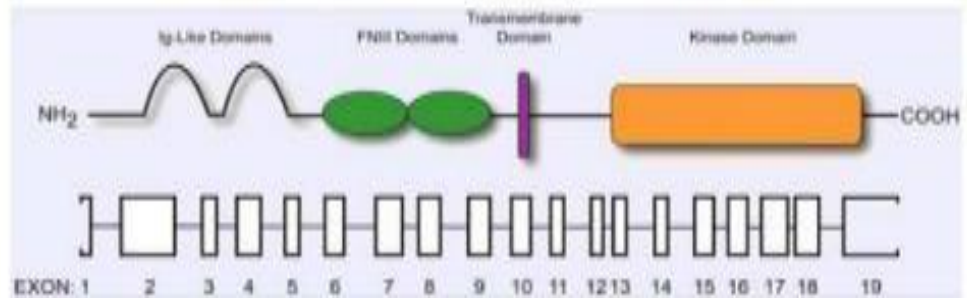
Lentiviral vektörler, bölünen ve bölünmeyen hücrelerde kullanılmakta ve konak hücre genomuna istikrarlı bir şekilde integre olabilmektedir. *in vitro* ve ya *in vivo* olarak uzun vadeli bir transgen ekspresyonu da elde etmek için eşsiz bir kabiliyete sahiptir. [20,21]. Lentiviral vektörler çok yönlüdür ve bir veya daha fazla gen içerisinde organize edebilmektedir. Ayrıca, 9 Kbp'ye kadar heterolog DNA verebilmektedir. Dahası lentivirüsler hücresel hızlandırıcılardan uzaklaşmaya eğilimli oldukları için eklemeli mutajenez ve onkojenite riski düşüktür [22,23]. Lentiviral vektörler, düşük bazal ve uyarılabilir yükseltici aktiviteye sahip LTR'lere sahiptir [161,162]. Lentiviral vektörler düşük immünojeniteye sahiptir [124]. Lentivirüslerin

insanlara bulaştırıcı değildir. İnsan popülasyonunda önceden var olan bağışıklığı yoktur [132].

4.6. *MERTK* Geni

MERTK (UniProt katılım Q12866), reseptör tirozin kinaz (TAM (Tyro3, Axl ve *MERTK*) ailesine ait tek geçişli bir transmembran reseptördür. *MERTK*; monosit / makrofajlar, dendritik hücreler, NK hücreleri, NKT hücreleri, megakaryositler, trombositlerde ve retinal pigment epitelyumu dâhil olmak üzere epitelyal hücrelerde yüksek ölçüde eksprese olmaktadır [25,26,27,28,29]. Yüksek düzeyde *MERTK* ekspresyonu, yumurtalık, prostat, testis, akciğer, retina ve böbrekte de tespit edilmekte ve daha düşük *MERTK* seviyeleri, kalp, beyin ve iskelet kasında bulunmaktadır [27]. Ayrıca, upregülasyon veya ektopik *MERTK* ifadesi habis hücrelerin bir spektrumunda bulunmaktadır [25].

İnsan *MERTK* geni, 2. kromozom (2q14.1) üzerinde bulunur [130,131] ve tahmini olarak 110 kDa'lık bir molekül ağırlığına sahiptir [25]. *MERTK* geni, 999 amino asit protein kodlayabilen 19 ekzondan oluşmaktadır [25]. Ekzon 1-9 hücre dışı alanı, ekzon 10 transmembran alanını ve ekzon 11-19 hücre içi alanı kodlamaktadır [31]. *MERTK* reseptörü, iki immunoglobulin benzeri C2 (IgGC2) ve iki fibronektin tip III (FN-III) alanına sahip hücre dışı bir bölgeye, oldukça korunumlu bir tirozin kinaz alanını içeren hücre içi bölgeye ve transmembran bölgesine sahiptir [27,32].

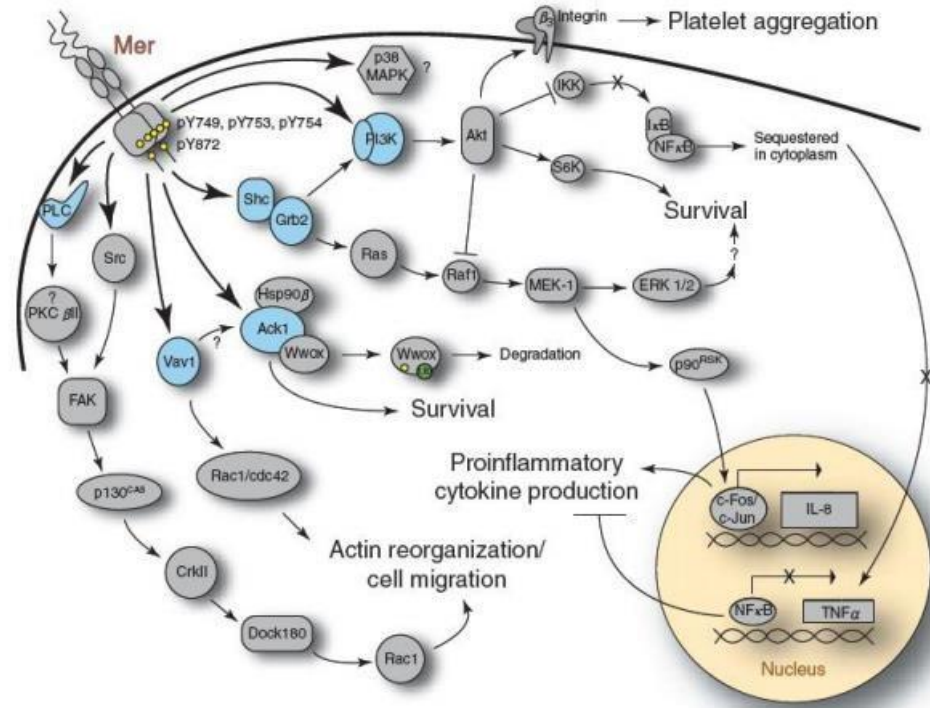


Şekil 4.6.1 *MERTK* gen yapısı [31].

Hücre dışı bölge, genel olarak yapışma moleküllerine benzemekte ve K vitamini bağımlı modifiye ligandları bağlamaktadır [26]. *MERTK*, iki büyük vitamin K bağımlı ligandı vardır: büyüme durdurma spesifik gen 6 (Gas6) ve protein S [26,163,164]. Gas6, oligodendrositler yoluyla miyelinasyon sürecinde önemlidir [165]. Protein S, vitamin K bağımlı antikoagülasyon faktörüdür.

Hücre içi bölge, tirozin kinaz alanını (aa 600-848) içermektedir [27]. *MERTK* reseptör dimerizasyonu ve tirozin otofosforilasyonu hücre içi alanda oluşmaktadır. Kinaz alanının aktivasyon halkası içindeki üç tirozin (Y749, Y753 ve Y754) otofosforilasyonu gerçekleştirmektedir [166].

MERTK'nin PI3K / Akt, PLCGamma, VAV1 ve MAPK / ERK sinyal yolları bulunmaktadır [25,34]. *MERTK* ile sinyal iletimi; ligand hücre dışına bağlandıktan sonra *MERTK* reseptörünün dimerizasyonu / oligomerizasyonu ve sitoplazmik alanda otofosforilasyon gerçekleşmektedir [166]. Ligand bağlanması, aktivasyon halkası tirozin (Tyr749, Tyr753 ve Tyr754) otofosforilasyonuna [166], bağdaştırıcı proteinlerin (Grb2, LimD4 ve Vav1) işe alımına [33,34,167,168] ve aşağı akış enzimlerinin (PI3K, MAPK ve GTPaz) aktivasyonuna [34,169] neden olmaktadır. MAPK / ERK sinyal yolağı, Grb2 ile Mer'in birleşimi ve Shc'nin fosforilasyonuna kadar Raf ve p90RSK kinaz aktivasyonu kurmaktadır. PLC gamma ile PI3K / Akt sinyal yolunun fosforilasyonu ve aktivasyonu, SH2 alanlarından birinin doğrudan endojen fosfo-*MERTK*'ye bağlanmasıyla gerçekleşebilmektedir [170]. Son olarak, VAV1'in yapısal olarak *MERTK* ile etkileşime girdiği ve ligand bağlı *MERTK* aktivasyonu üzerine VAV1'in salınması Rho ailesinin üyelerinin aktivasyonuna yol açmaktadır [168].



Şekil 4.6.2 Mer (*MERTK*) sinyal yolları trombosit agregasyonu, hücre hayatta kalımı, proinflamatuar sitokin üretiminin regülasyonu ve aktin sitoskeletonunun düzenlenmesine yol açtığını gösteren şekildir [171].

Şekil 4.6.2’ de mavi moleküllerin, doğrudan veya dolaylı etkileşim yoluyla Mer ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Mer kinaz alanı içindeki Tirosinler 749, 753 ve 754 (sarı daireler), otofosforilasyon alanlardır [171].

MERTK, proto-onkojen gibi davranır ve NIH / 3T3 ve B-lenfosit hücrelerinin hücresel transformasyonunda rol oynamakta ve [33,34] monositlerde, makrofajlarda, retinal pigment epitel hücrelerinde oluşan fagositik süreçleri yönlendirmektedir [35,36,37,38]. Ayrıca; *MERTK*'nin aktivasyonu ve PI3K / Akt, PLCGamma, VAV1 ve MAPK / ERK yoluyla aşağı akışlı sinyalleşme ile; hücre sağkalımı, proinflamatuar sitokin üretimi, aktin yeniden yapılanma ve hücre göçünde *MERTK* hücresel işlevlere aracılık etmektedir [25,165].

4.6.1. *MERTK* Mutasyonu ve Hastalıkla İlişkisi

MERTK geninde otozomal resesif geçişli mutasyon sonucunda retinal bozuklukların meydana geldiği gözlemlenmiştir [26,40,41,42]. Bu mutasyon retinitis pigmentosa (RP) olarak tanımlanmaktadır [25,31]. Gece körlüğü, görme alanında azalma, retinal vaskülatür zayıflama, optik solgunluğu ve kemik sikül pigmentleri aşamalı olarak retinitis pigmentosa (RP) hastalığında ortaya çıkmaktadır [172].

MERTK geni bir proto-onkojen olarak tanımlanmaktadır [127]. *MERTK*; lösemi [25,27,43], lenfoma [25,44], kolorektal kanser [45], prostat kanseri [46] meme kanseri [47], gastrik kanser [48], rabdomiyosarkoma [49], Astrocytoma/Glioblastoma [50,51] ve hipofiz adenomu [52] gibi çeşitli kanser türleri ile ilgisi bulunmaktadır. Ayrıca melanomda (p.Pro802Ser) [53,54], multipl miyelomda (p.Thr690Ile, p.Glu823Gln) [55], böbrek kanseri ve karsinomda (p.Ala446Gly, p.Ala708Ser) [56] somatik değişiklikler bulunmaktadır. Ek olarak, çeşitli sklerotik lezyonlarda *MERTK* ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir [57,58].

