



**MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE MANYETİK
HİPERTERMİ VE GEN TERAPİSİ İLE DUAL TERAPİ
YAKLAŞIMI**

Fatma TURHAN

Yüksek Lisans Tezi

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Gen Mühendisliği Bilim Dalı**

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER
İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet MAVİ
2022**

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI
GEN MÜHENDİSLİĞİ BİLİM DALI

**MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE MANYETİK HİPERTERMİ VE GEN TERAPİSİ
İLE DUAL TERAPİ YAKLAŞIMI**

(Dual Therapy Approach with Magnetic Hyperthermia and Gene Therapy in Breast Cancer Treatment)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma TURHAN

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER
İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet MAVİ

Erzurum
Eylül, 2022

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Fatma TURHAN tarafından hazırlanan “Meme Kanseri Tedavisinde Manyetik Hipertermi ve Gen Terapisi ile Dual Terapi Yaklaşımı” başlıklı çalışması 23/08/2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Gen Mühendisliği Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ahmet MAVİ Aslı Islak İmzalıdır.
Atatürk Üniversitesi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER Aslı Islak İmzalıdır.
Atatürk Üniversitesi

Jüri Üyesi: Prof.Dr. Harun BUDAK Aslı Islak İmzalıdır.
Atatürk Üniversitesi

Jüri Üyesi: Doç.Dr. Aslı YILMAZ Aslı Islak İmzalıdır.
Atatürk Üniversitesi

Jüri Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk ANAKÖK Aslı Islak İmzalıdır.
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

İkinci Tez Prof. Dr. Ahmet MAVİ Enstitü Yönetim Kurulunun
Danışmanı *Atatürk Üniversitesi*/....../.... tarih ve
sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır.

Bu çalışma Tübitak 1001 projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: 118Z150

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak *Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER* danışmanlığında sunulan “Meme Kanseri Tedavisinde Manyetik Hipertermi ve Gen Terapisi ile Dual Terapi Yaklaşımı” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	0	30
Kuramsal Temeller	2	30
Materyal ve Yöntem	10	35
Araştırma Bulguları	2	20
Tartışma ve Sonuç	5	20
Tezin Geneli	5	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Fatma TURHAN	Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER
2022	2022
İmza: Aslı Islak İmzalıdır.	İmza: Aslı Islak İmzalıdır.

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamda bana her konuda destek sağlayan çok değerli danışman hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER ve Sayın Prof. Dr. Ahmet MAVİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda bilgi birikimlerinden, önerilerinden yaralandığım, hiçbir zaman yardımlarını ve desteklerini eksik etmeyen sahip olduğum en iyi ekip arkadaşlarım Sayın Kübra SOLAK'a, Sayın Melek ACAR'a ve Sayın Şeyda YILDIZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımı yürüttüğüm Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) bünyesinde çalışan hocalarıma ve aynı çalışma ortamını paylaştığım kıymetli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, 118Z150 no'lu Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 1001 projesi kapsamında yapılmıştır. Aynı zamanda 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı (ARDEB)'na ve Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'na teşekkür ederim.

Beni her zaman destekleyen, maddi ve manevi yardımlarını eksik etmeyen en değerli varlığım olan aileme ve dostlarım Hatice, Özlem ve Sümeyye'ye teşekkür ederim.

Fatma TURHAN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE MANYETİK HİPERTERMİ VE GEN TERAPİSİ İLE DUAL TERAPİ YAKLAŞIMI

Fatma TURHAN

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yağmur ÜNVER
İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet MAVİ

Amaç: Bu çalışmada meme kanseri için kullanılmaya aday hedeflenebilir, etkili ve özgün bir yaklaşım olan manyetik hipertermi indüksiyonlu gen terapisi (dual terapi) yönteminin geliştirilmesi amaçlandı.

Yöntem: Öncelikle ısı ile indüklenebilir promotöre (HSP promotörü; P_{HSP}) sahip rekombinant pHSP-GFP elde edildi. Daha sonra durdurma kodonu içeren kodon optimize azurin geninin, pHSP-GFP'ye klonlanmasıyla pHSP-Azu elde edildi. Elde edilen rekombinant DNA'lar Sanger veya yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing) ile doğrulandı. Çalışmada gen aktarım ve hipertermi aracı olarak kullanılacak olan manyetik ve biyo-uyumlu nanopartiküllerin (MSNP-NH₂) TEM, DLS ve VSM analizleriyle karakterizasyonları yapıp, AC manyetik alan altında ısıtma kapasitesi belirlendi. MSNP-NH₂'lerin plazmit DNA'ları bağlama ve salma yetenekleri DLS ölçümü ve jel elektroforezi ile tespit edildi. Manyetofektinler (MSNP-NH₂+DNA+PEI) mıknatıs yardımı ile hücrelere gönderildi (manyetofeksiyon). Transfeksiyon etkinliği konfokal mikroskop, akış sitometrisi ve spektrofotometrik ölçüm ile belirlendi. Ayrıca manyetik hiperterminin tümörjenik (MCF-7) ve tümörjenik olmayan (MCF-10A) hücre hatları üzerindeki etkisi hücre canlılığı testi (MTS) ile ortaya konuldu. Son olarak, hipertermi ve gen terapisinin uygulandığı hücrelerde ikili terapinin etkinliği, apoptoz testi ve Real-Time PCR (qRT-PCR) ile gösterildi.

Bulgular: Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre MSNP-NH₂'lerin plazmit DNA'ları tutabildiği ve hücre içinde bırakabildiği görüldü. P_{HSP} 'nin inkübatör veya AC manyetik alan aracılığıyla indüklenebildiği ve hedef proteinlerin hücre içerisinde üretilabildiği belirlendi. Dual terapi uygulanan hücrelerde hem apoptoz testi hem de qRT-PCR ile belirlenen BAX/BCL2 oranlarına göre MCF-7 hücrelerinin apoptotik olmayan yolla öldüğü tespit edildi.

Sonuç: Bu çalışmada, dual terapinin MCF-10A üzerindeki etkisinin sınırlı olduğu, MCF-7 üzerindeki etkisinin ise daha fazla olduğu gösterildi. Ayrıca hücrelerin apoptotik yola kıyasla nekrotik yolu daha çok tercih ettiği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Manyetik hipertermi, gen terapisi, dual terapi, manyetofeksiyon, meme kanseri

Eylül 2022, 116 sayfa

ABSTRACT

MASTER'S THESIS

DUAL THERAPY APPROACH WITH MAGNETIC HYPERTHERMIA AND GENE THERAPY IN BREAST CANCER TREATMENT

Fatma TURHAN

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Yağmur ÜNVER

Co-supervisor Prof. Dr. Ahmet MAVİ

Purpose: In this study, it was aimed to develop magnetic hyperthermia induction gene therapy (dual therapy), which is a targetable, effective and unique approach for breast cancer.

Method: First, recombinant pHSP-GFP with a heat-inducible promoter (HSP promoter; P_{HSP}) was obtained. Then, pHSP-Azu was obtained by cloning the codon-optimized azurin gene containing the stop codon into pHSP-GFP. The resulting recombinant DNAs were confirmed by Sanger or Next Generation Sequencing. In the study, magnetic and biocompatible nanoparticles (MSNP-NH₂), which will be used as a gene transfer and hyperthermia tool, were characterized by TEM, DLS and VSM analyses and their heating capacity under AC magnetic field was determined. The ability of MSNP-NH₂s to bind and release plasmid DNA was determined by DLS measurement and gel electrophoresis. Magnetofectins (MSNP-NH₂+DNA+PEI) was sent to the cells with the help of magnet (magnetofection). Transfection efficiency was determined by confocal microscopy, flow cytometry and spectrophotometric measurement. In addition, the effect of magnetic hyperthermia on tumorigenic (MCF-7) and non-tumorigenic (MCF-10A) cell lines was revealed by cell viability test (MTS). Finally, the efficacy of dual therapy in cells with hyperthermia and gene therapy was demonstrated by apoptosis test and Real-Time PCR (qRT-PCR).

Findings: According to the data obtained from the study, it was seen that MSNP-NH₂s could hold plasmid DNAs and leave them in the cell. It was determined that P_{HSP} could be induced by incubator or AC magnetic field and target proteins could be produced inside the cell. According to the BAX/BCL2 ratios determined by both apoptosis test and qRT-PCR in the dual therapy cells, it was determined that MCF-7 cells died in a non-apoptotic way.

Results: This study showed that the effect of dual therapy on MCF-10A was limited, while the effect on MCF-7 was greater. In addition, it was observed that the cells preferred the necrotic pathway more than the apoptotic pathway.

Keywords: Magnetic hyperthermia, gene therapy, dual therapy, magnetofection, breast cancer

September 2022, 116 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	xii
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	4
Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri.....	4
Hedefe yönelik tedavi	5
Gen terapisi	7
Manyetik hipertermi tedavisi	17
MATERYAL VE METOT.....	23
Kullanılan Cihazlar	23
Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	24
Kullanılan Besiyeri, Çözelti ve Tamponların Hazırlanması	25
Tasarlanan primerler ve Restriksiyon Enzimleri.....	26
pCaSpeR-hs/act Plazmit DNA'sının Doğrulanması	26
Plazmit izolasyonu	26
Plazmit DNA'nın PCR reaksiyonu ile doğrulanması	27
Plazmit DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi.....	27
pHSP-GFP'nin Elde Edilmesi.....	28
P _{HSP} 'nin PCR ile amplifikasyonu.....	28
Ligasyon reaksiyonu	31
<i>E. coli</i> JM109 hücrelerinin transformasyonu	31
Koloni PCR.....	32
Muhtemel rekombinat plazmitlerin sekans analizi ile doğrulanması.....	33
pHSP-Azu'nun Elde Edilmesi	34

Azurin Genine ait nükleotit sekansının PCR ile amplifikasyonu	34
Ligasyon Reaksiyonu ve transformasyon	35
Koloni PCR	36
Muhtemel rekombinat plazmitlerin sekans analizi ile doğrulanması.....	37
Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Nitelendirilmesi.....	37
Floresan etiketli NP'lerin üretimi	38
MSNP'lerin DNA Bağlama ve Salım Yeteneği.....	39
MCF-7 ve MCF-10A Hücre Hatlarının Kültürü	39
Hücre alımının belirlenmesi.....	40
Hücre morfolojilerinin kontrolü.....	40
Proliferasyon ve sitotoksitesite testleri	41
Apoptoz testi	41
Transfeksiyon ve Promotör Kontrolü.....	42
MHT Optimizasyon Çalışmaları	43
Dual Terapi Uygulamaları.....	43
Kantitatif Gen Ekspresyon (Real-Time PCR) Analizi	44
Total RNA izolasyonu.....	45
cDNA sentezi	45
Real-Time PCR	46
ARAŞTIRMA BULGULARI	47
pCaSpeR-hs/act Plazmit DNA'sının Doğrulanması	47
Plazmit DNA'nın PCR Reaksiyonu ile doğrulanması	47
Plazmit DNA'nın Restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi	47
pHSP-GFP'nin Elde Edilmesi.....	48
Koloni PCR.....	48
Muhtemel rekombinat plazmitin sekans analizi ile doğrulanması.....	49
pHSP-Azu'nun Elde Edilmesi	51
Koloni PCR	52
Muhtemel rekombinat plazmitlerin sekans analizi ile doğrulanması.....	53
Manyetik NP'lerin Üretimi ve Yüzey Modifikasyonları	54
MSNP'lerin DNA Bağlama ve Salım Yeteneği.....	57
Hücre alımının Belirlenmesi.....	59
Hücre Morfolojilerinin Kontrolü.....	61
Manyetik NP'lerin Sitotoksitesitesi	63
Transfeksiyon ve Promotör İndüksiyonu	64

MHT Optimizasyonları	68
Dual Terapi Uygulamaları.....	73
TARTIşMA VE SONUÇ.....	80
Sonuç ve Öneriler.....	84
KAYNAKLAR.....	88
ÖZGEÇMİş.....	101



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. FDA Tarafından Meme Kanseri Tedavisi İçin Onaylanan Bazı İlaçlar	5
Tablo 2. Ticari Olarak Temin Edilen Klinik Olarak Onaylanmış Demir Oksit Nanopartiküller.....	20
Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Cihazların İsimleri, Marka ve Model Bilgileri	23
Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Kitlerin İsimleri ve Markaları.....	24
Tablo 5. Çalışmada Kullanılan Besiyeri, Çözelti ve Tamponların Hazırlanışı.....	25
Tablo 6. Klonlama Deneyleri İçin Tasarlanan Primerler.....	26
Tablo 7. Kesim Enzimlerinin Tanıma Sekansları ve Kesim Noktaları.....	26
Tablo 8. PCR Reaksiyonu Karışım İçeriği	27
Tablo 9. PCR Reaksiyon Şartları.....	27
Tablo 10. Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği.....	28
Tablo 11. PCR Reaksiyon Karışım İçeriği	29
Tablo 12. PCR Reaksiyon Şartları.....	29
Tablo 13. Kesim Reaksiyon Karışım İçeriği.....	30
Tablo 14. Ligasyon Reaksiyonu Karışım İçeriği	31
Tablo 15. Koloni PCR Reaksiyonu Karışım İçeriği	32
Tablo 16. Koloni PCR Reaksiyon Şartları.....	32
Tablo 17. Koloni PCR Reaksiyonu Karışım İçeriği	33
Tablo 18. Koloni PCR Reaksiyon Şartları.....	33
Tablo 19. Gradyan PCR reaksiyonu karışım içeriği.	34
Tablo 20. Gradyan PCR Reaksiyon Şartları	35
Tablo 21. Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği.....	35
Tablo 22. Ligasyon Reaksiyonu Karışım İçeriği	36
Tablo 23. Koloni PCR Reaksiyon Karışım İçeriği	36
Tablo 24. Koloni PCR Reaksiyon Şartları.....	36
Tablo 25. Koloni PCR Reaksiyon Karışım İçeriği	37
Tablo 26. Koloni PCR Reaksiyon Şartları.....	37
Tablo 27. cDNA Sentez Reaksiyon Karışımı	45
Tablo 28. qRT-PCR’da Kullanılan İnsana Ait Primer-Prob Karışımlarına Ait Bilgiler	46
Tablo 29. qRT-PCR Reaksiyon İçeriği.....	46
Tablo 30. qRT-PCR Reaksiyon Şartları	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Meme kanseri hastalığında uygulanan bazı hedefe yönelik tedavi türlerinin listesi.....	6
Şekil 2. Gen terapisinde kullanılan vektörlerin şematik gösterimi	8
Şekil 3. Azurinin birincil yapısı	16
Şekil 4. Manyetik hipertermi tedavisinin şematik gösterimi.....	18
Şekil 5. AC manyetik alana yanıt olarak manyetik NP'lerin farklı termal enerji üretim mekanizmaları	19
Şekil 6. Manyetik hipertermi tedavisinin antitümör terapötik etkinliğini iyileştirme stratejilerini gösteren şema.....	20
Şekil 7. Manyetik hipertermi cihazı	38
Şekil 8. Mıknatıs ile hücrelere manyetofektinin uygulamasına ait fotoğraf	42
Şekil 9. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	47
Şekil 10. pCaSpeR-hs/act plazmitine ait kesim reaksiyonu sonucu.....	47
Şekil 11. İnkübasyon sonunda gelişen bakteri kolonileri.....	48
Şekil 12. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonrası görüntüsü.....	48
Şekil 13. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	49
Şekil 14. Muhtemel rekombinant plazmitin agaroz jel elektroforez görüntüsü	49
Şekil 15. pHSP-GFP Sanger sekans analizi ile elde edilen nükleotid sekansının blast sonucu.....	50
Şekil 16. pHSP-GFP ve pCaSpeR-hs/act plazmitlerine ait NGS analizi	51
Şekil 17. pHSP-GFP'nin SnapGene'de çizilen haritası	51
Şekil 18. A. Azurin genine ait gradyan PCR sonucu	52
Şekil 19. İnkübasyon sonunda gelişen bakteri kolonileri.....	52
Şekil 20. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	53
Şekil 21. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	53
Şekil 22. Plazmit DNA'ya ait forward ve reverse primerleriyle gerçekleştirilen Sanger sekans analizi sonucu elde edilen nükleotid sekansının blast sonucu	54
Şekil 23. pHSP-Azu'nun SnapGene'de çizilen haritası	54
Şekil 24. Suda dağıtılan MSNP-NH ₂ 'nin zeta potansiyel grafiği	55
Şekil 25. MSNP-NH ₂ 'lerin boyut ve morfoloji analizi	55
Şekil 26. Suda dağıtılan MSNP-NH ₂ 'lere ait görüntüler	56
Şekil 27. MSNP-NH ₂ 'lerin AC manyetik alan altındaki davranışı	56

Şekil 28. MSNP-NH ₂ 'ye ait VSM sonucu	57
Şekil 29. Manyetofektin gruplarına ait agaroz jel elektroforez sonucu	58
Şekil 30. Manyetofektin için kullanılan bileşenlerin zeta potansiyellerinin karşılaştırılması..	58
Şekil 31. Manyetofektinlerin zeta potansiyeli sonuçları	59
Şekil 32. MCF-10A hücrelerinin konfokal mikroskop Z-kesit görüntüleri	60
Şekil 33. MCF-7 hücrelerinin konfokal mikroskop Z-kesit görüntüler	61
Şekil 34. MCF-7 hücrelerinin 48. saatte kaydedilen ters mikroskop görüntüsü	62
Şekil 35. MCF-10A hücrelerinin 48. saatte kaydedilen ters mikroskop görüntüsü	62
Şekil 36. Hücrelerin manyetofeksiyon sonrasında kaydedilen konfokal mikroskop görüntüleri	62
Şekil 37. MSNP-NH ₂ 'nin proliferasyon ve sitotoksosite sonucu	63
Şekil 38. PEI uygulaması yapılan MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinin 48 saat sonundaki MTS sonucu.....	63
Şekil 40. P _{HSP} kontrolüne ait akış sitometri sonuçları	65
Şekil 41. MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri	66
Şekil 42. MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinde 3 ve 6 saat indüksiyonla GFP üretimi.....	67
Şekil 43. MHT uygulaması sırasında ölçülen sıcaklık-zaman grafikleri	68
Şekil 44. MHT uygulaması sonucu ölçülen hücre canlılığı grafikleri	69
Şekil 45. MCF-7'ye ait sıcaklık optimizasyonu MTS sonuçları	70
Şekil 46. MSNP-NH ₂ 'nin MHT uygulaması altında doz denemesine ait apoptoz sonucu	71
Şekil 47. MSNP-NH ₂ 'nin MHT uygulaması altında doz denemesine ait apoptoz sonucu	72
Şekil 48. Tekrarlı MHT uygulamasına ait apoptoz sonucu	73
Şekil 49. MHT uygulamasına ait termal kamera görüntüleri	73
Şekil 50. Dual terapi uygulamasından 48 saat sonra çekilen hücre görüntüleri.....	74
Şekil 51. MCF-10A hücrelerinin dual terapi uygulamasından 48 saat sonra yapılan apoptoz testi sonuçları	74
Şekil 52. Dual terapi uygulanmış MCF-7 hücrelerinin 48 saatlik apoptoz testi sonuçları.....	75
Şekil 53. MCF-7 hücrelerinin dual terapi uygulamasından 48 saat sonra yapılan apoptoz testi sonuçları.....	76
Şekil 54. MCF-10A hücrelerinin dual terapi uygulamasından 48 saat sonra yapılan apoptoz testi sonuçları	77
Şekil 55. MCF-7 hücrelerinin dual terapi uygulamasından 48 saat sonra yapılan apoptoz testi sonuçları.....	78
Şekil 56. BCL2 ve BAX mRNA seviyelerini belirlemek üzere yapılan qRT-PCR sonuçları	79

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

AAV	Adeno-ilişkili virüs
AC	Alternating Current
AMF	AC manyetik alan
APTES	3-Aminopropil) trietoksisilan
bç	Baz çifti
CA	Sitrik asit
CIAP	Buzağı bağırsak alkali fosfataz (calf intestinal alkaline phosphatase)
CMD	Karboksilmetil-dekstran
DGRC	Drosophila Genomik Kaynak Merkezi (Drosophila Genomics Resource Center)
dk.	Dakika
DLS	Dinamik ışık saçılması
DNA	Deoksiribo nükleik asit
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
GFP	Yeşil floresan protein
HSV	Herpes simpleks virüsü
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IDT	Entegre DNA teknolojileri
MHT	Manyetik hipertermi
MNP	Manyetik nanopartikül
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
MSNP	Manyetik silika nanopartikül
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information)
NGS	Yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing)
TP53	Tümör protein 53
PAA	Poliamidoamin
PEG	Polietilen glikol

PEI	Polietilenimin
PFA	Paraformaldehit
rDNA	Rekombinant DNA
RNA	Ribonükleik asit
qRT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR)
SAR	Spesifik absorpsiyon oranı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SPION	Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
TEOS	Tetraetil ortosilikat
VSM	Titreşimli örnek manyetometre (Vibrating-sample magnetometer)

Simgeler

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
Fe	Demir
g	g-kuvveti
gr	Gram
l	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre

GİRİŞ

Dünya’da her beş kişiden birinin kansere yakalanması, bu hastalığın günümüzde en önemli halk sağlığı sorunlarından biri haline gelmesine sebep olmuştur. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı’nın (IARC) istatistikleri, 2018 yılından 2020 yılına kadar 19,3 milyon yeni vaka sayısına ulaşmış olup 10 milyon insanın kanserden dolayı ölümüyle sonuçlandığını göstermektedir. Yine IARC Ajansı’nın istatistiklerine göre, 2020 yılında 2,3 milyona yakın yeni meme kanseri vakası bildirilmiştir. Bu sonuca göre, her sekiz kişiden birinin meme kanseri olduğu görülmüştür ve meme kanserinin 2020 yılında 685.000 kişinin ölümüne sebep olduğu bildirilmiştir. Aynı ajansın öngörülerine göre, 2020 ve 2040 yılları arasında demografik değişiklikler nedeniyle kanser vakalarında %50’lik artış beklenmektedir (Globocan, 2020). Ölüme sebep olan kanser hastalıkları arasında beşinci sırada yer alan meme kanseri, birçok ülkede yeni vaka oranı (insidans) ve ölüm oranı (mortalite) açısından birinci sırada yer almaktadır. Kadınlarda sık görülen, malign (kötü huylu) tümör olan meme kanseri, bu hastalık sebebiyle hayatını kaybeden kadınların 1/6’sını oluşturmaktadır (Sung *et al.* 2021).

Dünya’da önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkan kanser, genlerde meydana gelen ardışık mutasyonlar sonucu hücre fonksiyonlarının değişmesiyle oluşmaktadır. Kimyasal bileşiklerin ve meydana gelen gen mutasyonlarının kanserli hücrelerin oluşumunda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Tüm kanserlerin yaklaşık %7’si ise virüsler, bakteriler ve radyasyon ışınlarından kaynaklanmaktadır (Parkin, 2006). Genel olarak kanser, hücrelerel ilişkilerin ve hayati genlerin fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır. Bu bozulmalar, anormal çoğalmaya neden olan hücre döngüsünde etkili olmaktadır (Knutsen, 1998; Seto *et al.* 2010). Normal koşullarda hücre bölünmesini ve büyümesini düzenleyen proto-onkogenler, çeşitli genetik mutasyonlar sonucu onkogenlere dönüşmektedir (Shtivelman *et al.* 1985). Genetik bozukluklara neden olan ve onkogen oluşumunda etkili olan genetik değişiklikler arasında kromozomal translokasyon, amplifikasyon, nokta mutasyonu, insersiyon ve delesyon yer almaktadır (Y. Zhang *et al.* 2010). Ayrıca, apoptozu etkileyen hücre içi ve hücre dışı yolların düzensizliği de kanser oluşumuyla ilgili kritik bir faktördür (Elmore, 2007).

Hemen hemen tüm meme kanserleri, memenin fonksiyonel birimi olan lobüller birimlerinde ortaya çıkmaktadır (Foote & Stewart, 1946). Ancak, meme kanserinin başlatıldığı mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Hücrelerel düzeyde, epigenetik değişiklikler ve kanser

kök hücrelerinin mekanizması durumu karmaşık hale getirmektedir (Bombonati & Sgroi, 2011).

Bitki ve hayvanlardan elde edilen ilaçlar, mikroorganizmalar ve onlardan elde edilen ürünler, kanser de dâhil olmak üzere birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisi açısından büyük katkı sağlamaktadır (Forbes, 2010; Guilford & Pezzuto, 2008; A. Harvey, 1998; Alan Harvey, 2000; Mehta *et al.* 2010; Mehta & Pezzuto, 2002). Günümüzde uygulanan kanser tedavi yöntemleri (örneğin kemoterapi), tümörlerin ilaca zamanla direnç geliştirmesi ve kanser hücrelerinin diğer sağlıklı dokulara yayılması (metastaz) nedeniyle yeterince etkili olamamaktadır (Iyer *et al.* 2013). Bu nedenle, etkili kanser tedavisi için yeni yöntemlere veya mevcut tedavi yöntemlerinin çeşitli kombinasyonlarla birlikte kullanılmasına (dual terapi) ihtiyaç duyulmaktadır. Birçok hastalığın tedavisinde ilaç olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olan, hedefe spesifik olarak bağlanan ve sağlıklı hücreler için düşük toksisite gösteren terapötik özellikteki peptit ve proteinler sağlık alanında oldukça önemli bir yere sahiptir (Joseph *et al.* 2017).

Bu bilgilerden yola çıkılarak, birden fazla tedavi yönteminin bir arada uygulanabildiği bir tedavi yaklaşımı, kanserle mücadelede etkili bir rol oynayabilir. Birden fazla ajanın terapötik amaçla bir araya getirilmesi noktasında son yıllarda büyük ilgi gören nano sistemler, bu anlamda oldukça kullanışlıdır. Nano sistemler, kontrollü bir şekilde programlanabilir ve hedef dokuda aktive edilerek önerilen tedavinin yan etkileri sınırlandırılabilir. Bu tez çalışmasında, manyetik nanopartikül (MNP) sistemi kullanılarak meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin manyetik hipertermi ile destekli bir gen terapisi yaklaşımı ile seçici olarak yok edilmesi amaçlandı. Gen terapi kapsamında, antikanser özelliğe sahip mikrobiyal kaynaklı azurin proteininin P_{HSP} kontrolü altında manyetik hipertermi aracılı ısı ile indüksiyonu sonucu ekspresyonu sağlandı. Bu yolla hücrelerde birçok yoldan (hipertermi, MNP ve azurin) eş zamanlı sitotoksik etki oluşturularak kanser hücrelerinin yok edilmesi hedeflendi. Bu doğrultuda;

- İki farklı rekombinant DNA hazırlandı;
 - a. pHSP-GFP; pCMV-GFP’de bulunan CMV promotörünün (P_{CMV}), P_{HSP} ile yer değiştirilmesiyle elde edildi. pHSP-Azu; tedavi amaçlı (dual terapi için) kullanılacak olan rekombinant plazmit DNA’dır. Taşıdığı P_{HSP} , sıcaklık artışına bağlı olarak akış aşağı (downstream) bölgesine yerleştirilen azurin geninin ekspresyonunu sağlayacaktır.

- b. pHSP-Azu; tedavi amaçlı (dual terapi için) kullanılacak olan rekombinant DNA'dır. Taşıdığı P_{HSP}, sıcaklık artışına bağlı olarak akış aşağı bölgesine yerleştirilen azurin geninin ekspresyonunu sağlayacaktır.
- P_{HSP} arkasına durdurma (stop) kodonu taşıyan ve taşımayan azurin geninin yerleştirilmesi ile pHSP-Azu elde edildi, bu plazmitler *E. coli* JM109 hücrelerinde klonlandı.
 - Gen aktarım ajanı olarak, yüzeyi pozitifleştirilmiş manyetik silika nanopartikülleri (MSNP-NH₂) kullanıldı. pHSP-Azu, MSNP-NH₂ ile bir araya getirilerek MSNP-NH₂/DNA kompleksi oluşturuldu (manyetofektin) ve elde edilen kompleks MCF-10A (kontrol) ve MCF-7 (tümörijenik) hücrelerine bir mikropipet yardımıyla transfer edildi.
 - Manyetik hipertermi uygulaması için, gen yüklü veya gen yüklenmeyen MSNP-NH₂ ile muamele edilmiş hücreler, belirli sürelerde manyetik alan altında tutuldu.
 - Dual terapi uygulanan hücrelerde sitotoksikite, proliferasyon ve hücre ölüm testleri yapıldı. Daha sonra, terapi yapılan hücrelerden total RNA izolasyonu yapıldı ve cDNA elde edildikten sonra apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenebilmesi için Real-time PCR (qRT-PCR) gerçekleştirildi.
 - 118Z150 numaralı proje kapsamında gerçekleştirilen bu tez çalışmasında hem kanserli dokuya hedeflenebilen hem de dual terapi (manyetik hipertermi + hipertermi indüksiyonlu azurin ekspresyonu) imkânı sağlayan ve daha önce uygulanmamış olan özgün bir yaklaşım ortaya konulmaktadır. Bu çalışmada ilk defa azurin terapötik geni içeren ve sıcaklık artışı ile indüklenebilir bir rekombinant plazmit kullanıldı. Rekombinant plazmiti taşıyan MSNP'leri alan hücrelerde, AC manyetik alan uygulaması sonucunda sıcaklık artışıyla birlikte ilk defa kanser hücrelerinde azurin ekspresyonu gerçekleştirildi. Dolayısıyla kanser tedavisinde önemli bir işleve sahip olan azurin proteininin ilk defa kanser hücrelerinde terapi amacıyla ekspresyonu ve gen terapisinin MHT ile desteklenmesi, bu çalışmanın özgün yanlarıdır.

KURAMSAL TEMELLER

Meme Kanseri Tedavi Yöntemleri

Meme kanseri, moleküler düzeyde heterojen bir hastalıktır. Sadece memede bulunan veya koltukaltı lenf düğümlerine yayılan kanser olan erken meme kanseri tedavi edilebilmektedir. Hastaya tanı konulduktan sonra asıl amaç, hastalığın kontrol altına alınmasıdır. Metastaz yeteneği olmayan meme kanserinde amaç hastanın sağ kalımını sağlamak, metastaz riskini en aza indirmek ve semptomların ortadan kaldırılmasını sağlayıp hastanın eski yaşam kalitesini yeniden kazanmasını sağlamaktır. Metastatik meme kanserindeyse, semptomları azaltarak hastanın sağ kalım süresinin uzatılması amaçlanmaktadır (Rahman, 2011).

Meme kanseri tedavisi, bu hastalığın en yaygın alt türlerinin moleküler mekanizmalarının ve yolaklarının aydınlatılmasıyla, son yıllarda önemli ilerlemeler kaydetmiştir. Meme kanseri için geleneksel tedavi seçenekleri arasında yer alan ve vücudun geri kalanını etkilemeden tümörü tedavi eden cerrahi yöntem, tümörün metastaz yapması durumunda yetersiz kalmaktadır. Radyasyon tedavisi, tümörün küçülmesi ya da tamamen yok olması için güçlü enerji dalgalarını ileterek tümör hücre bölünmesini hedeflerken, kemoterapinin amacı tümör hücresi büyümesine ve bölünmesine müdahale etmektir. Cerrahi yöntemle birlikte radyoterapi ve kemoterapi, meme kanseri alt tiplerinde tedavi amacıyla kullanılmaktadır (Nofech-Mozes *et al.* 2009). Kemoterapi ve radyoterapi, hayatta kalma oranını artırmak için güçlü kanser tedavi teknikleri olmasına rağmen bu teknikler, hastaların sağlıklı organları üzerinde akut ve uzun vadeli olumsuz etkilere yol açabilmektedir (S. Cai *et al.* 2010; Dao & Hanson, 2012). Geleneksel tedavi yöntemlerinden kaynaklanan bu olumsuz sonuçlar, araştırmacıları yeni tedavi yaklaşımlarını araştırmaya yöneltmiştir ve bunlardan biri de hedefe yönelik tedavidir.

Hedefe yönelik tedavi, kanser hücrelerinin büyümesini, bölünmesini ve yayılmasını kontrol eden proteinleri hedef alan kanser tedavilerinden biridir. Araştırmacılar, kansere neden olan DNA yapısındaki değişiklikler ve proteinler hakkında daha fazla şey öğrendikçe bu proteinleri hedef alan tedavileri daha iyi tasarlayabileceklerdir. Potansiyel hedefleri belirlemeye yönelik yaklaşım, kanser hücrelerindeki farklı proteinlerin miktarlarını normal hücrelerdekiyle karşılaştırmaktır. Kanser hücrelerinde bulunan ancak normal hücrelerde bulunmayan veya kanser hücrelerinde daha fazla bulunan proteinler, özellikle hücre büyümesi

veya hayatta kalmasıyla ilgili oldukları biliniyorsa potansiyel hedef olacaktır. Hedefe yönelik tedaviler arasında hormon terapileri, sinyal transdüksiyon inhibitörleri, gen ekspresyon modülleri, apoptoz indükleyicileri, anjiyogenez inhibitörleri, immünoterapiler ve toksin dağıtım molekülleri yer almaktadır. Kanser tedavisinde kullanılmak üzere birçok farklı hedefe yönelik tedavi Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) tarafından onaylanmıştır ve bunların bir kısmı Tablo 1’de verilmiştir (Correia *et al.* 2021; NCI, 2022)

Tablo 1. FDA Tarafından Meme Kanseri Tedavisi İçin Onaylanan Bazı İlaçlar

	MEME KANSERİ İÇİN ONAYLANMIŞ İLAÇLAR	KISA AÇIKLAMA
ÖNLEYİCİ	Raloksifen hidroklorür	Seçici Östrojen Reseptör Modülatörü (SERM). Östrojen reseptörüne bağlanma için östrojen ile rekabet eder.
	Tamoksifen sitrat	Bu ilacın aktif metabolitleri, östrojen reseptörüne bağlanmak için östrojen ile rekabet eder.
	Abemaciclib	CDK4 ve CDK6’yı hedefleyen Sikline Bağlı Kinaz (CDK) inhibitörü.
	Ado-trastuzumab emtansin	Sitotoksik bir ilaç olan emtansine bağlı monoklonal antikor, trastuzumab. Trastuzumab, HER2/neu reseptörüne bağlanarak kanser hücrelerinin büyümesini durdurur. Emtansin, tübüline bağlanarak hücreleri yok eder.
	Dosetaksel	Antimitotik kemoterapi ilacı, bitki alkaloidi. Mikrotübül düzeneğini destekler ve stabilize eder.
	Doksorubisin hidroklorür	Bir antrasiklin antibiyotik olan doksorubisinin hidroklorür tuzu. DNA’daki baz çiftleri arasına girer, topoizomera II enzimini inhibe eder ve serbest oksijen radikallerini oluşturur.
TEDAVİ EDİCİ	Gemsitabin hidroklorür	Hücre içi olarak aktif metabolitlerine dönüştürülür, DNA sentezi ve dâhil edilmesi için mevcut deoksiribonükleotit havuzunda bir azalmaya yol açar.
	İksabepilon	Tübüline bağlanır ve polimerizasyonunu destekler. Mikrotübül stabilizasyonunu destekler.
	Metotreksat	Antikanser ve immünosüpresan aktiviteleri olan antimetabolit ve antifolat ilacı. DNA, RNA ve proteinlerin sentezini inhibe eder.
	Neratinib maleat	EGFR, HER2 ve HER4 eksprese eden karsinomlara karşı antitümör etki gösteren tirozin kinaz inhibitörü.
	Paklitaksel	Tübüline bağlanarak hücre bölünmesini durdurarak mikrotübüllerin parçalanmasını engeller. Ayrıca BCL2 fonksiyonunu bloke ederek apoptozu indükler (antiapoptotik protein).
	Palbociclib	CDK inhibitörü. Hücre döngüsünün G1 fazında retinoblastoma protein fosforilasyonunu inhibe ederek CDK4 ve CDK6’yı inhibe eder.
	Pembrolizumab	Programlanmış hücre ölüm proteini 1 (PD-1) reseptörüne karşı monoklonal antikor.
	Ribociclib	Siklin D1/CDK4 ve siklin D3/CDK6 yolunu hedefleyerek hücre döngüsünü deregüle eden CDK inhibitörü.
	Tiotepa	Hem DNA replikasyonuna hem de hücre bölünmesine müdahale eden alkilleyici ajan.
	Tucatinib	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü tirozin kinazı (HER2 reseptörü) inhibe eder.