Patojenik olmayan *MERTK* varyantları p.Arg20Ser, p.Asp118Ser, p.Ala282Thr, p.Arg293His, p.Arg466Lys, p.Asp498Ser, p.Ile518Val ve p.Val870Ile olarak tanımlanmıştır [31,172,173,174]. *MERTK* geninde meydana gelen p.Glu540Lys, p.Ser661Cys, p.Ile871Thr değişimlerin hem hasta hem de ebeveynlerinde mevcut olan bazı heterozigot missense substitusyonlarının patolojik etkileri net olmasada tanımlanmıştır [31]. *MERTK* geninde meydana gelen p.Glu540Lys, p.Ser661Cys, p.Ile871Thr değişimleri sonucunda oluşan Leber Konjenital Amaurosis hastalığı heterozigot mutasyon olarak diğer gen bozukluklarından ayrılmıştır [175].

Ayrıca, *MERTK* geninde ki bozukluk sonucunda ramotoid artrit ve lopus gibi otoimmün hastalıklar, fagositozda bozukluk ve apoptotik hücrelerin aralığında bozukluklar meydana gelmektedir [25,26,59].

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Materyaller

Bu çalışmada kullanılan *E.coli* Stbl3 suşu Thermo Fisher Scientific firmasından ve Lenti-GDNF ve Lenti-VEGF, PAX, PMD2 plazmidler Applied Biological Materials Inc firmasından temin edilerek laboratuvara getirilmiştir. Ayrıca çalışmada SH-SY5Y ve 293T hücre hatları (cat. no. CRL-11268), insan osteosarkom (HOS) hücreleri (cat. no. CRL-1543) ATCC firmasından temin edilerek laboratuvara getirilmiştir.

5.2. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan DMEM yüksek glikoz (GIBCO, katalog numarası: 11995), UltraCULTURE Serumsuz besiyeri (Lonza, katalog numarası: 12-725F), 1s1 ile etkisiz hale getirilmiş FBS (GIBCO, katalog numarası: 26140-079), Glutamax (GIBCO, katalog numarası: 35050), Penisilin-streptomisin (GIBCO, katalog numarası: 15140122), % 0.25 Triptsin-EDTA (GIBCO, katalog numarası: 3197), PBS, kalsiyum klorür ve magnezyum klorür içermeyen PBS (GIBCO, katalog numarası: 14190), 25 mM EDTA (Invitrogen, katalog numarası: No Y02353), DNaseI Amplifikasyon derecesi (Invitrogen, katalog numarası: 18068015), CaCl₂ (Sigma, katalog numarası C-2536), H₂O (GIBCO, katalog numarası: 10977-015), ReliaPrep RNA Cell Miniprep System Kiti, PureLink® Quick Gel Extraction Kiti, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, iProof HiFi-Fidelity PCR kit, 10 Fast Digestion Green Buffer, Fast Digest Enzyme, Rapid DNA Ligation Kiti, kimyasallar firmalardan temin edilmiştir.

Ayrıca PCR için gerekli primerler de (F: 5' – AgTCA gAATTC ATC CgC AgC CCC ggg ATg g – 3' (30 bases) EcoRI, R: 5' – AgTCA gCggCCgC TCA CAT CAg gAC TTC TgA gCC TTC – 3' (37 bases) NotI) firmalardan temin edilmiştir.

5.3. Kullanılan Ekipman ve Cihazlar

15 mL'lik falcon tüpü, 75 cm²'lik flakslar, mikrosantrifüj tüpler, PCR tüpleri, 500 mL'lik erlen, 100 mL'lik mezür, 150 cm² kaplar (Nunclone, katalog numarası: 168381), T150 doku kültürü şişeleri, T25 doku kültürü flaksları, 6 kuyucuklu hücre kültürü plakaları (Applied Biosystems, katalog numarası: N801-0560), Polistiren yuvarlak tabanlı tüpler (5 ml, 12 mm? 75 mm) (Becton Dickinson, katalog numarası: 352005), 0,45 mm PES filtre üniteleri (Corning, katalog numarası: 430768), 0,22 mm PES filtre üniteleri (Corning, katalog numarası: 431096), 2. seviye biyogüvenlik kabini, Doku kültür kaputu(hood), inkübatör, Bekman ultra santrifüj (Beckman Coulter), SW28 ultra santrifüj rotoru (Beckman), SW28 santrifüj tüpleri (Beckman, katalog numarası: 344058), Beckman Avanti J-25 I santrifüj (Beckman), Sabit Açılı Rotor, JLA-10.500 (Beckman), 250 ml'lik kapak takımları olan polipropilen geniş ağızlı şişe(Beckman, katalog numarası: 356011), bu tez kapsamında laboratuarda kullanılan cihaz ve ekipmanlardır.

5.4. Yöntem

5.4.1. Reaktiflerin Hazırlanması 5.4.1.1. 23 HEPES-buffered saline (HBS) çözeltisi (50 mM HEPES, 1.5 mM

Na₂HPO₄, 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 12 mM sükkroz)

Son hacim 1,800 mL olacak şekilde 2X HBS çözeltisi, 23,8 g HEPES, 32,0 g NaCl, 4,32 g UltraPure sükkroz, 1,48 g DEPC ile iyileştirilmiş sulu KCl ve 2 mL 1,5 M Na₂HPO₄ eklenerek stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanmış çözelti 450 mL olacak şekilde dörde bölünerek stoklanmıştır. Sırasıyla dört stokun pH değerleri 7.07, 7.09, 7.11, 7.13 olması için 1 N NaOH kullanılarak gerekli ayarlamalar yapılmıştır. Her stok 500 ml olacak şekilde su ile tamamlanıp otaklavlanmıştır. Bu hazırlanan çözelti 4°C'de 1 ay ve -20°C'de bir yıl saklanabilmektedir.

Not: HBS'nin optimum transfekiyonu için pH değeri önemlidir.

5.4.1.2. 2 M CaCl₂ stok çözeltisi

Son hacmini 100 mL olacak şekilde 14,7 g CaCl₂ suda çözündürülüp temiz filtreden geçirilerek hazırlanmıştır. 15 mL'lik koni tüplerin içine 13,5 mL konularak 20°C'de 1 yıl saklanabilmektedir.

5.4.1.3. DNaseI

DNaseI üzerine 275 - 80 µL su eklenerek hazırlanmaktadır.

5.4.1.4. BL + TG Buffer

1500 µL Tiogliserol ve 150 mL BL Buffer eklenerek hazırlanmaktadır.

5.4.1.5. Column Wash Solution

24 mL Column wash solution ve 36 mL % 95'lik etanol ile hazırlanmaktadır.

5.4.1.6. RNA Wash Solution

350 mL % 95 etanol ve 206 mL RNA wash solution ile birlikte hazırlanmaktadır.

5.4.2. MERTK klonlama 5.4.2.1. cDNA'dan PCR yöntemiyle full length MERTK amplifikasyonu

(amplification of MERTK gene)

Hücre kültürü çalışmasına başlamadan önce; laminar flow kabini 30 dk süreyle UV ışığı altında sterilize edilmiştir. Kabin içi ve deney esnasında kullanılacak araç ve gereçler % 70'lik etanol ile temizlenmiştir. Hücre hattı olarak SH-SY5Y hücre hattı çalışma için seçilmiştir. Stokta dondurulmuş olarak bulunan SH-SY5Y hücre hattı çözünme hızı yaklaşık 2 dakika olacak şekilde 37°C'lik su banyosunda eritilmiştir. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra SH-SY5Y hücre hattının bulunduğu kap % 70 etanol ile hızla temizlenerek olası dekontaminasyon önlenmiştir. 15 mL'lik falcon tüpünün içine 9 mL medyum ilave edilmiştir. Üzerine çözünmüş SH-SY5Y hücre hattı ilave edilip 125 g'de 5-7 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım uzaklaştırılıp hücre pelleti 3 mL'lik medyum da resüspanse edilmiştir. pH'ı 7 ile 7,6 arasında olacak şekilde ayarlanan medyumdan 10 mL 75 cm²'lik flaska

konulmuştur ve üzerine medium+hücre süspansiyonu pipet yardımıyla ilave edilmiştir. Mikroskopta bakılarak 37°C' lik etüve kaldırılmıştır.

Flaks tabanının da % 80 dolulukta hücre yapışması olana kadar 37 °C' lik etüv de bekletilmiştir. Bağlanma tamamlandıktan sonra kültür ortamı uzaklaştırılmıştır, flaks yüzeyindeki hücre tabakasını kaldırmak için 2-3 mL Tripsin EDTA (% 0,25 (w/v) Tripsin, 0,53 mM EDTA) solüsyonu eklenmiştir. Hücre tabakası tamamen dağılık halde olana kadar flaks ters yüz edilmiştir. Mikroskop altında hücrelerin kalkıp kalkmadıkları incelenmiştir. 6-8 mL tam büyüme medyumunu flaksa eklenmiştir. Yeni flaklara 2×10^3 - 6×10^3 canlı hücre/cm² olacak şekilde eski flakstan medyum+hücre karışımı aktarılmıştır. Yeni flaklar 37 °C'lik etüv de bekletilmiştir. Alt kültürün hücre konsantrasyonu $6-7 \times 10^4$ canlı hücre /cm²'dir.

SH-SY5Y hücresinden RNA elde edilmesi için ReliaPrep RNA Cell Miniprep System kullanılmıştır. RNA izolasyonuna başlamadan önce DNaseI, BL+TG Buffer, Column wash solution ve RNA wash solution çözeltiler hazırlanmıştır. Hücreler steril santrifüj tüpüne alınıp 300 g'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatantlar atılmıştır. Santrifüj tüpünde kalan peletler soğuk 1X PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra 300 g'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında tüm süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan peletler BL+TG Buffer ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra karıştırma ve tüp kenarında kalan parçacıkların tüp tabanına birikmesi için döndürme yapılmıştır. Üzerine izopropanol eklenip 5 saniye karıştırılmıştır.

Mikrosantrifüj tüpünün üzerine mini kolan yerleştirilmiştir. Hazırlanmış lizat mini kolonun ortasından dikkatlice boşaltılmıştır. Mikrosantrifüj+kolon tüpleri 25°C sıcaklıkta 12000-14000 g'de 30 saniye santrifüj yapılmıştır. Kolon mikrosantrifüj tüpünden uzaklaştırılıp mikrosantrifüj tüpünde toplanan süpernatantlar atılmıştır. Kolon tekrar mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. 500 µL RNA wash solisyonu ile kolon yıkanmıştır. Kolon+mikrosantrifüj tüpü 12000-14000 g'de 30 saniye santrifüj yapılmıştır. Kolon mikrosantrifüj tüpünden uzaklaştırılıp mikrosantrifüj tüpünde toplanan süpernatantlar atılmıştır. Kolon tekrar mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Örnek başına 24 µL Yellow core buffer, 0,09 M MnCl₂ ve 3 µL DNaseI sarf

malzemeleri kullanılarak buz üzerinde karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım kolon üzerine aktarılmıştır. Mikrosantrifüj+ kolon 20-25°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kolon üzerine 200 µL Column wash solüsyonu eklenmiştir. Kolon+mikrosantrifüj tüpü 12000-14000 g'de 30 saniye santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında içinde süpernatant bulunan mikrosantrifüj tüpü atılmıştır. Yeni mikrosantrifüj tüpüne kolon takılarak üzerine 300 µL RNA wash solüsyonu eklenmiştir. 2 dakika boyunca yüksek hızla santrifüj yapılmıştır. Kolonu Elüsyon tüpüne yerleştirilmiştir. Kolon yüzeyi nükleaz free su ile yıkanıp 1200014000 g'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında kolon atılarak elde edilen RNA kullanılabildiği kadar – 80°C'de saklanmıştır.

SH-SY5Y hattından izole edilen RNA'dan cDNA sentezi için Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır. Deneye ilk olarak Temolate-Primer Mix hazırlanmasıyla başlanılmıştır. Temolate-Primer Mix son hacmi 13 µL olacak şekilde RNA (100ng), primer (2,5 µM) ve su kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan mix üzerine transcriptor reverse transcriptase reaction buffer, 5X conc. (8mM MgCl₂), protector Rnase Inhibitor (40 U/µL), Deoxynucleotide Mix (10 mM) ve Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/µL) sarf malzemeleri kullanılarak karışımın son hacmi 20 µL olacak şekilde uygun miktarlarda eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım pipet yardımıyla homojen hale getirilip kısa spin yapılmıştır. Daha sonra 55°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 85°C'de 5 dakika Transcriptor Reverse Transcriptase aktivitesi durdurulmuştur. cDNA kullanılabildiği kadar -20°C'de saklanmıştır.

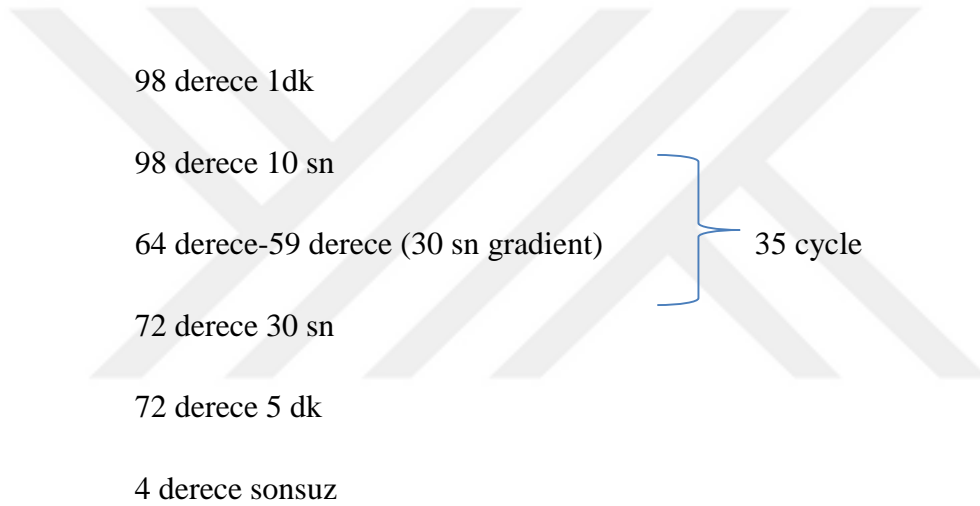
cDNA' dan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile MERTK geninin tamamının çoğaltılması için iProof HiFi-Fidelity PCR kit kullanılmıştır. 5X iProof HF buffere, dNTP mix (200 µM), Primerler, SH-SY5Y hattından izole edilen RNA'dan sentezlenen cDNA, iProof DNA Polymerase (0,02 U/µL) ve steril H₂O uygun miktarlarda eklenerek karışım hazırlanmıştır.

PZR'da kullanılacak primerler

F: 5' – AgTCA gAATTC ATC CgC AgC CCC ggg ATg g – 3' (30 bases)
EcoRI

R: 5' – AgTCA gCggCCgC TCA CAT CAg gAC TTC TgA gCC TTC – 3' (37
bases) NotI

Hazırlanan PZR karışımı BioRad thermal cycler cihazına yerleştirilmiştir.
Gradient PZR metot koşulları verilmiştir.



Gradient PZR metodu tamamlandıktan sonra PZR ürünleri -80°C'de saklanmıştır.

5.4.2.2. Jelde yürütme/Kesme/Temizleme

PZR yöntemiyle istenilen gen bölgesinin çoğaltılıp çoğaltılmadığını anlamak için 1 g agaroz, 100 mL TAE (Tris/Asetik asit/ EDTA) ve 4 µL red safety kullanılarak % 1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Hazırlanan jele 5 µL Ladder ve Pcr ürünleri 1 µL 6X Loading Dye ile 4 µL PZR ürünü karıştırılarak jele 5 µL yüklenilip 100V'da 30 dakika jelde yürütülmüştür. Yarım saat sonunda UV transliminatörde jel görüntülenmiştir.

İstenilen DNA fragmentleri jel üzerinden temiz bir ustura bıçağı yardımıyla kesilerek jel dilimi alınmıştır. 0,001 g hassasiyete sahip tartı yardımıyla kesilen jel dilimi tartılmıştır. 1,5-5mL'lik mikrosantrifüj tüpüne jel dilimi ve jel hacminin üç katı

kadar Gel Solubization Buffer (L3) konulmuştur. Mikrosantrifüj tüpü 50°C' de su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Jel çözünmesi tamamlanınca jel hacmi kadar izopropanol eklenmiştir. Quick Gel Extraction tüp+kolonu üzerine çözülmüş jel solüsyonu dikkatlice dökülmüştür. Quick Gel Extraction tüp+kolon 12000 g'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda Quick Gel Extraction tüpden kolon çıkarılarak tüp içindeki sıvı boşaltılmıştır. Quick Gel Extraction tüp üzerine geri kolon takılmıştır. Kolon üzerine ethanol ile hazırlanmış Wash Buffer 1 (W1)'den 500 µL konulmuştur. Quick Gel Extraction tüp+kolon 12000 g'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda Quick Gel Extraction tüpden kolon çıkarılarak tüp içindeki sıvı boşaltılmıştır. Quick Gel Extraction tüp üzerine geri kolon takılmıştır. Kolon üzerinde kalan sıvıyı Quick Gel Extraction tüpünü geçirmek için hızla 1-2 dakika hızla santrifüj yapılmıştır. Kolon yeni Quick Gel Extraction tüpüne konulmuştur. Kolon üzerine 50 µL Elution Buffer (E5) konulup oda ısısında 1 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 12000 g'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Kolon atılır ve tüpte kalan saf DNA kullanılabilece kadar -20°C' de saklanmıştır.

5.4.2.3. Restriksiyon enzimi ile çift yönlü kesim

Elde edilen saf DNA, 10 Fast Digestion Green Buffer, Fast Digest Enzyme ve streil su uygun miktarlarda karıştırılmıştır. Karışım nazikçe karıştırıp spin yapılmıştır. Karışım 37°C' de 5 dakika su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Böylece DNA'ya restriksiyon enzimi kullanılarak ikili kesimi yapılmıştır.

pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektörünün 10 Fast Digestion Green Buffer, Fast Digest Enzyme ve streil su uygun miktarlarda karıştırılmıştır. Karışım nazikçe karıştırıp spin yapılmıştır. Karışım 37°C' de 5 dakika su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Böylece pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektörü restriksiyon enzimi kullanılarak ikili kesimi yapılmıştır.

5.4.2.4. Ligasyon

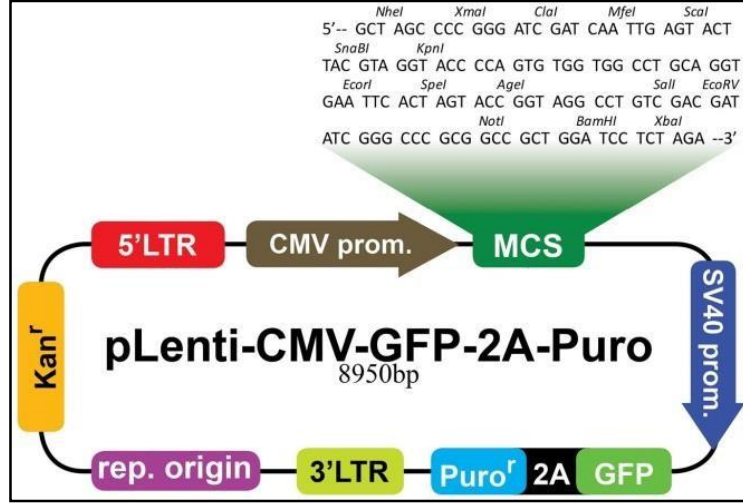
Restriksiyon enzimi ile kesilen saf DNA ve pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektörün ligasyonu için Rapid DNA Ligation Kiti kullanılmıştır. Ligasyon işlemi klonlanacak PZR ile amplifiye edilmiş DNA dizisi ile klonlamada aracı vektör olarak kullanılacak plazmit DNA'sının kovalent bağ oluşturarak birleştirilmesi işlemidir.

Restriksiyon enzimi ile kesilen saf DNA ve pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektörü, 5X rapid buffer, T4 DNA ligase (5 U/ μ L) ve su belirli oranlarda tüpe eklenip karıştırılmıştır. Karışım spin yapıp 22°C’ de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

5.4.2.5. Plazmid üretimi ve Transformasyon

Ligasyon reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünler ısı şoku metodu uygulanarak kompetant bakteri içerisine sokulması işlemidir.

Lentiviral sistemi içerisine yerleştirilecek olan ve GFP içeren Lenti-GDNF ve Lenti-VEGF plazmidlerini çoğaltmak için öncelikle *E.coli* Stb13 bakteri suşuna transforme edilmiştir. Bu işlemi öncelikle LB Broth (Klonlamada kullanılan plazmitlerin sahip olduğu antibiyotik direnç genine uygun antibiyotik ilave edilerek hazırlanmıştır.) besi ortamına ilave edildi sıvı besiyeri içerisine önceden belirlenmiş bir miktarda bakteri koyularak bir gece boyunca 37°C’de çalkalayıcı içinde inkübe edilmesiyle başlanılmıştır. Bu karışımdan 300 μ l alınarak daha büyük bir hacimde LB Broth içine konulup bakteri hücrelerinin çoğaltılması sağlanmıştır. 37°C’de 4 saat çalkalayıcıda inkübe edilen hücreler, 10 dakika buz üstünde bekletildikten sonra 4000 g’de 4°C’de 5 dakika santrifüje tabi tutulup, süpernatantı atıldıktan sonra 15 ml CaCl₂ (60 mM) eklenilmiştir. Daha sonra 30 dakika buz üstünde bekletilip 4000 g’de 4°C’de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Ardından süpernatanta 1,5 ml CaCl₂ eklenip yavaşça karıştırılmıştır. Bu karışım 250 μ l olacak şekilde tüplere ayrılarak, her bir tüpe 40 ng ligasyon ürünü eklenmiştir. Karışım 30 dakika buz üstünde bekletilip 42°C’de 45 saniye inkübe edildikten sonra 5 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Her bir tüpe 1 ml SOC besiyeri eklenilip çalkalayıcıda 37°C’de 1 saat bekletildikten sonra, 100 μ l alınarak petri kaplarındaki agar besiyerine ekilerek 37°C’de 1 gece inkübe edilmiştir. Çoğaltılan bakteriler dondurulup stoklar halinde saklanmıştır.