Hedefe yönelik tedavi

Meme kanseri için hedefe yönelik tedavi, tümörlü hücrenin büyümesi, çoğalması ve hayatta kalması ile ilişkili moleküllerin spesifik olarak hedeflenerek işlevlerinin engellenmesini

sağlayacak ilaç veya maddelerle gerçekleştirilmektedir. Meme kanseri hastalığında uygulanan bazı hedefe yönelik tedavi türleri Şekil 1’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1. Meme kanseri hastalığında uygulanan bazı hedefe yönelik tedavi türlerinin listesi

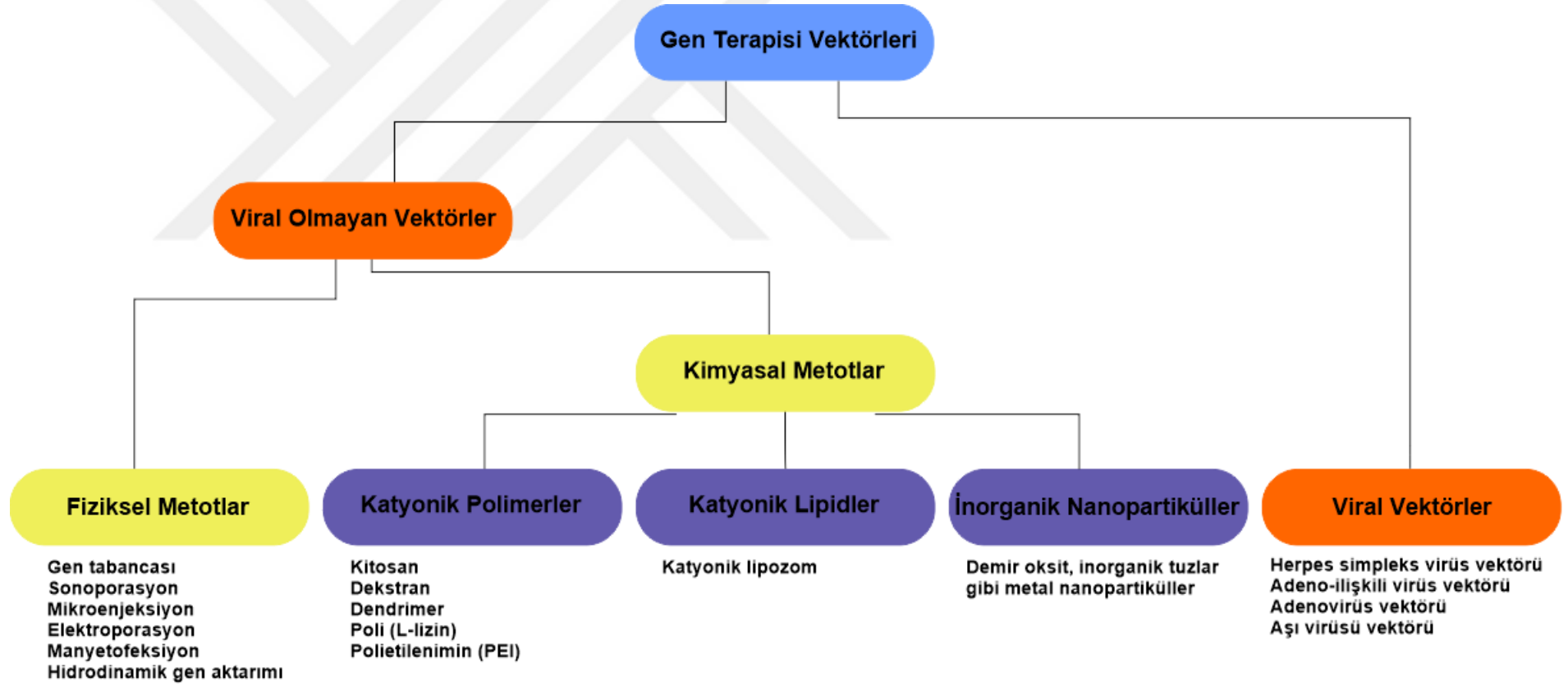
Tümörün ilerlemesi veya gerilemesi apoptoz ve hücre proliferasyonu arasındaki dengeye dayanmaktadır. Hücre ölümü için nekroz ve programlanmış hücre ölümü olan apoptoz olmak üzere iki ayrı mekanizma bulunmaktadır. Nekroz, inflamatuvar hücresel içeriğin kontrolsüz salınımı ile çevresel bozulmalardan kaynaklanan pasif ve kaza sonucu hücre ölümü olarak karakterize edilmiştir (Fink & Cookson, 2005). Programlanmış hücre ölümü ise hem hücre içi hem hücre dışı belirli sinyallere karşı programlanan hücre intihar prosedürüdür ancak, son çalışmalar programlanmış hücre ölümünün apoptotik olmayan formlarının da bulunduğunu bildirmektedir (Park & Kim, 2017; Rauf *et al.* 2016). Programlanmış hücre ölümü, çok hücreli organizmalarda büyük bir öneme sahip olup hücre sayısında uygun düzenlemeyi sağlamakta ve doku homeostazını korumaktadır (Fink & Cookson, 2005). Belirli hücre tipinde, belirleyici fizyolojik koşullar altında gerçekleşen programlanmış hücre ölümüne, hücreye zarar veren eksojen ajanlar ve dokuya özgü endojen ajanlar sebep olmaktadır. Çoğu hücre tipine tepki veren enfeksiyöz ajanlar ve fiziksel ajanlar, programlanmış hücre ölümünün eksojen aktivasyonlarına neden olmaktadır (Green & Llambi, 2015). Apoptotik hücre ölümü genellikle hücre büzülmesi, hücre dışı matrislere yapışma kaybı, membran yapısının bozulması ve çekirdekte meydana gelen DNA'nın parçalanmasının yanı sıra kromatin materyalinin yoğunlaşması gibi özellikler sergilemektedir. Apoptoz ve hücre proliferasyonu arasındaki dengeyi koruma amacıyla tasarlanan yeni yaklaşımlar için yapılan çalışmalar hız kazanmıştır (Renehan *et al.* 2001).

Tüm kanser türleri için mevcut tedavilerin çeşitliliğine rağmen, birçoğu için etkinlik ve güvenlik sorunları devam etmektedir ve bu durum hem tedavi sonucunu hem de hasta uyumunu etkilemektedir. Ayrıca dünya ölçeğinde meme kanserine neden olan hem vaka hem de ölüm sayısını azaltmada etkili olan ve daha ekonomik olan yeni yaklaşımların incelenmesi gerekmektedir. Meme kanseri tedavisinde de büyük bir önem taşıyan apoptoz mekanizması, daha az yan etki beklentisi nedeniyle önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir (Cao *et al.* 2017).

Gen terapisi

Gen terapisi, eksojen genlerin belirli yöntemler kullanılarak belirli hücrelere aktarılmasıyla hastalıkları tedavi etmek için kullanılan yeni bir terapötik tedavi sınıfıdır. Klinik aşamada muazzam bir potansiyele sahip olsa da düşük etkinlik veya güvenlik endişeleri nedeniyle başarılı tedavilerin geliştirilmesi son derece zordur. Bununla birlikte, genetik ve malzeme bilimlerindeki keşifler ve gelişmeler, bu yeni terapötiklerin bazılarının başarılı klinik uygulamasını mümkün kılmıştır (E. *et al.* 2018). Anti-anjiyogenik gen terapisi, intihar gen terapisi, immünomodülatör gen terapisi, siRNA tedavisi, pro-apoptotik gen terapisi ve onkolitik gen terapisi gibi kanser için çeşitli gen tedavi stratejileri geliştirilmiştir. Günümüze kadar dünya çapında gen terapisi üzerine binlerce klinik çalışma yürütülmüş ve onaylanmıştır. Bunların büyük bir kısmının kanser gen terapisi ile ilişkili olması, gen terapisinin kalıtsal hastalıklarla sınırlı olmadığını ve kanser gibi edinsel hastalıkların tedavisi için umut verici bir yaklaşım haline geldiğini de göstermektedir.

Gen terapisinin başarılı bir şekilde devam etmesi için terapötik genlerin hücre çekirdeğine girmesi ve ifade edilmesi gerekmektedir. Terapötik genlerin hedef hücrelere iletilme zorluğu ve hücre içine alınan genlerin çekirdeğe ulaşmadan sitoplazmada karşılaştığı zorlu koşullardan kaçamaması, yöntemin başarısını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle, gen terapisinin başarısı için temel koşul, güvenli ve verimli gen taşıyıcıların veya sistemlerin geliştirilmesi ve hedef genin hücrelerde çekirdeğe kadar başarılı bir şekilde ulaştırılmasının ardından gen ifadesinin sağlanmasıdır (F. Liu & Huang, 2002). Gen aktarımında kullanılacak olan ideal gen taşıma sistemleri, hedef hücrelere erişme yeteneğine sahip olmalı, verimli gen ekspresyonu için uygun olmalı ve biyolojik olarak parçalanabilir olmasının yanı sıra depolama ve uygulama sonrasında kararlılığını koruyabilmelidir. Ayrıca, immünojenik özellik göstermemeli ve hücre için toksik etki oluşturmamalıdır (Luo & Saltzman, 2000). Gen tedavisinde kullanılan taşıyıcı sistemler genel olarak, viral ve viral olmayan vektörler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. Gen terapisinde kullanılan vektörlerin şematik gösterimi

Gen aktarım sistemlerinde en yaygın olarak kullanılan viral vektörler, doğal transfeksiyon kabiliyetine sahip virüslerden türetilmiştir (El-Aneed, 2004). Viral vektörler, heterolog genleri hedeflenen hücrelere ulaştırmak için genellikle geliştirilmiş verimlilik, artırılmış güvenlik ve hücre alım için genetik olarak modifiye edilmektedir (Ramsey *et al.* 2010). Buna dayalı olarak, adenovirüs, adeno-ilişkili virüs (AAV), retrovirüs, herpes simpleks virüsü (HSV), lentivirüs ve poxvirüs gibi yaygın olarak kullanılan viral vektörler dâhil olmak üzere bir dizi viral vektör tanımlanmış ve gen aktarımı için araştırılmıştır (C. Zhang *et al.* 2011). Genel olarak, geleneksel transfeksiyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında viral vektörler, yüksek transfeksiyon verimlilikleri, etkin endozomal kaçışları ve uzun süreli gen ekspresyonu sağlamaları nedeniyle halâ gen aktarım araştırmalarının önemli bir parçasıdır. Bununla birlikte, bu vektörlerin immünojenisitesi, mutajenisitesi, toksisitesi, yüksek maliyeti ve transfekte edilmiş genin boyutunun sınırlandırılması gibi sahip olduğu çeşitli potansiyel problemler, bu gen aktarım teknolojisinin klinikte kullanımını sınırlandırmaktadır (Robbins & Ghivizzani, 1998; Toucheffeu *et al.* 2010).

Viral vektörlerin potansiyel sınırlandırmalarının üstesinden gelmek için, virüs aracılı olmayan fiziksel ve kimyasal gen aktarım yöntemlerinin geliştirilmesine odaklanılmıştır. Yaygın olarak kullanılan kimyasal vektörler, sentetik materyalin doğasına göre katyonik polimerler ve katyonik lipozomlar olmak üzere iki ana tipte sınıflandırılabilir. Gen aktarımı için en çekici alternatif haline gelen sentetik taşıyıcıların, immünojenik olmaması, genlerin konak kromozomuna entegrasyonunun olmaması, yüksek gen yükleme kapasitesine sahip olması, uygun ve verimli üretimin gerçekleştirilebilmesi, toksik olmayan gen aktarımı için polimerlerin yapısal modifikasyonunun sağlanabilmesi gibi birçok avantajı bulunmaktadır. Katyonik lipozomların klinik deneylerde birkaç çalışma ile sunduğu umut verici sonuçlara rağmen, transfeksiyon verimliliğinin düşük olması ve toksik etki göstermesi yaygın kullanımını engellemektedir (Hortobagyi *et al.* 2001). Bu nedenle, yeni tanımlanan katyonik çekirdek-kabuk nanopartikülleri, yüksek gen transfeksiyon verimliliği, ilaçların ve genlerin aynı hücrelere aynı anda teslim yeteneği gibi çok sayıda avantaj sunduğundan, lipozomlara bir alternatif olarak görülmektedir (Y. Wang *et al.* 2006). Katyonik polimerler, polietilen glikol (PEG) modifiye katyonik lipidler, polietileniminler (PEI'ler) ve bunların türevleri, kitosan ve modifiye kitosan, amfililik poli(L-lisin), poliamidoaminler (PAA'lar) gen taşıyıcıları olarak kullanılmaktadır (B. *et al.* 2007). Bunlar arasında yer alan PEI'ler ve modifiye PEI'ler, yüksek miktarda DNA yoğunlaşmasını sağlayan ve proton sünger etkisi sayesinde endozomlardan kaçarak mükemmel bir gen aktarım yeteneği sergileyen katyonik polimer sınıfıdır (Izzedine *et al.* 2009). Gen taşıyıcıları için ortak engeller arasında hücre dışı ortamda polilekslerin kararsızlığı, yetersiz hücre alım, düşük endozomal kaçış ve çekirdeğe düşük translokasyonun

gerçekleşmesi yer almaktadır. Katyonik taşıyıcıların, kan bileşenleriyle etkileşimi, toksisite göstermesi ve taşıyıcıların belirli hücelere göre düşük hedefleme göstermesi gibi sınırlılıkları bulunmaktadır (Tazawa *et al.* 2013). Bu nedenle, genellikle gen transfeksiyonunu sınırlayan hücre dışı ve hücre içi engelleri anlamak ve buna göre yeni stratejiler geliştirmek önemlidir.

Gen aktarımında kullanılan fiziksel yöntemler arasında mikroenjeksiyon, mikropartikül bombardımanı, ultrason aracılı mikrokabarcık (sonoporasyon), elektroporasyon, fotoporasyon, hidroporasyon, mekanik masaj ve son yıllarda oldukça popüler olan manyetofeksiyon yöntemi bulunmaktadır. Viral vektörlerle karşılaştırıldığında, bu yöntemlerin gen aktarımı açısından daha güvenli ve verimli olması, araştırmacıların daha çok ilgisini çekmiştir (Ramamoorth, 2015). Fakat, her yöntemin kendi içerisinde bir takım avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

Mikroenjeksiyon yönteminde, nükleik asitler hücelere başarılı bir şekilde aktarılmakta ancak yöntemin tecrübe gerektirmesi ve zahmetli olmasının yanı sıra sıklıkla hücre ölümüne de neden olması gibi dezavantajları bulunmaktadır (Kim & Eberwine, 2010). Fiziksel yöntemlerden biri olan biyolistik parçacık ile gen aktarım yönteminin basit ve güvenilir olmasının yanı sıra pahalı aletler gerektirmesi ve örneklerde fiziksel hasara sebep olması gibi sınırlandırmaları mevcuttur (Kim & Eberwine, 2010).

Gen aktarımında en yaygın kullanılan fiziksel yöntem olan elektroporasyon yöntemi, kolay ve hızlı olduğu için optimum elektroporasyon koşulları belirlendiğinde çok sayıda hücre, kısa sürede transfekte edilebilmektedir. Buna karşın, hücelere yüksek elektrik akımı uygulandığında hücre zarında açılan porların açık kalması ve buna bağlı olarak hücrenin geçirgenliğinin bozulması sonucu hücreye madde giriş çıkış dengesinin bozulması gibi dezavantajı bulunmaktadır.

Optoporasyon veya fototransfeksiyon olarak da bilinen lazer aracılı transfeksiyon yönteminde, lazer, hücre zarında gözenek oluşturmakta ve ortam ile sitozol arasındaki ozmotik farktan dolayı ortamda bulunan nükleik asitler hücre içine aktarılmaktadır. Çok küçük hücelere gen aktarımının yapılabilmesi, yöntemi cazip hale getirir de pahalı bir lazer mikroskop sistemi gerektirmesi, yöntemin kullanımını sınırlandırmaktadır (Kim & Eberwine, 2010).

Kanser için gen terapisi uygulamaları; immünoterapi, onkolitik viroterapi ve gen aktarımı olmak üzere üç kısma ayrılmaktadır. Genellikle, kanser hücrelerine yeni gen aktarımı ya ölüm için ya da bu hücrelerin normal fenotipine geri döndürülmesi amacıyla yapılır (Cross & Burmester, 2006). Şimdiye kadar akciğer ve deri tümörleriyle, jinekolojik, ürolojik, nörolojik, gastrointestinal, pediatrik, hematolojik tümörlerle mücadele için gen terapisi çalışmaları yapılmıştır (Khan *et al.* 2016).

Bu tip tedavi yaklaşımının en heyecan verici yönü hücrelere gen aktarımının yapılmasıdır. Ancak, gen aktarım terapisinde kullanılan plazmit DNA'nın biyo-bozunur potansiyelinin yüksek olması, boyutunun büyük ve elektrostatik olarak negatif yüklü olması onun hücre içine girişini ve çekirdeğe ulaşmasını engellemektedir. *In vivo* uygulamalarda rekombinant DNA'ların (rDNA) dolaşımında yarılanma ömürleri çok kısadır ve bunlar hem hücre içi hem de hücreler arası sindirim enzimlerinin hedefidirler. Bu nedenle bazı araştırmacılar, dolaşımında biyo-bozunmanın önüne geçmek amacıyla genellikle rDNA'ları taşıyıcı bir platform vasıtasıyla doğrudan hedef bölgeye ulaştırmayı hedeflemektedir. Gen aktarımı, oligodendromer DNA kaplama ve elektroporasyon gibi viral olmayan yöntemlerle (Patil *et al.* 2005) ve viral vektörlerle gerçekleştirilebilmektedir. Araştırmacılar, yüksek transfeksiyon etkinliğine rağmen viral vektörler yerine daha az zararı olan viral olmayan yöntemlerin nükleik asit aktarım etkinliğini artırmayı amaçlamaktadır (Silva *et al.* 2015).

Transfeksiyon yöntemlerinde kullanılan rDNA'lar difüzyonla hücre içerisine geçmektedir (Mykhaylyk *et al.* 2007). Bu süreçte rDNA, serum içeren ortamlarda zamanla parçalanmaktadır. Bu problemi çözmek için, yüksek konsantrasyonda uygulama yapılabilir ancak bu durumda rDNA kaynaklı sitotoksikite gözlenir. Bu nedenle, hızla hücre içine geçebilecek, transfeksiyon/transdüksiyon etkinliği yüksek olan manyetofeksiyon yöntemi geliştirilmiştir (Huth *et al.* 2004). Bu yöntemde manyetik nanopartiküllere (MNP) yüklenen nükleik asit veya rDNA, mıknatıs ile sağlanan geçici manyetik alan etkisi ile hücre içine çekilmektedir (Schillinger *et al.* 2005). Lokal uygulama imkânı sunan manyetofeksiyon ile sadece mıknatıs tutulan bölgede gen aktarımı olacağı için sağlıklı dokuların terapötik ajana maruz kalması engellenmekte ve yan etkiler azaltılmaktadır. Şimdiye kadar mıknatısların oluşturduğu manyetik alanın hücreler için olumsuz bir etkisine dair herhangi bir bulgu elde edilmemiştir (Golovin *et al.* 2015; Mykhaylyk *et al.* 2007). Bu işlem için kullanılan MNP'ler ise hücre içi degradasyon ile vücuttan uzaklaştırılan biyo-uyumlu ve toksisitesi sınırlı olan yapılardır (Cauda *et al.* 2010).

Viral olmayan vektörlerin hem düşük olan etkinliğini ve hedeflenmesini artırmak hem de diğer yöntemlerin sahip olduğu dezavantajların üstesinden gelerek sınırlandırmaları ortadan kaldırmak amacıyla “manyetofeksiyon” adı verilen yeni bir teknoloji geliştirilmiştir (X. Wang *et al.* 2009). Manyetofeksiyon, MNP ile ilişkili DNA'nın hedef hücrelere alınmasını teşvik etmek için manyetik alan kullanan ideal ve oldukça verimli bir gen aktarım yöntemi olarak kabul edilmektedir (X. Zhao *et al.* 2017). Bu yöntemin, *in vitro* yüksek verimli gen taraması için yeni bir araç sağlayabileceği ve *in vivo* gen terapisindeki temel sınırlamaların üstesinden gelmeye yardımcı olabileceği bildirilmiştir (Bergers & Song, 2005; Scherer *et al.* 2002).

Manyetofeksiyon yönteminde, genellikle polimer kaplı ve biyolojik olarak bozunabilir demir oksit nanopartiküller kullanılmaktadır. Bu teknolojinin, genetik materyalin manyetik alan yardımıyla hedef hücre yüzeyine hatta içine aktarılmasına olanak sağladığı, çevresel dokulardaki manyetik partiküllerin konumunun gösterilmesi ile ispatlanmıştır (Izzedine *et al.* 2009). MNP'lere yüklenmiş olan DNA'nın, çekirdeğe gitmek üzere sitoplazma ortamına salındığı ve serbest kalan MNP'lerin hücresel fonksiyonları etkilemeden hücreler tarafından metabolize edildiği bilinmektedir (Huang *et al.* 2013). Manyetofeksiyon yöntemi, endotelial hücreler gibi primer hücre kültürlerinin yanı sıra *in vitro* ve *in vivo* olarak da gastrointestinal sistem ve kan damarlarında lokal olarak yüksek transfeksiyon etkinliği göstermiştir (Bergers & Song, 2005).

Gen aktarımında nanopartiküller

Genler, canlıların kalıtsal karakterlerinin canlılıklarını devam ettirebilmeleri için gerekli olan proteinlerin kodlarını taşıyan, kromozom üzerinde lokalize olmuş, kodladığı proteine göre farklı uzunluklarda bulunan DNA dizileridir. Transfeksiyon, hücrelerin genetiğini değiştirmek amacıyla yabancı nükleik asitlerin hücre içerisine gönderildiği bir prosedürdür. Genin fonksiyonunun, regülasyonunun ve protein fonksiyonunun tetkik edilmesi için etkili bir analitik araçtır (Recillas-Targa, 2006). Gen terapisinin ana amacı, hedef geni spesifik olarak istenen hedef hücreye taşımak için kabul edilebilir bir taşıyıcı seçmek ve tedavi için onun etkin bir şekilde ekspresyonunu sağlamaktır (Kumar *et al.* 2019). Gen aktarımında seçilecek en ideal yöntem; transfeksiyon etkinliğinin yüksek, hücre toksisitesinin mümkün olduğu kadar düşük, alıcı hücre üzerindeki olumsuz etkinin minimum olduğu, bunun yanı sıra yöntemin kullanımının kolay ve tekrarlanabilir olduğu yöntemdir (Kim & Eberwine, 2010).

Son yıllarda nanoteknoloji alanındaki gelişmelerin hızla artması ve diğer temel bilimlerle birleştirilerek hedefe yönelik çok daha etkili yöntemlerin geliştirilmesine bağlı olarak alanında özgün birçok çalışma yapılmaktadır. Nanoteknolojik yöntemlerle elde edilen nanopartiküller, 10-100 nm aralığında bir boyuta sahip partikül dispersiyonları veya katı partiküller olarak tanımlanabilir. Gen terapisinde, DNA taşıyıcısı olarak kullanılan nanopartiküller (NP) manyetik alan altında belirli bir organı hedefleyebilmektedir. NP'lerin yüzeyine DNA bağlama için en basit yaklaşım, MNP'lerin yüzeyini katyonik maddelerle kaplamak ve daha sonra bunları elektrostatik adsorpsiyon yoluyla negatif yüklü genlerle bir araya getirmektir. Manyetofeksiyon yönteminin esası; plazmitleri ve MNP'leri tuz içeren tampon içerisinde bir araya getirerek kompleks oluşturmak (manyetofektin) ve elde edilen bu kompleksi, partikülleri hücrelere doğru çeken bir manyetik alanın etkisi altında hücrelere göndermektir. Sonuç olarak; manyetofeksiyon yöntemi ile tüm hücrelerin manyetofektine

maruz kalması ve hücrelerin çoğunun hızlı bir şekilde bu kompleksi içine alması beklenmektedir (Mykhaylyk *et al.* 2007).

Viral olmayan gen aktarım yöntemlerinin mevcut sınırlandırmalarından dolayı süperparamanyetik nanopartiküller, manyetofeksiyon başta olmak üzere hücre etiketleme ve hedefleme, hücresel terapi, doku onarımı, ilaç taşıma, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve hipertermi alanlarında yaygın kullanım potansiyeline sahiptir (Scherer *et al.* 2002). Bu amaçlarla kullanılan nanopartiküllerin, yüksek manyetik doyumluk, biyo-uyumluluk ve etkileşimli işlevlerin birleşik özellikleri gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir. Demir oksit NP'lerin sentezine yönelik yapılan birçok çalışma ile kararlı, biyo-uyumlu ve tek dağılımlı (monodispers) demir oksit NP'leri üretmek için verimli sentez yaklaşımları tanımlanmıştır. En yaygın kullanılan yöntemler arasında; birlikte çöktürme, hidrotermal sentez, termal bozunma, mikroemülsiyon ve sonokimyasal sentez yöntemi bulunmaktadır (Wu *et al.* 2008).

MNP'ler temel olarak; Fe, Co, Ni nanopartiküller gibi saf metalleri, FePt ve CoPt gibi manyetik nano-metal alaşımları, Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ gibi nano-ferritleri ve MnFe_2O_4 , CoFe_2O_4 ve ZnFe_2O_4 gibi metal katkılı demir oksitleri içermektedir (Hao *et al.* 2010). En çok kullanılanlardan Fe_3O_4 ve $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ partiküller hem yüksek süperparamanyetik özelliğe sahip hem de biyo-güvenilir olarak kabul edilmektedir (Akbarzadeh *et al.* 2012).

Özgün kimyasal ve manyetik özellikleri, toksik olmamaları ve ekonomik olmaları nedeniyle MNP'ler, biyo-ayrım (RNA, DNA, protein vs.), görüntüleme (MRI), hücre işaretleme, nükleik asit ve ilaç aktarımı amacıyla kullanılmaktadır (Hayashi *et al.* 2014; Z. Wang *et al.* 2016). Medikal uygulamalarda çok tercih edilen Fe_3O_4 MNP'ler, 20 nm'den küçük boyutlarda süperparamanyetik özellik göstermektedir ve çok düşük sitotoksik etkiye sahiptir (Hoang *et al.* 2015). Ancak Fe_3O_4 MNP'ler, biyolojik çalışmalarda kullanıldığında agregasyon oluşturarak hedef hücre tarafından alınmama, bağışıklık sistemince yakalanma, hücre tarafından alındıktan sonra hemen atılma veya demir iyonu salma gibi problemlerle karşılaşmaktadır. Fe_3O_4 MNP'ler, manyetik özelliklerinden bir şey kaybetmeyecek şekilde kabuk oluşturan bir yapı (silika, altın gibi) ile kaplanarak toksisitesi düşürülebilir (Sun *et al.* 2014). Yüzey kimyasının değiştirilmesi, NP'lere ekstra kimyasal ve fiziksel özellikler eklemektedir. Sonuçta MNP'lerin, silika ile kaplanması ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) NP'leri daha kararlı kılmakta ve uygulama alanlarını artırmaktadır (Lieberman *et al.* 2014; Sun *et al.* 2014).

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ MNP'ler negatif yüzey yüküne sahiptir. Manyetofeksiyon uygulamasında nükleik asitin MNP yüzeyine tutunabilmesi için pozitif yüzey gerekmektedir. Bu amaçla PEI gibi katyonik polimerler sıklıkla kullanılmaktadır. Yapısındaki amin grupları nedeniyle fizyolojik pH'da pozitif yüke sahip olan PEI, sentetik transfeksiyon ajanı olarak nükleik asit

aktarımında kullanılmaktadır. Dallanmış PEI, uzun zincirli yapısıyla DNA gibi biyomoleküllerin bağlanabileceği ekstra boş alan sunmaktadır (Steitz *et al.* 2007). Yüksek moleküler ağırlığa sahip PEI, yüksek dozda kullanıldığında sitotoksiktir ancak düşük moleküler ağırlıklarda ve taşıyıcı sistemlerde kullanılan dozlarda önemsiz düzeyde sitotoksikite gösterir (Yang *et al.* 2015). Çeşitli çalışmalarda PEI, MNP'lerin yüzey modifikasyonunda kullanılmıştır (örneğin $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PEI}$ eldesi için) ve manyetofeksiyon yönteminde kullanımıyla yüksek transfeksiyon etkinliği elde edilmiştir (Clima *et al.* 2015). Bununla birlikte PEI, MNP'lerin kararlılığını artırır ve canlı sistemlerde bağışıklık hücreleri tarafından tanınmasını azaltır (H. Cai *et al.* 2013). PEI kullanmanın bir diğer avantajı ise manyetofeksiyonun ardından, DNA'nın hücre sitoplazmasında serbest kalmasını sağlamasıdır (proton sünger etkisi). Ayrıca PEI, siRNA ile başarılı bir şekilde bağlanabilen bir çekirdek-kabuk yapısı oluşturmak için MNP'lerin yüzeyini doğrudan değiştirebilme özelliğine sahiptir. MNP'lerin yüzeyini modifiye etmede PEI'nin yanı sıra, poli arginin, poli-L-lisin (PLL) ve kitosanlar gibi diğer polikasyonlar da kullanılabilir. Son yıllarda biyolojik olarak parçalanabilen, özellikle polietilen glikol (PEG) gibi hidrofilik polimer ile kaplı olan polimerik nanopartiküller, uzun süre sirküle edilebilmeleri nedeniyle potansiyel ilaç taşıma ajanı olarak kullanılmaktadır. Yapılan çeşitli yüzey modifikasyonları sayesinde MNP'lerin DNA bağlama özellikleri artırılmakta ve bu da manyetofeksiyonu verimli hale getirmektedir (Bi *et al.* 2020). Nanopartiküllerin yüzeyine DNA bağlamada kullanılan ikinci yaklaşım ise, MNP'lerin yüzey yükünün etkisi olmadan gen/taşıyıcı komplekslerini oluşturmaktır. Bu yaklaşımda ise genler, ilk olarak polikasyona bağlanmakta daha sonra zıt yüklü MNP'ler ile bir araya getirilerek elektrostatik etkileşim yoluyla gen/taşıyıcı komplekslerini oluşturmaktadır. Sırasıyla; 12 sitrik asit (CA), karboksilmetil-dekstran (CMD), g-aminopropiltrietoksisilan (APTES), betain ve PEI modifikasyonu ile farklı yüklü MNP'lerin, karşılaştırılabilir gen/taşıyıcı kompleksleri ve artmış gen transfeksiyon verimliliğini doğruladığı bildirilmiştir. Son zamanlarda kanser tedavisinde nanopartiküllerin bir uygulaması, viral olmayan bir vektör olarak gen terapisinde kullanılacak olan nükleik asitleri yüzeylerine yükleyerek onları, doğrudan hedef hücre çekirdeğinin içine almasını sağlamaktır (Bi *et al.* 2020; Dobson, 2006).

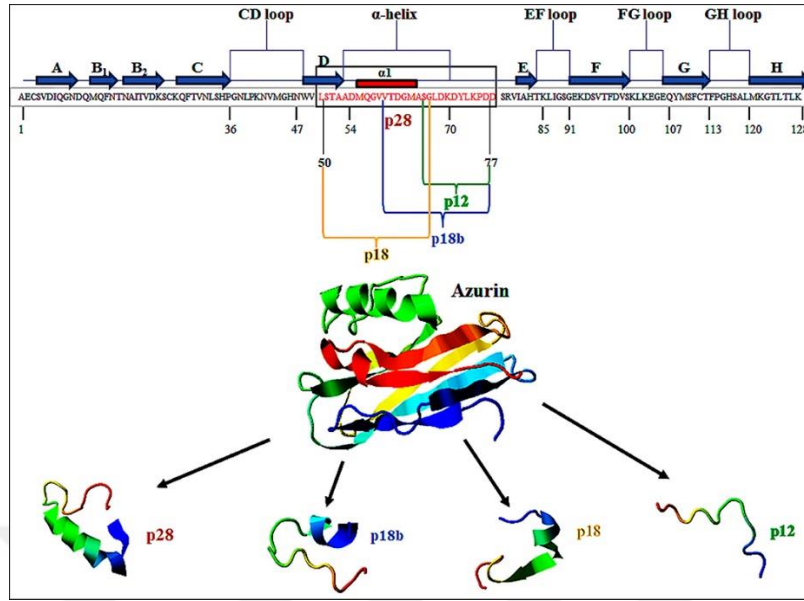
Azurin

Günümüzde mikroorganizmaların sekonder metabolitleri, antibiyotik ve kemoterapötiklerin gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Ambler & Brown, 1967; Bernardes *et al.* 2013). Bazı araştırmacılar, farklı mikrobiyal kaynaklarda çeşitli antikanser moleküllerin bulunduğunu (Apiyo & Wittung-Stafshede, 2002) ve bu moleküllerin, normal hücrelere kıyasla kanserli dokular üzerinde daha toksik olduğunu bildirmiştir (Forbes, 2010). Bu sebeple, son

yıllarda canlı bakteri ve bakteriyel ürünlerin kullanımına dayalı, yeni terapötik antikanser ajanların geliştirilmesi konusuna artan bir ilgi vardır. Bu çalışmalarla, kanser hücrelerinin çeşitli tiplerine karşı pre-klinik seviyede antikanser aktivite gösteren bazı bakteriyel protein ve peptitler tanımlanmıştır (Bernardes *et al.* 2013). Örneğin *Pseudomonas aeruginosa*'dan elde edilen azurin ve endotoksin A, *Streptococcus pneumoniae*'den elde edilen Pep27anal2, *Corynebacterium diphtheriae*'den elde edilen difteri toksini ve *Enterococcus* sp.'den elde edilen entap, antikanser aktivite göstermektedir (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2013).

Azurin (14 kDa, 128 amino asit), *P. aeruginosa* bakterisi tarafından üretilen, bakır içeren β -kırmalı tabakalı tek domaine sahip suda çözünebilir bir proteindir. Bu protein, bakır içeren (cupredoxin) redoks protein ailesinin bir üyesidir (Adman, 1991). Polipeptit zincirindeki bakır iyonu, bu proteinin stabilitesini sağlamaktadır (Pozdnyakova *et al.* 2001; Pozdnyakova & Wittung-Stafshede, 2001). Bir redoks proteini olan azurin, insan meme kanseri hücrelerine girebilir ve hastalarda herhangi bir yan etkiye sebep olmaksızın apoptozu teşvik eden antikanser bir ajan olarak son zamanlarda yoğun ilgi çekmektedir (Yamada, Goto, Punj, Zaborina, Chen, *et al.* 2002a). Bu sebeple azurin sentez yöntemlerine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Azurinin tümör hücrelerini yıkmaya yeteneği, kanser gelişimini inhibe eden bir protein olan TP53'ün stabilitesini artırmasından kaynaklanır. TP53, normalde yarı ömrü birkaç dakika olan kararsız bir proteindir. Sağlıklı hücrelerde TP53 miktarı çok azken kanser hücrelerinde TP53 ekspresyonu yüksek seviyededir (Kruiswijk *et al.* 2015). Azurin varlığında TP53'ün stabilitesinin artması, reaktif oksijen türlerinin önemli düzeyde üretimini ve buna bağlı olarak apoptozun teşvik edilmesini sağlar (Goto *et al.* 2003; Yamada, Goto, Punj, Zaborina, Chen, *et al.* 2002b). Azurin, antikanser aktivitesini birden fazla hedefle etkileşime girerek ve hastalığın ilerlemesinde çoklu adımlara müdahale ederek göstermektedir (Gao *et al.* 2017). Ancak, azurin tarafından teşvik edilen apoptozun mekanizması tam olarak belirlenmiş değildir. Sadece hücre çekirdeğinde azurinin, TP53'ün ve mitokondriyal sitokrom c'nin sitozole salınmasını tetikleyen Bax'ın intrasellüler seviyesini artırdığı ve bu prosesin hücresel gelişimde ve hücresel homeostazinin devamında temel proses olan apoptozu başlatan kaspaz kaskadını (kaspaz-7 ve 9) aktive ettiği bilinmektedir (Punj *et al.* 2004). Ailede meme veya yumurtalık kanseri öyküsü olan kişilerde ve BRCA1/BRCA2 mutasyonları teşhisi konmuş kadınlarda haftalık veya iki haftada bir azurin enjeksiyonu ile bu tür risk altındaki kişilerde kanserin başlangıcının büyük ölçüde azaltılacağı düşünülmektedir (Fialho & Chakrabarty, 2012). Ayrıca azurin, melanom olmayan cilt kanseri dışında kadınlarda en sık rastlanılan kanser tipi olan meme kanseri hücre proliferasyonunu bloke etmekte ve hem *in vitro* hem de *in vivo* mitokondriyal yolla apoptozu indüklemektedir. Bu nedenle, bakteriyel cupredoxin olan azurin

meme kanserinin tedavisi için potansiyel bir terapötik ajan olarak görülmektedir (Punj *et al.* 2004).



Şekil 3. Azurin proteininin birincil yapısı (128 amino asit) (Yaghoubi *et al.* 2020)

Azurin, rekombinant DNA teknolojisi (rDNA) ile üretilen bir proteindir (Roh *et al.* 2014; Yagati *et al.* 2017). rDNA teknolojisi hızla büyüyen bir alandır ve araştırmacılar, tarım, sağlık ve çevre gibi farklı sektörlerde uygulamalar için yeni yaklaşımlar ve mühendislik ürünleri geliştirmektedir. Bu yaklaşımlardan birisi, üretilen rDNA'nın miktarını artırmak için uygulanan kodon optimizasyon stratejisidir. Bu tez kapsamında uygulanan dual terapinin birinci kilit noktasında yer alan *P. aeruginosa* bakterisine ait azurin proteininin memeli (insan) hücrelerinde ekspresyonunu artırmak ve nadir bulunan kodonları sıkça kullanılanlar ile değiştirmek için kodon optimizasyonu yöntemine başvurulmuştur. Kodon optimizasyonu, canlı organizmalardaki protein ifadelerini en üst düzeye çıkarmak için kodon değişiklikleri kullanan gen mühendisliği yaklaşımlarını içermektedir. Bu yöntem, bir türün nükleotidlerinin DNA sekanslarını bir başka türün nükleotidlerinin DNA sekanslarına dönüştürerek hedef genlerin translasyon verimliliğini artırmak için kullanılmaktadır (Al-Hawash *et al.* 2017). Protein ekspresyonunu artırmak için gerçekleştirilen kodon optimizasyon stratejileri, nadir bulunan kodonların (rare codon) protein sentezi için sınırlayıcı olduğu, protein yapısı ve işlevini etkilemeden aynı anlamlı kodonların değiştirilebileceği ve nadir bulunan kodonların sıkça kullanılan kodonlarla değiştirilmesinin protein üretimini artıracak varsayımlarına dayanmaktadır. rDNA teknolojisinin uygulama alanlarından biri olan gen terapisi, hücreleri modifiye etmek için genetik materyali (*in vitro* ya da *in vivo*) kullanarak tedaviye yardımcı olan bir stratejidir (Khan *et al.* 2016; Mulligan, 1993). Şimdiye kadar akciğer ve deri tümörleriyle,

jinekolojik, ürolojik, nörolojik, gastrointestinal, pediatrik, hematolojik tümörlerle mücadele için gen terapisi çalışmaları yapılmıştır (Khan *et al.* 2016).

Manyetik hipertermi tedavisi

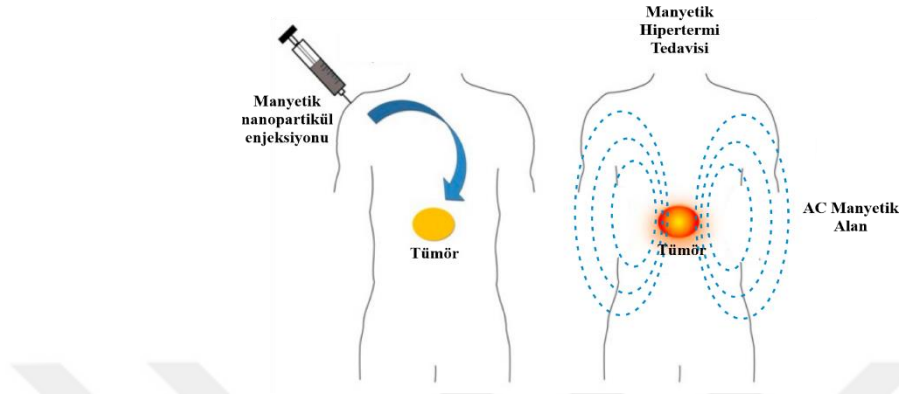
Hipertermi, normal dokuya hiç zarar vermeden ya da çok az zarar vererek kanser hücrelerinin zarar görmesini ve öldürülmesini sağlamak için vücut dokusunun ısıtıldığı bir tedavi türüdür (Kobayashi, 2011). Kanser tedavisinde uygulanan hipertermi, termal terapi, termal ablasyon veya termoterapi olarak da adlandırılmaktadır. Hipertermi tedavileri, en fazla 45 °C sıcaklığa kadar nispeten hafif tümör ısıtmasını indüklemeyi amaçlamaktadır. Oluşacak terapötik etki, belirli ısıtma süresinin ardından tümör bölgesinde oluşan sıcaklık kaynaklı olan termal doza bağlıdır (Kroesen *et al.* 2019).