Şekil 5.4.2.5.1 Lentiviral vektör plazmid

5.4.2.7. Koloni seçimi ve doğrulaması

Etrafindan iyi izole olmuş bir plazmid kolonisi seçilmiştir. Plasmid izolasyonu için bir miktar transforme olmuş bakteri LB Broth içinde bir gece çalkalayıcıda bekletilmiştir. Çoğalan bakteriler 5500 rpm' de 10 dakika santrifüj sonrası süpernatant atılıp pellet hücrelerin üzerine 250 µL Resuspension çözeltisi eklendikten sonra peletler pipet yardımıyla süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon olan peletlerin üzerine 250 µL Lysis çözeltisi eklenerek 4-6 kez alt üst edilip karıştırılmıştır. Daha sonra üzerine 350 µL neutralization çözeltisi eklenerek 4-6 kez alt üst edilip karıştırılıp 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Mikrosantrifüj tüpüne GeneSpin kolon yerleştirilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kolon üzerine aktarılıp 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında mikrosantrifüj tüpünde toplanan sıvı atılıp kolon tekrar mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Kolon tüpü Wash çözeltisi ile yıkanıp 30-60 saniye boyunca santrifüj edilmiştir. Kolon yeni mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek üzerine 50 µL Elution Buffer eklenmiştir. 2 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında kolon atılıp mikrosantrifüj tüpünde toplanan temizlenmiş plazmid kullanılabilece kadar 20 °C'de saklanılmıştır.

Elde edilen temizlenmiş plazmid DNA, 10 Fast Digestion Green Buffer, Fast Digest Enzyme ve steril su uygun miktarlarda karıştırılmıştır. Karışım nazikçe karıştırılıp spin yapılmıştır. Karışım 37°C'de 5 dakika su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Böylece temizlenmiş plazmid DNA'nın restriksiyon enzimi yardımıyla

ikili kesim yapılmıştır. Daha sonra %1'lik agaroz jelde ikili kesimi yapılmış temiz plazmid DNA yürütülerek DNA fragmentleri gözlenmiştir.

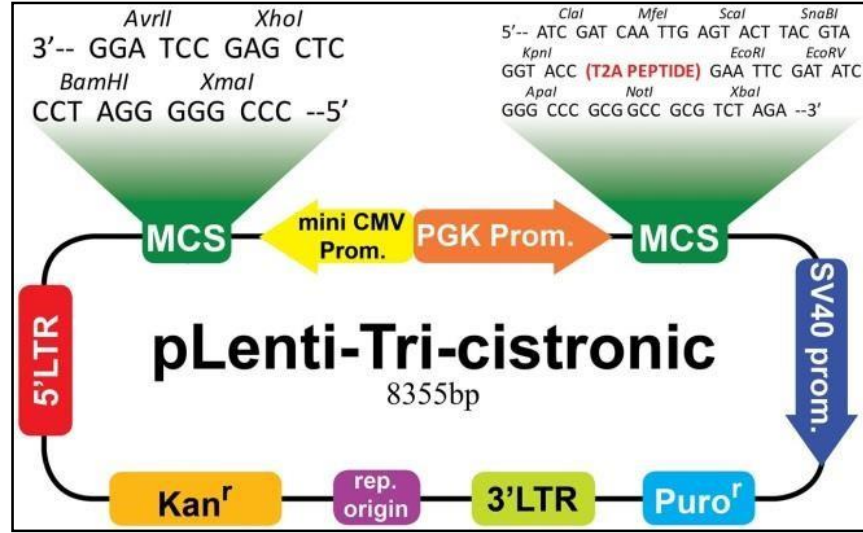
5.4.3. Pseudovirüs Üretimi

5.4.3.1. Lentiviral vektörlerin üretilmesi

GDNF ve VEGF genlerini taşıyan lentivirüs yapılarının üretilmesi için HEK293T (İnsan Embriyonik Böbrek) hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücre hattı, lentivirüs üretimi için gerekli viral partiküllerle transfekte edildiğinde virüs üretilme kapasitesine sahip bir paketleme hücre hattıdır. Kültür kaplarına yapışma kapasitesi çok yüksek değildir ve kolayca yüzeyden ayrılabilir.

Çalışmaya ilk olarak Lentiviral vektörlerin üretimi için 293T hücrelerinin ekimi ile başlanılmıştır. Bu aşama; 293 T hücrelerinin büyütülmesi için üç adet semiconfluent T150 şişelerine DMEM, % 10 FBS, % 1 Glutamaks ve % 1 penisilinstreptomisin konulmuştur. Her bir 150 cm²'lik kaplar içerisinde 8 x 10⁶ yoğunlukta 293T hücresi bulunacak şekilde 25 ml DMEM, % 10 FBS, % 1 Glutamaks ve % 1 penisilin-streptomisin içeren besiyeri konulmuştur. Mikroskop altında yaklaşık %30-40 miktarda, düzenli ve eşit dağılımlı olduğu gözlemlenmiştir.

Hazırlanmış terapötik geni içeren plazmidler, PAX paketleme plazmidini ve PMD2 (VSV-G ifade eden zarf plazmidini) plazmidleri Lentifektin ile kombine edilerek serum içermeyen hazırlanmış DMEM besiyerindeki hücrelere verilmiştir. Daha sonra 48 saat besiyerinde inkübasyona bırakılmıştır. 48 saatin sonunda medyum toplanmıştır. Sonra üzerine yeni medyum konulmuş olup 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saatin sonunda medyum toplanmıştır. 37°C'de 48 saat % 5 CO₂'lik doku kültür inkübatöründe inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında medyum toplanılmıştır. Sonra üzerine yeni medyum konularak tekrar 37°C'de 48 saat % 5 CO₂'lik doku kültür inkübatöründe inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında medyum toplanılmıştır. Toplanan medyumlar 25°C'de 10 dakika 500 g' de santrifüj yapılmıştır. 250 mL 0,45 mM PES filtre balonunun içine süpernatantlar toplanmıştır.



Şekil 5.4.3.1.1 Lentiviral vektör plazmid

5.4.3.2. Ultrasantrifügasyon ile Lentiviral vektör stoklarının konsantrasyonu

Ultra temiz santrifüj tüpü %70'lik etanol ile temizlendikten sonra laminer akış davlumbazının içinde UV ışığı altında 30 dakika bekletilmiştir. Ultra temiz santrifüj tüplerinin her birine 32 mL filtre edilmiş vektör içeren süpernatantlar konulmuştur. En fazla 12 mL % 20'lik sükröz çözeltisi konulmuştur. Her bir tüpün ağırlığı birbirinden 0,1 g fark olacak şekilde PBS konularak ayarlanmıştır. Tüpler 25.000 rpm' de 41°C'de 2 saat santrifüj edilmiştir. Tüpleri ultra santrifüj rotorundan dikkatlice çıkarıldı, tüplerden süpernatantlar boşaltıldı ve 10 dakika boyunca ters çevrilmiş bir kağıt havlu üzerine bırakılmıştır. Her pelete Ca / Mg olmadan 100 ml PBS eklenmiştir. Ultra santrifüj tüpleri 50 ml'lik konik tüplerin içine yerleştirilip kapak ile kapağı kapatılmıştır. Tüpler 4°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında her 20 dakikada yavaşça girdaplar yapılmıştır. Vektörü içeren sıvıyı toplamak için tüpleri 500 g'de 25°C'de 1 dakika döndürülmüştür. Kabarcık oluşturmadan pelet sıvıyı yavaşça yukarı ve aşağı pipetleyerek tekrardan süspanse edilmiştir. Yeniden süspanسیون haline gelmiş sıvıları bir ultra santrifüj tüpünde birleştirilmiştir.

5.4.5. Viral Transdüksiyon

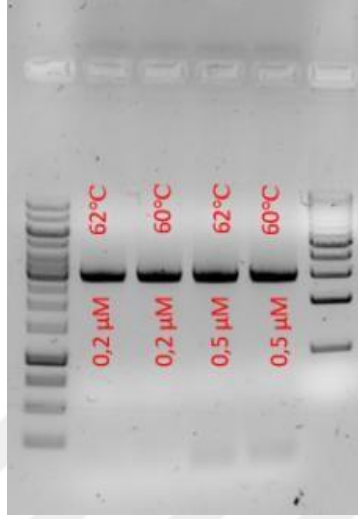
İzole edilmiş ve karakterizasyonu yapılmış hücreler % 10 FBS ve %1 PSA içeren DMEM besiyeri içerisine ekimi yapıp 37°C'de % 5 CO₂ inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında büyüme besiyeri polibren (2µg/ml) içeren besiyeri ile

değiştirilip farklı oranlarda üretilmiş olan terapötik genleri içeren ve kontrol GFP genini bulunduran virüslerden eklenilmiştir. Daha sonra hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücre besiyeri puromisin (plasmidi almış hücreler için seçici antibiyotik) içeren büyüme besiyeri ile değiştirilmiştir.



6. BULGULAR

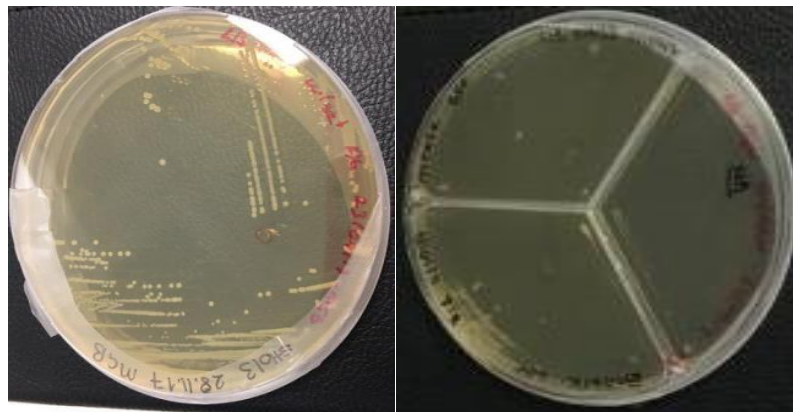
6.1. cDNA'dan PCR yöntemiyle full length *MERTK* amplifikasyonu



Resim 6.1.1 Full length *MERTK* amplifikasyonunun jel görüntüsü.

SH-SY5Y hücre hattından izole edilen RNA'dan cDNA sentezlendikten sonra PZR yöntemi kullanılarak *MERTK* genine uygun primerler ile full length *MERTK* amplifikasyonunu elde edilmiştir. Elde edilen PZR amplifikasyonları %1'lik agaroz jelde görüntüsü Resim 6.1.1'de görüntülenmiştir.

6.2. Üretilen plazmidlerin transformasyonu sonucu koloni seçimi ve doğrulaması



Resim:6.2.1 Plazmid kolonilerinin görüntüleri

Restriksiyon enzimi ile PZR amplifikasyon ürünü ve pLenti-CMV-GFP-2APuro vektörü çift yönlü kesildikten sonra ligasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ligasyon

ürününün *E.coli* stbl3 suşuna transformasyonu sonrasında elde edilen koloniler ve koloniler içinden istediğimiz koloniyi doğru şekilde seçilip seçilmediği resim 6.2.1’de gösterilmektedir.

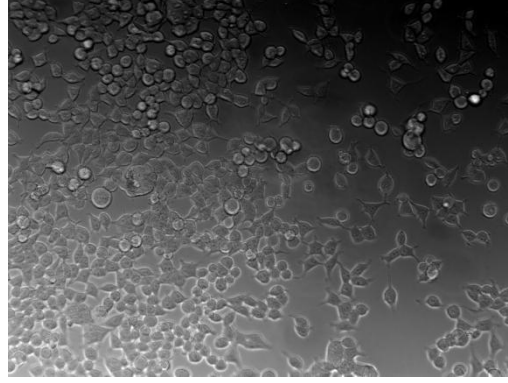
6.3. Koloni doğrulama



Resim 6.3.1 Transformasyon işleminden sonra seçilen koloniden elde edilen plazmid DNA'nın jel görüntüsü.

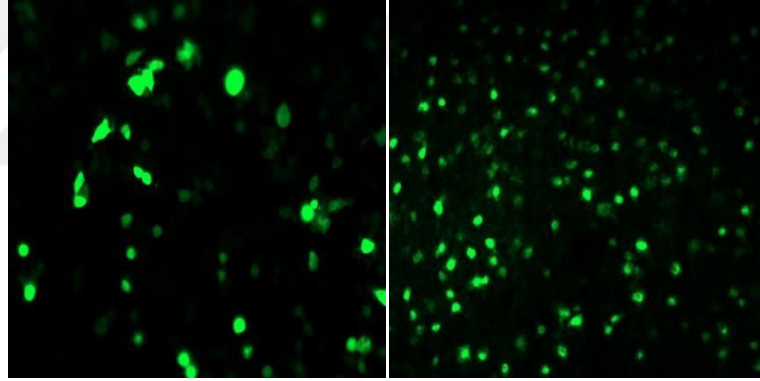
Resim 6.3.1’e göre birinci kuyuda vektör, ikinci kuyuda 1 kb’lık marker ve üçüncü kuyuda transformasyone sonrasında elde edilen plazmid DNA'nın ikili kesim sonucunda elde edilen bantları mevcuttur.

6.4. Lentiviral vektörlerin üretilmesi



Resim 6.4.1 Virüs üretmeye uygun HEK 293T hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü

Resim 6.4.1'de, lentiviral vektör üretilmeden önceki HEK 293T hücrelerinin mikroskop görüntüsüdür.



Resim 6.4.2 Virüs üreten hücrelerin görüntüsü

Resim 6.4.2'deki ilk resim lentiviral vektör üretiminden sonra çoğalması için 48 saat sonraki inkübasyon sonunda elde edilen vektörün HEK 293T hücrelerini enfekte ettiğini gösteren floresans filtreli görüntüsüdür. İkinci resimde de 72. saat sonunda elde edilen vektörün HEK 293T hücrelerini enfekte ettiğini gösteren floresans filtreli görüntüsüdür.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmada *MERTK* geninin iletilmesinde kullanılacak olan lentiviral vektörlerin üretilmesi, çoğaltılması ve hücre hattına iletilmesinde istenilen başarıyı elde etme hedefimizi literatürdeki çalışmalar ile desteklemekteyiz.

Literatürlerde yer alan *MERTK* geninin mutasyonu sonucunda görülen hastalıklar üzerinde yapılan genetik tedavi çalışmalarında çeşitli viral vektörlerin üretildiği görülmektedir. Ancak kullandıkları bazı viral vektörlerin gen tedavisinde istenmeyen sonuçlar sergilediğinden bahsedilmektedir [176,177,178,179]. Lentiviral vektörlerin diğer viral vektörlere kıyasla gen aktarma kapasitesinin yüksek olduğu, daha özel ve etkili aktarıma uygun olduğu, transgen ekspresyonunun hızla başladığı ve uzun vadeli olduğu da literatürlerde yer almaktadır [180,181,182].

MERTK geninin iletilmesinde kullanılacak olan lentiviral vektörlerin üretilmesi, çoğaltılması ve hücre hattına iletilmesi amacıyla gerçekleştirdiğimiz çalışmada uygulanan her aşama ve literatürlerdeki benzer çalışmalar hakkında bilgiler aşağıda mevcuttur.

SH-SY5Y hücre hattından RNA izolasyonu yaparak RNA elde edilip, RNA'dan Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. cDNA, *MERTK* genine özgü primerler ve İProof Hihg-Fidelity PCR kit kullanılarak *MERTK* genini PZR yöntemiyle kullanılarak çoğaltılmıştır.

Çoğaltılmış PCR ürünleri agaroz jelde görüntülenmiştir (Resim 6.1.1). Literatürlerdeki *MERTK* geninin üretim protokü ile kıyaslandığında uyumlu olduğu görülmüştür.

Vollrath et al. [176], Retinal distrofi fenotipinin iyileştirilmesi amacıyla *MERTK* genini RCS sıçanına adenoviral vektör kullanarak gerçekleştirdikleri gen transferi çalışmasında, RCS sıçanlarının nöral retinasından cDNA sentezleyip elde ettikleri cDNA'den PZR yöntemi kullanarak 3019 bp'lik *MERTK* genini üretmişlerdir.

Smith et al. [178]. AAV aracılı gen transferi ile pigmentosaya sahip RCS sıçanlarındaki fotoreseptör kaybını yavaşlatmak amacıyla yaptıkları çalışmada, farenin retinasından cDNA sentezleyip elde ettikleri cDNA'den PZR yöntemi kullanarak 3037 bp'lik *MERTK* genini üretmişlerdir.

Restriksiyon enzimi ile *MERTK* geni ve pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektörü çift yönlü kesildikten sonra Rapid DNA Ligation Kiti kullanılarak ligasyon gerçekleştirilmiştir. Transformasyonda kullanılacak *E.coli* stb13 elde edilen plazmidlerin sahip olduğu antibiyotik direnç genine uygun antibiyotik eklenmiş besi yerinde çoğaltılmıştır. Elde edilen ligasyon ürünü *E.coli* stb13 suşuna yüklenip ısı şoku uygulanarak transformasyon gerçekleştirilmiştir.

Resim 6.2.1' deki ilk resimde transformasyon sonrası petri kabındaki plazmid kolonilerinin içinden *MERTK* genini içinde barındırdığını düşündüğümüz plazmid kolonisi seçildi. İkinci resimde de seçilen plazmidin doğru seçilip seçilmediğini anlamak için yaptığımız antibiyotik diyagramın gösterimidir.

Transformasyon sonrasında elde edilen plazmid kolonilerin izolasyonu yapıp restriksiyon enzimi ile çift yönlü kesimi yapılarak agaroz jelde yürütülüp görüntülenmiştir (Resim 6.3.1).

Elde edilen *MERTK* genini içeren plazmid DNA ile PAX ve PMD2 paketleme plazmidleri birleştirilerek HEK 293T hücre hattı kullanılarak lentiviral vektör üretilip inkübasyona bırakarak çoğaltılmıştır.

Resim 6.4.1' de, lentiviral vektör üretilmeden önceki HEK 293T hücrelerinin mikroskop görüntüsüdür.

Resim 6.4.2' deki ilk resim lentiviral vektör üretiminden sonra çoğalması için 48 saat sonraki inkübasyon floresans filtreli görüntüsüdür. İkinci resimde de 72. saat sonundaki lentiviral vektörlerin floresans filtreli görüntüsüdür.

Elde edilen lentiviral virüsler ultrasantrifüj ile saflaştırılıp transdüksiyonu gerçekleştirilmiştir. Literatürlerde var olan lentiviral vektör üretimi, çoğaltılması ve

hücre hattına iletimi yöntemi ile çalışmamız kıyaslandığında kullanılan sarf malzemeler de farklılıklar olsa da yöntem ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Tschernutter et al. [182], *MERTK* geninin mutasyonu sonucunda meydana gelen retinitis pigmentosa hastalığının uzun vadede iyileştirilmesi için lentiviral aracılı gen tedavisi çalışmalarında, farenin retinasından cDNA sentezleyip elde ettikleri cDNA'den PZR yöntemi kullanarak 3037 bp'lik *MERTK* genini üretmişlerdir. Ürettikleri *MERTK* genini pHR'SIN-cPPT-SEW vektörüne klonlayıp paketleme plazmidleri ile birlikte 293T hücrelerine transfekte ederek vektör üretimini gerçekleştirmişler. Daha sonra elde ettikleri vektörleri inkübasyona bırakarak çoğaltıp ultrasantrifüj ile saflaştırdıktan sonra fare retinasına iletmışlerdir.

Ana hedefler kapsamında tez çalışmasından elde edilen sonuçlar bir bütün halinde sunulmuş ve maddeler halinde öngörülen hedeflerin başarısı değerlendirilmiştir.

HEDEF I: *MERTK* geninde meydana gelen mutasyonları iyileştirmek için gerekli olan sağlıklı *MERTK* geninin Lentiviral yöntem kullanılarak üretilmesi hedeflenmiştir.

GERÇEKLEŞME: SH-SY5Y hücre hattından izole edilen RNA'dan sentezlenen cDNA PCR yöntemi ile çoğaltılarak agaroz jeldeki *MERTK* genine ait fragmentlerinden *MERTK* geni elde edilmiştir (Resim 6.1.1). Aynı restriksiyon enzimi ile kesilen vektör ve *MERTK* geni ligasyonu yapıp *Stbl3* bakterisine transforme edilmiştir. Transforme işleminden sonra elde edilen plazmidlerin besiyerinde çoğalması ve uygun koloninin seçimi gerçekleştirilmiştir (Resim 6.2.1). Koloniden elde edilen plazmid DNA temizlendikten sonra jel üzerinden yürütülüp plazmid DNA varlığı gözlenmiştir (Resim 6.3.1). Plazmid DNA ile paketleme plazmidleri ile birleştirerek lentiviral vektör üretimi gerçekleştirilmiştir (Resim 6.4.1).

HEDEF II: Lentiviral yöntem ile üretilen sağlıklı *MERTK* geninin çoğaltılması hedeflenmiştir.