Kanser hücrelerinde kan akışı ve ısı dağılımı normal hücrelere göre daha yavaştır ve ısı kapasiteleri daha düşük olmaktadır. Ayrıca, düzensiz damarlaşma nedeniyle besin ve oksijen bakımından da yetersiz kalmakta ve bu durum, kanser hücrelerinin normal hücrelerden daha hızlı bir şekilde apoptoza gitmesine neden olmaktadır. Bu durumlar göz önüne alındığında, hipertermi uygulaması sonrasında hipoksi bölgelerinde asidoza yol açılması da tümör hücrelerinin ısıya daha duyarlı hale gelmesine sebep olmaktadır (Fatima *et al.* 2021).

Hipertermi tedavisi, tüm vücut hipertermisi, bölgesel hipertermi ve lokal hipertermi olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Salunkhe *et al.* 2014). Tüm vücut hipertermisinde, vücudun tamamı radyo dalgaları, mikrodalgalar veya ultrason dalgaları gibi dışarıdan bir enerji kaynağı yardımıyla ısıtılmaktadır. Bu tedavi yönteminde seçici olmayan ısıtma nedeniyle olumsuz yan etkiler gözlenmektedir (Chicheł *et al.* 2007). Bölgesel hipertermi, bir organ, uzuv veya vücut boşluğu gibi vücudun belirli bir bölgesinde geniş bir hücre alanını ısıtan gelişmiş bir hipertermi tedavi yöntemidir (M. H. Falk, 2001). Lokal hipertermi ise Fe, Co ve Ni gibi metalik nanopartiküllerin seçici olarak vücudun belli bir bölgesinde AC manyetik alan altında termal enerji üretmesiyle kanser hücrelerinin öldürüldüğü bir yöntemdir (Otte, 1988). Bu yöntem, manyetik hipertermi tedavisi (MHT) olarak da adlandırılmaktadır.

Manyetik hipertermide, AC manyetik alan (AMF) altında MNP'lerin relaksasyonları (gevşeme) ile termal enerjinin üretilmesi ve kanserli hücrelerin öldürülerek antitümör tedavisinde kullanılması hedeflenmektedir (LIU *et al.* 2013) (Şekil 4). Özellikle, son yıllarda malign tümörlerin tedavisi için manyetik hipertermi (MHT) ile çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Yöntem, MNP'lerin hedefleme yoluyla tümörlü bölgede spesifik olarak toplanması ve ardından AC manyetik alanın uygulanmasıyla bölgesel sıcaklık artışı sonucunda sağlıklı hücreler etkilenmeden kanserli hücrelerin seçici ölümüne dayanmaktadır. Manyetik hiperterminin *in*

vitro uygulamalarında 42 °C’de apoptotik ve nekrotik yolla kanser hücre ölümü başlar (Kossatz *et al.* 2014; Zhou *et al.* 2011). Manyetik hipertermi uygulaması sırasında kanser hücreleri hasar görürken normal doku minimal düzeyde zarar görür (Ota *et al.* 2014). Çünkü, tümör hücreleri 42 °C üzerindeki sıcaklığa karşı daha yüksek duyarlılığa sahiptir. Böylece, kanser hücrelerinin MHT ile seçici olarak öldürülmeleri mümkündür (Andrä & (ed), 1999).



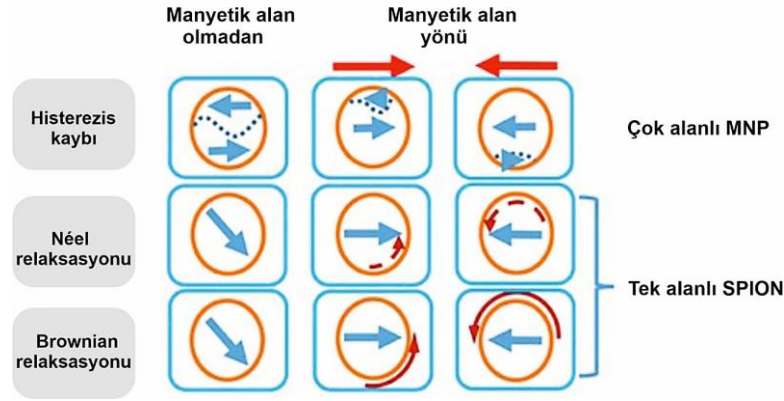
Şekil 4. Manyetik hipertermi tedavisinin şematik gösterimi

MNP’lerin hipertermide kullanılmasının avantajları arasında, kolloidal süspansiyonlarda sentezlenebilmesi ve çeşitli hedefleme teknikleri ile takibinin sağlanması için vücuda enjekte edilebilmesi bulunmaktadır. Ayrıca, hedeflendikleri bölgeye, dokuya veya hücreye göre çeşitli boyutlarda da sentezlenebilmektedir. Bütün bu avantajları sayesinde manyetik hipertermi, diğer ısıtma tekniklerine kıyasla kanseri tedavi etmek için daha umut verici bir teknik haline gelmektedir (Chouhan *et al.* 2021).

MNP’lerin manyetik hipertermideki işlevselliğini etkileyen faktörler arasında; hedefleme etkinliği, ısıtma verimliliği ve alıcı hücre tarafından sindirilmesi gibi özellikler bulunmaktadır. Isıtma verimliliği, termal doz ve spesifik absorpsiyon oranı (SAR) cinsinden tanımlanabilir. Yeterli sıcaklık için gereken termal dozun en aza indirilmesi için yüksek SAR değerine sahip MNP’lerin geliştirilmesi gerekmektedir. SAR, bir denklem olarak ifade edilmektedir ve belirli bir frekansta MNP’lerin birim kütlesi başına enerjinin emilme hızına eşittir (Albarqi *et al.* 2019; Sharma, 2021).

MNP’ler AC manyetik alana maruz kaldıklarında, terapötik sistem içinde termal enerji üretmek için (1) histerezis kaybı, (2) girdap akımı, (3) Néel veya Brownian relaksasyonu ve (4) sürtünme kayıpları olarak adlandırılan dört farklı mekanizma işlev görmektedir. Ayrıca, süperparamanyetik MNP’lerde Néel veya Brownian relaksasyonu baskın olmakta ve manyetik momentin salınımı, termal enerji üreten alan yapılarının yer değiştirmesine neden olmaktadır. AMF’den dolayı AC manyetik alanın yönünün değişimi sırasında, manyetik momentler ya Néel relaksasyonu olarak adlandırılan parçacıkların içindeki bireysel manyetik moment ya da

Brownian relaksasyonu olarak adlandırılan kendi eksenleri etrafında bireysel parçacıkların dönüşü ile termal enerji üretilmesidir (Şekil 5).

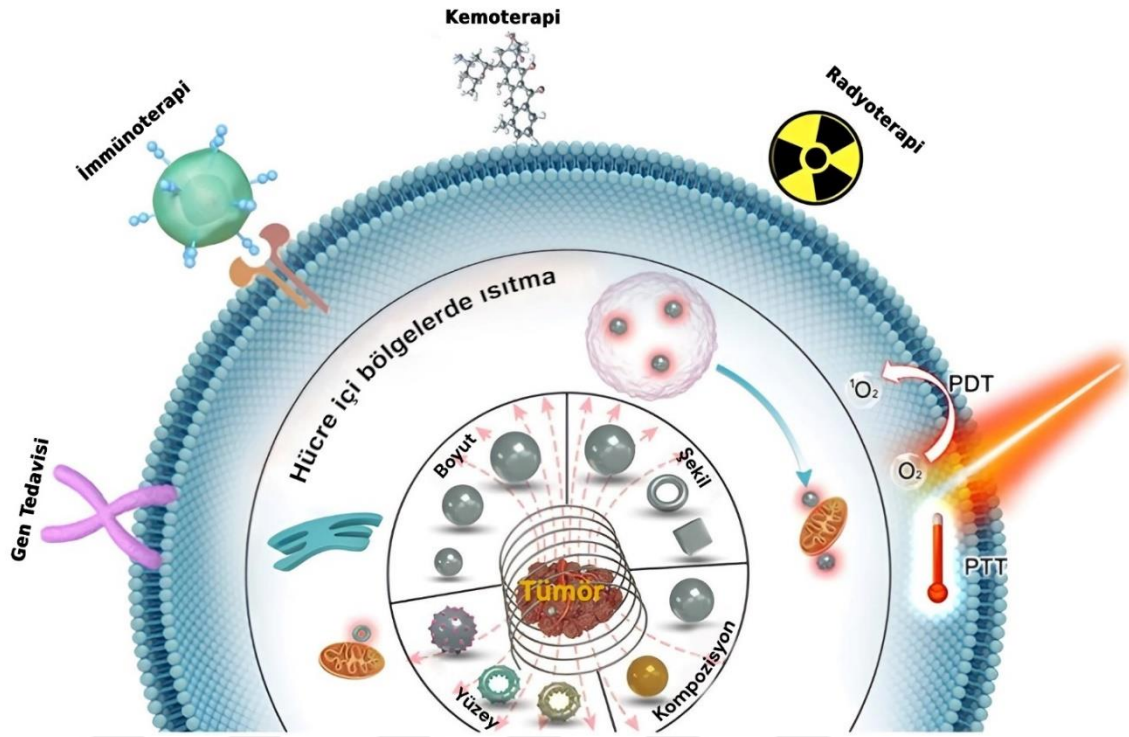


Şekil 5. AC manyetik alana yanıt olarak manyetik NP'lerin farklı termal enerji üretim mekanizmaları

Turuncu daireler manyetik demir oksit NP'leri, kısa düz oklar manyetik alan yönünü, kavisli oklar hareketi (düz kavisli ok) veya manyetik moment yönündeki değişimi (kesikli kavisli ok) ve kesikli çizgiler çok alanlı NP'lerde alan sınırlarını temsil eder. SPION: Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller. (Chang *et al.* 2018)'den Türkçe'ye çevrildi.

Manyetik hipertermi tedavisinin antitümör terapötik etkinliğini geliştirmek için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Bu tedavide kullanılan MNP'lerin etkili ısıtma yeteneği için bazı optimizasyonları ile lokalize indüksiyon etkilerinin anlaşılması, manyetik hipertermi kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, fototermal/PDT ve gen terapisi gibi diğer terapötik stratejilerle sinerjik olarak birleştirilerek antitümör etkinliğinin daha da artmasını sağlamaktadır (Şekil 6) (X. Liu *et al.* 2020b). Isı ve kemoterapi arasındaki sinerjistik etki, hafif hipertermi koşullarının homolog rekombinasyonda yer alan bir protein olan BRCA2'nin bozulmasını tetiklemesi ve hücrelerin DNA onarım mekanizmasında yetersiz kalması sonucu hücrelerin DNA hasarına neden olan ilaçlara karşı daha duyarlı hale gelmesi olarak açıklanabilir (Krawczyk *et al.* 2011).

Yapılan çalışmalar, fototermal ve immünoterapi, manyetik hipertermi ve fototermal tedavi, hipertermi ve immünoterapi gibi birden fazla tedavi yönteminin bir arada kullanıldığı kombine tedavi yaklaşımlarının (dual terapi) kanser için daha etkili tedavi sağlayacağını belirtmektedir (Tao *et al.* 2014; Wust *et al.* 2002).



Şekil 6. Manyetik hipertermi tedavisinin antitümör terapötik etkinliğini iyileştirme stratejilerini gösteren şema
(X. Liu *et al.* 2020a)’den Türkçe’ye çevrildi.

MNP’ler tümöre intratümoral, intraperitoneal, intraarteriyel, intrakaviter ve intravenöz uygulama yoluyla iletebilirler. Bunlardan intravenöz uygulama yöntemi, daha geniş kanser yelpazesi için en yaygın uygulama yollarından biridir (Chang *et al.* 2018). MNP’ler, geliştirilmiş geçirgenlik ve tutma etkisine (EPR etkisi; nanopartiküllerin sağlıklı dokularda değil sadece katı tümörlerde lokalize olmalarının sağlanması durumudur) bağlı olarak intravenöz uygulama sonrasında sızdıran damar yapıları ve zayıf drenajları nedeniyle tümör hücrelerinde birirmektedir (Clark *et al.* 2016). Klinik olarak onaylanmış demir oksit MNP’ler Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Ticari Olarak Temin Edilen Klinik Olarak Onaylanmış Demir Oksit Nanopartiküller

İsim (Genel)	Üretici firma	Onaylanmış Gösterge	Kabul edilme tarihi
Feraheme [®] (ferumoksitol)	AMAG Pharmaceuticals	Kronik böbrek hastalığında demir eksikliği anemisi	2009 (FDA)
Resovist [®] (ferucarbotran)	FUJIFILM RI Pharma	Karaciğer için MRI görüntüleme ajanı	2002 (PMDA)
Nanoterm [®]	MagForce	Glioblastomun hipertermik tedavisi	2010 (CE mark)
Magtrace [®]	Endomag	Kanser evrelemesi için sentinel lenf nodu biyopsisi	2011 (CE mark) 2018 (FDA)

Mümkün olduğu kadar sağlıklı dokuyu koruyarak tümörleri yok etmek için gereken dozu yeniden belirleyen tedavi planlaması, birçok hipertermi modalitesi için radyoterapideki gelişmelerden yararlanmıştır (Rubia-Rodríguez *et al.* 2021). Magforce™ firması tarafından yürütülen klinik deneylerde elde edilen olumlu sonuçlar, manyetik hiperterminin kanser tedavi yöntemleri arasında yer almasına imkân tanımıştır. Günümüzde, manyetik hipertermi için nanopartiküllerin iyileştirilmesine ve hücre düzeyinde manyetik hipertermi etkisinin anlaşılmasına ihtiyaç vardır (Freis *et al.* 2021).

MHT, hipertermi ile kanser hücrelerinin öldürülmesinin yanında sıcaklık artışıyla indüklenebilen promotör bölgelerini aktive etmek amacıyla da kullanılabilir. Termal enerjiyle indüklenebilen promotör bölge içeren plazmitin hedef dokuya ulaştırılması durumunda dış AC manyetik alan uygulaması ile ilgili hücrede promotörün akış aşağı (downstream) bölgesine yerleştirilen genin ekspresyonu sağlanabilir. Bu strateji, kanserli dokularda terapötik proteinlerin kontrollü üretilmesini sağlayabilir. Yukarıda da bahsedildiği gibi azurin proteini böyle bir strateji için uygun bir adaydır. Çünkü (Yamada, Goto, Punj, Zaborina, Kimbara, *et al.* 2002), azurinin retikulum hücre sarkoması memeli J774 makrofaj benzeri hücrelerde apoptoz ilişkili tümör baskılayıcı protein olan TP53'ü teşvik ettiği bildirilmiştir. Başka bir çalışmada (Yamada, Goto, Punj, Zaborina, Chen, *et al.* 2002b) azurinin insan melanoma hücre hattının (UISO-Mel-2) sitozölüne girdiğini, nükleusa transfer edildiğini ve TP53 ile kompleks oluşturarak bu proteini kararlı hâle getirdiğini bildirmiştir. Azurin ile muamele edilen hücrelerde TP53'ün kararlılığı, farelerin melanoma hücrelerinde intrasellüler TP53 seviyesinde artışı sağlayarak *in vivo* baskılamaya öncülük etmiştir. Ayrıca Punj ve arkadaşları, MCF-7 meme kanseri hücre hattında azurinin güçlü sitotoksik aktivite gösterdiğini ve apoptoz yoğunluğunu %50'den daha fazla artırdığını, meme kanseri MDA-MB-157, MDD2 ve MDA-MB-231 hücrelerinde ise apoptoz yoğunluğunu %15-18 artırdığını bildirmiştir (Punj *et al.* 2004). Benzer şekilde Choi arkadaşları, azurinle muamele edilen oral skuamöz kanser hücrelerinin canlılıklarında azalma, morfolojik değişimler, DNA kırılması, TP53 ve siklin B1 protein seviyelerinde artış gözlemiştir. Ayrıca anti-kanser ajanlarla birlikte azurinin uygulanması kanser hücrelerinin antikanser ilaçlara duyarlılığını artırmıştır (Choi *et al.* 2011).

Bu tez çalışmasında azurin hücre veya canlılara saf protein olarak uygulanmıştır. Peki, antikanser olduğu bilinen azurin proteini, kanser hastası bir canlıda bölgesel olarak istenildiği zaman üretilir mi? Yin ve arkadaşları, apoptotik yolakla ilişkili TRAIL geni ile P_{HSP} (ısıyla indüklenen bir promotör) taşıyan bir plazmit DNA hazırlamışlardır (Yin *et al.* 2016). Bu plazmit DNA manyetofeksiyon yöntemi ile mezenşimal kök hücrelere aktarılmıştır. Geni ve MNP'leri barındıran mezanşimal kök hücreler, *in vitro* ve *in vivo* olarak yumurtalık kanserinde

kullanılmıştır. Çalışmada, manyetik hipertermi etkisiyle gen ekspresyonu kontrol edilmiş ve TRAIL ekspresyonu sayesinde kobaylarda yumurtalık kanser hücrelerinin yok edildiği gösterilmiştir. Benzer şekilde kanserli dokularda azurin ekspresyonu MHT'nin P_{HSP}'yi aktive edilmesiyle gerçekleştirilebilir. Buna ilaveten MNP'ler, MHT oluşturma avantajı sağlamalarının yanında manyetofeksiyon ile rekombinant plazmitin etkili bir şekilde kanser hücrelerine ulaştırılmasını da sağlamaktadır. Örneğin Somolders ve arkadaşları, merkezi sinir sistemi makrofajları olarak bilinen mikrogliya (fagositik hücre) hücrelerine manyetofeksiyon yöntemi ile başarılı bir şekilde gen aktarabilmiş ve normalde transfeksiyona dirençli olan bu hücrelerde transfeksiyon etkinliğini %34,95 olarak belirtmiştir (Smolders *et al.* 2018).

Bu tez çalışmasında termal enerji ile indüklenebilir bir promotör kontrolündeki azurin geninin kanser hücrelerinde ekspresyonu ve manyetik hipertermi ile desteklenmiş dual bir terapi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3’te verildi.

Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Cihazların İsimleri, Marka ve Model Bilgileri

Cihaz Adı	Marka-Model
Çeker ocak	Tolkim
Elektroforez güç kaynağı	Bio-rad, Power pac universal power supply
Elektroforez yürütme tankı	Bio-rad, WideMini-Sub Cell GT
Flow (Akım) sitometri cihazı	Beckman Coulter CytoFLEX
Floresan mikroskobu	Zeiss Axio Scope A
Hassas Terazi	Shımadzu
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Heidolph
Isıtmalı, çalkalamalı inkübatör	JSR, JSSI300C
Işık mikroskobu	ZEISS Primo Star
Karbondioksitli etüv	NUAIRE
Kemilüminesans jel dökümantasyon sistemi	Bio-Rad Gel Doc XR+
Lazer taramalı konfokal mikroskop	Zeiss LSM 710
Mikrobiyoloji biyogüvenlik kabini	ESCO, Laminar flow cab.
Mikrodalga fırın	Arçelik, MD574S
Mikroplaka floresan spektrofotometre	Agilent, Cary Eclipse
Mikroplaka spektrofotometresi (ELISA Okuyucu)	Biotek Epoch
Mikrosantrifüj	VWR, Microstar 12
Mini santrifüj	IKA mini G
Otoklav	HMC Hırayama
PCR cihazı	Bio-rad CFX96 TOUCH REAL TIME PCR
pH metre	Mettler Toledo
qRT-PCR	Thermo
Saf su cihazı	Millipore Direct-Q 8 UV
Santrifüj	HETTİCH, Rotofix 32A- Beckman Coulter
Sıcaklık kontrollü çalkalayıcı	Eppendorf, Thermomixer C
Su banyosu	Memmert, WNB14
Ters ışık mikroskobu	ZEISS Primovert
Ultrasonik yıkama banyosu	Isolab
UV-görünür spektrofotometre	Shimadzu, UV-1800 240V
Vorteks	Heidolph

Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve kitler Tablo 4’te verildi.

Tablo 4. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Kitlerin İsimleri ve Markaları

Kimyasal/Kit Adı	Marka
Agaroz	Sigma
Amfisilin antibiyotiği	Sigma Aldrich
Amonyum hidroksit	Sigma Aldrich
Annexin V-FITC apoptoz tespit kiti	Biolegend, 640914
At serumu	Gibco
Hücre boyama tamponu	BioLegend
CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)	Invitrogen™
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)	Serva
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco
DMEM/F12 (glikoz ve L-glutamin içeren besiyeri)	Gibco
PureLink™ Expi Endotoxin-Free Maxi Plasmid Purification Kit	Invitrogen
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	Sigma Aldrich
Etanol (EtOH)	Isolab
Fast Digest <i>Sall</i> , <i>KpnI</i>	ThermoFisher
Fenol/kloroform/izoamil alkol	Sigma Aldrich
Fetal sığır serumu (FBS)	Capricorn
Flash Phalloidin Green	BioLegend
Flash Phalloidin Red 594	BioLegend
Fosfat tampon (PBS)	Sigma Aldrich
Gliserol	ISOLAB
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma Aldrich
Hidrokortizon	Sigma Aldrich
İnsülin	Sigma Aldrich
Jel yükleme boyası	Thermo Scientific™
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Scientific™
Kloroform	Sigma Aldrich
LB agar	LAB/Neogen
LB broth	LAB/Neogen
MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kit	Intron
MTS Cell Proliferation Assay Kit	Abcam
MycoXpert Solüsyonu	Capricorn
UltraPure™ DNase/RNase içermeyen distile su	Invitrogen

Tablo 4. (devamı)

Paraformaldehit	Sigma Aldrich
Penisilin-streptomisin antibiyotiği	Gibco
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	ThermoFisher
Polietilenimin (PEI), 25kDa	Sigma Aldrich
Poly-D-Lysine	Gibco
PureLink® Quick Gel Extraction Kit	Invitrogen
PureLink-Hi-Pure plazmit DNA saflaştırma mini kiti	Invitrogen
RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution	Intron
PureLink™ RNA Mini Kit	Invitrogen
Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Scientific™
Gel Loading Solution	SNP
Sodyum dodesil sülfat	Merck
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma Aldrich
50X TAE (Tris bazı, asetik asit ve EDTA)	Thermo
UltraPure™ Agarose	Invitrogen
TE tampon	Multicell
TRITC (5/6-tetramethyl-rhodamine isothiocyanate)	Thermo Scientific
Triton-X 100	MERCK
Trypsin-EDTA	Gibco

Kullanılan Besiyeri, Çözelti ve Tamponların Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan besiyeri, çözelti ve tamponların hazırlanışı Tablo 5’te verildi.

Tablo 5. Çalışmada Kullanılan Besiyeri, Çözelti ve Tamponların Hazırlanışı

Adı	Hazırlanışı
%0,3 Triton X-100	30 µl Triton-X-100 10 ml saf su içerisinde çözdürülerek hazırlandı.
%1 SDS	0,5 g SDS tartılıp 50 ml saf suda çözdürüldü.
PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi, pH 7,4)	100 mg hazır tablet, 100 ml suda çözüldü. Otoklavlanarak steril edildi. Çözelti +4 °C’de muhafaza edildi.
PEI	10 mg PEI tartıldı, 8 ml nükleaz içermeyen su ile çözüldü ve HCl ile pH 7,0-7,4’ye ayarlandıktan sonra son hacim 10 ml’ye tamamlandı. Steril filtreden (0,22 µM) geçirildi ve +4 °C’de muhafaza edildi.
TAE (1X)	50X TAE, saf su ile seyreltilerek 1 L, 1X TAE hazırlandı.

Tasarlanan primerler ve Restriksiyon Enzimleri

Tablo 6. Klonlama Deneyleri İçin Tasarlanan Primerler

Primer Adı	Primer Dizisi	Amaç
EGFP-N-R	5'-CGTCGCCGTCAGCTCGACCAG-3'	Plazmit doğrulama
<i>Sall</i> -pHSP-F	5'-TACAGTCGACGGATTTTTCACACTTTCC-3'	P_{HSP} 'nin amplifikasyonu
<i>KpnI</i> -pHSP-R	5'-GCGGTACCTATTCAGAGTTCTCTTCTTG-3'	
<i>KpnI</i> -Azu-F	5'-CGGGGTACCATGCTGAGAAAATC-3'	Sentetik azurin gen dizisini çoğaltma
<i>Apal</i> -SAzu-R	5'-ATAGGGCCCTCACTTCAGGGTCA-3'	

Tablo 7. Kesim Enzimlerinin Tanıma Sekansları ve Kesim Noktaları

Restriksiyon Enzim Adı	Tanıma Sekansı
Fast Digest <i>HindIII</i>	5'-A [^] AGCTT-3'
Fast Digest <i>Sall</i>	5'-G [^] TCGAC-3'
Fast Digest <i>Apal</i>	5'-GGGCC [^] C-3'
Fast Digest <i>KpnI</i>	5'-GGTAC [^] C-3'

pCaSpeR-hs/act Plazmit DNA'sının Doğrulanması

DGRC'den (<https://dgrc.bio.indiana.edu>)'den katı besiyerine (bakteriyel stab) ekili olarak temin edilen, pCaSpeR-hs/act plazmitlerini taşıyan *E. coli* hücreleri, stab kültürden alınarak antibiyotik içeren LB agara ardından LB sıvı besiyerine inoküle edildi. İnkübasyon sonrası PureLink™ HiPure Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen™- K210003) ile tarif edilen protokole göre hücrelerden plazmitler izole edildi. Saflaştırılan plazmitler TE tamponunda süspanse edildi ve plazmitlerin konsantrasyonu ve saflığı, nanodrop spektrofotometre ile belirlendi. Saf olarak elde edilen plazmit hem gene ait primerlerle PCR reaksiyonu hem de restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesim reaksiyonu gerçekleştirilerek doğrulandı.

Plazmit izolasyonu

pCaSpeR-hs/act plazmitlerini taşıyan *E. coli* hücreleri plazmit izolasyonu için 10 ml LB sıvı besiyerine inoküle edildi. 37 °C'de gece boyu çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilen inkübasyonun ardından 'PureLink™ HiPure Plasmid Miniprep Kit' protokolüne göre izolasyon yapıldı. İzolasyon için, gece boyu LB sıvı besiyerinde büyütülen hücreler 4.000 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve RNase içeren 800 µl resüspansiyon tamponu (R3) pelet üzerine eklendi. Hücre süspansiyonu homojen oluncaya kadar hafifçe alt üst edilerek vortekslenildi. 800 µl lizis tamponu eklenerek karışım homojen oluncaya kadar hafifçe alt üst edildi. Oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edildikten sonra üzerine 800 µl çöktürme tamponu (N3) eklendi. Karışım homojen oluncaya kadar hızlıca alt üst edildi ve 10.000 g'de 13 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant kolona transfer edildi. Lizat kolondan geçtikten

sonra 2,5 ml yıkama tamponu (W8) iki kez kolona eklendi. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra kolon steril 1,5 ml ependorf tüpe yerleştirilerek kolona 900 µl elüsyon tamponu (E4) eklendi. Solüsyon kolondan tamamen aktıktan sonra kolon uzaklaştırıldı. Tüpteki elüata 630 µl izopropanol eklendi. İyice karıştırıldı. 16.000 g'de 4 °C'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelet, 1 ml %70'lik etanol ile yıkandı. 16.000 g'de 4 °C'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pelet oda sıcaklığında 10 dakika boyunca kurumaya bırakıldı. 50 µl TE tamponunda süspanse edilen DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı, nanodrop spektrofotometrede belirlendi.

Plazmit DNA'nın PCR reaksiyonu ile doğrulanması

pCaSpeR-hs/act plazmit DNA'sının doğrulanması için (*SalI*-pHSP-F ve *KpnI*-pHSP-R) primerleri ile Tablo 8'deki karışım kullanılarak Tablo 9'daki gibi PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra görüntülendi.

Tablo 8. PCR Reaksiyonu Karışım İçeriği

PCR Reaksiyonu Karışım İçeriği	Miktar (µl)
Plazmit DNA	2 (~200 ng)
dNTP karışımı	0,5
<i>SalI</i> -pHSP-F primer (10 pmol/µl)	1
<i>KpnI</i> -pHSP-R primer (10 pmol/µl)	1
10x PCR tampon	2
ddH ₂ O	7,9
Taq DNA polimeraz	0,6
Toplam	15

Tablo 9. PCR Reaksiyon Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
1	94	4
	94	1
35	59	1
	72	1
	72	5
1	4	∞

Plazmit DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi

pCaSpeR-hs/act plazmit DNA'sı Fast Digest *HindIII* enzimi ile kesildi (37 °C'de 15 dakika boyunca inkübasyon) ve 80 °C'de 10 dakika boyunca tutularak *HindIII* enzimi inaktive edildi (Tablo 10). Kesilen parçaların tekrar birbirine bağlanmasını önlemek adına, kesilen

plazmitlerin 5' ucundaki fosfat grupları, 1 µl CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) enzimi ile uzaklaştırıldı (37 °C'de 30 dakika) ve örnekler agaroz jeline yüklendi.

Tablo 10. Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği

Reaksiyon Karışım İçeriği	Miktar (µl)
Plazmit DNA	2 (~800 ng)
FastDigest <i>Hind</i> III	1
10x FastDigest tampon	2
ddH ₂ O	15
Toplam	20

Kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi

%1 oranında olacak şekilde tartılan agaroz, gerekli miktardaki (80-100 ml) 1X TAE içerisine alındı, mikrodalga fırında kaynatılıp 40 °C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra bu karışıma, son konsantrasyon 0,4 µg/ml olacak şekilde RedSafe™ nükleik asit boyama solüsyonu eklenip jel katılaşmaya bırakıldı. Jel katılaştıktan sonra DNA içeren örnekler yükleme boyası ile karıştırıldı ve kuyucuklara yüklenerek 60 V'de bir belirteç (marker) ile birlikte 90 dakika boyunca yürütüldü (Sambrook & Russell, 2001). Jel sonuçları, kemilüminesans jel dökümantasyon sistemi (Bio-Rad Gel Doc XR+) ile görüntülendi ve Image Lab 6.1 programı ile işlenerek kaydedildi.

pHSP-GFP'nin Elde Edilmesi

Bu çalışmada kullanılan ısıyla indüklenebilir memeli ekspresyon plazmiti olan pHSP-GFP, Connie Cepko Lab'dan temin edilen pCMV-GFP'nin (Addgene, stok numarası: 11153) manipülasyonu ile elde edildi. *Drosophila melanogaster*'e ait HSP70 promotörü (P_{HSP}) ve regülatör bölge sekansı, pCaSpeR-hs/act (GenBank Acc. # U60735, stok numarası: 1216) den elde edildi.

P_{HSP} 'nin PCR ile amplifikasyonu

Doğrulan pCaSpeR-hs/act plazmitinde bulunan regülatör bölge ve P_{HSP} sekansı, *Sall*-pHSP-F ve *Kpn*I-pHSP-R primerleri ve Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher) içeren bir karışım kullanılarak PCR ile çoğaltıldı (Tablo 11 ve Tablo 12).

Tablo 11. PCR Reaksiyon Karışım İçeriği

PCR Reaksiyon Karışım İçeriği	Miktar (µl)
pCaSpeR-hs/act plazmiti	1 (~4 ng)
dNTP karışımı	1,6
MgCl ₂ (50 mM)	0,3
<i>SalI</i> -pHSP-F primer (10 pmol/µl)	1
<i>KpnI</i> -pHSP-R primer (10 pmol/µl)	1
5X Phusion HF tampon	4
ddH ₂ O	11,2
Phusion High-Fidelity (HF) DNA Polimeraz	0,2
Toplam	20

Tablo 12. PCR Reaksiyon Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)
1	98	30
	98	10
35	62	30
	72	60
	72	300
1	4	∞

Reaksiyon sonucu elde edilen ürünler hazırlanan agaroz jele yüklendi ve 60 V'de bir belirteç ile birlikte 80 dakika boyunca yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandığında bantlar, jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

PCR ürünlerinin saflaştırılması

PCR ürünleri agaroz jelde yürütülüp teyit edildikten sonra MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification Kit (Intron) kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi kısaca şu şekilde yapıldı: PCR ürünlerinin toplam hacminin 5 katı kadar BNL Buffer eklendi ve vortekslendi. Karışım MEGAquick-spin™ kolonuna transfer edildi. 13.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi, kolondan inen sıvı uzaklaştırıldı. Kolona 700 µl Washing Buffer eklendi, 13.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Kolondan inen sıvı uzaklaştırıldı, kurutmak için kolon boş olarak 13.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Kolon, steril mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Membrana dokunmadan kolonun tam ortasına 30 µl Elution Buffer eklendi. Oda sıcaklığında 15-20 dakika boyunca inkübe edildikten sonra 13.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi, kolon uzaklaştırıldı. Elüe edilen DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı nanodrop spektrofotometre ile kontrol edildi.

PCR ürünlerinin ve plazmit DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesimi

Uçlarında kesim enzimlerinin tanıma sekanslarını içeren P_{HSP} sekansına ve regülatör bölgeye ait PCR ürünleri ve pCMV-GFP, Fast Digest *SalI* (37 °C'de 65 dakika) ve *KpnI* (37 °C'de 5 dakika) enzimleri (ThermoFisher) ile kesildi. *SalI* ve *KpnI* enzimlerinin inaktivasyonu için 65 °C'de 10 dakika ve 80 °C'de 5 dakika inkübasyon adımları kullanıldı. Plazmit DNA için 1 µl CIAP eklenerek 37 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi (Tablo 13).

Tablo 13. Kesim Reaksiyon Karışım İçeriği

Reaksiyon Karışım İçeriği	PCR ürünü kesim reaksiyonu Miktar (µl)	PCR ürünü kesim reaksiyonu Miktar (µl)
Kalıp DNA	1,5 (200 ng)	1,6 (1,5 µg)
10x Fast Digest tampon	2	3
ddH ₂ O	24,5	22,4
Fast Digest <i>SalI</i>	1	1
Fast Digest <i>KpnI</i>	1	1
Toplam	30	30

PCR ürünlerinin ekstraksiyonu

Kesim sonrası promotörü içeren ilgili dizi, steril saf su ile 100 µl'ye tamamlandı. Üzerine toplam hacmin yarısı kadar fenol/kloroform/izoamil alkol (25/24/1) ilave edilerek 20 saniye vortekslendi. 14500 rpm'de oda sıcaklığında 10 dakika boyunca santrifüj edilmesinin ardından üst faz, temiz bir tüpe alındı. Alınan fazın 1/10 hacmi kadar 3 M sodyum asetat ve 2,5 hacim saf etanol ilave edildi. Vorteksleme işleminin ardından 14500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılarak oda sıcaklığında kurutulan pelet, 20 µl TE tamponunda çözüldü.

Kesilen plazmit DNA'nın saflaştırılması

Kesim sonrası plazmit DNA jele yüklenip yürütüldükten sonra ilgili kısım PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) kullanılarak jelden ekstrakte edildi. Bu işlem için; jelde yürütülen DNA, UV altında kesilerek jelden alındı ve bant ağırlığı belirlendi. Üzerine 3 hacim Gel Solubilization Buffer (L3) eklendi. 50 °C'de 10 dakika boyunca su banyosunda inkübe edildi, her 3 dakikada bir tüpler hafifçe vortekslendi. Jel çözüldükten sonra 5 dakika daha 50 °C'de inkübe edildi. 1 jel hacmi kadar izopropanol eklendi ve karıştırıldı. Tüplerdeki karışım tek bir kolonda birleştirildi, 14.000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi, kolonun altındaki sıvı uzaklaştırıldı. Kolona 500 µl Wash Buffer (W1) eklendi. 14.000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi, kolonun altındaki sıvı uzaklaştırıldı. Kolon boş olarak maksimum hızda (20.000

g) 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Kolon yeni steril bir tüpe yerleştirildi ve kolonun tam ortasına 50 µl Elution Buffer (E5) eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakika boyunca inkübe edildikten sonra 14.000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen DNA'ların konsantrasyonu ve saflığı nanodrop spektrofotometre ile kontrol edildi.

Ligasyon reaksiyonu

Restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilmiş olan plazmit DNA ve regülatör dizisiyle birlikte çoğaltılan P_{HSP} sekansı, gen/plazmit DNA miktarı eşit hacimde olacak şekilde (7 µl) karıştırıldı (Tablo 14). Karışım T4 DNA ligaz içeren bir ortamda 16 °C'de 16 saat inkübe edilerek ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 14. Ligasyon Reaksiyonu Karışım İçeriği

Reaksiyon Karışım İçeriği	Miktar (µl)
10X ligasyon tampon	4
Plazmit DNA	7
P _{HSP} sekansı	7
T4 DNA ligaz	1
ddH ₂ O	1
Toplam	20

***E. coli* JM109 hücrelerinin transformasyonu**

Kompetan E. coli hücrelerinin hazırlanması

Katı besiyerinde büyütülen *E. coli* hücreleri 10 ml LB sıvı besiyerine inoküle edildi ve 37 °C'de, 150 rpm'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, kültürden 500 µl alınarak 50 ml LB sıvı besiyerine inoküle edilip, 37 °C'de, 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Kültürün OD₆₀₀ değeri 0,5'e ulaşınca sıvı kültür alınıp buz üzerine konuldu. Bu kültürden 44 ml steril falkon tüpe konularak 6.000 rpm'de, +4 °C'de, 8 dakika boyunca santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücrelere 20 ml buzda soğutulmuş (ice-cold) CaCl₂ çözeltisi (50 mM) ilave edilip yavaşça pipetaj ile resüspanse edildi. Steril falkon tüpe 10 ml hücre alınarak 20 dakika boyunca buz üzerinde bekletildikten sonra 6.000 rpm'de, +4 °C'de, 8 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Hemen kullanım için peletin üzerine 1,25 ml buzda soğutulmuş CaCl₂ çözeltisi eklenerek süspanse edildi. Süspansiyon 100'er µl'lik alikuatlara ayrıldı. Kompetan hale getirilen *E. coli* hücreleri transformasyon işlemi için buz üzerinde bekletildi (Hideaki Shiraishi, 2000).

Trasformasyon

Ligasyon ürünü (5 µl) daha önceden CaCl₂ ile kompetan hale getirilmiş olan *E. coli* JM109 hücrelerine ısı şok yöntemi ile transfer edildi (Shiraishi, 2000). Transfer işleminin ardından, bakteri hücreleri, steril ortamda önceden ısıtılmış 250 µl S.O.C besiyeri ile karıştırıldıktan sonra 1 saat çalkalanarak inkübe edildi (37 °C, 225 rpm). Ardından 150 µl hücre süspansiyonu LB-amfisilin seçim plaklarına yayıldı ve 37 °C’de 1 gece inkübe edildi.

Koloni PCR

İnkübasyon sonrası gelişen antibiyotik direncine sahip kolonilerden rastgele seçilip promotöre (HSP) ve plazmit DNA’ya ait primerler kullanılarak koloni PCR yapıldı. Reaksiyon sonrası elde edilen ürünler agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

***P_{HSP}*’ye ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu**

İnkübasyon sonunda gelişen kolonilerden rastgele seçim yapılarak plazmite yerleştirilen sekansa ait primerler (*SalI*-pHSP-F ve *KpnI*-pHSP-R) ile koloni PCR gerçekleştirildi (Ebru Kaymak, 2008). Gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu için reaksiyon karışım içeriği ve PCR reaksiyon şartları Tablo 15 ve Tablo 16’da verildi. Reaksiyon sonucu elde edilen ürünler, agaroz jelde 60 V’de 90 dakika boyunca yürütüldükten sonra görüntülendi.