GERÇEKLEŞME: Lentiviral vektörünün üretiminden sonra 72 saat boyunca çoğalması gözlenmiştir (Resim 6.4.1, Resim 6.4.2).

HEDEF III: Çoğaltılan *MERTK* geninin uygun hücre hattına iletilmesi hedeflenmiştir.

GERÇEKLEŞME: Ultrasantrifüj ile saflaştırılan Lentiviral yöntem ile üretilen sağlıklı *MERTK* geninin içinde bulunduğu izole edilmiş ve karakterizasyonu yapılmış hücreler % 10 FBS ve % 1 PSA içeren DMEM besiyeri içerisine ekimi yapıp 37°C’ de % 5 CO₂ inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında büyüme besiyeri polibren (2µg/mL) içeren besiyeri ile değiştirilip farklı oranlarda üretilmiş olan terapötik genleri içeren ve kontrol GFP genini bulunduran virüslerden eklenilmiştir. Daha sonra hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücre besiyeri puromisin (plasmidi almış hücreler için seçici antibiyotik) içeren büyüme besiyeri ile değiştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında; SH-SY5Y hücre hattından elde edilen *MERTK* geninin pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektörüne klonlanıp uygun paketleme plazmidleri ile birlikte 293T hücre hattına verilerek lentivirüs vektörü üretilmiş, inkübasyona bırakılarak çoğaltılmış ve hedeflenen hücreye iletimi başarıyla gerçekleştirilmiştir. İleride yapılmasını planladığımız *MERTK* geni ile ilgili gen tedavisi çalışmalarında tez kapsamında elde ettiğimiz *MERTK* geninin lentiviral vektör ile hücre hattına aktarılma metodunu kullanarak gerçekleştirmemize yardımcı olabileceği sonucuna varılmıştır.

8. KAYNAKLAR

1. Mutation, Mutagens, and DNA Repair Outline, <http://www-personal.ksu.edu/~bethmont/mutdes.html>
2. Lodish H, Baltimore D, et al. Molecular Cell Biology 4th edition. Media Connected. 2000.
3. Fry JW, Wood KJ. Gene therapy: potential applications in clinical transplantation, *Exp Rev Mol Med* 8 June, 1999.[Electronic Journal], Erişim: [<http://www.expertreviews.org/99000691h.html>]
4. Kaufmann K, Buning H, Galy A, Schambach A, Grez M. Gene therapy on the move. *EMBO Mol Med*.5, 1642–1661,2013.
5. Patil PM. Review Article on Gene Therapy. *International Journal of Genetics*, ISSN: 0975-2862 & E-ISSN: 0975-9158, Volume 4, Issue 1, pp.-7479,2012.
6. Akhtar N, Akram M, Asif HM, Usmanghani K, Shah SMA, Rao SA, Uzair M, Shaheen G, Ahmad K. Gene therapy: A review article. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(10), pp. 1812-1817, 18 May, 2011.
7. Wolff JA, Lederberg J. An early history of gene transfer and therapy. *Hum Gene Ther*. 5(4):469-80,1994.
8. Wade N. Gene therapy caught in more entanglements. *Science*. 212(4490): 21-4,1981.
9. Rolland AP. From genes to gene medicines: recent advances in nonviral gene delivery, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 15(2): 143-198,1998.
10. Keeler AM, Elmallah MK, Flotte TR. Gene Therapy 2017: Progress and Future Directions. Citation: *Clin Transl Sci*. 10, 242–248,2017.
11. Canver MC. Evaluation of the Clinical Success of Ex Vivo and In Vivo Gene Therapy. *J Young Invest*. 19(7):1-10,2009.

- 12.** Ramamoorth M, Narvekar A. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 01-06,2015.
- 13.** Midoux P, Pichon C, Yaounac JJ, Jaffres PA. Chemical vectors for gene delivery; a recent review of histidine or imidazole containing polymers, peptides and lipids as nucleic acid carriers. *Br J Pharmacol*. 157 (2): 166-78,2009
- 14.** Walther W, Stein U. *Viral Vectors for Gene Transfer*. Max-DelbrückCenter for Molecular Medicine, Berlin, Germany. Aug; 60 (2): 249-271,2000.
- 15.** Hasan N, Saini S. Gene Therapy: Current status and future perspective. *International Journal of Pharma Sciences and Research*. 586-593,2014.
- 16.** Wolff JA, Malone RW, Williams P. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. 247:1465-68,1990.
- 17.** Hirai H, Satoh E, Osawa M, Inaba T, Shimazaki C, Kinoshita S, et al. Use of EBV-based vector/ HVJ-liposome complex vector for targeted gene therapy of EBV-associated neoplasms. *Biochem Biophys Res Commun*. 241:112–8,1997.
- 18.** Robertson ES, Ooka T, Kieff ED. Epstein-Barr virus vectors for gene delivery to B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:11334–40.
- 19.** Castellani S, Conese M. Lentiviral Vectors and Cystic Fibrosis Gene Therapy. *Viruses*. 2, 395-412,2010.
- 20.** Naldini L, Blomer U, Gally P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267,1996b.
- 21.** Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat. Genet*. 17, 314-317,1997.
- 22.** Cereseto A., Giacca M. Integration site selection by retroviruses. *AIDS Rev*. 6, 13-21,2004.

- 23.** Ciuffi A. Mechanisms governing lentivirus integration site selection. *Curr. Gene Ther.* 8, 419-429,2008.
- 24.** Baekelandt V, Eggermont K, Michiels M, Nuttin B, Debyser Z. Optimized lentiviral vector production and purification procedure prevents immune response after transduction of mouse brain. *Gene Ther.* 10, 1933-1940,2003.
- 25.** Linger RM, Keating AK, Earp HS, Douglas KG. TAM Receptor Tyrosine Kinases, Biologic Functions, Signaling, and Potential Therapeutic Targeting in Human Cancer. *Adv Cancer Res.* 100: 35-83,2008.
- 26.** Strick DJ, Vollrath D. Focus on molecules, MERTK. *Exp Eye Res.* 91: 786-787,2010.
- 27.** Graham DK, Dawson TL, Mullaney DL, Snodgrass HR, Earp HS. Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth Differ.* 5(6):647- 57,1994.
- 28.** Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, Arnout J, Dewerchin M, Hoylaerts M, Herbert J, Collen D, Dahlbäck B, Carmeliet P. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med.* 7(2):215-21,2001.
- 29.** Behrens EM, Gadue P, Gong SY, Garrett S, Stein PL, Cohen PL. The mer receptor tyrosine kinase: expression and function suggest a role in innate immunity. *Eur J Immunol.* 33(8):2160-7,2003
- 30.** Weier HU, Fung J, Lersch RA. Assignment of protooncogene MERTK (a.k.a. c-mer) to human chromosome 2q14.1 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 84 (1-2), 91-92,1999.
- 31.** Gal A, Li Y, Thompson DA. Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 26:270-27,2000.
- 32.** Graham DK, Bowman GW, Dawson TL, Stanford WL, Earp HS,

Snodgrass HR. Cloning and developmental expression analysis of the murine c-mer tyrosine kinase. *Oncogene*. 10:2349–2359,1995.

33. Georgescu MM, Kirsch KH, Shishido T, Zong C, Hanafusa H.

Biological effects of c-Mer receptor tyrosine kinase in hematopoietic cells depend on the Grb2 binding site in the receptor and activation of NF-kappaB. *Mol. Cell Biol*. 19:1171–1181,1999.

34. Ling L, Kung HJ. Mitogenic signals and transforming potential of Nyk,

a newly identified neural cell adhesion molecule-related receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell Biol*. 15:6582–6592,1995.

35. D’Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail

MM, Vollrath D. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum. Mol. Genet*. 9:645–651,2000.

36. Duncan JL, Yang H, Vollrath D, Yasumura D, Matthes MT, Trautmann

N, Chappelov AV, Feng W, Earp HS, Matsushima GK, LaVail MM. Inherited retinal dystrophy in *Mer* knockout mice. *Adv. Exp. Med. Biol*. 533:165–172,2003.

37. Ghazi NG, Abboud EB, Nowilaty SR, Alkuraya H, Alhommadi A, Cai

H, Hou R, Deng WT, Boye SL, Almaghamsi A, Al Saikhan F, Al-Dhibi H, Birch D, Chung C, Colak D, LaVail MM, Vollrath D, Erger K, Wang W, Conlon T, Zhang K, Hauswirth W, Alkuraya FS. Treatment of retinitis pigmentosa due to *MERTK* mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: results of a phase I trial. *Hum Genet* 2016; [PMID: 26825853].

38. Rong-mei Peng, Jing Hong, Ying Jin, Yu-zhao Sun, Yi-qian Sun, Pei

Zhang. *Mertk* gene expression and photoreceptor outer segment phagocytosis by cultured rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Molecular Vision*. 23:8-19,2017.

39. Binder MD, Kilpatrick TJ. TAM receptor signalling and demyelination.

Neurosignals. 17: 277-287,2009

- 40.** Brea-Fernández AJ, Pomares E, Brión MJ. et al Novel splice donor site mutation in MERTK gene associated with retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 92:1419–1423,2008.
- 41.** Charbel Issa P, Bolz HJ, Ebermann I. et al Characterisation of severe rod-cone dystrophy in a consanguineous family with a splice site mutation in the MERTK gene. *Br J Ophthalmol* 93:920–925,2009.
- 42.** Ksantini M, Lafont E, Bocquet B. et al Homozygous mutation in MERTK causes severe autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Eur J Ophthalmol* 22:647–653,2012.
- 43.** Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA. et al Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell*. 1: 133-43,2002.
- 44.** Ek S, Hogerkorp CM, Dictor M, Ehinger M, Borrebaeck CA. Mantle cell lymphomas express a distinct genetic signature affecting lymphocyte trafficking and growth regulation as compared with subpopulations of normal human B cells. *Cancer Res*. 62: 4398-405,2002.
- 45.** Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y. et al Differential gene expression signatures between colorectal cancers with and without KRAS mutations: crosstalk between the KRAS pathway and other signalling pathways. *Eur J Cancer* 47:1946–1954,2011.
- 46.** Wu YM, Robinson DR, Kung HJ. et al Signal pathways in upregulation of chemokines by tyrosine kinase MER/NYK in prostate cancer cells. *Cancer Res*. 64: 7311-20,2004.
- 47.** Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*. 451: 147-52,2008.
- 48.** Wu CW, Li AF, Chi CW. et al Clinical significance of AXL kinase family in gastric cancer. *Anticancer Res*. 22: 1071-8,2002.

- 49.** Khan J, Bittner ML, Saal LH. et al cDNA microarrays detect activation of a myogenic transcription program by the PAX3-FKHR fusion oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 13264-9,1999.
- 50.** Keating AK, Kim GK, Jones AE. et al Inhibition of Mer and Axl receptor tyrosine kinases in astrocytoma cells leads to increased apoptosis and improved chemosensitivity. *Mol Cancer Ther;* 9: 1298-307.
- 51.** Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell;* 17: 98-110.
- 52.** Evans CO, Young AN, Brown MR, et al. Novel patterns of gene expression in pituitary adenomas identified by complementary deoxyribonucleic acid microarrays and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab.* 86: 3097-107,2001.
- 53.** Gyorffy B, Lage H. A Web-based data warehouse on gene expression in human malignant melanoma. *J Invest Dermatol.* 127: 394-9,2007.
- 54.** Tworkoski KA, Platt JT, Bacchiocchi A. et al MERTK controls melanoma cell migration and survival and differentially regulates cell behavior relative to AXL. *Pigment Cell Melanoma Res* 26:527–541,2013.
- 55.** Huchtagowder V, Meyer R, Mullins C. et al Resequencing analysis of the candidate tyrosine kinase and RAS pathway gene families in multiple myeloma. *Cancer Genet* 205:474–478,2012.
- 56.** Greenman C, Stephens P, Smith R. et al Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446:153–158,2007.
- 57.** Hurtado B, Muñoz X, Recarte-Pelz P. et al Expression of the vitamin K-dependent proteins GAS6 and protein S and the TAM receptor tyrosine kinases in human atherosclerotic carotid plaques. *Thromb Haemost* 105:873–882,2011.

- 58.** Weinger JG, Omari KM, Marsden K. et al Up-regulation of soluble Axl and Mer receptor tyrosine kinases negatively correlates with Gas6 in established multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol* 175:283–293,2009.
- 59.** Rosen A, Casciola-Rosen L. A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation. *Nat Med.* 7: 664-665,2001.
- 60.** Merdan T, Kopecek J, Kissel T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliv Rev*, 54, 715-758,2002.
- 61.** Soofiyani S, Baradaran B, Lotfipour F, Kazemi T, Mohammadnejad L. Gene Therapy, Early Promises, Subsequent Problems, and Recent Breakthroughs. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(2), 249-255,2013.
- 62.** Friedmann T. A brief history of gene therapy. *Nature Genetics.* 2:9398,1992.
- 63.** Misra S. Human Gene Therapy : A Brief Overview of the Genetic Revolution. *JAPI.* 127-133,2013.
- 64.** Anderson WF. Human gene therapy. *Nature.* 392, 25-30,1998.
- 65.** Baltimore D. Viral RNA-dependent DNA polymerase: RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature.* 226(5252):1209-11,1970.
- 66.** Check EA. A tragic setback. *Nature.*420, 116-118,2002.
- 67.** Eichler F et al. Hematopoietic Stem-Cell Gene Therapy for Cerebral Adrenoleukodystrophy. *N Engl J Med*, 377:1630-8, 2017.
- 68.** Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics.* 3rd ed. New york: Garland Publishing; 2004.
- 69.** Mathews QL, Curiel DT. Gene Therapy: Human Germline Genetics Modifications-Assessing the Scientific, Socioethical, and Religious Issues. *Southern Medical Journal.* 100:98-100,2007.

- 70.** Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced Biomedical Research*.1-27,2012.
- 71.** Wolf E, Scherthaner W, Zakhartchenko V, Prella K, Stojkovic M, Brem G. Transgenic technology in farm animals-progress and perspectives. *Exp Physiol*. 85:615–25,2000.
- 72.** Johnson-Saliba M, Jans DA. Gene therapy: Optimising DNA delivery to the nucleus. *Curr Drug Targets*. 2:371–99,2001.
- 73.** Jaenisch R. Transgenic animals. *Science*. 240:1468–74,1988.
- 74.** Smith KR. Gene Therapy: The Potential Applicability of Gene Transfer Technology to the Human Germline. *Int J Med Sci*. 1:76–91,2004.
- 75.** Torres M. The use of embryonic stem cells for the genetic manipulation of the mouse. *Curr Topics Dev Biol*. 36:99–114,1998.
- 76.** Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by micro-injection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 77:7380–4,1980.
- 77.** John PL, Kevin C, Joaquin G. Sperm and testis mediated DNA transfer as a means of gene therapy. *Syst Biol Reprod Med*. 57:35–42,2011.
- 78.** Kevin S, Corrado S. Sperm-mediated gene transfer: Applications and implications. *BioEssays*. 27:551–62,2005.
- 79.** Bank A. Human Somatic Cell Gene Therapy. 18:999-1007,1996.
- 80.** Brenner MK. Human somatic gene therapy: progress and problems. *J Intern Med*. 237(3):229-39,1995.
- 81.** Gould DJ, Favorov P. Vectors for the treatment of autoimmune disease. *Gene Ther*. 10(10):912-27,2003.
- 82.** Mountain A. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol*. 18(3):119-28,2000.

- 83.** Rosenberg SA, Aebbersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, et al. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med.* 323(9):570-8,1990.
- 84.** Templeton, NS. *Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies.* New York: CRC Press; 2008
- 85.** <http://www.biologydiscussion.com/gene/therapy/gene-therapy-exvivo-and-in-vivo-gene-therapy-with-diagram/9969>
- 86.** Gregory-Evans K, Bashar AM, Tan M. Ex vivo gene therapy and vision. *Curr Gene Ther.* 12(2):103-15,2012.
- 87.** Rejali D, Lee VA, Abrashkin KA, Humayun N, Swiderski DL, Raphael Y. Cochlear implants and ex vivo BDNF gene therapy protect spiral ganglion neurons. *Hear Res.* 228(1-2):180-7,2007.
- 88.** Herrero MJ, Sabater L, Guenechea G, Sendra L, Montilla AI, Abargues R, et al. DNA delivery to 'ex vivo' human liver segments. *Gene Ther.* 2011 in press.
- 89.** Suhonen J, Ray J, Blömer U, Gage FH, Kaspar B. Ex vivo and *in vivo* gene delivery to the brain. *Curr Protoc Hum Genet.* 13 Unit 13.3,2006.
- 90.** <http://www.biologydiscussion.com/gene/therapy/gene-therapy-exvivo-and-in-vivo-gene-therapy-with-diagram/9969>
- 91.** Al-Dosari MS, Gao X. Non viral gene delivery: Principle, limitations and recent progress. *AAPS J.* 11(4):671–81,2009.
- 92.** Gascon AR, Pozo-Rodriguez AD, Solinis MA. Non viral delivery systems in gene therapy. In *Gene therapy –tools and potential application.* 2013 www.inthechopen.com [Assessed on March 31st 2014]
- 93.** Herweiger H, Wolff JA. Progress and prospects: naked gene transfer and therapy. *Gene ther.* 10:453–58,2003.

- 94.** Audouny SA, Deleij LF, Hoekstra D, Molema G. In vivo characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy. *Pharm Res.* 19:1599–6005,2002.
- 95.** Varga CM, Hong K, Lanf Furburger DA. Quantitative analysis of synthesis gene delivery vector design properties. *Mol Ther.* 4:438–46,2001.
- 96.** Li SD, Huang SL. Gene therapy progress and prospects; Decade strategy. *Gene Ther.* 13:1313–19,2006.
- 97.** Shirley S, Heller R, Heller L. In Gene therapy of cancer. 3rd edition. Sandiego[USA]: Elsevier. Electroporation gene therapy; pp. 93–106,2013.
- 98.** Edited by lattime EC, Gerson SL. Klein TM, Arentzen R, Lewis PA, Fitzpatrick McElligoutt S. Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Biotechnology.* 10:286–91,1992.
- 99.** Cheng L, Ziegelhoffer PR, Yang NS. In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:4455–9,1993.
- 100.** Mc Mahon JM, Wells DJ. Electroporation for gene transfer to skeletal muscles: Current status. *Biol Drugs.* 18:155–65,2004.
- 101.** Newman CM, Bettinger T. Gene therapy progress and prospects: Ultrasound for gene transfer. *Gene ther.* 14(6):465–75,2007.
- 102.** Jiang J, Yamato E, Miyazaki J. Intravenous delivery of naked plasmid DNA for in vivo cytokine expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 289:1088–92,2001.
- 103.** Maruyama H, Higuchi N, Kameda S, Miyazaki J, Gejyo F. Rat liver targeted naked plasmid DNA transfer by tail vein injection. *Mol Biotechnol.* 26:165–72,2004.
- 104.** Li SD, Huang L. Non viral is superior to viral gene delivery. *J Cont releae.* 123[3]:181–83,2007.

- 105.** Yang J, Chen S, Huang L, Michalopoulos GK, Liu Y. Sustained expression of naked plasmid DNA encoding hepatocyte growth factor in mice promotes liver and overall body growth. *Hepatology*. 33:848,2001.
- 106.** Kim HJ, Greenleaf JF, Kinnick RR, Bronk JT, Bolander ME. Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Hum Gene Ther*. 7:1339–46,1996.
- 107.** Al-Dosari MS, Gao X. Non viral gene delivery: Principle, limitations and recent progress. *AAPS J*. 11(4):671–81,2009.
- 108.** Dabson J. Gene therapy progress and prospects; magnetic nano particle based gene delivery. *Gene therapy*. 13:283–87,2006.
- 109.** Jones CH, Chen CK, Ravikrishnan A, Rane S, Pfeifer BA. Overcoming non viral gene delivery barriers: perspective and future. *Mol Pharm*. 10(11):4082–98,2013.
- 110.** Herweiger H, Wolff JA. Progress and prospects: Hydrodynamic gene delivery. *Gene ther*. 14:99–107,2006.
- 111.** Hatada S, Nikkuni K, Bentley SA, Kirby S, Smithies O. Gene correction in hematopoietic progenitor cells by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:13807–11,2000.
- 112.** Hofmann GA, Dev SB, Nanda GS, Rabussay D. Electroporation therapy of solid tumors. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 16:523–69,1999.
- 113.** Gissel H, Clausen T. Excitation -induced Ca influx and skeletal muscle cell damage. *Acta Physiol Scand*. 171:327–34,2001.
- 114.** Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther*. 10:1258–66,1999.
- 115.** Miao CH, Ye X, Thompson AR. High level factor VIII gene expression *in vivo* achieved by nonviral liver-specific gene therapy vectors. *Hum Gen Ther*. 14:1297–305,2003.

- 116.** Su CH, WU YJ, Wang HH, Yeh HI. Non viral gene therapy targeting Cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 303:H629–38,2012.
- 117.** Jin L, Zeng X, Liu M, Deng Y, He N. Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano carriers. *Theranostics.* 4[3]:240–55,2014.
- 118.** Scherer F, Anton M, Schillinger U, Henke J, Bergemann C, Krüger A, et al. Magnetofection: Enhancing and targeting gene delivery by magnetic force *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther.* 9:102–9,2002.
- 119.** Plank C, Anton M, Rudolph C, Rosenecker J, Krötz F. Enhancing and targeting nucleic acid delivery by magnetic force. *Exp Opin Biol Ther.* 3:745–58,2003.
- 120.** Mair L, Ford K, Alam MR, Kole R, Fisher M, Superfine R, et al. SizeUniform 200 nm Particles: Fabrication and Application to Magnetofection. *J Biomed Nanotechnol.* 5:182–91,2009.
- 121.** Ziandy AG, Ferkol T, Dawson DV, Perlmutter DH, Davis PB. Chain length of the polylysine in receptor-targeted gene transfer complexes affects duration of reporter gene expression both *in vitro* and *in vivo*. *274:4908–16,1999.*
- 122.** Mastrobattista E, Koning GA, van Bloois L, Filipe AC, Jiskoot W, Storm G. Functional characterization of an endosome-disruptive peptide and its application in cytosolic delivery of immunoliposome-entrapped proteins. *J Biol Chem.* 277:27135–43,2002.
- 123.** Son KK, Tkaeh D, Hall KJ. Efficient *in vivo* gene delivery by the negatively charged complexes of cationic liposome and plasmid. *DNA Biochem Biophys Acta.* 1468:6–10,2000.
- 124.** Schnyder A, Huwyler J. Drug transport to brain with targeted liposomes. *NeuroRx.* 2:99–107,2005.