Tablo 15. Koloni PCR Reaksiyonu Karışım İçeriği

PCR Reaksiyon Karışım İçeriği	Miktar (µl)
dNTP karışımı	0,8
<i>SalI</i> -pHSP-F primer (10 pmol/µl)	1
<i>KpnI</i> -pHSP-R primer (10 pmol/µl)	1
10x PCR tampon	1
ddH ₂ O	7,6
Taq DNA polimeraz	0,6
Toplam	12

Tablo 16. Koloni PCR Reaksiyon Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
1	94	10
	94	1
35	59	1
	72	1
	72	5
1	4	∞

***P_{HSP}*'ye ve plazmit DNA'ya ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu**

Seçilen kolonilerle P_{HSP}'ye ait forward ve plazmit DNA'ya ait reverse primerler (SalI-pHSP-F ve EGFP-N-R) ile koloni PCR gerçekleştirildi. Gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu için reaksiyon karışım içeriği ve PCR reaksiyon şartları Tablo 17 ve Tablo 18'de verildi. Reaksiyon sonucu elde edilen ürünler, agaroz jelde 60 V'de 90 dakika boyunca yürütüldükten sonra görüntülendi.

Tablo 17. Koloni PCR Reaksiyonu Karışım İçeriği

PCR Reaksiyon Karışım İçeriği	Miktar (µl)
dNTP karışımı	0,8
SalI-pHSP-F primer (10 pmol/µl)	1
EGFP-N-R primer (10 pmol/µl)	1
10x PCR tampon	1
ddH ₂ O	7,6
Taq DNA polimeraz	0,6
Toplam	12

Tablo 18. Koloni PCR Reaksiyon Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
1	94	10
	94	1
35	61	1
	72	1
	72	5
1	4	∞

Muhtemel rekombinat plazmitlerin sekans analizi ile doğrulanması

Belirlenen koloniler (4. ve 8. koloniler) LB-amfisilin sıvı besiyerlerinde çoğaltıldı ve PureLink™ HiPure Plasmid Miniprep Kit kullanılarak rekombinant plazmitler saflaştırıldı. DNA örnekleri, 50 µl nükleaz içermeyen suda süspanse edildi. Saflaştırılan plazmitlerin Sanger ve NGS (Next Generation Sequencing) ile sekans analizi yaptırıldı. Ayrıca, plazmitlere yerleştirilen regülatör bölge ve HSP promotör sekansına ait elde edilen analiz sonuçlarının karşılaştırılması için klonlanan bu dizilerin çoğaltılmasında kalıp olarak kullanılan pCaSpeR-hs/act plazmitinin de NGS ile sekans analizi yaptırıldı.

pHSP-Azu'nun Elde Edilmesi

Kodon optimize edilen ve durdurma (stop) kodonu taşıyan azurin geni (S-Azurin) pHSP-GFP'ye yerleştirilerek pHSP-Azu elde edildi.

Azurin Genine ait nükleotit sekansının PCR ile amplifikasyonu

Terapötik protein olarak kullanılacak olan azurine ait dizi için NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veri tabanı kullanıldı. Wild-type *P. aeruginosa* bakterisine ait azurin gen dizisinin memeli hücrelerinde iyi ifade edilebilmesi için IDT (Integrated DNA Technologies) Codon Optimization Tool software (San Jose, California, USA) programı kullanıldı. Optimize edilen sekansın optimizasyondan önce ve sonraki kodon adaptasyon indeksleri (Codon Adaptation Index-CAI) ve GC içerikleri, GenScript Rare Codon Analysis Tool software (GenScript, Piscataway, NJ, USA) programı kullanılarak belirlendi. Belirlenen dizi sentetik olarak satın alındı (ThermoFisher). Durdurma (stop) kodonu taşıyan azurin geninin amplifikasyonu diziye özgü tasarlanan primerler (Tablo 6) ve Phusion High-Fidelity (HF) DNA polimeraz kullanılarak gerçekleştirildi. Aynı zamanda primer bağlanma sıcaklığının belirlenebilmesi için 65 °C, 65,5 °C ve 66 °C sıcaklıklarda gradyan PCR yapıldı (Tablo 19 ve Tablo 20). PCR ürünlerinin azurin gen dizisine ait olduğu agaroz jel elektroforezi ile doğrulandı. İlgili diziye ait PCR ürünleri, kesim reaksiyonu için MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification Kit (Intron) protokolü takip edilerek saflaştırıldı. Elde edilen DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı nanodrop spektrofotometre ile kontrol edildi.

Tablo 19. Gradyan PCR reaksiyonu karışım içeriği.

PCR Reaksiyon Karışım İçeriği	Miktar (µl)
Kalıp DNA (Azurin içeren plazmit)	0,8 (4 ng)
dNTP karışımı	1,6
MgCl ₂ (50 mM)	0,3
<i>KpnI</i> -Azu-F primer (10 pmol/µL)	1
<i>ApaI</i> -SAzu-R primer (10 pmol/µL)	1
5X Phusion HF tampon	4
ddH ₂ O	11,4
Phusion High-Fidelity (HF) DNA polimeraz	0,2
<u>Toplam</u>	20

Tablo 20. Gradyan PCR Reaksiyon Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)
1	98	30
	98	10
35	65- 65,5- 66	30
	72	30
	72	300
1	4	∞

PCR ürünlerinin ve plazmit DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesimi

Uçlarında kesim enzimlerinin tanıma sekanslarını içeren azurin gen sekansına ait PCR ürünleri ve pHSP-GFP, Fast Digest *KpnI* ve *ApaI* (37 °C'de 30 dakika) enzimleri (ThermoFisher) ile kesildi. *KpnI* ve *ApaI* enzimlerinin inaktivasyonu için 65 °C'de 5 dakika ve 80 °C'de 5 dakika inkübasyon adımları kullanıldı. Plazmit DNA için 1 µl CIAP eklenerek 50 °C'de 60 dakika boyunca inkübe edildi (Tablo 21). Kesim reaksiyonu sonunda PCR ürünleri için Fenol/Kloroform ekstraksiyonu yapılırken, plazmit DNA agaroz jele yüklenerek yürütüldü, ilgili kısım jelden ekstrakte edilerek saflaştırıldı. Kesim reaksiyonu sonrası %1'lik agaroz jele yüklenip yürütülen örnekler, jelden ekstrakte edildi. Vektör DNA'nın jelden ekstraksiyonu 'MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification Kit' kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 21. Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği

Reaksiyon Karışım İçeriği	PCR ürünü kesim reaksiyonu Miktar (µl)	pHSP-GFP kesim reaksiyonu Miktar (µl)
Kalıp DNA	11,52 (200 ng)	1,95 (1 µg)
10x Fast Digest tampon	2	2
ddH ₂ O	14,48	14,05
Fast Digest <i>KpnI</i>	1	1
Fast Digest <i>ApaI</i>	1	1
Toplam	30	20

Ligasyon Reaksiyonu ve transformasyon

Restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilmiş olan plazmit DNA ve azurin gen sekansı, gen/plazmit DNA miktarı eşit hacimde olacak şekilde (4,5 µl) karıştırıldı (Tablo 22). Karışım T4 DNA ligaz içeren bir ortamda 16 °C'de 16 saat inkübe edilerek ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ligasyon ürünlerinin *E. coli* hücrelerine transfer edilmesi için öncelikle hücreler kompetan hale getirildi. Daha sonra buzda bekletilen kompetan hücreler üzerine 5 µl DNA (ligasyon karışımı) ilave edilerek transformasyon işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 22. Ligasyon Reaksiyonu Karışım İçeriği

Reaksiyon Karışım İçeriği	Miktar (µl)
10X ligasyon tampon	4
DNA	4,5 (72 ng)
Vektör DNA	4,5 (36 ng)
T4 DNA ligaz	1,5
ddH ₂ O	5,5
Toplam	20

Koloni PCR

İnkübasyon sonrası gelişen antibiyotik direncine sahip kolonilerden rastgele seçilip gene (azurin) ve plazmit DNA'ya ait primerler kullanılarak koloni PCR yapıldı. Reaksiyon sonrası elde edilen ürünler agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

Plazmit DNA'ya ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu

Seçilen kolonilerle vektör DNA'ya ait primerler (*SalI*-pHSP-F ve *KpnI*-pHSP-R) ile koloni PCR gerçekleştirildi. Gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu için reaksiyon karışım içeriği ve PCR reaksiyon şartları Tablo 23 ve Tablo 24'te verildi. Reaksiyon sonucu elde edilen ürünler, agaroz jelde 60 V'de 90 dakika boyunca yürütüldükten sonra görüntülendi.

Tablo 23. Koloni PCR Reaksiyon Karışım İçeriği

PCR Reaksiyon Karışım İçeriği	Miktar (µl)
dNTP karışımı	1
<i>SalI</i> -pHSP-F primer (10 pmol/µl)	1
<i>KpnI</i> -pHSP-R primer (10 pmol/µl)	1
10x PCR tampon	1,2
ddH ₂ O	7,2
Taq DNA polimeraz	0,6
Toplam	12

Tablo 24. Koloni PCR Reaksiyon Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
1	94	10
	94	1
35	61	1
	72	1,5
	72	5
1	4	∞

Gene ve plazmit DNA'ya ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu

İnkübasyon sonunda gelişen kolonilerden rastgele seçim yapılarak hem gene (*KpnI*-Azu-F) hem de plazmit DNA'ya (EGFP-N-R) ait primerler ile koloni PCR gerçekleştirildi (Tablo 25 ve Tablo 26). Reaksiyon sonucu elde edilen ürünler, agaroz jelde 60 V'de 90 dakika boyunca yürütüldükten sonra görüntülendi.

Tablo 25. Koloni PCR Reaksiyon Karışım İçeriği

PCR Reaksiyon Karışım İçeriği	Miktar (µl)
dNTP karışımı	1
<i>KpnI</i> -Azu-F primer (10 pmol/µl)	1
EGFP-N-R primer (10 pmol/µl)	1
10x PCR tampon	1,2
ddH ₂ O	7,2
Taq DNA polimeraz	0,6
Toplam	12

Tablo 26. Koloni PCR Reaksiyon Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)
1	94	10
	94	1
35	64	1
	72	1,5
	72	5
1	4	∞

Muhtemel rekombinat plazmitlerin sekans analizi ile doğrulanması

Koloni PCR belirlenen koloniye ait bakteriler LB-amfisilin sıvı besiyerlerinde çoğaltıldı ve rekombinant plazmit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen™) kullanılarak saflaştırıldı. Klonlamanın doğrulanması için saflaştırılan plazmitler Sanger sekans analizine gönderildi.

Manyetik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Nitelendirilmesi

Önceki çalışmalar kapsamında, APTES ile modifiye edilmiş süperparamanyetik silika kaplı demir oksit manyetik NP'ler çalışma grubumuz tarafından elde edildi (Kalakenger, 2021). NP'lerin ayırt edici yönlerinin ve genel özelliklerinin belirlenmesi işlemleri, Atatürk Üniversitesi, Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) bünyesindeki cihazlar ve uzman desteği ile gerçekleştirildi. Yapısal analiz için TEM (geçirimli

elektron mikroskop) ile görüntü alınırken örnek, karbon kaplı bakır grid üzerine damlatıldı. TEM görüntüleri kullanılarak NP'lerin boyut dağılımını hesaplamak üzere ImageJ programından yararlanıldı. Ortalama boyut hesaplanırken, yaklaşık 80 adet NP'nin çap ölçümü gerçekleştirildi. Ölçüm sonuçları, OriginPro yazılımı kullanılarak bir histogram grafik olarak sunuldu.

MSNP-NH₂'lerin bulunduğu ortamı ısıtma kapasiteleri, MSI Automation Hyper-5 manyetik hipertermi cihazı (Şekil 7) ve fiber optik termometre ile belirlendi. Sıcaklığın görsel takibinde termal kamera (Seek ShotPRO, 320x240 Pixel) kullanıldı. 0,5, 5 ve 10 mg/ml konsantrasyonlarda (1 ml) hazırlanan sulu MSNP-NH₂ çözeltileri, maksimum kapasite ile çalışan cihazda ısınma durumlarına göre 10-75 dakika boyunca tutuldu. Fiber optik termometre ile elde edilen veri, sıcaklık-zaman grafiğine dönüştürüldü.



Şekil 7. Manyetik hipertermi cihazı (MSI Automation Hyper-5)

MSNP-NH₂'lere ait manyetizasyon ölçümü, Gebze Teknik Üniversitesi'nde bulunan VSM (Vibrating-sample magnetometer, Quantum Design PMS9T) cihazı ile yapıldı. Ölçüm, oda sıcaklığında 11,6 mg örnek ile ± 20 kOe manyetik alan uygulanarak gerçekleştirildi.

Floresan etiketli NP'lerin üretimi

Floresan etiketli NP'lerin üretiminde kırmızı floresan ışımaya olarak gözlenen TRITC boyası kullanıldı. Bu amaçla, 2,4 μ l APTES, 0,6 ml susuz etanol içerisinde 1 mg TRITC ile karıştırıldı ve karışım inert atmosfer altında ve karanlık şartlarda 2 saat karıştırıldı (Xia *et al.* 2009). Boya ile modifiye edilmiş APTES daha önce yapılan çalışmada silika modifikasyonunda anlatıldığı (Kalakenger, 2021) gibi hazırlanan NP'lerin TEOS ekleme adımında TEOS ile karıştırılarak reaksiyon ortamına eklendi. Reaksiyon sonunda NP'ler toplandı ve silika modifikasyonu adımını takip eden CTAB uzaklaştırma ve APTES ile amin modifikasyonu işlemleri uygulandı (Kalakenger, 2021). Son olarak etanol ile yıkanan TRITC-işaretli MSNP-NH₂'ler ağızlı açık olarak karanlık ortamda ve steril kabin içinde kurutuldu.

MSNP'lerin DNA Bağlama ve Salım Yeteneği

Manyetofektinler hazırlanırken uygun şartlar daha önce yapılan çalışma (Kalakenger, 2021) referans alınarak devam ettirildi.

Üretilen MSNP-NH₂'nin DNA yükleme potansiyelini ortaya koymak üzere; MSNP-NH₂ (50 ve 75 µg), PEI (0,5 ve 1,5 µg) ve DNA (~1 ve ~2 µg) kullanılarak DNA bağlama ve ardından %1 SDS ile DNA salımı çalışıldı. Manyetofektin karışımları hazırlanırken DNA konsantrasyonları; x µg/25 µl, PEI için istenen konsantrasyonlar; x µg/25 µl ve MSNP-NH₂'ler için belirlenen konsantrasyonlar; x µg/50 µl olacak şekilde sabit tutuldu. PEI içermeyen gruplarda eşit hacimde PBS kullanıldı. İşlem sırasında son hacimler PBS ile 100 µl'ye tamamlanarak deney grupları arasında son hacim her zaman eşit tutuldu. Hazırlanan manyetofektin karışımları 30 dakika boyunca inkübe edildi ve 30 dakika boyunca mıknatıs uygulandıktan sonra üst faz steril bir tüpe alındı. Mıknatısla toplanan manyetofektin karışımlarında bağlanmayan DNA ve PEI'leri ortamdan uzaklaştırmak için her grup 36 µl steril saf su ile yıkandıktan sonra tekrar mıknatıs ile toplanarak üst faz atıldı. Daha sonra tüplere, 36 µl %1 SDS eklenerek vorteks ve pipetaj yapıldıktan sonra tüplerin ağzı parafilmle kapatılarak 60 °C'de 300 rpm'de ısı bloğunda 60 dakika boyunca inkübe edildi. Daha sonra, yine 30 dakika boyunca mıknatıs ile MSNP-NH₂'ler toplandıktan sonra üst faz steril tüplere alındı. DNA salımından önce ve sonra toplanan her örnekten 18 µl alınarak %1'lik agaroz jele yüklenip, 80 V'de 1 saat yürütüldü.

Elde edilen MSNP-NH₂'lerin DNA bağlama ve salım yeteneği değerlendirildikten sonra farklı şartlarda hazırlanan manyetofektin komplekslerinin yüzey yüklerinin belirlenmesi için zeta potansiyellerine bakıldı. Bu amaçla MSNP-NH₂ (100 µg) miktarı sabit tutulmak kaydıyla farklı dozlarda DNA (0,5, 1, 3, 5 µg) ve farklı PEI/DNA (a/a) oranlarında (0,5, 0,75, 1, 2 ve 4) PEI kullanılarak manyetofektinler hazırlandı. Hazırlanan karışımlar 30 dakika boyunca oda şartlarında inkübe edildikten sonra karışımların 25 °C'de DLS (ZS90, Malvern) ölçümleri alındı.

MCF-7 ve MCF-10A Hücre Hatlarının Kültürü

Bu çalışmada MCF-7 (ATCC®HTB-22™) ve MCF-10A (ATCC®CRL-10317™) hücre hatları kullanıldı. MCF-7 hücrelerinin büyütülmesi için yüksek glikoz içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), %10 fetal bovine serum (FBS) ve %1 antibiyotik solüsyonu ile desteklenerek kullanıldı. MCF-10A hücreleri %5 at serum, %1 antibiyotik, 0,5 µg/ml hidrokortizon, 10 µg/ml insülin, 100 ng/ml kolera toksin ve 20 ng/ml epidermal büyüme faktörü (EGF) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) içinde

büyütüldü (Nahler, 2009). Hücreler 37 °C’de, %5 CO₂ ve %90 nem içeren inkübatörde inkübe edildi. Uygun medyumda, 25 veya 75 cm² taban alanlı hücre kültür kaplarında büyütülen hücreler tripsin-EDTA solüsyonu (MCF-7 için %0,25 tripsin, 5 dakika ve MCF-10A için %0,05 tripsin, 15 dakika) ile toplandı ve sayıldı.

Hücresel alımın belirlenmesi

MSNP’lerin hücreler tarafından alındığını ve bu sürece mıknatısın etkisinin belirlenmesi için steril kabin içinde, 24 oyuklu hücre kültür kaplarının oyuklarına 0,5 ml saf etanol konuldu ve 12 mm çaplı yuvarlak lameller bu oyuklara yerleştirildi. 30 dakika sonra etanol çekildi ve 30 dakika boyunca UV ışık uygulandı. Cam içeren oyuklar 2 kez steril saf su ile yıkanıp 50 µg/ml konsantrasyonda PBS ile seyreltilen Poli-D-lizin ile 1 saat muamele edildi. Daha sonra kuyular 3 kez steril saf su ile yıkanıp 3 saat kabin içerisinde kurumaya bırakıldı. Ardından camlara, her bir oyukta 7,5x10⁴ olacak şekilde MCF-7 ve MCF-10A hücreleri ekildi. 24 saat sonra eski medyum ortamı çekildi ve oyuklara 100 µg/ml konsantrasyonda TRITC-işaretli MSNP-NH₂’ler içeren 1 ml medyum eklendi (kontrol grubu hariç). Uygulama yapılmış hücreler standart inkübatör şartları altında 0, 15, 30 ve 60 dakika süreyle mıknatıs üzerinde tutuldu. Mıknatıs kaldırıldıktan sonra, inkübatör içerisinde 4 saat inkübasyonun ardından eski medyum uzaklaştırıldı ve oyuklar PBS ile iki kez yıkandı. Oda şartlarında %4 paraformaldehit (PFA) ile 15 dakika boyunca fikse edilen hücreler, 5 dakika boyunca %0,3 Triton X-100 ile muamele edildi. Oyuklar PBS ile tekrar yıkandı, %2,5 oranında olacak şekilde PBS ile seyreltilen FBS oyuklara eklendi ve 30 dakika boyunca oda şartlarında inkübe edildi. FBS uzaklaştırıldıktan sonra Flash Phalloidin Green 488 (Biolegend), PBS ile 1:200 oranında seyreltilerek oyuklara eklenip 20 dakika boyunca inkübe edildi. Tüm kuyular 1 kez PBS ile yıkandıktan sonra PBS içinde çözülen DAPI (2 µg/mL) ile 37 °C’de 15 dakika boyunca inkübe edilerek karşıt boyama yapıldıktan sonra örnekler PBS ile yıkandı. Hücre boyama tamponu eklendikten sonra her örnek lamelle kapatılarak lazer taramalı konfokal mikroskop ile incelendi. 5 µm’lik adım boyutuyla (Z-kesit) yüksek çözünürlüklü konfokal mikroskop görüntüleme gerçekleştirildi.

Hücre morfolojilerinin kontrolü

Manyetofeksiyon uygulamasının hücre morfolojileri üzerine etkisinin araştırılması amacıyla steril cam üzerine ekilen MCF-7 ve MCF-10A hücreleri, kontrol grupları hariç 100 µg/ml MSNP-NH₂ ve 3 µg pCMV-GFP ile muamele edilip hücreler 30 dakika boyunca mıknatıs üzerinde tutuldu. Mıknatıs kaldırıldıktan sonra hücrelerin 48 saat inkübasyonunun ardından hücre iskeleti Flash Phalloidin Red 594 (BioLegend) ile firmanın önerdiği protokole

göre boyandı. Hücre çekirdeği DAPI ile boyandı. Boyamalardan önce hücreler %4 PFA ile 15 dakika boyunca fikse edildi. 5 dakika boyunca %0,3 Triton X-100 ile muamele edildi. Oyuklar, PBS ile tekrar yıkandı ve PBS içinde çözölen DAPI (2 µg/ml) ile 37 °C’de 15 dakika boyunca inkübe edilerek örnekler, hücre boyama tamponu içinde tutularak lazer taramalı konfokal mikroskop ile görüntülendi.

Proliferasyon ve sitotoksite testleri

Çalışmada proliferasyon ve sitotoksitenin belirlenmesi için MTS (abcam) testi kullanıldı. Bunun için, 96 oyuklu hücre kültür kaplarının her bir oyuğuna 1×10^4 MCF-7 ve 7×10^4 MCF-10A olacak şekilde hücreler ekildi. 24 saat sonra uygulama yapıldı. Sadece uygulanacak gruplara 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 100 µg/ml konsantrasyonlarında MSNP-NH₂ uygulandı. Sadece PEI içeren gruplarda ise 0, 5, 10, 15, 20, 25 µg/ml konsantrasyonlarında PEI uygulandı. Tüm MSNP-NH₂ uygulamalarında hücre kültür kapları 30 dakika boyunca inkübatör içinde bir mıknatıs üzerinde tutuldu. 48 saat inkübe edilen hücrelerden eski medyum çekildi ve hücre içeren oyuklar PBS ile yıkandı. Her oyuğa 220 µl MTS/medyum karışımı (20 µl MTS ve 200 µl medyum içeren) eklendi. Üretici firmanın tavsiyesi üzerine 0,5-4 saat inkübe edildikten sonra oyuklardan 200 µl sıvı alındı ve temiz bir 96 oyuklu hücre kültür kabına transfer edildi. Muamele edilen ve muamele edilmeyen hücrelerin absorbansı, 490 nm’de (OD₄₉₀) bir plaka okuyucu ile ölçüldü. Çalışmada DMSO, pozitif kontrol (5 µl) olarak kullanıldı. Kontrol grubuna göre % canlılık hesaplandı ve OriginPro uygulaması kullanılarak veriler görselleştirilip istatistiksel analizi yapıldı. Hücre canlılığı (%) aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ canlılık} = \frac{\text{absorbans(muamele)}}{\text{absorbans(kontrol)}} \times 100$$

Apoptoz testi

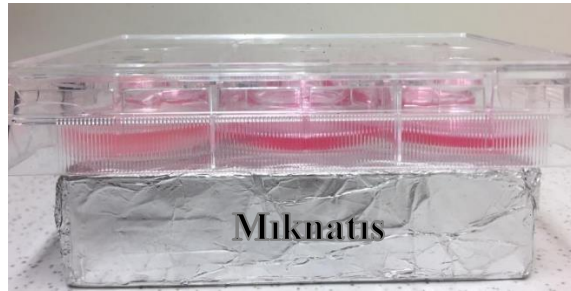
Hücre canlılığı, erken-geç apoptoz ve nekrozun belirlenmesi için çalışmada PI ile Annexin V-FITC Apoptoz Tespit Kiti (Biolegend, 640914) kullanıldı. Akış sitometri ile manyetofeksiyonun apoptotik etkisinin belirlenmesi için kullanılacak apoptoz kitinin GFP ile aynı kanalda ışıma vermesi nedeniyle GFP içeren gruplara AnnexinV-FITC uygulanmadı. pHSP-Azu, GFP ekspresyonu gerçekleştirmediğinden, dual terapide apoptoz oranının belirlendiği çalışmalarda bu plazmit kullanıldı. Bunun için 6 oyuklu hücre kültür kaplarına $2,5 \times 10^5$ MCF-7 ve MCF-10A olacak şekilde hücreler ekildi. Hücre ekiminden 24 saat sonra uygulama gerçekleştirildi ve uygulamadan 48 saat sonra test yapıldı. Test için hücreler toplandı ve pellet bir kez PBS ile santrifüjde yıkandı. Firma talimatlarına göre Binding Buffer ile

süspanse edilen hücreler Annexin V-FITC ve PI ile inkübe edildi. Örnekler akış sitometri cihazında okutuldu ve sonuçlar CytExpert 2.0 programı kullanılarak analiz edildi.

Transfeksiyon ve Promotör Kontrolü

HSP promotörünün hücre kültürü şartlarında çalışıp çalışmadığını gözlemek amacıyla öncelikle MCF-7 hücreleri sadece PEI ile transfekte edildi. Bu amaçla, PEI (PEI/DNA: 0,5 veya 0,75) ile pCMV-GFP veya pHSP-GFP (5 µg) oda şartlarında 30 dakika boyunca inkübe edildikten sonra hücrelere uygulandı. Uygulamadan 12 saat sonra, HSP promotörü, hücrelerin 38 °C'ye ayarlı inkübatörde 90 dakika boyunca tutulmasıyla indüklendi. İndüksiyondan 48 saat sonra hücreler tripsinle toplanıp, hücre boyama tamponu içinde süspanse edilerek akış sitometri cihazında okutuldu.

Daha sonra, HSP promotörünün indüksiyonu için MHT ile farklı sayıda indükleme yapıldı. 75 µg/ml MSNP-NH₂, 0,75 oranında PEI ve 3 µg pCMV-GFP veya pHSP-GFP ile karıştırıldı ve MCF-7 hücrelerine bir mıknatıs yardımıyla uygulandı (Şekil 8). HSP promotörünün indüksiyonu MHT aracılığıyla 1, 2 veya 3 kez (40 °C'de 30 dakika) olmak üzere gerçekleştirildi. Tekrarlı indüksiyonda, ikinci indüksiyon, ilk indüksiyondan 24 saat sonra, üçüncü indüksiyon ise ikinci indüksiyondan 8-10 saat sonra yapıldı. Uygulamalardan 48 saat sonra hücreler toplandı. Akış sitometri analizi ile GFP içeren hücre yüzdeleri ve PI ile boyama yapılarak hücrelerin ölüm oranları belirlendi.



Şekil 8. Mıknatıs ile hücrelere manyetofektinin uygulamasına ait fotoğraf

Son olarak, MCF-7 ve MCF-10A hücreleri, 100 µg/ml MSNP-NH₂, 3 µg pCMV-GFP veya pHSP-GFP ve PEI/DNA oranı 4 olacak şekilde PEI (µg) ile 30 dakika boyunca inkübe edildikten sonra hazırlanan manyetofektinler ile muamele edildi. Hücreler, 3 ve 6 saat AC manyetik alan altında tutularak P_{HSP}'nin indüklenmesi sağlandı. Hücreler, 48 saat inkübe edildikten sonra akış sitometri cihazında okutularak GFP içeren hücre yüzdeleri belirlendi. Aynı şartlar altında deney grubu hazırlandı ve steril cam üzerine ekili hücrelere uygulama yapıldıktan sonra hücreler konfokal mikroskop ile görüntülendi.

Tüm deneylerde konfokal mikroskop ile görüntüleme öncesinde hücreler, %4 PFA ile fikse edilip hücre çekirdeği DAPI ile hücre iskeleti ise Flash Phalloidin 594 ile boyandı. Ayrıca GFP içeren hücre yüzdelерinin belirlenmesi amacıyla tripsinlenip toplanan hücreler, hücre boyama tamponu içinde süspanse edilerek akış sitometri cihazı ile analiz edildi. Akış sitometri analizinde GFP ölçümü için cihazın FITC kanalı kullanıldı. Diğer yandan, akış sitometri ile transfeksiyon etkinliğine ve propidium iyodür (PI) ile boyanan hücrelerin ölüm oranlarına bakıldı.

MHT Optimizasyon Çalışmaları

MSNP-NH₂'nin AC manyetik alan altında MCF-10A ve MCF-7 hücrelerinin canlılığına olan etkisini araştırmak amacıyla MHT uygulama sıcaklığı, MHT uygulama süresi ve MSNP-NH₂ konsantrasyonu (50, 75, 100 ve 150 µg/ml) optimizasyon deneyleri yapıldı. Öncelikle hücreler, 75 µg/ml konsantrasyonda MSNP-NH₂ ile muamele edilip farklı sıcaklıklarda (38, 39, 40 ve 41 °C) 20 dakika boyunca MHT cihazında tutuldu. Süre optimizasyonu için ise aynı şartlarda MSNP-NH₂ uygulanan hücreler 41 °C'de farklı sürelerde (15, 30, 45, 60, 90 dakika) AC manyetik alana tabi tutuldu. Uygulama yapılmayan hücreler (kontrol grubu) toplamda 30-45 dakika boyunca MHT cihazında tutuldu. Uygulama sonrası hücreler eşit şekilde 96 oyuklu hücre kültür kaplarına ekildi ve 48 saat sonunda MTS testi uygulandı. Daha sonra, seçilen şartlara göre muamele edilen hücrelere apoptoz testi yapıldı.

Son olarak MHT indüksiyon sayısını araştırmak üzere 75 µg/ml MSNP-NH₂, 0,75 oranında PEI ve 3 µg pHSP-GFP ile karıştırıldı ve MCF-7 hücrelerine uygulandı. HSP promotörünün indüksiyonu MHT aracılığıyla 1, 2 veya 3 kez olmak üzere gerçekleştirildi (40 °C'de 30 dakika). Aynı şartlar inkübatörde gerçekleştirilerek indüksiyon işleminin tekrar edildi. Bir grup hücre ise DNA içermeyecek şekilde hazırlanan MSNP-NH₂ ile muamele edilerek AC manyetik alan altında tutuldu. Tekrarlı indüksiyon grupları her 12 saatte bir tekrar MHT cihazında tutuldu.

Dual Terapi Uygulamaları

Dual terapi için MCF-7 ve MCF-10A hücreleri 35 mm hücre kültürü kaplarına ekildi ve belirlenen gruplara manyetofektin uygulandı. Gece boyu inkübasyonun ardından hücreler 90 dakika boyunca AC manyetik alana tabi tutuldu. Tekrarlı indüksiyonda, ikinci indüksiyon ilk indüksiyondan 24 saat sonra, üçüncü indüksiyon ise ikinci indüksiyondan 8-10 saat sonra yapıldı. Hücrelerin MHT öncesi ve sonrası sıcaklıkları termal kamera ile ölçüldü. İlk indüksiyondan 48 saat sonra Annexin-V/PI kiti kullanılarak apoptoz testi yapıldı ve gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) için RNA örnekleri toplandı. Deney grupları (1) muamele

yapılmamış, (2) MHT veya azurin geni uygulanmış ve (3) MHT veya azurin geni uygulanmamış örnekleri içerecek şekilde planlandı.

Azurinin MSNP-NH₂ içermeyen ve hipertermi uygulanan gruplardaki etkisini gözlemek için MCF-7 ve MCF-10A hücreleri 35 mm hücre kültürü kaplarına ekildi ve belirlenen gruplara manyetofektin uygulandı. Gece boyu inkübasyonun ardından hücrelerin medyumı değiştirildi. Hücreler 38 °C'ye ayarlanmış inkübatörde 90 dakika boyunca inkübe edilerek P_{HSP} indüklendi. P_{HSP}'nin indüksiyonu için 1, 2 ve 3 kez inkübatörde inkübe edilen gruplar oluşturuldu. Tekrarlı indüksiyonda, ikinci indüksiyon ilk indüksiyondan 24 saat sonra, üçüncü indüksiyon ise ikinci indüksiyondan 8-10 saat sonra yapıldı. İlk indüksiyondan 48 saat sonra Annexin-V/PI kiti kullanılarak apoptoz testi yapıldı.

Azurinin artan PEI/DNA oranlarında 3 ve 6 saat hipertermi uygulanan gruplardaki etkisini gözlemek için MCF-7 ve MCF-10A hücreleri 35 mm hücre kültürü kaplarına ekildi. Gece boyu inkübasyonun ardından hücreler 90 dakika boyunca AC manyetik alana tabi tutuldu. Hücrelerin MHT öncesi ve sonrası sıcaklıkları termal kamera ile ölçüldü. İndüksiyondan 48 saat sonra Annexin-V/PI kiti kullanılarak apoptoz testi yapıldı ve qRT-PCR için RNA örnekleri toplandı. Deney grupları, (1) muamele yapılmamış, (2) MHT veya azurin geni uygulanmış ve (3) MHT veya azurin geni uygulanmamış örnekleri içerecek şekilde planlandı.

Kantitatif Gen Ekspresyon (Real-Time PCR) Analizi

qRT-PCR ile gen ekspresyon analizlerinde daha hızlı, daha hassas ve daha verimli sonuçlar elde edildiği için çok tercih edilen, oluşan DNA miktarının artmasıyla floresan şiddetinin de arttığı bir metottur. Kullanılan primer ve prob sayesinde tek bir tüp içerisinde sayısal veriler alınabildiği gibi hedef bölgede bulunan mutasyonlar da belirlenebilir. TaqMan primer-probları ile yapılan çalışma sisteminde 5' ve 3' uçlarında floresans işaretli prob kullanılır. Hedeflenen dizi tek zincir haline getirildikten sonra prob, primerlerin bağlanma bölgesi arasındaki DNA'ya bağlanır. Buradaki bağlanma devam ettikçe probda bulunan florokrom baskılanır. Taq DNA polimeraz enzimi aktifleştikçe florokrom serbest hale geçerek sinyal oluşturmaya başlar (Holland *et al.* 1991; Morris *et al.* 1996). Çalışmada gerçekleştirilen qRT-PCR analizinde BAX (BCL2-ilişkili proteini/pro-apoptotik) ve BCL2 (B-hücresi lenfoma 2/anti-apoptotik) mRNA ekspresyon seviyeleri belirlendi. Daha sonra dual terapi şartlarında uygulama yapılmış ve 2 kez AC manyetik alana maruz bırakılmış hücrelerde BAX ve BCL2 mRNA ekspresyon seviyeleri araştırıldı.

Total RNA izolasyonu

Uygulama yapılmış hücrelerden total RNA izolasyonu için ilk olarak, hücreler PBS tamponu ile yıkandı ve tripsin ile kaldırılarak 1,5 ml'lik ependorf tüplere toplandı. PureLink™ RNA Mini Kit protokolüne göre izolasyon basamakları gerçekleştirildi. Ependorf tüplerde toplanan hücrelere %1 β -merkaptoetanol içeren lizis tamponundan 0,6 ml eklendi ve hücreler süspanse edildi. Daha sonra 10 saniye buzda tutma ardından 10 saniye vorteksleme olacak şekilde 60 saniye vorteksledi. Homojenatlar, 12.000 g'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatantlar RNaz içermeyen temiz tüplere aktarıldı. Üzerlerine 1:1 oranında olacak şekilde %70 etanol eklenerek vorteksledi. Örneklerden 700 μ l alınarak toplama tüplerine transfer edildi. 12.000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolonun altında kalan sıvı uzaklaştırılarak kolona 700 μ l Yıkama Tamponu I eklendi, 12.000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona 500 μ l Yıkama Tamponu II eklendi, 12.000 g'de 15 saniye santrifüj edildi (2 kez). Kolon, bir kez de kurutma amacıyla boş şekilde santrifüj edildi. Daha sonra kolona, 75 μ l RNase içermeyen su eklendi, oda sıcaklığında 2 dakika boyunca inkübe edildi. Kolon, 12.000 g'de 2 dakika boyunca santrifüj edilerek RNA elüe edildi. RNA saflığı ve konsantrasyonu nanodrop spektrofotometrede belirlendi. RNA örnekleri -80 °C'de muhafaza edildi.

cDNA sentezi

İzolasyon sonucunda elde edilen mRNA'lerden cDNA'ların sentezi için Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre adımlar takip edildi. Kit içeriğinde bulunan solüsyonlar buz üzerinde çözdürüldükten sonra Tablo 27'de belirtilen miktarlarda reaksiyon karışımı hazırlandı. Daha sonra PCR tüplerine her bir mRNA örneği için Tablo 27'de hazırlanan karışımdan 10'ar μ l dağıtıldı ve son olarak karışıma 10 μ l RNA örnekleri eklendi. Tüpler sırasıyla 25 °C'de 10 dakika, 37 °C'de 120 dakika ve 85 °C'de 5 dakika olacak şekilde inkübe edildi. Elde edilen cDNA'ların konsantrasyonları nanodrop spektrofotometrede ölçüldü.

Tablo 27. cDNA Sentez Reaksiyon Karışımı

Reaksiyon Karışım İçeriği	Hacim (μ l)
10X RT Buffer	2,0
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8
10X RT Random Primerler	2,0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0
Nükleaz içermeyen H ₂ O	4,2
Toplam hacim	10,0

Son olarak, cDNA örnekleri qRT-PCR’da kullanılıncaya kadar -20 °C’de saklandı.

Real-Time PCR

Çalışmada kullanılan primer- problar ThermoFisher firmasından temin edildi (Tablo 28). Referans gen olarak GAPDH kullanıldı. Kontrol grubu ve uygulama yapılan gruplardan elde edilen cDNA’ların konsantrasyonları eşitlenip TaqMan primer-probları kullanılarak BAX ve BCL2 genlerinin ekspresyon miktarları ölçüldü.

Tablo 28. qRT-PCR’da Kullanılan İnsana Ait Primer-Prob Karışımlarına Ait Bilgiler

Gen	Katalog numarası	Kullanılan boya
GAPDH	Hs02786624_g1	VIC-MGB
BAX	Hs00180269_m1	FAM-MGB
BCL2	Hs00608023_m1	FAM-MGB

qRT-PCR için bileşenler Tablo 29’daki gibi hazırlanarak PCR tüplerine üçer tekrar olacak şekilde konuldu. Tablo 30’daki PCR şartları uygulandı.

Tablo 29. qRT-PCR Reaksiyon İçeriği

Reaksiyon Karışım İçeriği	Hacim (µl)
Master Mix	5,0
Prob ve Primerler	0,5
Nükleaz içermeyen H ₂ O	2,5
cDNA	2,0 (25 ng/µl)
Toplam	10,0

Tablo 30. qRT-PCR Reaksiyon Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)
1	50	60
1	95	30
40	95	15
	60	30

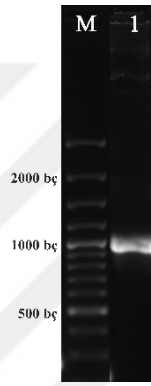
Deney sonrasında, eşik değeri döngüsü (CT) değerleri kullanılarak ve gen ekspresyon seviyeleri Livak ve ark.’daki gibi $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri hesaplanarak analiz edildi (Livak & Schmittgen, 2001). Gen ekspresyon seviyeleri, gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH, referans gen) transkriptine göre normalleştirildi. İstatistiki hesaplama, Origin Pro programında one way ANOVA testi ile yapıldı.

ARAŞTIRMA BULGULARI

pCaSpeR-hs/act Plazmit DNA'sının Doğrulanması

Plazmit DNA'nın PCR Reaksiyonu ile doğrulanması

Temin edilen pCaSpeR-hs/act plazmitinin doğrulanması için yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüleri Şekil 9'da sunuldu. Beklenildiği gibi *SalI*-pHSP-F ve *KpnI*-pHSP-R primerleri kullanıldığında pCaSpeR-hs/act plazmitindeki 949 bp'lik bölge amplifiye edildi.

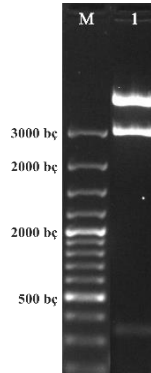


Şekil 9. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

M: Belirteç; 1 numaralı kuyu; pCaSpeR-hs/act plazmitine ait amplifikasyon sonucu, primer bağlanma sıcaklığı 59 °C. bp: baz çifti.

Plazmit DNA'nın Restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi

İkinci bir doğrulama için FastDigest *HindIII* enzimi ile kesim yapıldı. Plazmit sekansına bakılarak *HindIII* enzimi ile kesim haritası çıkarıldığında (www.restrictionmapper.org), pCaSpeR-hs/act plazmitini (9255 bp) üç yerden (368 bp, 3037 bp ve 5850 bp'lik fragmentler oluşur) kestiği belirlendi. *HindIII* enzimi ile gerçekleştirilen kesim reaksiyonu sonucu beklenen boyutlarda bantlar gözlemlendi. Kesilen plazmite ait agaroz jel görüntüsü Şekil 10'da verildi.



Şekil 10. pCaSpeR-hs/act plazmitine ait kesim reaksiyonu sonucu
(M: Belirteç, 1: Kesilmiş plazmit.)

pHSP-GFP'nin Elde Edilmesi

Drosophila melanogaster'e ait HSP70 promotörü (P_{HSP}) ve regülatör bölge sekansı, doğrulanan pCaSpeR-hs/act plazmitinden *SalI*-pHSP-F ve *KpnI*-pHSP-R primerleri kullanılarak amplifiye edilen PCR ürünleri ve pCMV-GFP Fast Digest *SalI* ve *KpnI* restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesim ürünleri ligasyon reaksiyonuyla birleştirildi. Ligasyon reaksiyonu sonucu elde edilen ürün kompetan *E. coli* JM109 hücrelerine transfer edildi. Transformasyon sonrasında hücreler LB-amfisilin besiyerine yayıldı. 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakıldıktan sonra kolonilerin gelişimi gözlemlendi (Şekil 11).

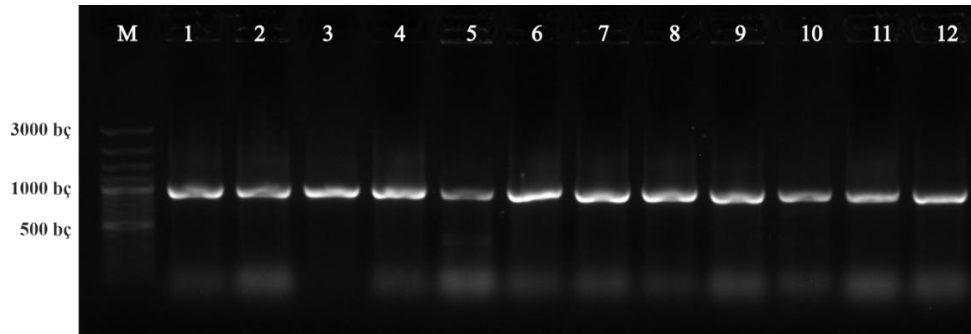


Şekil 11. İnkübasyon sonunda gelişen bakteri kolonileri

Koloni PCR

P_{HSP} 'ye ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu

Transformasyon sonrasında besiyerinde gelişen kolonilerden 12 tane seçilerek P_{HSP} 'ye ait primerler ile koloni PCR reaksiyonu yapıldı. PCR reaksiyonu sonrasında elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde 60 V'de 80 dakika boyunca yürütüldükten sonra görüntülendi (Şekil 12).

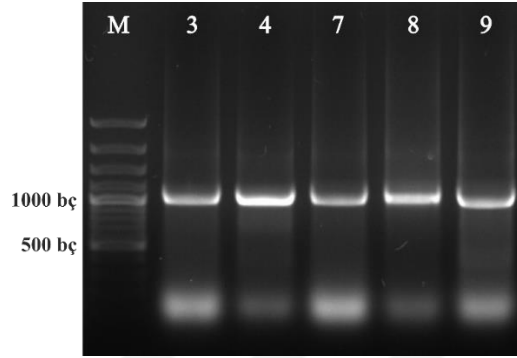


Şekil 12. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonrası görüntüsü

(M: Belirteç; 1-12. kuyular: 1'den 12'ye kadar seçilen koloniler ile gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünleri)

***P_{HSP}*'ye ve plazmit DNA'ya ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu**

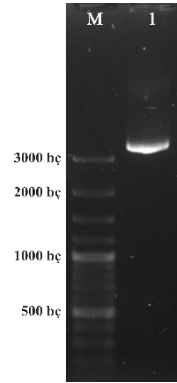
Transformasyon sonrası gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucuna göre seçilen 3, 4, 7, 8 ve 9 numaralı koloniler ile P_{HSP}'ye ve plazmit DNA'ya ait primerler kullanılarak PCR reaksiyonu yapıldı. Reaksiyon sonrası PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 13).



Şekil 13. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Belirteç; sırasıyla, 3, 4, 7, 8 ve 9 numaralı koloniler)

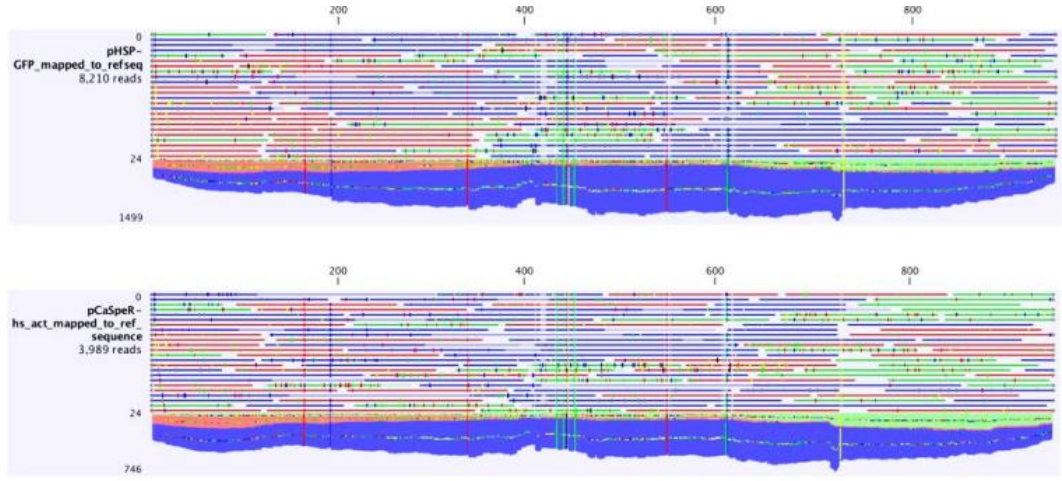
Muhtemel rekombinat plazmitin sekans analizi ile doğrulanması

Klonlamanın doğruluğunu kontrol etmek için LB-amfisilin sıvı besiyerlerinde çoğaltılan kolonileri oluşturan bakterilerden plazmitler saflaştırıldı. Plazmite ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 14'te verildi.



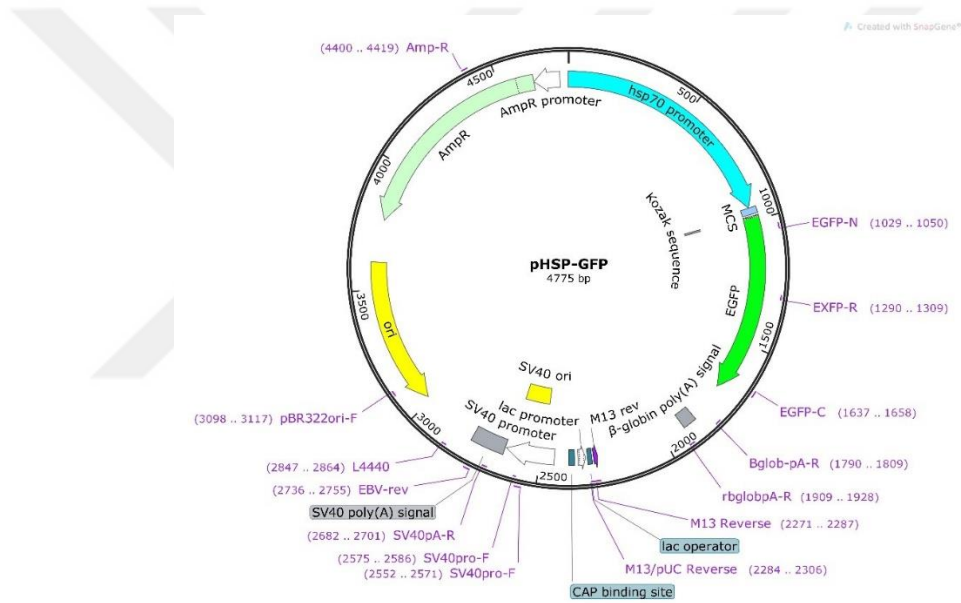
Şekil 14. Muhtemel rekombinant plazmitin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: Belirteç; 1: Muhtemel pHSP-GFP plazmiti)

HF DNA polimeraz enzimi kullanılarak referans alınan sekansın (regülatör bölge ve P_{HSP}) PCR'da amplifiye edilmesine rağmen, Sanger sekanslama analizi sonucunda klonlanan dizide delesyon, insersiyon ve baz değişikliklerinin görülmesi üzerine (Şekil 15) pCaSpeR-hs/act plazmitinin ve klonlanan pHSP-GFP plazmitinin NGS (Next Generation Sequencing) ile tüm sekans okumaları yaptırıldı. NGS analizi ile klonlanan pCaSpeR-hs/act plazmitinin 3989 kez ve pHSP-GFP'nin 8210 kez (Şekil 16) yapılan okuma sonucu her iki plazmite ait elde edilen sekanslar blastlandı (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Blastlama sonucu promotör



Şekil 16. pHSP-GFP ve pCaSpeR-hs/act plazmitlerine ait NGS analizi

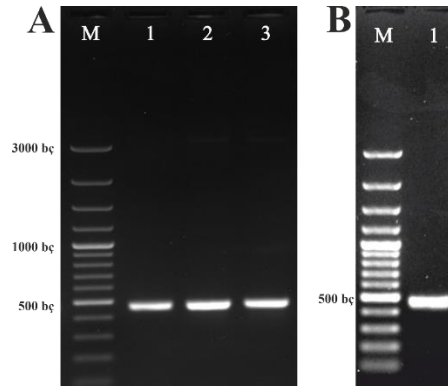
Plazmit haritası SnapGene (<https://www.snapgene.com/>) ile çizildi.



Şekil 17. pHSP-GFP'nin SnapGene'de çizilen haritası

pHSP-Azu'nun Elde Edilmesi

Kodon optimizasyonu sonucunda, azurin genine ait nükleotid sekansının optimizasyondan önceki CAI değerinin (iyi bir translasyon verimliliği için kodon adaptasyon indekslerinin 1'e yakın olması tavsiye edilir) 0,84, optimizasyondan sonraki CAI değerinin ise 0,95 olduğu, aynı şekilde GC içeriğinin (%30-%70 arasında olması tavsiye edilir) %61,97 iken %62,26 olduğu belirlendi. Sentetik azurin geni kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu sonucunda beklenildiği gibi 444 bç'lık bant gözlemlendi (Şekil 18).



Şekil 18. A. Azurin genine ait gradyan PCR sonucu

(M: Belirteç, 1, 2, 3. kuyular sırasıyla 65°C, 65,5 °C, 66 °C primer bağlanma sıcaklıkları) B. Azurin geninin HF polimeraz ile amplifikasyonu (M: Belirteç, 1: Azurin)

Uçlarında kesim enzimlerinin tanıma sekanslarını içeren azurin gen sekansına ait PCR ürünleri ve pHSP-GFP, Fast Digest *KpnI* ve *ApaI* enzimleri ile kesildi. Kesim ürünleri ligasyon reaksiyonuyla birleştirildi. Ligasyon reaksiyonu sonucu elde edilen ürün kompetan *E. coli* JM109 hücrelerine transfer edildi. Transformasyon sonrasında hücreler LB-amfisilin besiyerine yayıldı. 37 °C’de gece boyu inkübasyona bırakılıp kolonilerin gelişimi gözlemlendi (Şekil 19).

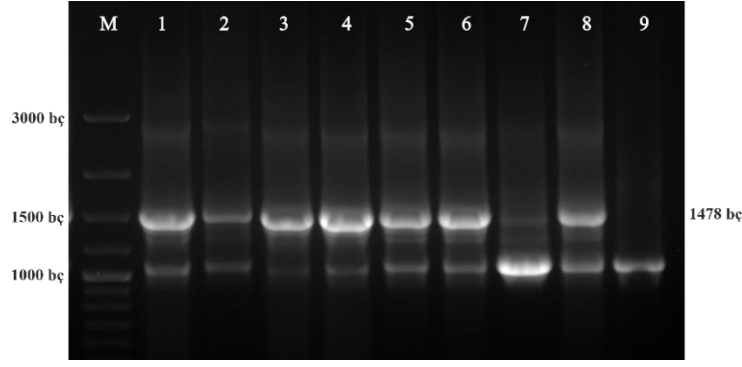


Şekil 19. İnkübasyon sonunda gelişen bakteri kolonileri

Koloni PCR

Plazmit DNA’ya ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu

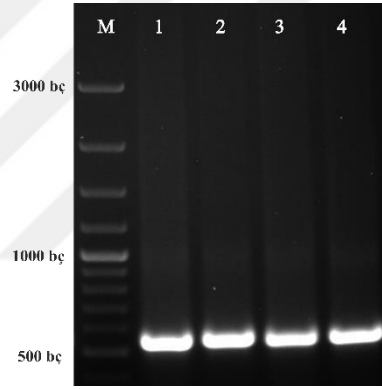
Transformasyon sonrasında besiyerinde gelişen kolonilerden 9 tane seçilerek gene ait primerler ile koloni PCR reaksiyonu yapıldı. PCR reaksiyonu sonrasında elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde 60V’de 80 dakika boyunca yürütüldükten sonra görüntülendi (Şekil 20).



Şekil 20. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.
(M: Belirteç; 1-9. kuyular: 1’den 9’a kadar seçilen koloniler ile gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünleri).

Gene ve plazmit DNA’ya ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR reaksiyonu

Ayrıca transformasyon sonrası gerçekleştirilen PCR reaksiyonu ile elde edilen sonuca göre seçilen 4 koloniden gen ve plazmit DNA’ya ait primerler kullanılarak PCR reaksiyonu yapıldı. Reaksiyon sonrası PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 21).



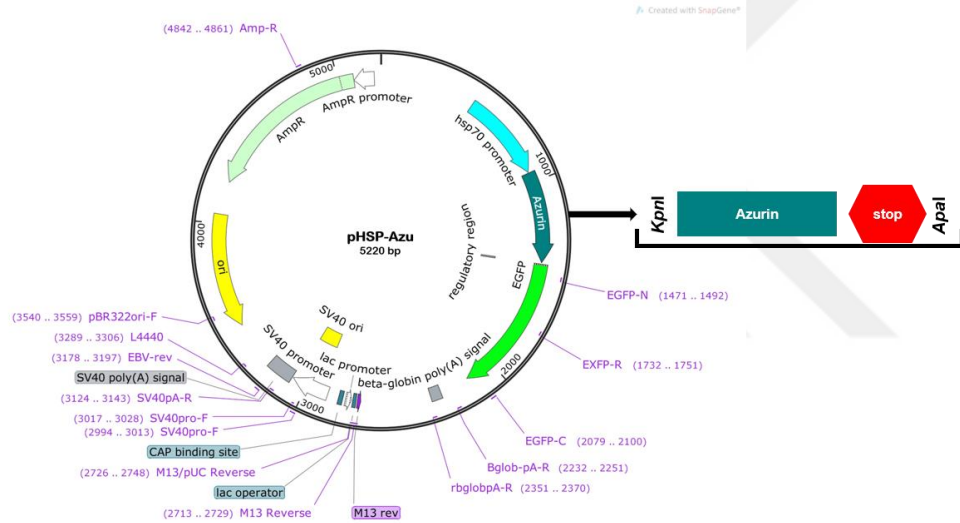
Şekil 21. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü
(M: Belirteç; 1-4. kuyular: 1’den 4’e kadar seçilen koloniler ile gerçekleştirilen PCR reaksiyon ürünleri).

Muhtemel rekombinat plazmitlerin sekans analizi ile doğrulanması

Sekans analiz sonucu elde edilen nükleotid sekansı, kodon optimize azurin nükleotid sekansı ile blastlandığında (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) benzerliklerin %100 olduğu görüldü (Şekil 22). Elde edilen rekombinant pHSP-Azu’nun SnapGene ile çizilmiş haritası Şekil 23’te verildi.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
826 bits(447)	0.0	447/447(100%)	0/447(0%)	Plus/Minus
Query 1	ATGCTGAGAAAACTCGCTGCCGTGTCCTGCTCCCTGCTCAGCGCCCCCTGCTGGCT	60		
Sbjct 516	ATGCTGAGAAAACTCGCTGCCGTGTCCTGCTCCCTGCTCAGCGCCCCCTGCTGGCT	457		
Query 61	GCCGAGTGCAGCGTGGACATCCAGGGCAACGACAGATGCAAGTTCAACACCAATGCCATC	120		
Sbjct 456	GCCGAGTGCAGCGTGGACATCCAGGGCAACGACAGATGCAAGTTCAACACCAATGCCATC	397		
Query 121	ACCGTGGACAAGAGCTGCAAGCAGTTACCGTCAACCTGTCCACCCCGGCAACCTGCCC	180		
Sbjct 396	ACCGTGGACAAGAGCTGCAAGCAGTTACCGTCAACCTGTCCACCCCGGCAACCTGCCC	337		
Query 181	AAGAAGCTCATGGGCCACAACCTGGGTGCTGAGCACC GCCGACATGCAGGGCGTGGTC	240		
Sbjct 336	AAGAAGCTCATGGGCCACAACCTGGGTGCTGAGCACC GCCGACATGCAGGGCGTGGTC	277		
Query 241	ACCGACGGCATGGCTTCGGCCTGGACAAGGATTACCTGAAGCCCGACGACAGAGATC	300		
Sbjct 276	ACCGACGGCATGGCTTCGGCCTGGACAAGGATTACCTGAAGCCCGACGACAGAGATC	217		
Query 301	ATCGCCACACCAAGCTGATCGGCAGCGGCGAGAAGGACAGCTGACCTTGACGTCTCC	360		
Sbjct 216	ATCGCCACACCAAGCTGATCGGCAGCGGCGAGAAGGACAGCTGACCTTGACGTCTCC	157		
Query 361	AAGCTGAAGGAAGGCGAGCAGTACATGTTCTTCTGACCTTCCCGGCACTCCGCCCTG	420		
Sbjct 156	AAGCTGAAGGAAGGCGAGCAGTACATGTTCTTCTGACCTTCCCGGCACTCCGCCCTG	97		
Query 421	ATGAAGGGCACCTGACCTGAAGTGA 447			
Sbjct 96	ATGAAGGGCACCTGACCTGAAGTGA 70			

Şekil 22. Plazmit DNA'ya ait forward ve reverse primerleriyle gerçekleştirilen Sanger sekans analizi sonucu elde edilen nükleotid sekansının blast sonucu

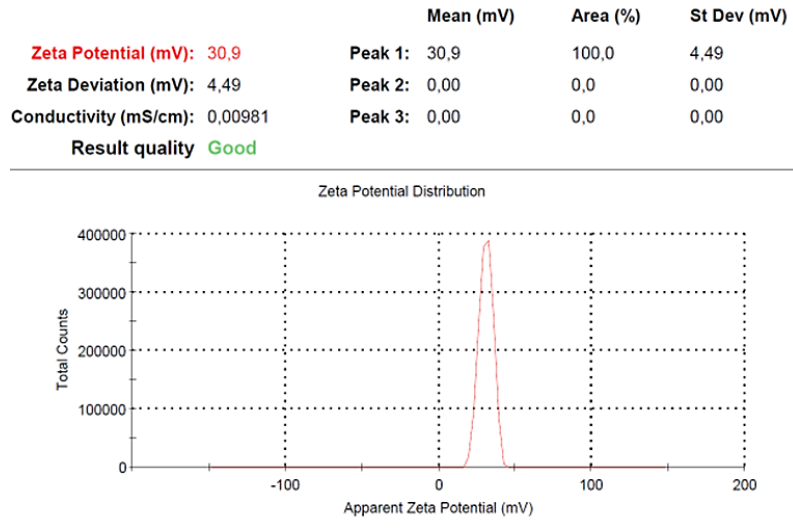


Şekil 23. pHSP-Azu'nun SnapGene'de çizilen haritası

Elde edilen tüm veriler hedeflenen plazmit yapılarının başarılı bir şekilde elde edildiğini göstermektedir.

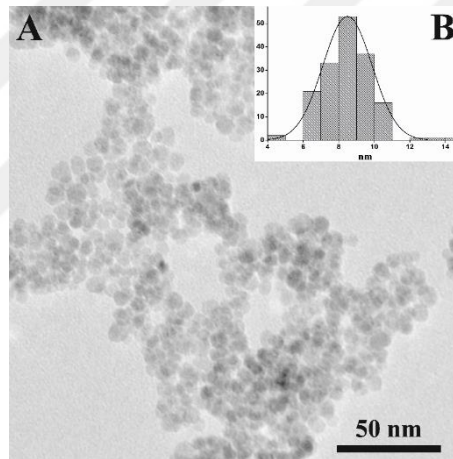
Manyetik NP'lerin Üretimi ve Yüzey Modifikasyonları

Manyetik yönlendirme ile hızlı gen aktarımı ve AC manyetik alan altında sıcaklık artışı sağlamak üzere kullanılacak olan manyetik silika nanoparçacıklar, APTES ile yapılan yüzey fonksiyonelleştirme işlemi ile pozitif hale getirildi (Şekil 24).



Şekil 24. Suda dağıtılan MSNP-NH₂'nin zeta potansiyel grafiği

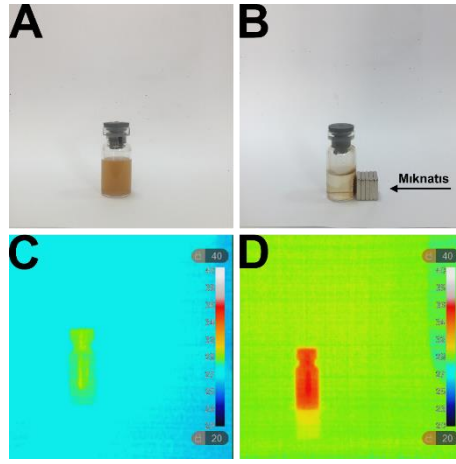
Kaydedilen TEM görüntülerinden, üretilen MSNP-NH₂'nin boyutunun 20 nm'nin altında ve monodispers olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 25).



Şekil 25. MSNP-NH₂'lerin boyut ve morfoloji analizi

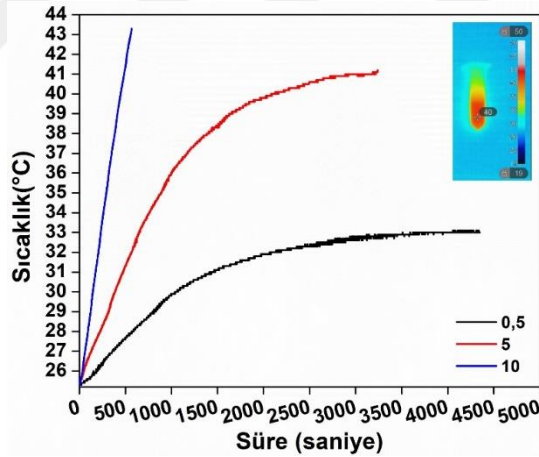
A. MSNP-NH₂'lere ait TEM görüntüsü ve B. TEM görüntüsü üzerinden hesaplanan NP boyut dağılım grafiği

MSNP-NH₂'lerin mıknatısa yanıtının gözlenmesi için suda dağıtılan MSNP'ler, mıknatıs ile toplandı ve fotoğrafları alındı (Şekil 26). Görüntülerden MSNP'lerin suda dağılımının iyi olduğu anlaşılmaktadır. Bu durum, hücrelere uygulama sırasında tüm MSNP-NH₂'nin mıknatıs ile hücrelere doğru çekilebileceğini göstermektedir. Ayrıca termal kamera ile kaydedilen AC manyetik alan öncesi ve sonrası görüntülerde, MSNP-NH₂'nin bulunduğu ortamı ısıttığı gözlemlendi.



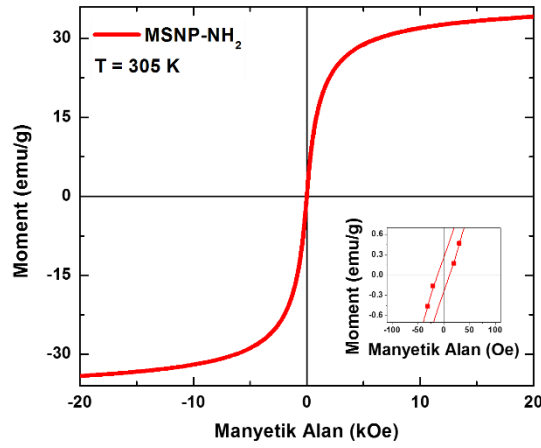
Şekil 26. Suda dağıtılan MSNP-NH₂'lere ait görüntüler
Mıknatıs A. öncesi ve B. sonrası, MHT C. öncesi ve D. 15 dakika boyunca AC manyetik alan altında tutulan MSNP'lere ait görüntü. Skala °C cinsindendir.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan sulu MSNP-NH₂ çözeltilerine ait sıcaklık-zaman grafiği Şekil 27'de verildi. AC manyetik alan altındaki ısınma grafiklerine bakıldığında 10 mg/ml MSNP-NH₂ yaklaşık 8 dakikada ortamın sıcaklığını, oda sıcaklığından 43 °C'ye çıkardı. Konsantrasyon azaldıkça sıcaklık artış hızında azalma kaydedildi. Düşük konsantrasyonlarda sıcaklığın belli bir süre sonra neredeyse sabit kaldığı tespit edildi. AC manyetik alan altında tutulduktan hemen sonra termal kamera görüntüsü alınan örneğin dış yüzeyi 40 °C' idi.



Şekil 27. MSNP-NH₂'lerin AC manyetik alan altındaki davranışı
MSNP-NH₂'lere (0,5, 5 ve 10 mg/ml) ait sıcaklık-zaman grafiği ve ısınmış tüpe (5 mg/ml) ait termal kamera görüntüsü (grafik içi fotoğraf)

Biyomedikal uygulamalarda MNP'lerin oda sıcaklığında süperparamanyetik davranış sergilemesi gerekmektedir (Kılınç, 2016). Bu malzemeler kalıcı bir mıknatıslanma özelliği yerine oda sıcaklığında manyetik doyum sergiler. Bunun için MSNP-NH₂'ye ait manyetik özellikler titreşimli numune manyetometresi (VSM) analizi ile araştırıldı (Şekil 28). Gözlenen "S" şeklindeki histerisiz eğrisi, elde edilen yapının süperparamanyetik olduğunu göstermektedir. MSNP-NH₂'nin manyetizasyon doygunluğunun 30 emu/g olduğu belirlendi.

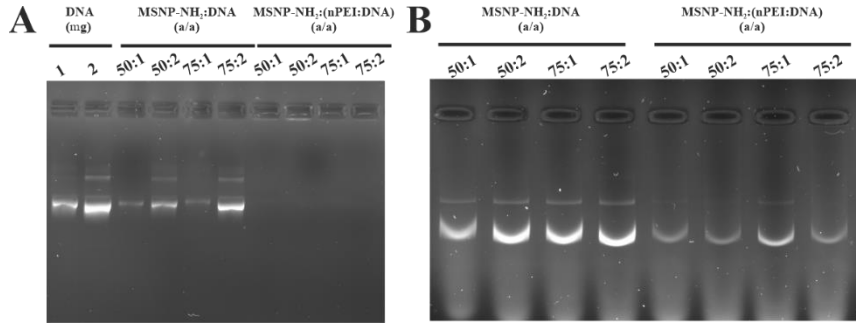


Şekil 28. MSNP-NH₂'ye ait VSM sonucu

MSNP'lerin DNA Bağlama ve Salım Yeteneği

Üretilen MSNP-NH₂'nin DNA bağlamasında ortama eklenen PEI'nin etkisini belirlemek için hazırlanan farklı manyetofektin gruplarına ait agaroz jel görüntüsü incelendiğinde, PEI yokluğunda ortamda halen bağlanmayan DNA'lara ait bant gözlenirken PEI/DNA (a/a) oranı 0,5 ve 0,75 olacak şekilde hazırlanan gruplarda DNA'ya ait bantlar gözlenmedi. Bu da ortama eklenen ilave PEI'nin DNA bağlanma oranını artırdığını göstermektedir. 50 ve 75 µg MSNP-NH₂'nin PEI varlığında yaklaşık 2 µg DNA'yı tutabildiği belirlendi (Şekil 29 A).

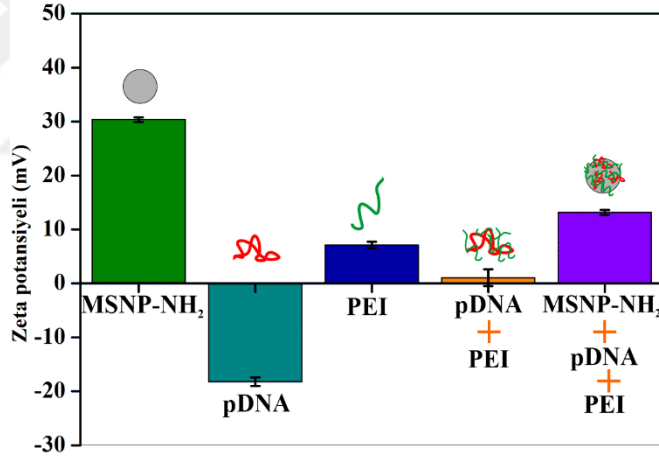
Manyetofektin kompleksinin oluşumu kadar bu kompleksten nükleik asitlerin salınması da gen aktarım sistemleri için önemli bir konudur. Hücrede gen ekspresyonu için nükleik asitlerin salınımı gereklidir (Lee *et al.* 2005; Vighi *et al.* 2010; Naylor, 1999). DNA salınımı test etmek için negatif yüklü bir deterjan molekülü olan SDS kullanılmaktadır. SDS'nin katyonik yapılara afinitesi, nükleik asitlerden daha yüksektir ve %1'lik SDS solüsyonu (nihai konsantrasyon), nükleik asitleri kompleksten salmak için yeterlidir (del Pozo-Rodríguez *et al.* 2009). Literatürde yer alan bir çalışmada, DNA yüklenmiş PEI ile modifiye NP'lerden plazmit DNA elüsyonu için 60 °C sıcaklık inkübasyonu uygulanmıştır (Danthanarayana *et al.* 2018). Bu doğrultuda, çalışmada hücresiz bir ortamda DNA'nın MSNP-NH₂'den salınımı için belirlenen şartlarda manyetofektin karışımları elde edildi ve %1 SDS ile gerçekleştirilen salım sonrası ortama salınan DNA'ya ait agaroz jel elektroforez sonuçları Şekil 29'da verildi. Bağlanan DNA'ların, %1 SDS ile gerçekleştirilen salım sonuçları incelendiğinde ise PEI varlığında salınan DNA miktarının daha az olduğu görüldü (Şekil 29 B).



Şekil 29. Manyetofektin gruplarına ait agaroz jel elektroforez sonucu

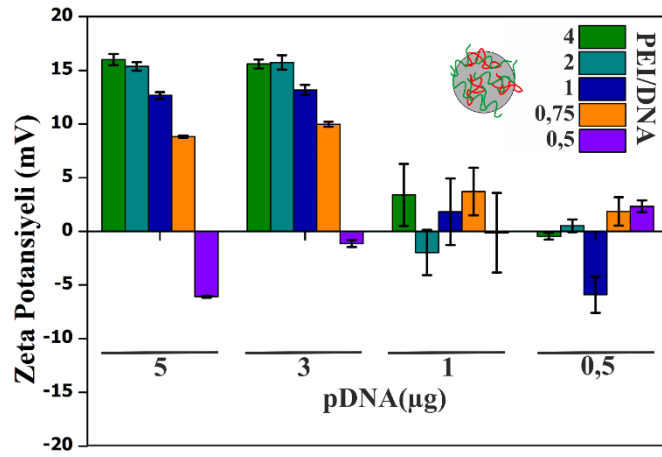
A. 30 dakika boyunca inkübe edilip 30 dakika mıknatıs tutularak toplanan üst faz ve B. manyetofektinler yıkandıktan sonra %1 SDS ile 60 dakika inkübasyonun ardından toplanan üst faz.

Transfeksiyonda kullanılan MSNP-NH₂, plazmit DNA ve PEI'nin ayrı ayrı daha sonra DNA-PEI kompleksi ve MSNP-NH₂-DNA-PEI kompleksinin zeta potansiyelleri karşılaştırıldı. 100 µg MSNP-NH₂'nin su içindeki zeta potansiyel değerleri $30,4 \pm 0,4$ mV, 3 µg pDNA'nınki $-18,2 \pm 0,7$, 3 µg PEI'ninki ise $7,1 \pm 0,6$ olarak ölçüldü. 3 µg pDNA ve 3 µg PEI ile 30 dakika boyunca inkübasyon sonrasında oluşturulan kompleksin zeta potansiyel değeri $1,1 \pm 1,5$, 100 µg MSNP-NH₂, 3 µg pDNA, 3 µg PEI ile oluşturulan manyetofektinin zeta potansiyeli ise $13,17 \pm 0,5$ mV olarak ölçüldü (Şekil 30).



Şekil 30. Manyetofektin için kullanılan bileşenlerin zeta potansiyellerinin karşılaştırılması

Farklı şartlarda hazırlanan manyetofektin komplekslerinin zeta potansiyel değerleri, DLS analizi ile ölçüldü (Şekil 31). Hazırlanan manyetofektinlerdeki artan DNA ve PEI konsantrasyonlarının oluşturulan kompleksin yüzey yükünü artırdığı gözlemlendi. Düşük DNA konsantrasyonlarında ölçülen zeta potansiyel değerlerinin anlamsız değişimi kompleksin kararsız yapısından dolayı olabilir.

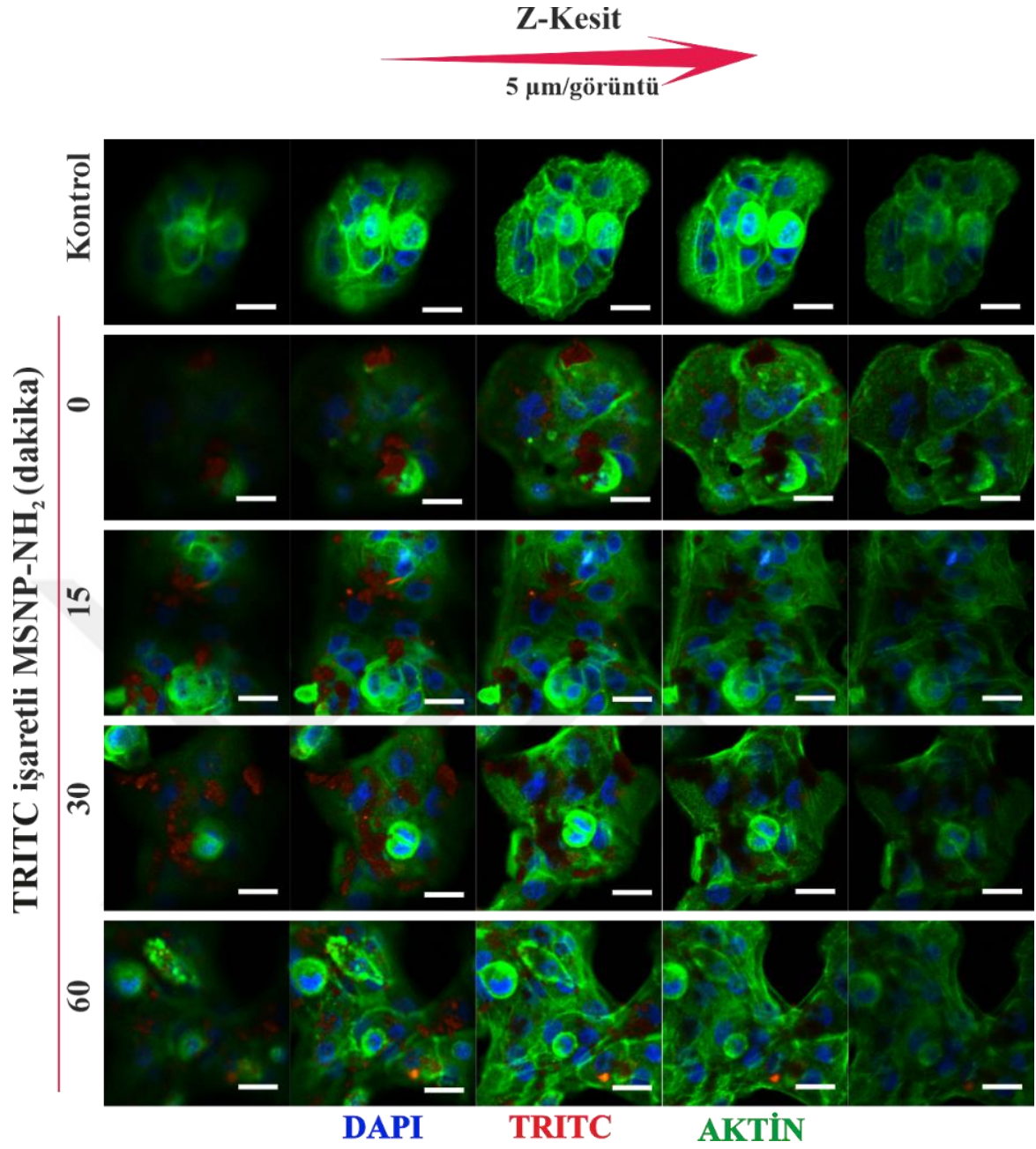


Şekil 31. Manyetofektinlerin zeta potansiyeli sonuçları

100 µg MSNP-NH₂ ile farklı DNA ve PEI konsantrasyonlarında hazırlanan gruplar, oda şartlarında 30 dakika boyunca inkübe edildi.

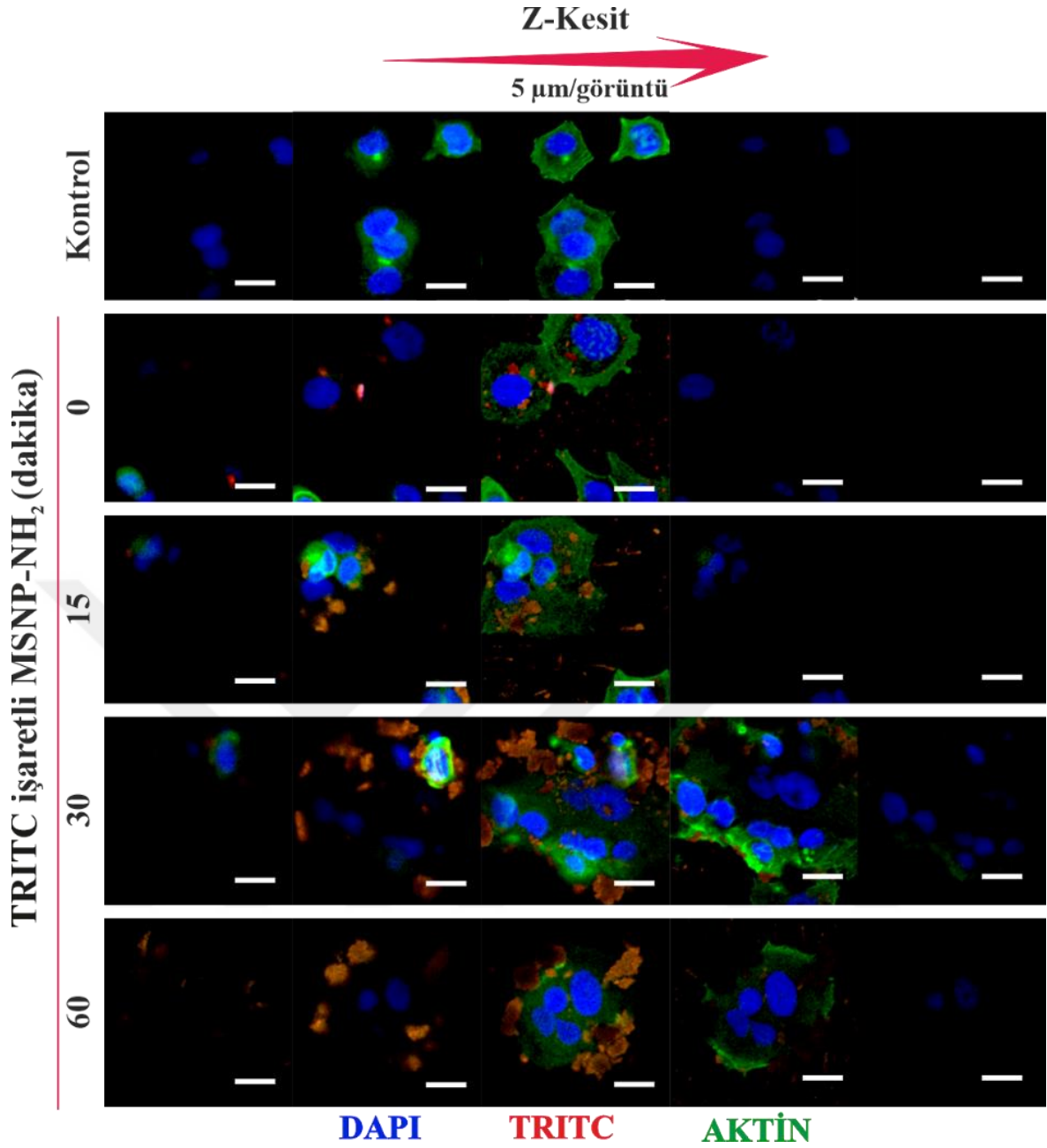
Hücresel Alımın Belirlenmesi

Mıknatıs süresinin hücreler tarafından alınan MSNP-NH₂ miktarı üzerine etkisini ortaya koyan konfokal mikroskopta Z-Kesit yöntemiyle 5 µm aralıklarla örneklerden alınan görüntüleri Şekil 32 ve Şekil 33’de verildi. Görüntülerden, mıknatıs süresi arttıkça DAPI boyama nedeniyle mavi görünen çekirdek çevresinde ve üzerinde TRITC-işaretli MSNP-NH₂ miktarının arttığı net olarak anlaşılmaktadır. MCF-7 ve MCF-10A hücreleri karşılaştırıldığında MCF-7 hücre hattının daha fazla MSNP-NH₂ aldığı söylenebilir. MCF-10A hücre hattında yapılan uygulamada, 15 dakika ve üzeri mıknatıs süresinde NP’lerin daha yoğun bir şekilde hücrelerin etrafında toplandığı gözlemlendi. MCF-7 hücre hattında ise mıknatıs tutulmayan (0 dakika) grupta MSNP-NH₂ yapılarının hücrelerin çevresinde yoğunlaştığı ancak çekirdeğe diğer gruplara göre daha az ulaştığı görüldü. Kullanılan TRITC-işaretli MSNP-NH₂ miktarı ve 60 dakika boyunca mıknatıs tutulan grupların hücre çekirdek bütünlüğündeki değişim göz önüne alındığında, mıknatıs tutma süresinin artması hücrelerde yoğun TRITC-işaretli MSNP-NH₂ alımına sebep olmuştur ve buna bağlı olarak olarak hücrelerde sitotoksitenin gözlenmesi söz konusu olabilir.



Şekil 32. MCF-10A hücrelerinin konfokal mikroskop Z-kesit görüntüleri

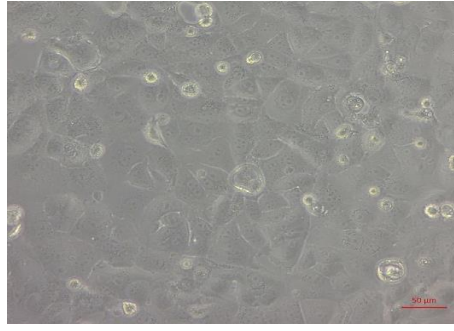
TRITC işaretli MSNP-NH₂ (kırmızı, 100 µg/ml) ile muamele edilen MCF-10A hücrelerinin hücre iskeleti proteinleri (aktin) yeşil işaretlenirken, hücre çekirdeği DAPI ile mavi boyandı. Ölçek 20 µm'dir.



Şekil 33. MCF-7 hücrelerinin konfokal mikroskop Z-kesit görüntüleri TRITC işaretli MSNP-NH₂ (kırmızı, 100 µg/ml) ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin hücre iskeleti proteinleri (aktin) yeşil işaretlenirken, hücre çekirdeği DAPI ile mavi boyandı. Ölçek 20 µm'dir.

Hücre Morfolojilerinin Kontrolü

Çalışmada kullanılan hücre hatlarının aydınlık alan görüntüleri, hücrelerin sağlıklı bir şekilde büyütüldüğünü ortaya koymaktadır (Şekil 34 ve Şekil 35).

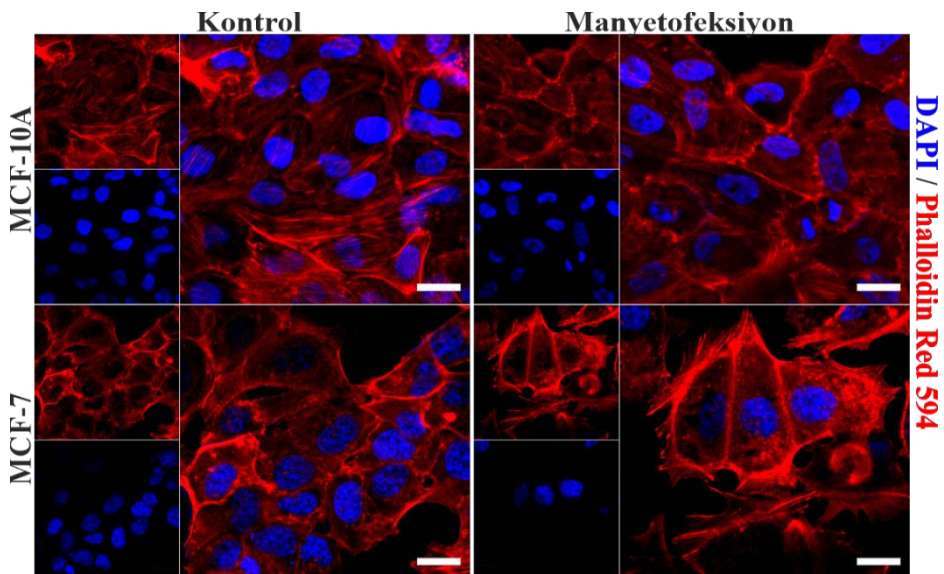


Şekil 34. MCF-7 hücrelerinin 48. saatte kaydedilen ters mikroskop görüntüsü
Ölçek 50 µm'dir.



Şekil 35. MCF-10A hücrelerinin 48. saatte kaydedilen ters mikroskop görüntüsü
Ölçek 50 µm'dir.

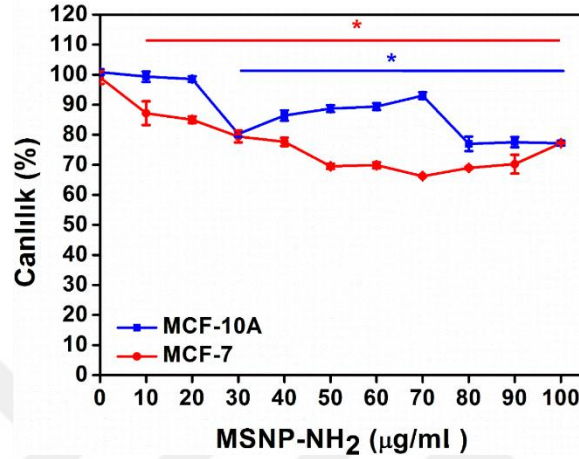
Manyetofektin karışımında bulunan PEI ve MSNP-NH₂'nin hücre yapısına olumsuz yönde etkisi olabileceğinden hücre morfolojileri merceğe altına alındı. Hücre iskeletinin boyaması ile uygulama yapılmış hücre yapılarında kontrol grubuna göre fark olmadığı belirlendi (Şekil 36). Uygulama sonrası herhangi bir çekirdek deformasyonu gözlenmedi. Hücrelerin iyi büyüdüğü ve cam yüzeye tutunma şekillerinin kontrol grubunda ve manyetofektin uygulanmış gruplarda benzer olduğu tespit edildi.



Şekil 36. Hücrelerin manyetofeksiyon sonrasında kaydedilen konfokal mikroskop görüntüleri
Uygulamada 50 µg/ml MSNP-NH₂, 3 µg pCMV-GFP, 1:1 oranında PEI/DNA (a/a) kullanıldı. Ölçek 20 µm'dir.
Sol üst: sadece Flash Phalloidin Red 594 (aktin), sol alt: sadece DAPI (çekirdek) ve sağ büyük resim: birleştirilmiş görüntüler

Manyetik NP'lerin Sitotoksitesi

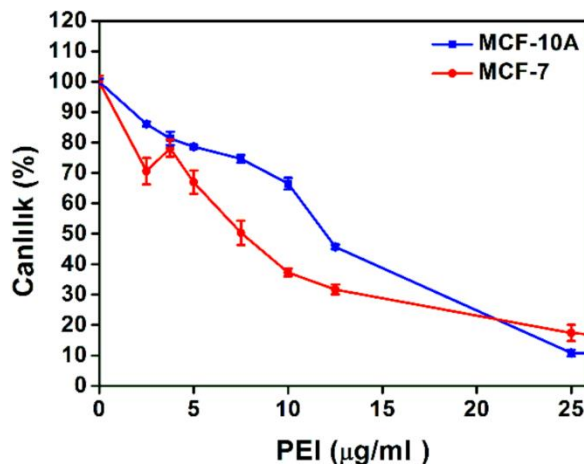
MSNP-NH₂ ile muamele edilen hücre hatlarında MCF-7'nin MCF-10A'ya göre MSNP-NH₂ muamelesine daha hassas olduğu aynı dozlarda daha düşük canlılık yüzdesine sahip olmasından anlaşılmaktadır (Şekil 37). Doz bağımlı etki izlenen MTS sonuçlarında, MSNP-NH₂ uygulanmış hücre canlılığının MCF-10'da %80'in, MCF-7'de ise %70'in üzerinde olduğu belirlendi.



Şekil 37. MSNP-NH₂'nin proliferasyon ve sitotoksite sonucu

MSNP-NH₂ uygulaması yapılan MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinin 48 saat sonundaki MTS testi sonucu (* q<0,05)

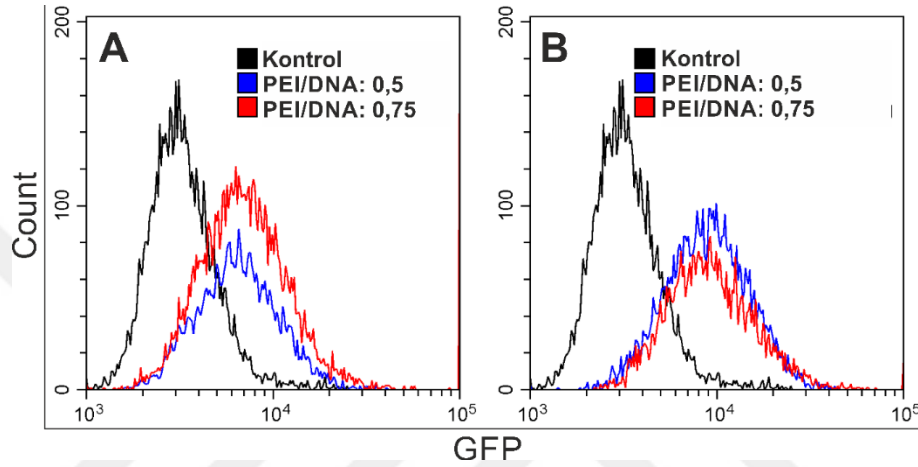
PEI ile muamele edilen gruplarda PEI'nin aynı dozlarda MCF-7 hücrelerini MCF-10A hücrelerinden daha fazla etkilediği, düşük canlılık yüzdesinden anlaşıldı. Artan dozlarda MSNP-NH₂ uygulanan gruplara yapılan MTS testi sonuçlarına göre, yaklaşık 10 µg PEI ile MCF-7 hücre hattında canlılığın %50'nin altında gözlenmesi ve MCF-10A hücrelerinde ise yaklaşık %70 oranında olduğu gözlemlendi.



Şekil 38. PEI uygulaması yapılan MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinin 48 saat sonundaki MTS sonucu

Transfeksiyon ve Promotör İndüksiyonu

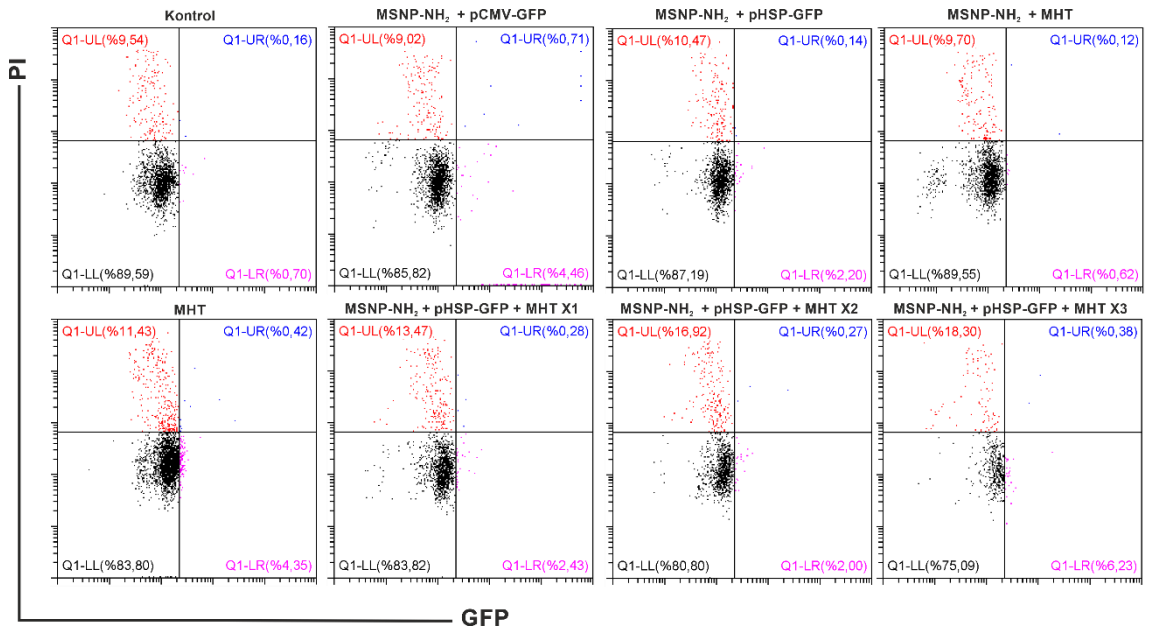
P_{HSP} 'nin hücre kültürü şartlarında çalışıp çalışmadığını gözlemek amacıyla sadece PEI kullanılarak transfeksiyon gerçekleştirildi. Akış sitometri sonuçlarında, kontrol grubuna göre normalizasyon yapıldıktan sonra P_{CMV} ve P_{HSP} 'nin kontrolünde GFP üretiminin kat artışı, FITC kanalında kaydedilen sinyaller ile belirlendi (Şekil 39). Kontrol grubuna göre ortalama FITC-H kat artışı sırasıyla; 0,5 ve 0,75 oranındaki PEI/DNA uygulamalarında P_{CMV} 'ye sahip gruplar için 3,86 ve 20,88 iken P_{HSP} 'ye sahip gruplarda 2,75 ve 3,38'dir. Ayrıca yüksek PEI/DNA oranının transfeksiyon etkinliğini artırdığı gözlemlendi.



Şekil 39. P_{HSP} kontrolüne ait akış sitometri sonuçları

A. pCMV-GFP veya B. pHSP-GFP (5 μ g) ve 0,5 ve 0,75 oranında PEI/DNA (a/a) ile hazırlanan transfeksiyon ajanı ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin akış sitometri ile ölçülen sonuçları. P_{HSP} , hücrelerin 38 °C'ye ayarlı inkübatörde 90 dakika boyunca tutulmasıyla indüklendi.

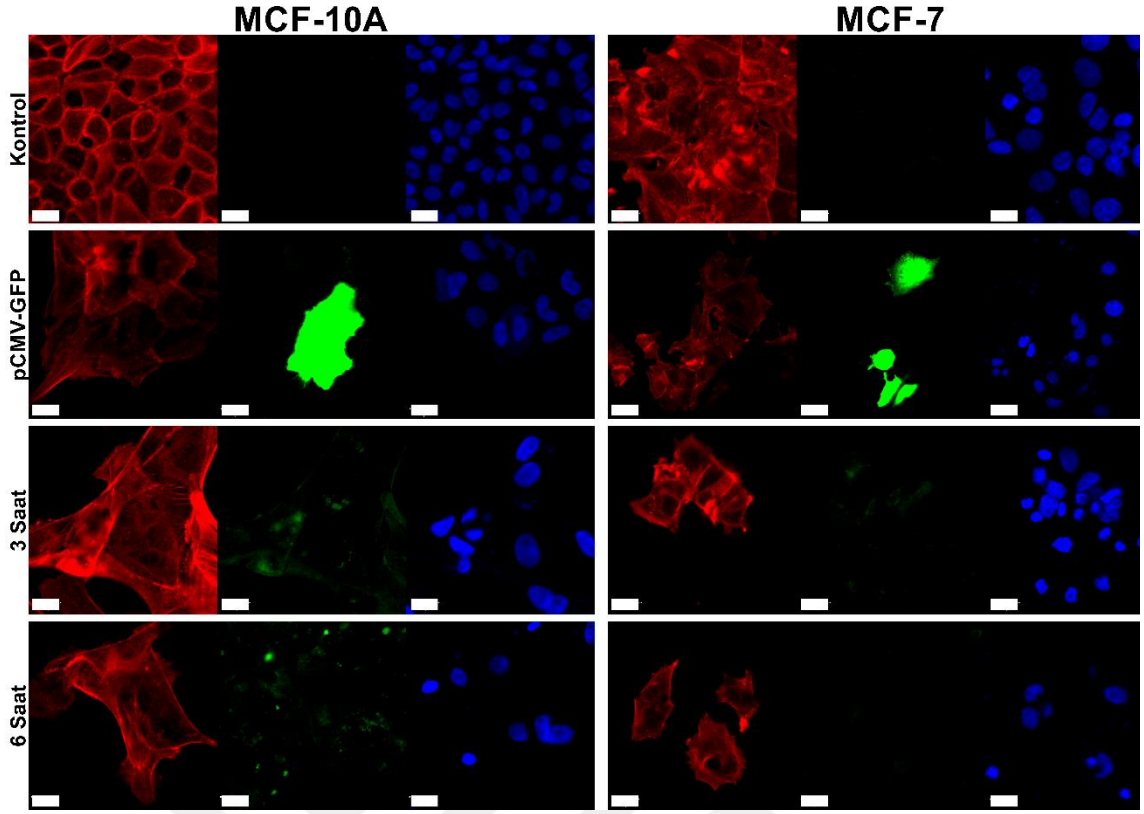
Manyetofeksiyon ile pHSP-GFP uygulanmış hücrelerin AC manyetik alan altında tutulması sonucunda hücre canlılığı, GFP ifade eden hücre yüzdesi ve PI ile işaretlenen ölü hücre yüzdesi Şekil 40'ta verildi. Gen içermeyen ve MHT uygulanmış olan grupta, hücre canlılığı %89 olarak gözlemlendi. Sadece AC manyetik alan altında tutulan hücre canlılığında kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim olmadığı belirlendi. pCMV-GFP gönderilen gruplarda GFP içeren hücre yüzdesi %5,31 olarak belirlenirken buna yakın değer, ancak 3 kez indüklenen pHSP-GFP uygulanmış grupta ölçüldü.



Şekil 40. P_{HSP} kontrolüne ait akış sitometri sonuçları

75 µg/ml MSNP-NH₂, PEI (PEI/DNA: 0,75) ile pCMV-GFP veya pHSP-GFP (3 µg) transfeksiyonu sonucu MCF-7 hücrelerinde 48 saat sonunda yapılan apoptoz testi sonuçları. P_{HSP}, hücrelerin MHT cihazında 40 °C’de 30 dakika boyunca tutulmasıyla indüklendi.

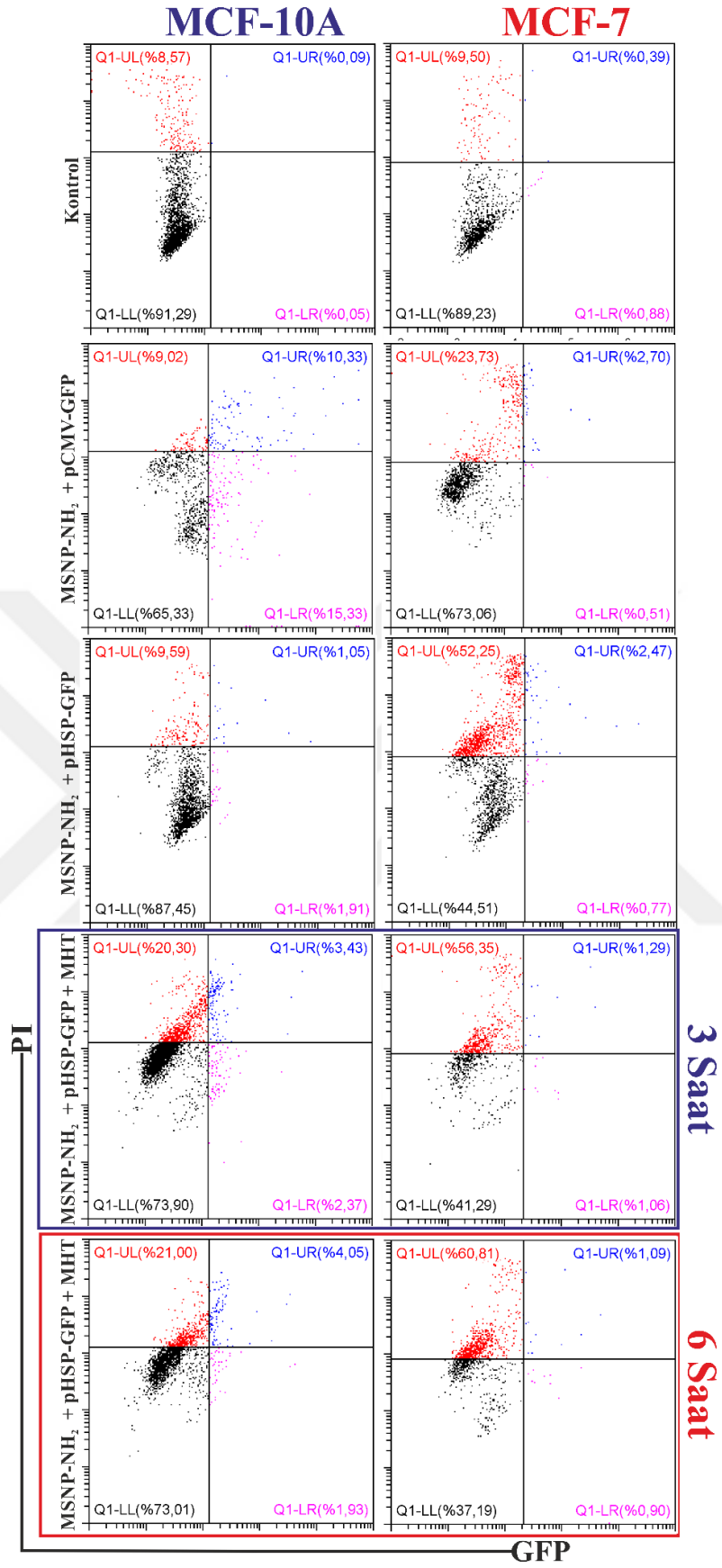
Son olarak, MHT uygulama süresinin etkisini görmek üzere 3 ve 6 saat indüklenen hücrelerde üretilen GFP’nin varlığı ve miktarı konfokal mikroskop ve akış sitometrisiyle değerlendirildi. Konfokal mikroskop verilerine göre, aktin boyama ile anlaşılabileceği üzere, her iki hücre hattında da indüksiyon süresi arttıkça hücrelerin morfolojik yapılarının ve çekirdek yapısının bozulduğu anlaşıldı (Şekil 41). Ayrıca transfeksiyonun MCF-7 hücre hattının pCMV-GFP uygulanan grubunda daha fazla olduğu belirlendi.



Şekil 41. MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri

pCMV-GFP veya pHSP-GFP yüklenmiş MSNP-NH₂ (100 µg/ml) ile muamele edilen hücrelerinin hücre iskeleti proteinleri (aktin) kırmızı işaretlenirken, hücre çekirdeği DAPI ile mavi boyandı. Yeşil görüntülenen kısım GFP proteininin varlığını göstermektedir. Ölçek 20 µm'dir.

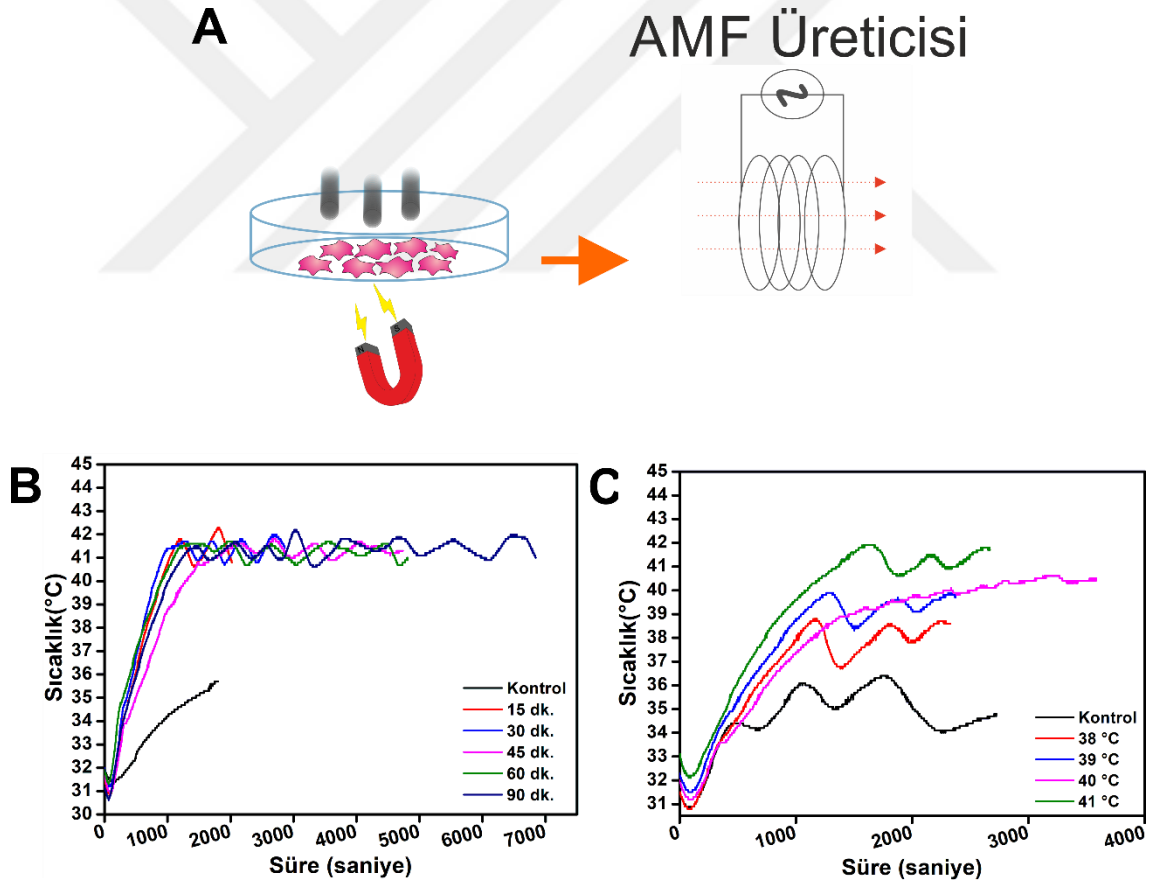
Konfokal mikroskop görüntülerini destekler şekilde, MCF-10A hücre hattının kontrol grubunda hücre canlılığı %91,34 iken 3 saat indüksiyon için %76,27 ve 6 saat indüksiyon için %74,94, MCF-7 hücre hattında ise hücre canlılığı kontrol grubunda %90,11 iken 3 saat indüksiyon için %42,35 6 saat indüksiyon için %38,09 olarak görüldü. MCF-7 hücre hatlarında pCMV-GFP ve indüklemeye yapılmayan pHSP-GFP gruplarında GFP ifade eden hücre yüzdeleri sırasıyla %3,2 ve %3,24 iken 3 ve 6 saat indüklemeye yapılan pHSP-GFP gruplarında sırasıyla, %2,35 ve %1,99'du (Şekil 42).



Şekil 42. MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinde 3 ve 6 saat indüksiyonla GFP üretimi
Hücreler pCMV-GFP veya pHSP-GFP yüklenmiş MSNP-NH₂ (100 µg/ml) ile muamele edildi.

MHT Optimizasyonları

MSNP-NH₂ uygulanan MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinde MHT için sırasıyla sıcaklık ve süre optimizasyon çalışmaları yapıldı. MHT uygulanan hücrelere ait sıcaklık-zaman grafikleri Şekil 43'te sunuldu. Şekil 43 B'de görüldüğü üzere hücrelerin sıcaklığı yaklaşık 30 dakikada 41 °C'ye ulaştı. Ayrıca tüm gruptaki hücrelerin sıcaklık artış hızı birbiriyle benzerdi ve hücreler 30 dakika boyunca istenilen sıcaklıkta sabit tutuldu. Şekil 43 C'ye bakıldığında ise aynı şekilde hücrelerin sıcaklığının 30 dakikada 41 °C'ye ulaştığı ve hücrelerin eşit sıcaklık artışına sahip olduğu görüldü. AC manyetik alanın gücü kontrol altında tutularak hücrelerin ortam sıcaklığı 41 °C'de istenilen sürelerde sabitlendi. Uygulanan yüksek voltajdaki AC manyetik alanın helezonda oluşturduğu ısınmadan dolayı kontrol gruplarında çok yavaş bir şekilde de olsa sıcaklık artışı gözlemlendi. Fakat bu sıcaklık, 37 °C'nin üzerine çıkmadığından dikkate alınmadı. Ayrıca, MTS sonuçlarında görüldüğü üzere kontrol gruplarındaki sıcaklık artışının hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı görüldü (Şekil 47).



Şekil 43. MHT uygulaması sırasında ölçülen sıcaklık-zaman grafikleri

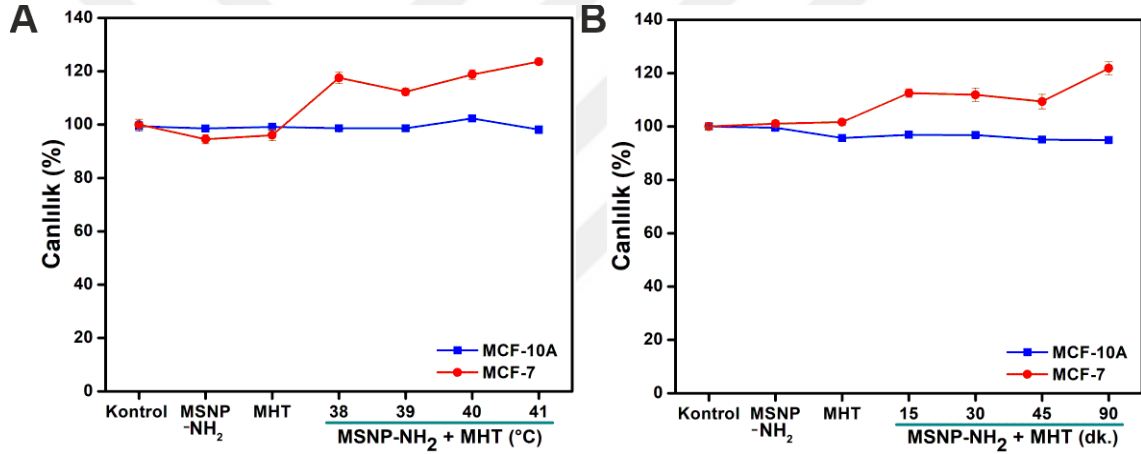
Hücrelerin MSNP-NH₂ (75 µg/ml) ile muamelesine ait A. uygulama özet şekli, B. Hücrelerin farklı sürelerde 41 °C'de AC manyetik alana tabi tutulması ile elde edilen grafik ve C. Farklı sıcaklıklarda 20 dakika boyunca MHT uygulamasına ait sıcaklık-zaman grafiği.

Yapılan MTS analizi sonuçlarına göre, MSNP-NH₂ uygulanan MCF-10A ve MCF-7 hücrelerinin 90 dakika boyunca 41 °C'ye kadar AC manyetik alana dayanabildiği belirlendi

(Şekil 47 B). İlginç bir şekilde MCF-7 hücrelerinin canlılığının sıcaklık artışıyla birlikte arttığı belirlendi (Şekil 44 A).

75 µg/ml konsantrasyonda MNSP-NH₂ ile yürütülen MHT optimizasyonu deneylerinde MCF-10A hücrelerinde sıcaklık optimizasyonu için gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi. 41 °C’de farklı sürelerde uygulanan AC manyetik alan sonucunda ise en yüksek canlılık kontrol grubu ve sadece MNSP-NH₂ uygulanan gruplarda gözlemlendi. Diğer gruplarda ise canlılığın %95’in altına düşmediği görüldü (Şekil 44 B).

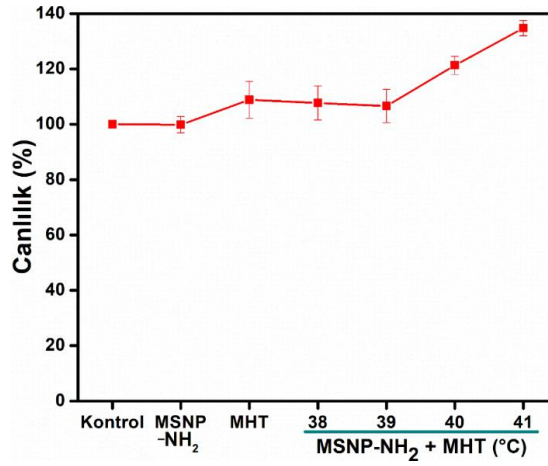
MCF-7 hücrelerinin sıcaklık optimizasyon sonuçlarına bakıldığında ise kontrol ve sadece MNSP-NH₂ uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında, diğer gruplarda canlılığın arttığı görüldü. En yüksek canlılık ise %123,61 oranıyla 41 °C’de 20 dakika boyunca MHT uygulanan grupta gözlemlendi. Hücreler, süre optimizasyonu için 41 °C’de 90 dakika boyunca AC manyetik alana maruz kaldığında ise canlılığın %121,83 olduğu görüldü (Şekil 44).



Şekil 44. MHT uygulaması sonucu ölçülen hücre canlılığı grafikleri

MCF-7 ve MCF-10A’ya ait A. sıcaklık ve B. süre optimizasyonu MTS sonuçları. Sıcaklık optimizasyonunda hücrelere belirli sıcaklıklarda 30 dakika boyunca MHT uygulandı. Süre optimizasyonunda ise hücreler 41 °C’de farklı sürelerde AC manyetik alana tabi tutuldu.

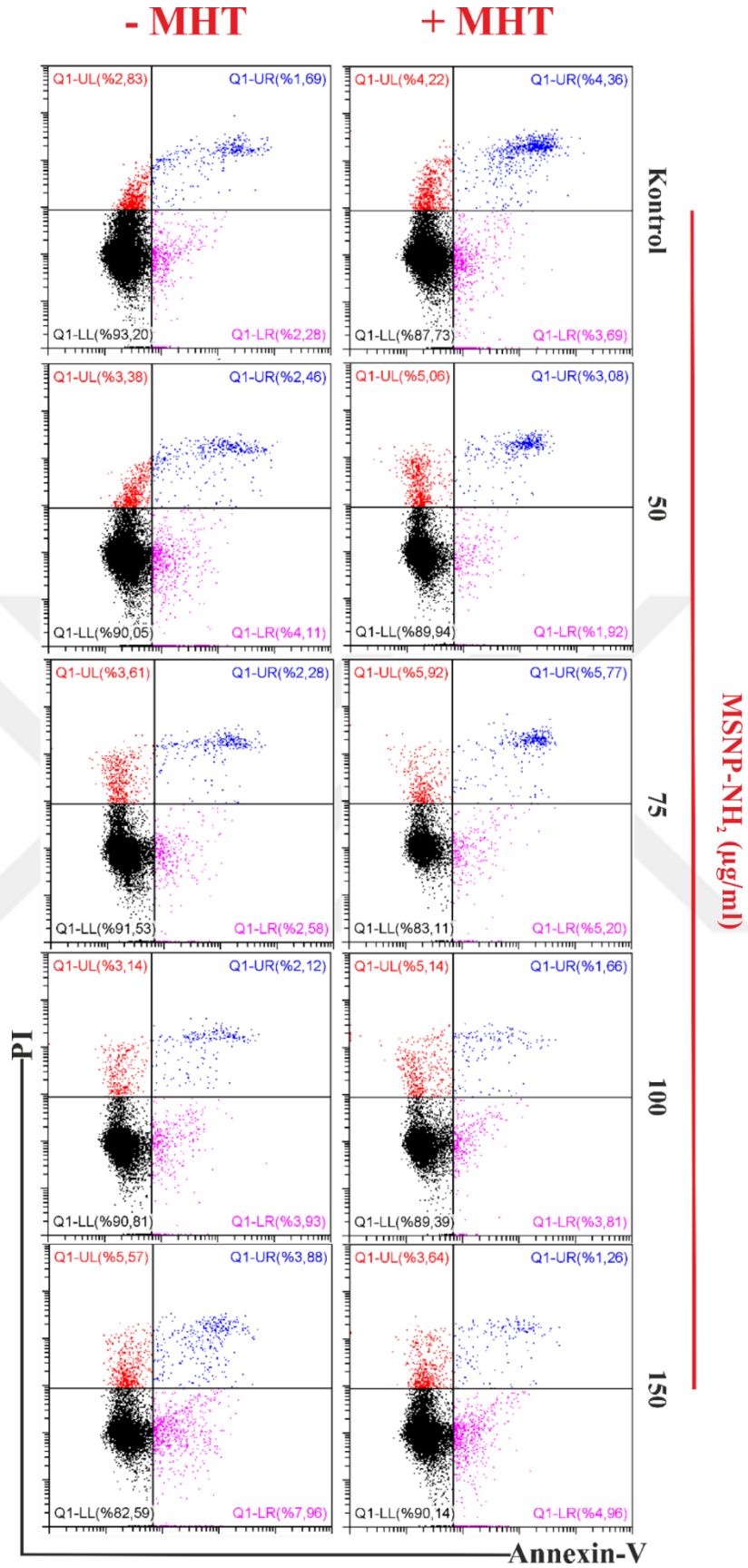
MHT deneylerinde MCF-7 hücre canlılığının sıcaklık artışıyla birlikte artması ilginç bir sonuç olarak yorumlandı. Bu durumu araştırmak üzere farklı sıcaklık değerlerine ayarlanmış inkübatörde tutulan MCF-7 hücrelerinin canlılığı ayrıca ölçüldü. MHT ile yapılan deneye benzer şekilde, sıcak inkübatörde tutulan MCF-7 hücrelerinde sıcaklık arttıkça hücre canlılığının da arttığı gözlemlendi (Şekil 45). 41 °C’ye ayarlanmış inkübatörde 30 dakika boyunca inkübe edilen MCF-7 hücrelerinin canlılığının %134,28 olduğu görüldü.



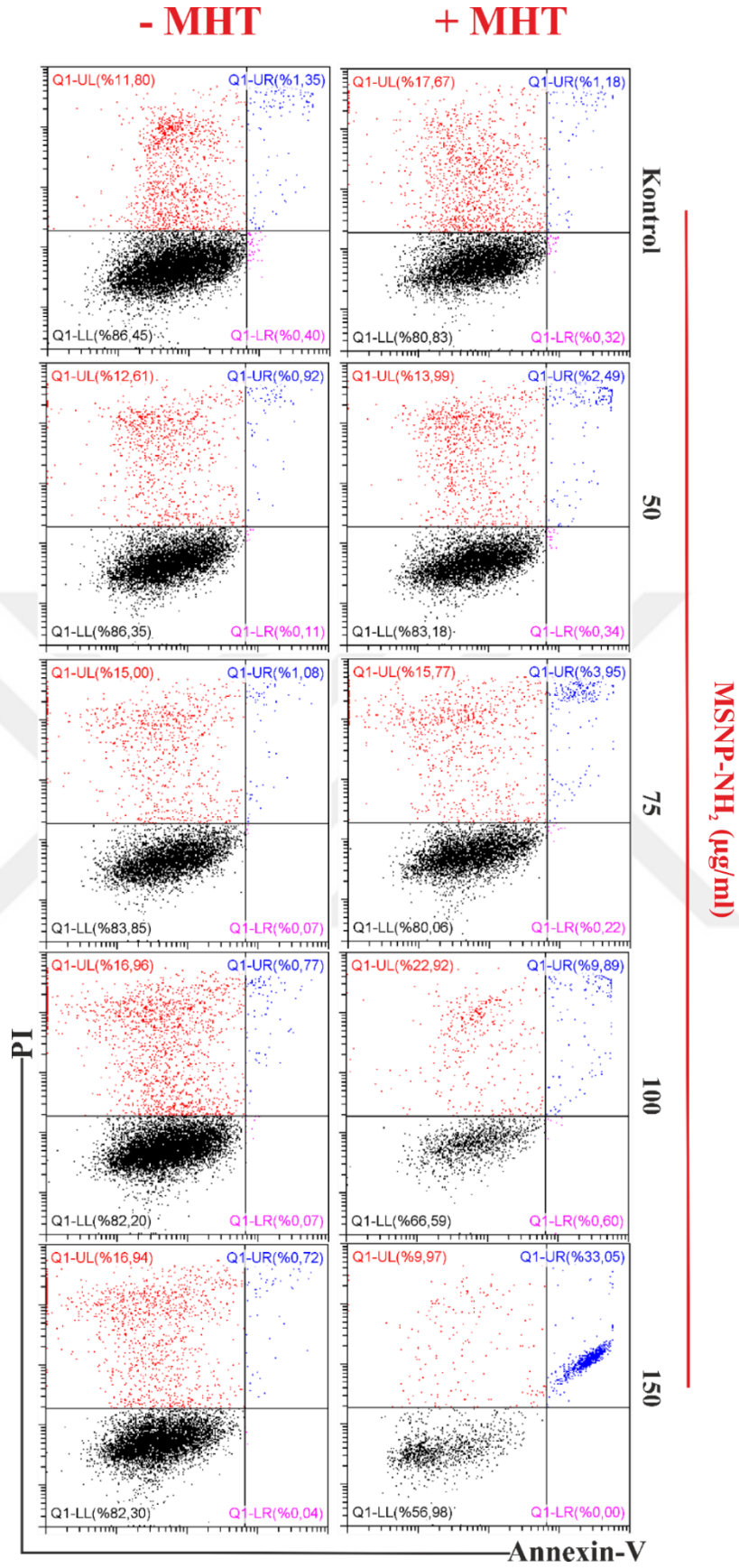
Şekil 45. MCF-7’ye ait sıcaklık optimizasyonu MTS sonuçları

Hücreler belirli sıcaklıklarda ayarlanmış inkübatörde 30 dakika boyunca inkübe edildi. (75 µg/ml MNSP-NH₂).

MCF-10A ve MCF-7 hücreleri için artan dozlarda MSNP-NH₂’nin MHT uygulaması altında apoptoz sonucu Şekil 46 ve Şekil 47’de gösterildi. Yapılan analizlere göre her iki hücre hattında da MHT uygulamasının, MSNP-NH₂ uygulanmayan gruplarda bile hücreleri etkilediği gözlemlendi. Hücre canlılığının MCF-10A hücrelerinde %4,8 seviyesinde düşerken MCF-7 hücrelerinde %5,7 seviyesinde düştüğü belirlendi. MCF-10A hücreleri için tüm konsantrasyonlarda MHT uygulaması yapılan gruplarda daha fazla ölümün olduğu ve ölümlerin en çok nekroz ile gerçekleştiği gözlemlendi (Şekil 46).

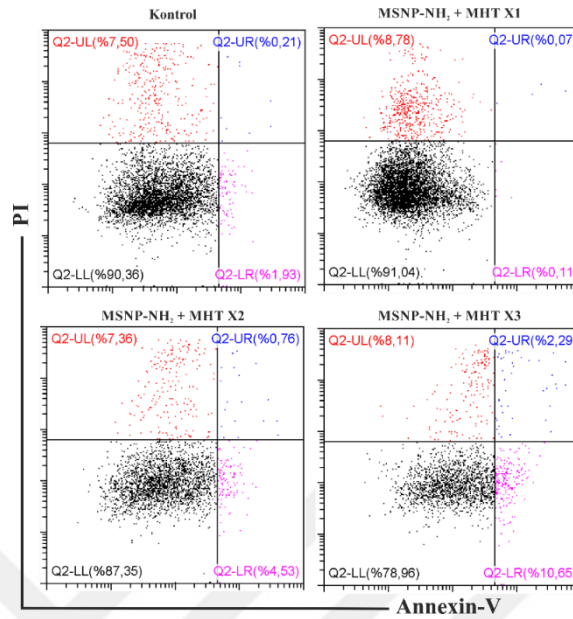


Şekil 46. MSNP-NH₂'nin MHT uygulaması altında doz denemesine ait apoptoz sonucu MSNP-NH₂ ile muamele edilen MCF-10A hücreleri 3 saat MHT cihazında tutuldu.



Şekil 47. MSNP-NH₂'nin MHT uygulaması altında doz denemesine ait apoptoz sonucu MSNP-NH₂ ile muamele edilen MCF-7 hücreleri 3 saat MHT cihazında tutuldu.

P_{HSP} 'nin çoklu indüksiyonunu araştırmak üzere gerçekleştirilen çalışmada gen içermeyen manyetofektin karışımı ile muamele edilen hücrelerde indüksiyon sayısı arttıkça hücre canlılığının azaldığı gözlemlendi (Şekil 48).

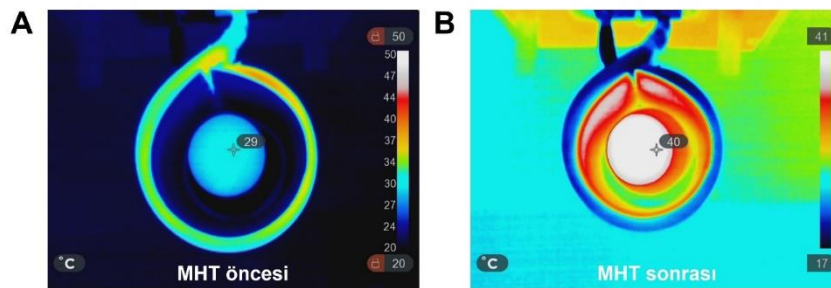


Şekil 48. Tekrarlı MHT uygulamasına ait apoptoz sonucu

75 $\mu\text{g/ml}$ MSNP-NH₂ ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde 48 saat sonunda yapılan apoptoz testi sonuçları. Hücreler, MHT cihazında 40 °C'de 30 dakika boyunca tutuldu. Tekrarlı indüksiyon grupları (X2, X3) her 12 saatte bir tekrar MHT cihazında tutuldu.

Dual Terapi Uygulamaları

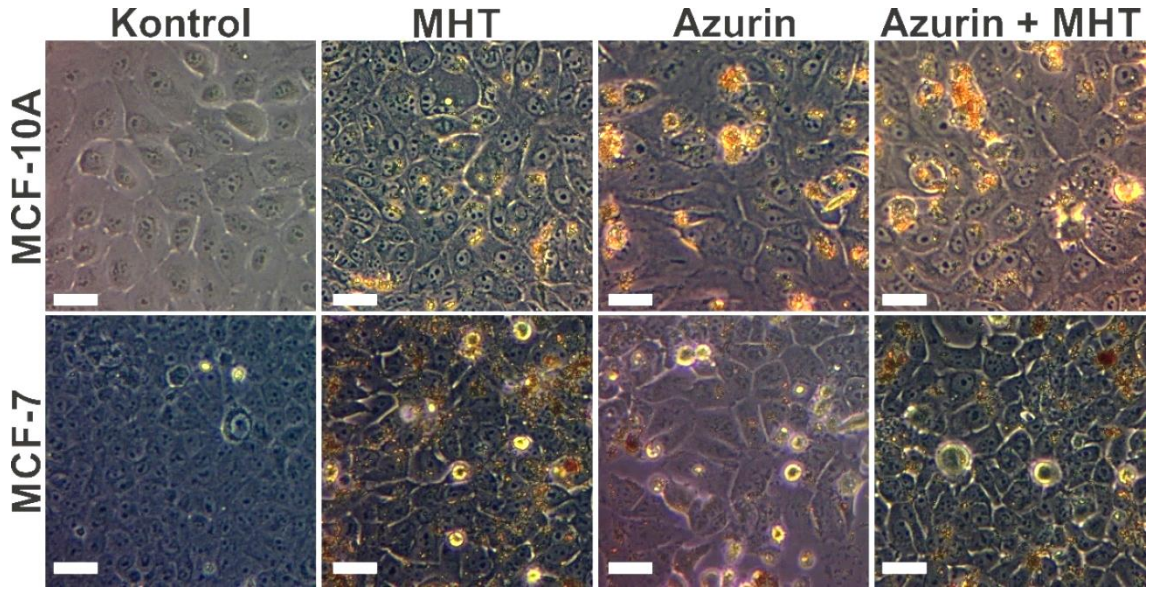
Manyetofektin uygulanan hücreler, 90 dakika boyunca AC manyetik alana maruz kaldığında ortamın sıcaklığı yaklaşık 60 dakikada 40 °C'ye yükseldi. MHT öncesi ve sonrası termal kamera görüntüleri Şekil 49'da verildi.



Şekil 49. MHT uygulamasına ait termal kamera görüntüleri

MSNP-NH₂ (50 $\mu\text{g/ml}$) uygulanmış hücrelerin A. MHT öncesi ve B. MHT sonrası termal kamera görüntüleri.

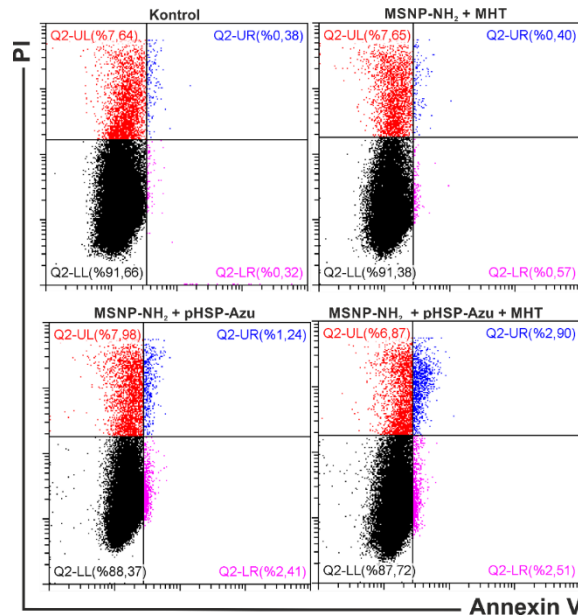
Dual terapi uygulanmış hücrelere ait ters mikroskop görüntülerinde (Şekil 50), yapılan uygulamaların hücre morfolojisi üzerinde önemli bir olumsuz etki oluşturmadığı görüldü.



Şekil 50. Dual terapi uygulamasından 48 saat sonra çekilen hücre görüntüleri

MHT: pHSP-GFP ile hazırlanan manyetofektin uygulanmış ve 90 dakika boyunca MHT cihazında tutulmuş hücreler, Azurin: sadece pHSP-Azu ile hazırlanan manyetofektin uygulanmış hücreler ve Azurin + MHT: pHSP-Azu ile hazırlanan manyetofektin uygulanmış ve 90 dakika boyunca MHT cihazında tutulmuş hücrelerdir. Manyetofeksiyonda 50 mg/ml MSNP-NH₂, 3 µg pHSP-Azu ve 0,5 oranında PEI/DNA (a/a) kullanıldı. Skala 20 µm'dir.

Azurin ve MHT uygulanmış MCF-10A hücrelerinde apoptotik ve nekrotik hücre ölümünde anlamlı bir fark belirlenmedi (Şekil 51). Bu sonuçlara göre, azurin, manyetofektin veya MHT'nin ayrı ayrı ya da birlikte uygulanmasının MCF-10A hücrelerini etkilemediği görüldü.

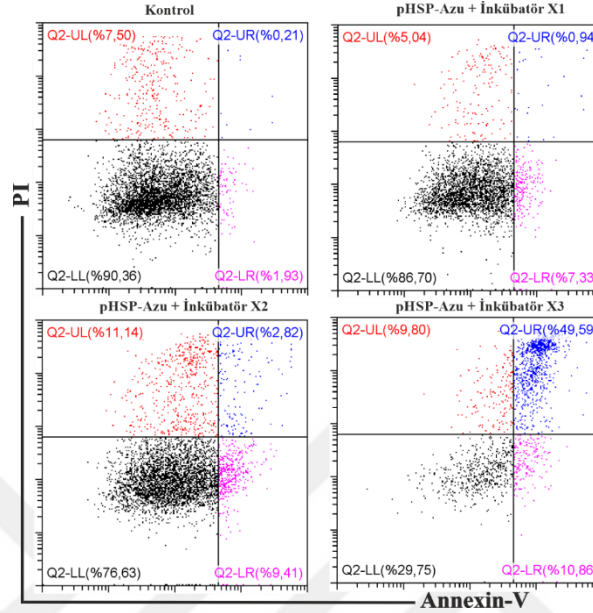


Şekil 51. MCF-10A hücrelerinin dual terapi uygulamasından 48 saat sonra yapılan apoptoz testi sonuçları

Manyetofeksiyonda 50 mg/ml MSNP-NH₂, 3 µg pHSP-Azu ve 0,5 oranında PEI/DNA (a/a) kullanıldı. MHT gruplarında hücreler 90 dakika boyunca MHT cihazında tutuldu.

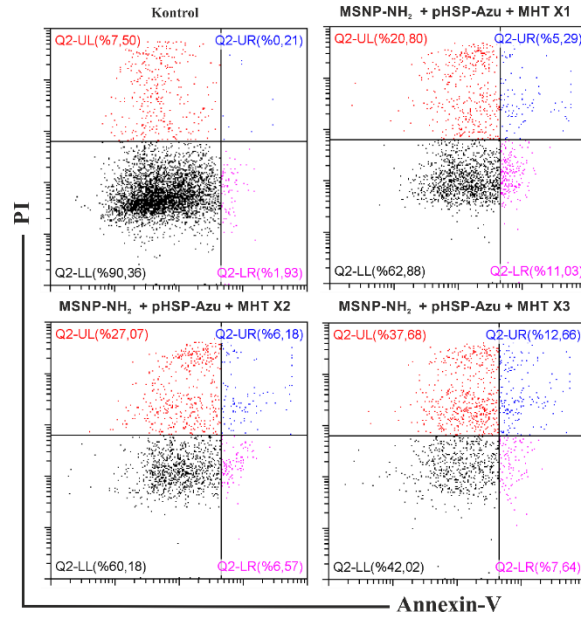
Literatürde azurinin apoptoz ile hücreyi ölüme götürdüğü belirtilmiştir (Yaghoubi *et al.* 2020). MSNP-NH₂ içermeyen, sadece PEI ile pHSP-Azu MCF-7 hücrelerine transfer edildi. Bu

durumda P_{HSP} 'nin indüksiyonu inkübatörde gerçekleştirilerek hücrelerde azurin ekspresyonu teşvik edildi. Bu durumda indüksiyon sayısı arttıkça hücre canlılığında azalma gözlemlendi (Şekil 52). Ancak MHT ile indüklemenin (Şekil 51) aksine, inkübatörde yapılan deneyde indüksiyon sayısı arttıkça apoptozun arttığı belirlendi (%7,3, %10,75 ve %57,96).



Şekil 52. Dual terapi uygulanmış MCF-7 hücrelerinin 48 saatlik apoptoz testi sonuçları pHSP-Azu gruplarında DNA+PEI uygulanan hücreler 38 °C'ye ayarlanmış inkübatörde 1, 2 ve 3 kez 90 dakika boyunca inkübe edildi (3 µg pHSP-Azu ve 0,5 oranında PEI/DNA (a/a))

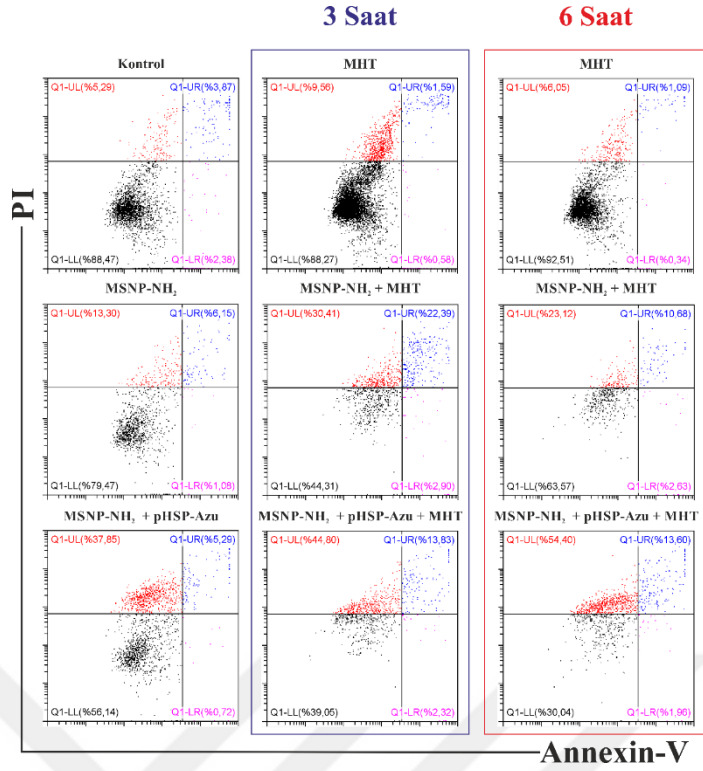
Aynı şartlar ve bunlara ek olarak tekrarlı MHT indüksiyonunun yapıldığı MCF-7 hücrelerinin apoptoz sonuçlarında, MCF-7 hücrelerinin önerilen terapiden daha fazla etkilendiği belirlendi (Şekil 53). Tüm gruplar arasında, dual terapi uygulanmış MCF-7 hücrelerinde en düşük hücre canlılığı belirlendi ve indüksiyon sayısı arttıkça hücre canlılığının azaldığı görüldü. Sadece MSNP-NH₂ ve 3 kez AC manyetik alana tabi tutulan hücrelerde nekrotik hücre ölümü yüzdesi %27,79 olarak belirlenirken apoptoz oranı %20,27 olarak gözlemlendi. Belirlenen bu şartlarda, MHT uygulaması, hücre ölümü apoptoz yerine nekroza kaydırmaktadır. Aynı şartlarda azurin içeren plazmit varlığında sırasıyla, 1, 2 ve 3 kez yapılan indüksiyon sonucunda hücrelerin %29,31, %36,5 ve %55,65'inin nekrotik yolla öldüğü görüldü. Bu hücrelerin apoptoz oranları ise yine sırasıyla, 1, 2 ve 3 kez yapılan indüksiyon sonucunda %13,97, %11,39 ve %17,82 olarak hesaplandı. MHT uygulanmadığında, MSNP-NH₂+pHSP-Azu uygulanan grupta düşük hücre canlılığı gözlemlendi. Bu durum 37 °C'de az da olsa P_{HSP} 'nin indüklenmiş olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 53. MCF-7 hücrelerinin dual terapi uygulamasından 48 saat sonra yapılan apoptoz testi sonuçları

MHT: azurine ait dizi içermeyen plazmit ile hazırlanan manyetofektin uygulanıp 90 dakika boyunca MHT cihazında tutuldu, Azurin: sadece pHSP-Azu ile hazırlanan manyetofektin uygulandı ve Azurin + MHT: dual terapi uygulandı (50 µg/ml MSNP-NH₂, 3 µg pHSP-Azu, 0,5 oranında PEI/DNA (a/a)).

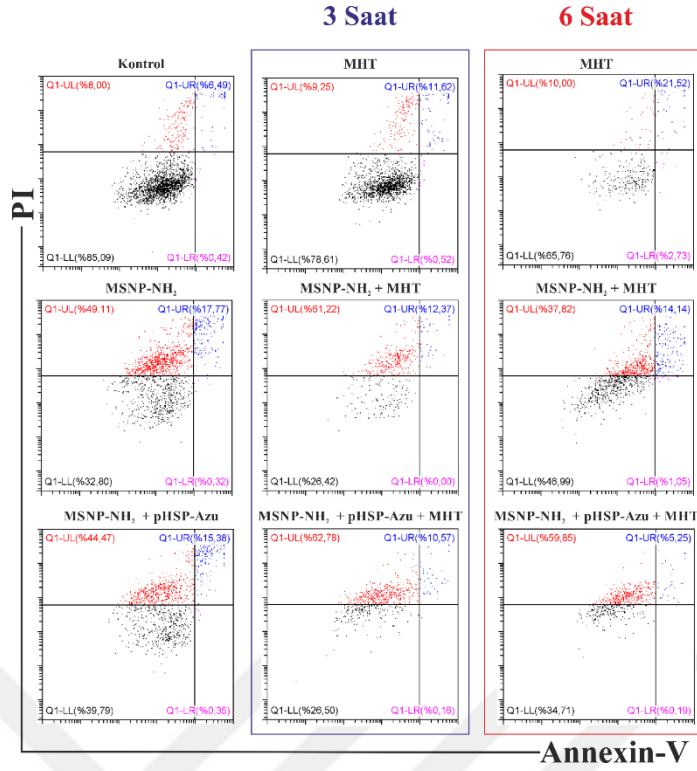
MHT uygulama süresi artırıldığında beklenildiği üzere hücre canlılığının azaldığı Şekil 54'teki sonuçlarda net olarak görülmektedir. Yapılan uygulamada yalnızca MSNP-NH₂ kullanılan gruplarda MHT uygulanmaksızın hücrelerin etkilendiği görülmektedir. MSNP-NH₂ uygulanan gruplar ile azurin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında ise azurinin hücre ölümünü artırdığı görülmüştür. Azurin içeren gruplarda MHT uygulaması yapılmamasına rağmen hücrelerde ölüm gözlemlendi. MHT indüksiyon süresi artırıldığında ise bu oranın daha da arttığı gözlemlendi.



Şekil 54. MCF-10A hücrelerinin dual terapi uygulamasından 48 saat sonra yapılan apoptoz testi sonuçları

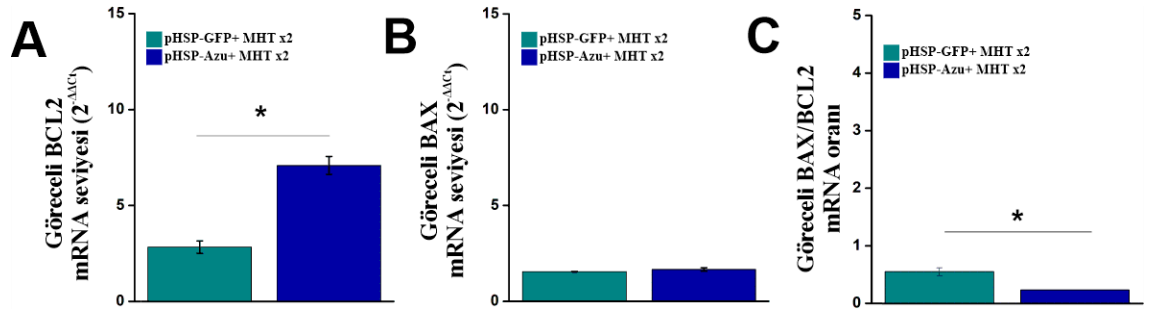
MHT: azurine ait dizi içermeyen plazmit ile hazırlanan manyetofektin uygulanıp 3 ve 6 saat MHT cihazında tutuldu, Azurin: sadece pHSP-Azu ile hazırlanan manyetofektin uygulandı ve Azurin + MHT: dual terapi uygulandı. (100 µg/ml MSNP-NH₂, 3 µg pHSP-Azu, 4 oranında PEI/DNA (a/a)).

Aynı uygulama MCF-7 hücrelerine yapıldığında, MCF-7 hücre hatlarında hücre alımının fazla olması sebebiyle sadece MSNP-NH₂ uygulanan gruplardaki ve azurin uygulanan gruplardaki hücre ölümünün kontrole göre daha fazla olduğu görüldü.



Şekil 55. MCF-7 hücrelerinin dual terapi uygulamasından 48 saat sonra yapılan apoptoz testi sonuçları

Azurin proteininin MCF-7 hücrelerinde ekspresyonuna dair etki, qRT-PCR sonuçlarıyla ortaya konuldu. Aynı şartlarda azurin genini içermeyen (pHSP-GFP) ve içeren (pHSP-Azu) plazmitlerle hazırlanan manyetofektin ile transfekte edilmiş MCF-7 hücrelerinde, dual terapi için P_{HSP}'nin indüksiyonu iki kez gerçekleştirildi ve ardından apoptoz oranını belirten BAX/BCL2 seviyesi araştırıldı. BCL2 ekspresyonunun MCF-7 hücrelerinde kontrole oranla azurin yokken $3,23 \pm 0,6$ kat ve azurin varken $7,47 \pm 0,73$ kat arttığı görüldü (Şekil 56 A). BAX ekspresyonu ise azurin varlığında ve yokluğunda hemen hemen aynı orandaydı (Şekil 56 B). Göreceli BAX/BCL2 oranının, pHSP-GFP transfer edilen hücrelerde 0,5 kat arttığı, pHSP-Azu transfer edilen hücrelerde ise 0,2 kat arttığı görüldü (Şekil 56 C). Bu durum, MCF-7 hücrelerinin apoptotik olmayan yolla ölüme gittiğini göstermektedir. Diğer yandan akış sitometri sonuçlarının (Şekil 51, Şekil 52 ve Şekil 53) qRT-PCR sonuçlarını desteklediği görülmektedir. Bu şekilde önerilen terapi yaklaşımında hücre ölümünün nekrotik yolla olduğu ortaya konulmuş oldu.



Şekil 56. BCL2 ve BAX mRNA seviyelerini belirlemek üzere yapılan qRT-PCR sonuçları 50 μ g/ml MSNP-NH₂, PEI (PEI/DNA: 0,5) ile pHSP-GFP veya pHSP-Azu (3 μ g) transfeksiyonu sonucu A, B ve C, MCF-7 hücrelerine ait. P_{HSP}'nin indüksiyonu için hücreler iki kez 90 dakika boyunca MHT cihazında tutuldu

TARTIŞMA VE SONUÇ

Canlılarda kendiliğinden oluşmayan DNA moleküllerinin rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilmesi sayesinde farklı terapi yöntemlerinde kullanılması için yeni plazmitler oluşturulmuştur. Bunun için ilgili gen dizisi, konakçı hücreye uygun ekspresyon vektöründe yer alan promotör arkasına yerleştirilip rekombinant DNA elde edilir (Overton, 2014). Yapılan bu çalışmada memeli hücrelerinde sıcaklık ile indüklenebilen P_{HSP} , yapısal promotör olan P_{CMV} ile yer değiştirilerek pHSP-GFP elde edildi (Şekil 17). Elde edilen bu ekspresyon plazmitine terapötik kodon optimize edilmiş ve durdurma kodonu içeren azurin geni yerleştirilerek pHSP-Azu elde edildi (Şekil 23).

Oldukça küçük boyutlarda üretilebilen (Şekil 25) manyetik nanopartiküller (MNP), mıknatıs ile istenilen alanda toplanma (Şekil 26) ve AC manyetik alan altında termal enerji sağlama (Şekil 26 ve Şekil 27) yetenekleri nedeniyle ilaç ve gen aktarım çalışmaları için ideal taşıyıcılardır. MNP'lerin biyomedikal uygulamaları noktasında ilgili hedeflere ulaşabilmesi için kılcal damarlardan yayılabilmesi gerekir. Bu tür uygulamalarda, boyutun yanı sıra NP'lerin biyolojik bozunmaya karşı kararlı olması ve aşırı topaklaşmasının önlenmesi önemlidir. Bu amaçla MNP'lerin yüzeyi bir kabuk ile kaplanmaktadır (He & Shi, 2011; Sun *et al.* 2014). Moleküllerin ve ilaçların kolayca NP yüzeyine bağlanmasına olanak tanıyan hidrofilik silika kaplama, sahip olduğu birçok eşsiz avantaj nedeniyle biyomedikal uygulamalarında sıkça kullanılmaktadır (Solak *et al.* 2021).

Oda sıcaklığında kaydedilen verilere göre elde edilen histerezis eğrisi süperparamanyetik malzemelerin manyetik doygunluğunu belirtmektedir (Pon-On *et al.* 2019). Bu çalışmada elde edilen MSNP-NH₂'lerin ölçülen manyetik doygunluğu (30 emu/g) çok ince bir kabuk varlığını işaret etmektedir (Şekil 28). MSNP-NH₂'de kullanılan silika kabuk yapısının manyetizasyona katkısı olmayacağı gibi nihai partikülün manyetizasyonunu da bir miktar düşürmektedir (Pon-On *et al.* 2019). Literatürdeki bir çalışmada, ancak HR-TEM ile görüntülenebilen incelikte, yaklaşık 4 nm kabuk kalınlığına sahip MSNP'lerin manyetik doygunluğu 40 emu/g olarak bildirilmiştir (Yi *et al.* 2006). Üretilen MSNP-NH₂'nin küresel morfolojide ve oldukça küçük olduğu anlaşılan Şekil 25'deki TEM görüntülerinde belirgin bir kabuk kalınlığı gözlenmedi. Literatüre göre, Fe₃O₄ NP'ler veya kabuk ile kaplı NP'ler 106, 68 veya 60 emu/g gibi farklı manyetik doygunluklara sahiptir (Asín *et al.* 2012; Santha Moorthy *et al.* 2017). MSNP-NH₂'lerin AC manyetik alan altında kaydedilen sıcaklık-zaman grafiğinde

(Şekil 27), düşük MSNP-NH₂ konsantrasyonunda sıcaklık artış hızının yavaş olduğu görüldü. Bu da dual terapide istenilen sıcaklığa daha uzun sürede ulaşmaya neden olmaktadır. Bu durumun kabuk kaplamadan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Floresan etiketli MSNP-NH₂'nin miknatıs yokluğunda 4 saat (Şekil 32, Şekil 33, 0 dakika) içinde hücrelerin etrafında gözlenmesi MSNP-NH₂'nin hücre membranına kolayca yapışabildiğini, bunun nedeninin elektrostatik etkileşim olduğunu düşündürmektedir. Benzer şekilde sadece MSNP-NH₂ (Şekil 24) ve MSNP-NH₂ ile karıştırılan PEI/DNA'nın zeta potansiyelinde elde edilen değerler (Şekil 30 ve Şekil 31) MSNP-NH₂'nin ve manyetofektin kompleksinin yüzeyinin pozitifliğini göstermektedir.

Manyetofektin için kullanılan MSNP-NH₂ (30,4±0,4 mV), DNA (-18,2±0,7) ve PEI (7,1±0,6)'nin her birinin ayrı ayrı ve nihai kompleksin (13,17±0,5 mV) zeta potansiyel sonuçları incelendiğinde (Şekil 30), DNA yüklü partikülün yüzey yükünün DNA yüklenmeyen partikülden daha az pozitif olması, DNA yüklendiğini göstermektedir. Dallı ve yüksek pozitiviteye sahip PEI, hücrelere gen aktarımı yapmak için iyi bir ajandır. Fakat PEI'nin steril saf su ile hazırlandıktan sonraki sahip olduğu yüksek pozitivite hücreler için toksik etki oluşturabilir. Bundan dolayı, PEI solüsyonunun pH değeri 7-7,4 arasında ayarlanıp pozitivitesi (7,1±0,6) azaltılarak kullanıldı (Kandemir, 2013).

Manyetofektin hazırlanırken DNA'nın beklendiği gibi MSNP-NH₂ ve PEI arasında kalıp kalmadığını ve komplekste ne kadar DNA kaldığını araştırmak üzere, hazırlanan manyetofektin miknatıs ile toplanıp nükleaz içermeyen suyla yıkandıktan sonra kompleksten DNA salımı yaptırıldı (Şekil 29). PEI ile hazırlanan manyetofektin gruplarında yükleme sonrası toplanan örneklerle ait kuyularda bant varlığının gözlenmemesinin sebebinin ortama eklenen DNA'nın hemen hemen hepsinin manyetofektin yapısına dâhil olduğu düşünüldü (Şekil 29 A). PEI varlığında salınan DNA miktarının daha az görülmesinin (Şekil 29 B), (i) ortama eklenen PEI'nin, DNA'yı sıkıca tutmasından dolayı DNA'nın manyetofektin kompleksinden kolaylıkla salınamadığı veya (ii) PEI'nin, nükleik asit boyama solüsyonunun DNA'ya bağlanmasını engellediği ve bu yüzden UV altında bant gözlenmediği şeklinde iki farklı sebebi olabilir.

Manyetofektin hazırlanırken eklenen PEI'nin DNA'ya oranı yapının pozitifliğini değiştirmektedir. PEI miktarının düşük, DNA miktarının yüksek olması manyetofektin kompleksinin nihai yükünün negatif olmasını sağlamaktadır (Şekil 31). MSNP-NH₂, DNA ve PEI oranı manyetofektin kararlılığını etkilemektedir. Farklı PEI/DNA oranında hazırlanan manyetofektinlere ait DLS ölçümü (Şekil 31), kompleksteki her bileşenin etkileşiminin yapının yüzey yükünü ne kadar etkileyebildiğini ortaya koymaktadır. PEI/DNA miktarındaki artış ile

kompleksin zeta potansiyelinde artış gözlenirken, düşük DNA ve düşük PEI/DNA oranlarında yapının beklenenin aksi yönde yüzey yüküne sahip olabildiği gözlemlendi.

Hücreler ile yürütülen deneylerde hazırlanan manyetofektin ile DNA'nın hücre içine ulaştığı ve hedef proteinin üretilbildiği ortaya konuldu (Şekil 41). Yapısal promotör yerine ısı ile indüklenebilen bir promotör kullanıldığında 3 ve 6 saat indüksiyon ile hücrelerde hedef proteinin ekspresyonu gerçekleşti (Şekil 42). Literatürde gen aktarımı zor olan hücrelere manyetofeksiyon yöntemi ile gen aktarımının diğer yöntemlere göre daha kolay ve ucuz olduğu belirtilmektedir (X. Zhao *et al.* 2017). Yapılan çalışmada, yapısal promotör varlığındaki transfeksiyon etkinliğinin indüklenebilir promotör varlığındaki transfeksiyon etkinliğinden daha fazla olduğu görüldü (Şekil 39, Şekil 40, Şekil 41). Konfokal mikroskop (Şekil 41) sonuçlarından yola çıkarak MCF-10A hücrelerine manyetofeksiyon yöntemi ile gen aktarımında yüksek transfeksiyon etkinliğinin görülmemesinin nedeni, sağlıklı hücrelerin uygulama yapılan maddelere karşı hassasiyet göstermesi ile strese girmesinden veya ölümünden kaynaklanabilir. Literatürde MCF-10A hücrelerine diğer transfeksiyon yöntemleri ile gen aktarımında zorluk yaşanmaktadır. Öte yandan, birçok farklı hücre hattına farklı özelliklerde NP'lerin gönderildiği bir çalışmada, silika ve APTES ile modifiye edilmiş manyetik NP'lerin MCF-7 hücreleri tarafından alımının zor olduğuna yer verilmiştir (Zhu *et al.* 2012). Bu çalışmada mıknatıs kullanıldığında MSNP-NH₂'nin her iki hücre türünde de hücre alımının yüksek olduğu belirlendi (Şekil 32, Şekil 33).

MSNP-NH₂ uygulanan her iki hücre hattında, hücrelerin canlılığı (Şekil 37) ve morfolojileri (Şekil 36) üzerinde yürütülen çalışmalarda, üretilen yapının hücreler üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı ortaya konuldu. Hipertermi denemelerinde ise MHT ile veya inkübatörde ısıtılan MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunun arttığı belirlendi (Şekil 44 ve Şekil 45). Bu durum, artan ortam sıcaklığının, MCF-7 hücrelerinde ısı şok proteinlerini aktifleştirip, hücre proliferasyonunu artırmasından kaynaklanabilir. Çünkü meme kanserinin, hücrelerin sahip olduğu östrojen reseptörlerine (ER) göre moleküler türleri tanımlanmaktadır ve ER proteinin, ER α ve ER β olmak üzere iki sınıfı vardır. MCF-7 hücreleri ER α pozitifdir. Östrojen takviyesi ile ısı şok proteini 1'in (HSP1) aktive edildiği ve bu yolla MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunun arttığına dair çalışmalar bulunmaktadır (Vydra vd., 2021, 2019). HSP1, normalde stres şartları altında hücrelerin sağ kalımını sağlayan bir şaperon proteinidir. Ancak yüksek seviyede üretilmiş HSP1 proteini, ER pozitif kanser hücrelerinin proliferasyonunu artırmaktadır. Bunun yanı sıra HSP70'in hücre döngüsü ve büyümesi üzerinde olumlu etkisi olduğu bilinmektedir. Genellikle hücrelere öldürücü olmayan dozda uygulanan sıcaklık, HSP'leri aktive etmektedir. Literatürde artmış HSP70 üretiminin, hipertermi nedenli hücre

toksitesine karşı hücrelerin direncini artırdığına dair çalışmalara da rastlanmıştır (Barnes *et al.* 2001).

MHT, diğer hipertermi terapilerine göre daha avantajlı ve gelecek vaat eden bir hipertermi yöntemi olarak görülmektedir (DeNardo & DeNardo, 2008). Çünkü sıcaklığı artıran MNP'lerin hücre içinde olması nedeniyle hücre iç kısmından ısınmaktadır (Alphandéry, 2014). Ancak, MHT'nin etkili olması için 43-45 °C gibi sıcaklıklara erişmek gerekmektedir. MCF-7 hücrelerinin termal toleransı nedeniyle, bu çalışmada uygulanan nispeten düşük sıcaklığın hücrelerin canlılığını artırdığı düşünülmektedir. Kansere karşı 42 °C'nin altında 1-6 saat süreyle uygulanan hiperterminin etkili olduğu belirtilmektedir (DeNardo & DeNardo, 2008). Bir çalışmada MCF-7 hücreleri farklı süre ve sıcaklıkta hipertermiye (inkübatör) maruz bırakılmış ve 38 °C'de 4 saat tutulduğunda hücre canlılığının $71,6 \pm 3,7$ olduğu belirtilmiştir (Asita Elengoe, 2013). Benzer durumu, Elengoe vd. (2019), MCF-10A, MCF-7 ve MDA-MB 231 hücrelerinde görmüştür. Araştırmacılar, hücreleri 38-44°C sıcaklık aralığında, 0-4 saat tuttuklarında MCF-7 hücrelerinin 42 °C'de 1 saat boyunca hücre canlılığını koruduğunu, 42 °C'de 2 saat hipertermi uygulamasının MCF-7 canlılığını %80'e düşürdüğünü görmüşlerdir. Ancak 40-41 °C'de 4 saat boyunca gerçekleştirilen hiperterminin hücre canlılığını %50'nin altına düşürebildiği görülmüştür (Elengoe *et al.* 2019). Bu sonuçların çalışmamızda elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görüldü (Şekil 44). Yapılan tez çalışmasında hücrelere 90 dakika AC manyetik alan uygulandı. Bu süreye MSNP-NH₂'nin ısınma süresi de dâhildir. Dolayısıyla düşük sıcaklığa (40 °C) kısa süre maruz kalan MCF-7'nin yukarıda anlatıldığı gibi termal tolerans gösterdiği düşünüldü. Bu nedenle sadece MHT'nin etkisinin araştırıldığı uygulamalarda MHT uygulama sayısının (Şekil 48) veya süresinin (Şekil 54 ve Şekil 55) ve kullanılan NP dozunun artırılması (Şekil 46 ve Şekil 47) yoluyla daha yüksek hipertermi sıcaklıkları test edildi. Uygulamalar sonucunda MCF-10A ile karşılaştırıldığında MCF-7'nin daha hassas olduğu görülmektedir. Bu durum, sağlıklı hücreleri daha az etkilemesi sebebiyle, yapılan uygulamaların terapi için bir avantaj olduğunu göstermektedir.

Tümör hücrelerinin sıcaklığının artırılması, onların nekroz yoluyla ölümüne sebep olduğu bilinmektedir (Darvishi *et al.* 2021; Steeves, 1992). Manyetik hipertermide ise kanser hücrelerinin ölümünde nekroz veya apoptoz olmak üzere iki farklı yol tercih edilmektedir (Darvishi *et al.* 2021). Bu çalışmada elde edilen dual terapi sonuçları incelendiğinde MCF-7 hücrelerinin apoptozdan çok nekroza yöneldiği görüldü (Şekil 53). qRT-PCR sonuçlarının da akış sitometri sonuçlarını desteklediği gözlemlendi (Şekil 56). Literatürde demir oksit NP uygulaması AC manyetik alan ile desteklendiğinde hücre ölümünün dışsal (örn., kaspaz-8 aracılı apoptoz) veya içsel (örn., BAX/BCL2 oranındaki artış) olabildiği belirtilmektedir

(Harmon *et al.* 1991; Sellins & Cohen, 1991). BAX VE BCL2 proteinleri, mitokondri geçirgenliğini artırarak içsel hücre ölümü yolunu aktive etmektedir (Pucci *et al.* 2022). Kritik bir hücre ölümü promotörü olan BAX'ın ekspresyon seviyesinin artması, radyoterapi veya hipertermi uygulamasından sonra ya TP53'e bağımlı ya da TP53'ten bağımsız olabilir (Gong *et al.* 1999; Liang *et al.* 2007; H. Wang *et al.* 2011; J. Zhao *et al.* 2011). Literatüre göre azurinin, TP53 ile bir kompleks oluşturup ve MCF-7 hücrelerinde hücre içi TP53 seviyesini yükselttiği bilinmektedir (Punj *et al.* 2004; Yamada *et al.* 2004). Bu çalışma kapsamında önerdiğimiz dual terapide, apoptozdan çok nekroz görülmesinin nedeni, hücrelerin azurinden önce MSNP-NH₂ ile mücadele etmesi olabilir. Çünkü demir içeren NP'ler, hücrelerin apoptotik olmayan bir yol olarak önerilen ferroptosis ile ölüme gitmesine yol açmaktadır (Dixon *et al.* 2012; Stockwell *et al.* 2017; Y. Zhao *et al.* 2021).

Sonuç ve Öneriler

Dünyada ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alan ve yakın bir zamanda birinci sıraya yükselmesi beklenen kanser, günümüzde insanlar için büyük bir tehdittir. GCO'nun (Global Cancer Observatory) 2020 verilerine göre kanser vakaları içinde meme kanseri %11,7 oran ile dünyada en fazla görülen kanser türüdür (Globocan, 2020). Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institution)'nın verilerine göre sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde 2020 yılında kanser tedavisi için toplamda 208,9 milyar USD harcanırken bunun büyük kısmı 29,8 milyar USD ile meme kanseri tedavilerinde kullanılmaktadır (National Cancer Institution, 2019). T.C. Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından 2021 yılında yayımlanan İlaç Sektörü Raporu'na göre, 2020 yılı dünya ilaç ihracatı 723 milyar USD'dir. Ayrıca, 2020 yılı dünya reçeteli ilaç satışları incelendiğinde en fazla payı onkoloji ilaçlarının aldığı görülmektedir. Bugün Türkiye'de en çok ciro yapan 100 ilacın 95'i ithaldir ve bu ilaçlar için yabancı şirketlere yılda 7 milyar TL ödenmektedir.

Bu sebeple hem ekonomik hem de stratejik öneme sahip olan yerli ilaç üretimi çalışmaları öncelikli alandır. Bu tez çalışmasında, meme kanseri tedavisi için kullanılmaya aday, özgün bir yöntem önerilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar şu şekildedir:

- pCMV-GFP'de bulunan P_{CMV}'nin P_{HSP} ile yer değiştirilmesiyle pHSP-GFP elde edildi. Böylelikle ısı ile indüklenebilir plazmit DNA elde edildi. Azurin proteinine ait gen dizisi pHSP-GFP'ye klonlandı, sekans analizi ile rekombinant plazmitlerin üretildiği doğrulandı.
- AC manyetik alan altında tutulduğunda sıcaklığı artıran, mıknatıs tarafından çekilebilen, süperparamanyetik, yüzeyi DNA bağlamaya ve DNA'nın salımına

uygun halde modifiye (MSNP-NH₂) edilmiş, küçük boyutlarda ve monodispers yapıda NP'ler kullanıldı.

- Manyetofektinler oluşturulurken, MSNP-NH₂'lere DNA bağlandıktan sonra ortama PEI eklenerek oluşturulan kompleksin yüzey pozitif yükü artırıldı. Ayrıca kullanılan PEI, kompleksin hücre içerisinde endozomdan kaçışını sağlayarak hücre çekirdeğine kadar ulaşabilmesine yardımcı olmuştur.
- Yaklaşık 100 µg MSNP-NH₂'nin yaklaşık 1 µg DNA'yı tutabildiği belirlendi. Ayrıca yaklaşık 2 µg DNA'nın, 50 µg MSNP-NH₂ ve 0,5 oranında PEI/DNA (a/a) ile tutulabildiği belirlendi.
- Zeta potansiyeli ölçümü sonucunda 0,5 (a/a) oranında PEI/DNA kullanıldığında manyetofektin kompleksinin yüzeyi negatif iken, bu oran 0,75'e çıkarıldığında yüzey pozitivitesinin arttığı gözlemlendi.
- Manyetofektinin, MCF-7 ve MCF-10A hücrelerinin morfolojisi üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı belirlendi.
- NP'ler, MCF-7 ve MCF-10A hücrelerine uygulanarak farklı mıknatıs tutma süreleri ile hücrelere ulaştırıldı. En uygun mıknatıs tutma süresinin 30 dakika olduğu ve MCF-7 hücrelerinin MCF-10A hücrelerine göre daha fazla NP aldığı belirlendi.
- MSNP-NH₂ uygulaması yapıldığında MCF-7 hücre canlılığının, MCF-10A'ya göre MSNP-NH₂'lerden daha fazla etkilendiği gözlemlendi.
- PEI ile muamele edilen gruplarda, aynı dozlarda MCF-7 hücrelerinin MCF-10A hücrelerinden daha fazla etkilendiği gözlemlendi.
- MCF-7 ve MCF-10A hücrelerine gönderilen plazmitler aracılığıyla hücre içinde P_{CMV} ve P_{HSP} kontrolünde yeşil floresan protein (GFP) üretildi.
- MCF-7 ve MCF-10A hücrelerine uygulanan manyetofeksiyon sonucunda MCF-7 hücre morfolojisinin ve çekirdek yapısının MCF-10A hücrelerinden daha fazla etkilendiği gözlemlendi. Ayrıca 3 ve 6 saat süreyle yapılan indüksiyon sonucunda, süre arttıkça her iki hücre hattında da hücre morfolojisinin ve çekirdek yapısının bozulduğu anlaşıldı.
- Hipertermi yöntemiyle P_{HSP}'nin indüksiyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirildi ve hücrelerde P_{HSP} kontrolünde GFP ekspresyonu gözlemlendi. Sadece MSNP-NH₂ uygulanıp AC manyetik alan altında tutulan MCF-10A hücrelerinde yüksek sıcaklıkta (40 °C'ye kadar) sınırlı toksisite gözlemlendi.
- Sadece MSNP-NH₂ uygulanıp AC manyetik alan altında tutulan MCF-7 hücrelerinde hem AC manyetik alan ile hem inkübatör ile uygulanan yüksek sıcaklık şartlarında hücre canlılığında artış görüldü.

- MSNP-NH₂ uygulanan MCF-10A ve MCF-7 hücrelerinin 90 dakika boyunca 41 °C'ye kadar AC manyetik alana dayanabildiği belirlendi.
- MCF-10A ve MCF-7 hücreleri için artan dozlarda MSNP-NH₂'nin MHT uygulaması sonucunda MCF-7'lerin daha çok öldüğü ve ölümlerin en çok nekroz ile gerçekleştiği gözlemlendi.
- P_{HSP}'nin çoklu indüksiyonu araştırmak üzere gen içermeyen manyetofeksiyon karışımı ile muamele edilen hücrelerde indüksiyon sayısı arttıkça hücre canlılığının, azaldığı gözlemlendi.
- MCF-10A ve MCF-7 hücreleri için azurinin etkisini gözlemek amacıyla azurin içeren plazmitlerin hücrelere PEI ile transfeksiyonu sonucu hücrelerin apoptoz ve nekroz ile öldüğü gözlemlendi.
- pHSP-Azu'nun hücrelere PEI ile transfeksiyonu sonucu artan indüksiyon denemelerinde hücre ölümünün daha çok apoptozla olduğu ve aynı plazmit DNA'nın hücrelere MSNP-NH₂ ile transfeksiyonu sonucu artan indüksiyon denemelerinde hücrelerin çoğunlukla nekroz ile öldüğü görüldü.
- Önerilen dual terapinin MCF-7 hücrelerini MCF-10A hücrelerine göre daha fazla etkilediği gözlemlendi.
- MCF-7 hücrelerinde dual terapi sonrası yapılan apoptoz testleri ve BAX/BCL2 oranlarına göre önerilen tedavinin hücreleri apoptoza yönlendirmediği görüldü.

Çalışmada 50, 75 ve 100 µg/ml MSNP-NH₂ kullanıldı, terapötik protein geni içeren pHSP-Azu, hücrelere sadece 1 doz uygulandı ve farklı sürelerde ve farklı indüksiyon sayısında AC manyetik alana tabi tutuldu. Bu şartlarda yapılan dual terapide apoptotik bir etki gözlenmedi. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlara göre, düşük MSNP-NH₂ konsantrasyonlarında uzun süreli indüksiyon denenebilir. Ayrıca daha geniş aralıkta denenecek farklı PEI/DNA oranları ile transfeksiyon etkinliği artırılabilir. MHT uygulamasında daha yüksek sıcaklığa erişmek amacıyla daha yüksek konsantrasyonda fakat hücre proliferasyonunu çok fazla etkilemeyecek seviyede MSNP-NH₂ denenebilir. Ya da ısınma kapasitesi yüksek biyo-uyumlu yeni MNP'ler denenebilir. Daha yüksek etkinliğe sahip MHT cihaz sistemleri kullanılarak sıcaklık artış miktarı artırılabilir. Transfeksiyon etkinliğinin artırılması ve P_{HSP}'nin daha etkin şekilde indüklenmesi sayesinde hücrelerde azurin ekspresyonu artırılabilir ve kanser hücreleri apoptoza yönlendirilebilir. Ayrıca azurin varlığında hücrelerin apoptoz ile ölümü gerçekleşirken MHT uygulaması ile nekrozla ölmesi, uygulanan dual terapinin farklı yolları aktive ettiğini göstermektedir. Bunun için uygulama yapılan hücrelerde farklı analizler yapılarak hücrenin ölüm için tercih ettiği yol aydınlatılabilir. Uygun sonuçlar elde edildiğinde

canlı sistemler üzerinde denemeler yapılarak ortaya konan terapi yönteminin in vivo etkileri de araştırılabilir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında geliştirilen dual terapi, meme kanseri tedavisinde umut verici sonuçlar göstermiştir. Önerilen çalışmalarla etkinliği daha da artırılıp farklı kanser türlerinde de kullanılabilir.



KAYNAKLAR

- Adman, E. T. (1991). Copper Protein Structures. In *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 42, pp. 145–197). [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60536-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60536-7)
- Akbarzadeh, A., Samiei, M., & Davaran, S. (2012). Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters*, 7(1), 144. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-144>
- Al-Hawash, A. B., Zhang, X., & Ma, F. (2017). Strategies of codon optimization for high-level heterologous protein expression in microbial expression systems. *Gene Reports*, 9, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2017.08.006>
- Albarqi, H. A., Wong, L. H., Schumann, C., Sabei, F. Y., Korzun, T., Li, X., Hansen, M. N., Dhagat, P., Moses, A. S., Taratula, O., & Taratula, O. (2019). Biocompatible Nanoclusters with High Heating Efficiency for Systemically Delivered Magnetic Hyperthermia. *ACS Nano*, 13(6), 6383–6395. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b06542>
- Alphandéry, E. (2014). Perspectives of breast cancer thermotherapies. *Journal of Cancer*, 5(6), 472–479. <https://doi.org/10.7150/jca.8693>
- Ambler, R., & Brown, L. (1967). The amino acid sequence of *Pseudomonas fluorescens* azurin. *Biochemical Journal*, 104(3), 784–825. <https://doi.org/10.1042/bj1040784>
- Andrä, W., & (ed), N. N. (1999). Magnetism in Medicine: A Handbook. *Physiological Measurement*, 20(3), 329–329. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/20/3/701>
- Apiyo, D., & Wittung-Stafshede, P. (2002). Presence of the cofactor speeds up folding of *Desulfovibrio desulfuricans* flavodoxin. *Protein Science*, 11(5), 1129–1135. <https://doi.org/10.1110/ps.3840102>
- Asín, L., Ibarra, M. R., Tres, A., & Goya, G. F. (2012). Controlled cell death by magnetic hyperthermia: Effects of exposure time, field amplitude, and nanoparticle concentration. *Pharmaceutical Research*, 29(5), 1319–1327. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0710-z>
- Asita Elengoe, S. H. (2013). Heat Sensitivity between Human Normal Liver (WRL-68) and Breast Cancer (MDA-MB 231) Cell lines. *International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences*, 1(1), 191–195.
- B., L. I., A., R. R., N., P., W., G. N., G., T., D., Y. G., & J., W. S. (2007). Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), 3219–3224. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611206104>
- Barnes, J. A., Dix, D. J., Collins, B. W., Luff, C., & Allen, J. W. (2001). Expression of inducible Hsp70 enhances the proliferation of MCF-7 breast cancer cells and protects against the cytotoxic effects of hyperthermia. *Cell Stress and Chaperones*, 6(4), 316–325. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2001\)006<0316:EOIHET>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2001)006<0316:EOIHET>2.0.CO;2)
- Bergers, G., & Song, S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-Oncology*, 7(4), 452–464. <https://doi.org/10.1215/S1152851705000232>

- Bernardes, N., Chakrabarty, A. M., & Fialho, A. M. (2013). Engineering of bacterial strains and their products for cancer therapy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(12), 5189–5199. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4926-6>
- Bi, Q., Song, X., Hu, A., Luo, T., Jin, R., Ai, H., & Nie, Y. (2020). Magnetofection: Magic magnetic nanoparticles for efficient gene delivery. *Chinese Chemical Letters*, 31(12), 3041–3046. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2020.07.030>
- Bombonati, A., & Sgroi, D. C. (2011). The molecular pathology of breast cancer progression. *The Journal of Pathology*, 223(2), 308–318. <https://doi.org/10.1002/path.2808>
- Cai, H., An, X., Cui, J., Li, J., Wen, S., Li, K., Shen, M., Zheng, L., Zhang, G., & Shi, X. (2013). Facile Hydrothermal Synthesis and Surface Functionalization of Polyethyleneimine-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(5), 1722–1731. <https://doi.org/10.1021/am302883m>
- Cai, S., Thati, S., Bagby, T. R., Diab, H.-M., Davies, N. M., Cohen, M. S., & Forrest, M. L. (2010). Localized doxorubicin chemotherapy with a biopolymeric nanocarrier improves survival and reduces toxicity in xenografts of human breast cancer. *Journal of Controlled Release*, 146(2), 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.04.006>
- Cao, Z., Zhang, H., Cai, X., Fang, W., Chai, D., Wen, Y., Chen, H., Chu, F., & Zhang, Y. (2017). Luteolin Promotes Cell Apoptosis by Inducing Autophagy in Hepatocellular Carcinoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(5), 1803–1812. <https://doi.org/10.1159/000484066>
- Cauda, V., Schlossbauer, A., & Bein, T. (2010). Bio-degradation study of colloidal mesoporous silica nanoparticles: Effect of surface functionalization with organo-silanes and poly(ethylene glycol). *Microporous and Mesoporous Materials*, 132(1–2), 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2009.11.015>
- Chang, D., Lim, M., Goos, J. A. C. M., Qiao, R., Ng, Y. Y., Mansfeld, F. M., Jackson, M., Davis, T. P., & Kavallaris, M. (2018). Biologically Targeted Magnetic Hyperthermia: Potential and Limitations. *Frontiers in Pharmacology*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00831>
- Chicheł, A., Skowronek, J., Kubaszewska, M., & Kanikowski, M. (2007). Hyperthermia – description of a method and a review of clinical applications. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, 12(5), 267–275. [https://doi.org/10.1016/S1507-1367\(10\)60065-X](https://doi.org/10.1016/S1507-1367(10)60065-X)
- Choi, J. H., Lee, M. H., Cho, Y. J., Park, B. S., Kim, S., & Kim, G. C. (2011). The bacterial protein AAzurin enhances sensitivity of oral squamous carcinoma cells to anticancer drugs. *Yonsei Medical Journal*, 52(5), 773–778. <https://doi.org/10.3349/ymj.2011.52.5.773>
- Chouhan, R. S., Horvat, M., Ahmed, J., Alhokbany, N., Alshehri, S. M., & Gandhi, S. (2021). Magnetic Nanoparticles—A Multifunctional Potential Agent for Diagnosis and Therapy. *Cancers*, 13(9), 2213. <https://doi.org/10.3390/cancers13092213>
- Clark, A. J., Wiley, D. T., Zuckerman, J. E., Webster, P., Chao, J., Lin, J., Yen, Y., & Davis, M. E. (2016). CRLX101 nanoparticles localize in human tumors and not in adjacent, nonneoplastic tissue after intravenous dosing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(14), 3850–3854. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603018113>
- Clima, L., Ursu, E. L., Cojocaru, C., Rotaru, A., Barboiu, M., & Pinteala, M. (2015). Experimental design, modeling and optimization of polyplex formation between DNA oligonucleotides and branched polyethylenimine. *Org. Biomol. Chem.*, 13(36), 9445–9456. <https://doi.org/10.1039/C5OB01189B>

- Correia, A. S., Gärtner, F., & Vale, N. (2021). Drug combination and repurposing for cancer therapy: the example of breast cancer. *Heliyon*, 7(1), e05948. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05948>
- Cross, D., & Burmester, J. K. (2006). Gene Therapy for Cancer Treatment: Past, Present and Future. *Clinical Medicine & Research*, 4(3), 218–227. <https://doi.org/10.3121/cmr.4.3.218>
- Danthanarayana, A. N., Manatunga, D. C., De Silva, R. M. N., Chandrasekharan, N. V., & De Silva, K. M. N. (2018). Magnetofection and isolation of DNA using polyethyleneimine functionalized magnetic iron oxide nanoparticles. *Royal Society Open Science*, 5(12). <https://doi.org/10.1098/rsos.181369>
- Dao, K.-L., & Hanson, R. N. (2012). Targeting the Estrogen Receptor using Steroid–Therapeutic Drug Conjugates (Hybrids). *Bioconjugate Chemistry*, 23(11), 2139–2158. <https://doi.org/10.1021/bc300378e>
- Darvishi, V., Navidbakhsh, M., & Amanpour, S. (2021). Heat and mass transfer in the hyperthermia cancer treatment by magnetic nanoparticles. *Heat and Mass Transfer/Waerme- Und Stoffuebertragung*. <https://doi.org/10.1007/s00231-021-03161-3>
- del Pozo-Rodríguez, A., Solinís, M. A., Gascón, A. R., & Pedraz, J. L. (2009). Short- and long-term stability study of lyophilized solid lipid nanoparticles for gene therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.015>
- DeNardo, G. L., & DeNardo, S. J. (2008). Turning the heat on cancer. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 23(6), 671–679. <https://doi.org/10.1089/cbr.2008.0591>
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
- Dobson, J. (2006). Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Drug Development Research*, 67(1), 55–60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ddr.20067>
- E., D. C., A., H. K., Keith, J. J., B., K. D., Keiya, O., & Michel, S. (2018). Gene therapy comes of age. *Science*, 359(6372), ean4672. <https://doi.org/10.1126/science.aan4672>
- Ebru Kaymak. (2008). *Arabidopsis Thaliana* lipases: Cloning and expression in *Pichia pastoris*. Sabancı University, Istanbul.
- El-Aneed, A. (2004). An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release*, 94(1), 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.09.013>
- Elengoe, A., Mohammed Alitheen, N. J. B., & Hamdan, S. (2019). HYPERTHERMIA EFFECT ON HUMAN NORMAL BREAST (MCF-10A) AND CANCER (MDA-MB 231 AND MCF-7) CELLS. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 12(3), 512–515. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2019.v12i3.30956>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Fatima, H., Charinpanitkul, T., & Kim, K.-S. (2021). Fundamentals to Apply Magnetic Nanoparticles for Hyperthermia Therapy. *Nanomaterials*, 11(5), 1203. <https://doi.org/10.3390/nano11051203>

- Fialho, A. M., & Chakrabarty, A. M. (2012). Patent controversies and court cases. *Cancer Biology & Therapy*, 13(13), 1229–1234. <https://doi.org/10.4161/cbt.21958>
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, 73(4), 1907–1916. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>
- Foote, F. W., & Stewart, F. W. (1946). A histologic classification of carcinoma of the breast. *Surgery*, 19(1), 74–99. <http://ci.nii.ac.jp/naid/10027404528/en/>
- Forbes, N. S. (2010). Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 10(11), 785–794. <https://doi.org/10.1038/nrc2934>
- Freis, B., Cotin, G., Pertion, F., Mertz, D., Boutry, S., Laurent, S., & Begin-Colin, S. (2021). The Size, Shape, and Composition Design of Iron Oxide Nanoparticles to Combine, MRI, Magnetic Hyperthermia, and Photothermia. In *Magnetic Nanoparticles in Human Health and Medicine* (pp. 380–429). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119754725.ch17>
- Gao, M., Zhou, J., Su, Z., & Huang, Y. (2017). Bacterial cupredoxin azurin hijacks cellular signaling networks: Protein-protein interactions and cancer therapy. *Protein Science*, 26(12), 2334–2341. <https://doi.org/10.1002/pro.3310>
- Globocan. (2020). *Age standardized (World) incidence rates, breast, all ages*. International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>
- Golovin, Y. I., Gribanovsky, S. L., Golovin, D. Y., Klyachko, N. L., Majouga, A. G., Master, A. M., Sokolsky, M., & Kabanov, A. V. (2015). Towards nanomedicines of the future: Remote magneto-mechanical actuation of nanomedicines by alternating magnetic fields. *Journal of Controlled Release*, 219, 43–60. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.038>
- Gong, B., Chen, Q., Endlich, B., Mazumder, S., & Almasan, A. (1999). Ionizing radiation-induced, bax-mediated cell death is dependent on activation of cysteine and serine proteases. *Cell Growth and Differentiation*.
- Goto, M., Yamada, T., Kimbara, K., Horner, J., Newcomb, M., Gupta, T. K. Das, & Chakrabarty, A. M. (2003). Induction of apoptosis in macrophages by *Pseudomonas aeruginosa* azurin: tumour-suppressor protein p53 and reactive oxygen species, but not redox activity, as critical elements in cytotoxicity. *Molecular Microbiology*, 47(2), 549–559. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03317.x>
- Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12), a006080. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>
- Guilford, J. M., & Pezzuto, J. M. (2008). Natural products as inhibitors of carcinogenesis. In *Expert Opinion on Investigational Drugs* (Vol. 17, Issue 9, pp. 1341–1352). <https://doi.org/10.1517/13543784.17.9.1341>
- Hao, R., Xing, R., Xu, Z., Hou, Y., Gao, S., & Sun, S. (2010). Synthesis, Functionalization, and Biomedical Applications of Multifunctional Magnetic Nanoparticles. *Advanced Materials*, 22(25), 2729–2742. <https://doi.org/10.1002/adma.201000260>
- Harmon, B. V., Takano, Y. S., Winterford, C. M., & Gobé, G. C. (1991). The role of apoptosis in the response of cells and tumours to mild hyperthermia. *International Journal of Radiation Biology*. <https://doi.org/10.1080/09553009114550441>
- Harvey, A. (1998). From demons to darlings: Drugs from venoms. *Drug Discovery Today*, 3(12), 531–532. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(98\)01269-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(98)01269-0)

- Harvey, Alan. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. In *Drug Discovery Today* (Vol. 5, Issue 7, pp. 294–300). [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(00\)01511-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(00)01511-7)
- Hayashi, K., Nakamura, M., Miki, H., Ozaki, S., Abe, M., Matsumoto, T., Sakamoto, W., Yogo, T., & Ishimura, K. (2014). Magnetically responsive smart nanoparticles for cancer treatment with a combination of magnetic hyperthermia and remote-control drug release. *Theranostics*, 4(8), 834–844. <https://doi.org/10.7150/thno.9199>
- He, Q., & Shi, J. (2011). Mesoporous Silica Nanoparticle Based Nano Drug Delivery Systems: Synthesis, Controlled Drug Release and Delivery. *Materials Chemistry*, 21, 5845–5855. <https://doi.org/10.1039/C0JM03851B>
- Hideaki Shiraishi. (2000). *Transformation of E. coli (calcium chloride method)*. Labrotory of Gene Biodynamics, Graduate School of Biostudies, Kyoto University.
- Hoang, M. D., Lee, H. J., Lee, H. J., Jung, S. H., Choi, N. R., Vo, M. C., Nguyen-Pham, T. N., Kim, H. J., Park, I. K., & Lee, J. J. (2015). Branched Polyethylenimine-Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (bPEI-SPIONs) Improve the Immunogenicity of Tumor Antigens and Enhance Th1 Polarization of Dendritic Cells. *Journal of Immunology Research*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/706379>
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), 7276–7280. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7276>
- Hortobagyi, G. N., Ueno, N. T., Xia, W., Zhang, S., Wolf, J. K., Putnam, J. B., Weiden, P. L., Willey, J. S., Carey, M., Branham, D. L., Payne, J. Y., Tucker, S. D., Bartholomeusz, C., Kilbourn, R. G., De Jager, R. L., Sneige, N., Katz, R. L., Anklesaria, P., Ibrahim, N. K., ... Hung, M.-C. (2001). Cationic Liposome-Mediated E1A Gene Transfer to Human Breast and Ovarian Cancer Cells and Its Biologic Effects: A Phase I Clinical Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 19(14), 3422–3433. <https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.14.3422>
- Huang, G., Chen, H., Dong, Y., Luo, X., Yu, H., Moore, Z., Bey, E. A., Boothman, D. A., & Gao, J. (2013). Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Amplifying ROS Stress to Improve Anticancer Drug Efficacy. *Theranostics*, 3(2), 116–126. <https://doi.org/10.7150/thno.5411>
- Huth, S., Lausier, J., Gersting, S. W., Rudolph, C., Plank, C., Welsch, U., & Rosenecker, J. (2004). Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *Journal of Gene Medicine*, 6(8), 923–936. <https://doi.org/10.1002/jgm.577>
- Iyer, A. K., Singh, A., Ganta, S., & Amiji, M. M. (2013). Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13–14), 1784–1802. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.012>
- Izzedine, H., Ederhy, S., Goldwasser, F., Soria, J. C., Milano, G., Cohen, A., Khayat, D., & Spano, J. P. (2009). Management of hypertension in angiogenesis inhibitor-treated patients. *Annals of Oncology*, 20(5), 807–815. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/annonc/mdn713>
- Joseph, M., Trinh, H. M., & Mitra, A. K. (2017). Peptide and Protein-Based Therapeutic Agents. In *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-42978-8.00007-3>

- Kalakenger, S. (2021). *Manyetofeksiyon yöntemiyle transfer edilen azurinin MCF-10A hücrelerinde heterolog ekspresyonu*. 2021.
- Kandemir, B. B. (2013). *Polyethylenimine-starch nanoparticles for cancer gene therapy*. September.
- Karpiński, T. M., & Szkaradkiewicz, A. K. (2013). Anticancer peptides from bacteria. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 8(3), 343–348. <https://doi.org/10.3329/bjp.v8i3.15704>
- Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., & Hou, H. (2016). Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International Journal of Genomics*, 2016, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/2405954>
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173–3178. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
- Kılınç, E. (2016). γ -Fe₂O₃ magnetic nanoparticle functionalized with carboxylated multi walled carbon nanotube: Synthesis, characterization, analytical and biomedical application. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 401, 949–955. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2015.11.003>
- Knutsen, T. (1998). Cytogenetic Changes in the Progression of Lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, 31(1–2), 1–20. <https://doi.org/10.3109/10428199809057581>
- Kobayashi, T. (2011). Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles. *Biotechnology Journal*, 6(11), 1342–1347. <https://doi.org/10.1002/biot.201100045>
- Kossatz, S., Ludwig, R., Dähring, H., Ettelt, V., Rimkus, G., Marciello, M., Salas, G., Patel, V., Teran, F. J., & Hilger, I. (2014). High therapeutic efficiency of magnetic hyperthermia in xenograft models achieved with moderate temperature dosages in the tumor area. *Pharmaceutical Research*, 31(12), 3274–3288. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1417-0>
- Krawczyk, P. M., Eppink, B., Essers, J., Stap, J., Rodermond, H., Odijk, H., Zelensky, A., Van Bree, C., Stalpers, L. J., Buist, M. R., Soullié, T., Rens, J., Verhagen, H. J. M., O'Connor, M. J., Frankene, N. A. P., Ten Hagen, T. L. M., Kanaar, R., & Aten, J. A. (2011). Mild hyperthermia inhibits homologous recombination, induces BRCA2 degradation, and sensitizes cancer cells to poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101053108>
- Kroesen, M., Mulder, H. T., van Holthe, J. M. L., Aangeenbrug, A. A., Mens, J. W. M., van Doorn, H. C., Paulides, M. M., Oomen-de Hoop, E., Vernhout, R. M., Lutgens, L. C., van Rhoon, G. C., & Franckena, M. (2019). Confirmation of thermal dose as a predictor of local control in cervical carcinoma patients treated with state-of-the-art radiation therapy and hyperthermia. *Radiotherapy and Oncology*, 140, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2019.06.021>
- Kruiswijk, F., Labuschagne, C. F., & Vousden, K. H. (2015). p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(7), 393–405. <https://doi.org/10.1038/nrm4007>
- Kumar, S., Diwan, A., Singh, P., Gulati, S., Choudhary, D., Mongia, A., Shukla, S., & Gupta, A. (2019). Functionalized gold nanostructures: promising gene delivery vehicles in cancer treatment. *RSC Advances*, 9(41), 23894–23907. <https://doi.org/10.1039/C9RA03608C>

- Lee, M. K., Chun, S. K., Choi, W. J., Kim, J. K., Choi, S. H., Kim, A., Oungbho, K., Park, J. S., Ahn, W. S., & Kim, C. K. (2005). The use of chitosan as a condensing agent to enhance emulsion-mediated gene transfer. *Biomaterials*. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.008>
- Liang, H., Zhan, H. J., Wang, B. G., Pan, Y., & Hao, X. S. (2007). Change in expression of apoptosis genes after hyperthermia, chemotherapy and radiotherapy in human colon cancer transplanted into nude mice. *World Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i32.4365>
- Liberman, A., Mendez, N., Trogler, W. C., & Kummel, A. C. (2014). Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine. *Surface Science Reports*, 69(2–3), 132–158. <https://doi.org/10.1016/j.surfrep.2014.07.001>
- Liu, F., & Huang, L. (2002). Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 78(1), 259–266. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00494-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00494-1)
- LIU, J., LI, N., LI, L., LI, D., LIU, K., ZHAO, L., TANG, J., & LI, L. (2013). Local hyperthermia for esophageal cancer in a rabbit tumor model: Magnetic stent hyperthermia versus magnetic fluid hyperthermia. *Oncology Letters*, 6(6), 1550–1558. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1618>
- Liu, X., Zhang, Y., Wang, Y., Zhu, W., Li, G., Ma, X., Zhang, Y., Chen, S., Tiwari, S., Shi, K., Zhang, S., Fan, H. M., Zhao, Y. X., & Liang, X.-J. (2020a). Comprehensive understanding of magnetic hyperthermia for improving antitumor therapeutic efficacy. *Theranostics*, 10(8), 3793–3815. <https://doi.org/10.7150/thno.40805>
- Liu, X., Zhang, Y., Wang, Y., Zhu, W., Li, G., Ma, X., Zhang, Y., Chen, S., Tiwari, S., Shi, K., Zhang, S., Fan, H. M., Zhao, Y. X., & Liang, X.-J. (2020b). Comprehensive understanding of magnetic hyperthermia for improving antitumor therapeutic efficacy. *Theranostics*, 10(8), 3793–3815. <https://doi.org/10.7150/thno.40805>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Luo, D., & Saltzman, W. M. (2000). Synthetic DNA delivery systems. *Nature Biotechnology*, 18(1), 33–37. <https://doi.org/10.1038/71889>
- M. H. Falk, R. D. I. (2001