- 125.** Alton EW, Middleton PG, Caplen NJ, Smith SN, Steel DM, Munkonge FM, et al. Non-invasive liposome mediated gene delivery can correct the ion transport defect in cystic fibrosis mutant mice. *Nat Genet.* 5:135–42,1993.
- 126.** Zhu N, Liggitt D, Liu Y, Debs R. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science.* 261:209–11,1993.
- 127.** Yang G. Multifunctional non-viral delivery systems based on conjugated polymers. *Science of Macromolecular Biology.* 12: 1600-14,2012.
- 128.** Huang Y, Liu X, Dong L, Liu Z, He X, Liu W. Development of Viral Vectors for Gene Therapy for Chronic Pain. *Pain Res Treat.* 2011:968218,2011.
- 129.** Evans CH. Gene delivery to bone. *Adv Drug Deliv Rev* 64:1331–1340,2012.
- 130.** Gardlik R, Palffy R, Hodosy J, Lukacs J, Turna J, Celec P. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit.* 11:110–21,2005.
- 131.** Katare DP, Aeri V. Progress in gene therapy: A Review. *I.J.T.P.R.* 1:33–41,2010.
- 132.** Vannucci L, Lai M, Chiappesi F, Ceccherini-Nelli L, Pistello M. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiologica* 36:122,2013.
- 133.** Anson DS. The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vectormediated gene delivery. *Genet Vaccines Ther.* 2:9,2004.
- 134.** Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-XI. *Science.* 302:415–9,2003.
- 135.** Pohl M, Braz J. Gene therapy of pain: emerging strategies and future directions. *European Journal of Pharmacology.* 429(1–3):39–48,2001.

- 136.** Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M. Adenovirus, gen aktarımı için vektörler. *Biyoteknolojideki Güncel Görüş*. 10 (5): 440-447,1999.
- 137.** Volpers C, Kochanek S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med*. 6: 164-71,2004.
- 138.** Bett AJ, Prevec L, Graham FL. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol*. 67:5911–21,1993.
- 139.** Marshall E. Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*. 286:2244–5,1999.
- 140.** Report of the National, Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee. NIH Report. Assessment of adenoviral vector safety and toxicity. *Hum Gene Ther*. 13: 3-13,2002.
- 141.** Meager A (ed). Gene therapy technologies, applications and regulations. Wiley, New York,1999.
- 142.** Teramoto S, Ishii T, Matsuse T. Crisis of adenoviruses in human gene therapy. *Lancet*. 355:1911–2,2000.
- 143.** Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr Gene Ther*. 11:321–330,2011.
- 144.** Kay M.A., Glorioso J.C., Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med*. 7, 33-40,2001.
- 145.** Coura Rdos S., Nardi N.B. The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virol. J*. 7, 12,2010.
- 146.** Smith R.H. Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther*. 15, 817-822,2008.
- 147.** Roizman B., Knipe D., Whitley R. Herpes simplex viruses, p. 25012602. In: H.P. Knipe DM, ed. *Fields Virology*, 5th ed ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia,2007.

- 148.** Chou J, Kern ER, Whitley RJ, et al. Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to γ 134.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science*. 250: 1262-6,1990.
- 149.** International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>
- 150.** Coffin JM, Hughes SH, Varmus H. 1997. *Retroviruses*: Cold Spring Harbor. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19376/(accessed 1 August 2012)
- 151.** Adamson CS, Jones IM. The molecular basis of HIV capsid assembly- five years of progress. *Reviews in medical virology*. 14(2):107–21,2012.
- 152.** Bukrinsky MI, Haffar OK. HIV-1 nuclear import: in search of a leader. *Front. Biosci.* 4, 772-781,1999.
- 153.** Freed E.O. HIV-1 replication. *Somat. Cell Mol. Genet.* 26, 13-33,2001.
- 154.** Naldini L. and Verma I.M. Lentiviral vectors, in *The Development of Gene Therapy* (Friedmann, T., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA,1999.
- 155.** Katz RA, Skalka AM. The retroviral enzymes. *Annual review of biochemistry*. 63:133–73,1994.
- 156.** Pluta K, Kacprzak MM. Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta biochimica Polonica*. 56(4):531–95,2009.
- 157.** Dropuli B. Lentiviral vectors: their molecular design, safety, and use in laboratory and preclinical research. *Hum. Gene Ther.* 22, 649-657,2011.
- 158.** Howarth JL, Youn Bok Lee Y, Uney JB. Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting. *Cell. Biol. Toxicol.* 6, 1-20,2010.
- 159.** Matrai J, Chuah MK, Vandendriessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol. Ther.* 18, 477-490,2010.

- 160.** Federico M. Lentivirus Gene Engineering Protocols. Methods in Molecular Biology, vol. 229,2003.
- 161.** Freed E.O. HIV-1 replication. Somat. Cell Mol. Genet. 26, 13-33,2001.
- 162.** Tripathy MK, Abbas W, Herbein G. Epigenetic regulation of HIV-1 transcription. Epigenomics. 3, 487-502,2011.
- 163.** Stankovich J, Kilpatrick TJ, Binder MD, Field J. Polymorphisms in the receptor tyrosine kinase MERTK gene are associated with multiple sclerosis susceptibility.PloS One 2011
- 164.** Sather S, Kenyon KD, Lefkowitz JB, Liang X, Varnum BC, Henson PM, Graham DK. A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation. Blood. 109: 10261033,2007.
- 165.** Binder MD, Xiao J, Kemper D, Ma GZ, Murray SS, Kilpatrick TJ. Gas6 increases myelination by oligodendrocytes and its deficiency delays recovery following cuprizone-induced demyelination. PloS one 6 2011
- 166.** Ling L, Templeton D, Kung HJ. Identification of the major autophosphorylation sites of Nyk/Mer, an NCAM-related receptor tyrosine kinase. J. Biol. Chem. 271:18355–18362,1996.
- 167.** Colland F, Jacq X, Trouplin V, Mougín C, Groizeleau C, Hamburger A, Meil A, Wojcik J, Legrain P, Gauthier JM. Functional proteomics mapping of a human signaling pathway. Genome Res. 14:1324–1332,2004.
- 168.** Mahajan NP, Earp HS. An SH2 domain-dependent, phosphotyrosine-independent interaction between Vav1 and the Mer receptor tyrosine kinase: a mechanism for localizing guanine nucleotide-exchange factor action. J. Biol. Chem. 278:42596–42603,2003.

- 169.** Chen J, Carey K, Godowski PJ. Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene*. 14:2033–2039,1997.
- 170.** Sen P, Wallet MA, Yi Z, Huang Y, Henderson M, Mathews CE, Earp HS, Matsushima G, Baldwin AS Jr, Tisch RM. Apoptotic cells induce Mer tyrosine kinase-dependent blockade of NFkappaB activation in dendritic cells. *Blood*. 15;109(2):653-60,2007.
- 171.** Linger RMA, Keating AK, Earp HS, Graham DK. TAM Receptor Tyrosine Kinases: Biologic Functions, Signaling, and Potential Therapeutic Targeting in Human Cancer. *Advances in Cancer Research*. 35-83,2008.
- 172.** Tschernutter M, Jenkins SA, et al Waseem NH. Clinical characterisation of a family with retinal dystrophy caused by mutation in the Mertk gene. *Br J Ophthalmol* 90:718–723,2006.
- 173.** McHenry CL, Liu Y, Feng W. et al MERTK arginine-844-cysteine in a patient with severe rod-cone dystrophy: loss of mutant protein function in transfected cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:1456–1463,2004.
- 174.** Tada A, Wada Y, Sato H. et al Screening of the MERTK gene for mutations in Japanese patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 12:441–444,2006.
- 175.** Li L, Xiao X, Li S, Jia X, Wang P, Guo X. Detection of variants in 15 genes in 87 unrelated Chinese patients with Leber congenital amaurosis. *PLoS One* 6:e19458;2011
- 176.** Vollrath D et al. Correction of the retinal dystrophy phenotype o the RCS rat by viral gene transfer of Mertk. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 12584–12589,2001.
- 177.** Reichel MB et al. Immune responses limit adenovirally mediated gene expression in the adult mouse eye. *Gene Therapy* 1998; 5: 1038–1046.

- 178.** Smith AJ et al. AAV-Mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther.* 8: 188–195,2003.
- 179.** Grieger JC, Samulski RJ. Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps. *J Virol.* 79: 9933–9944,2005.
- 180.** Bainbridge JW et al. In vivo gene transfer to the mouse eye using an HIV-based lentiviral vector; efficient long-term transduction of corneal endothelium and retinal pigment epithelium. *Gene Therapy.* 8:1665–1668,2001.
- 181.** Hashimoto T, Gibbs D, Lillo C, Azarian SM, E Legacki E, Zhang XM, Yang X-J, Williams DS. Lentiviral gene replacement therapy of retinas in a mouse model for Usher syndrome type 1B. *Gene Therapy.* 14, 584–594,2007.
- 182.** Tschernutter M, Schlichtenbrede FC, Howe S, Balaggan KS, Munro PM, Bainbridge JWB, Thrasher AJ, Smith AJ, Ali RR. Long-term preservation of retinal function in the RCS rat model of retinitis pigmentosa following lentivirus-mediated gene therapy. *Gene Therapy.* 12, 694–701,2005.

7. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Aslı Güner	Soyadı	ÖZTÜRK DEMİR
Doğum Yeri	Yeşilyurt	Doğum Tarihi	21.05.1988
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	
E-mail	agdemir@medipol.edu.tr	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	İnönü Üniversitesi	2012
Lise	Malatya Cumhuriyet Lisesi	2005

İş Deneyim Durumu

	Görevi	Kurum	Süre
1.	Proje Teknisyeni	İstanbul Medipol Üniversitesi	12 ay
2.	İdari Personel	İstanbul Medipol Üniversitesi	14 ay
3.			

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

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu								
KPDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOFEL PBT	TOFEL CBT	FCE	CAE	CPE

Başarılımış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; YDS: Yabancı Dil Bilgisi Seviye Tespit Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	80,91567	75,69655	68,38780
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanım becerisi
MS OFFİCE	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer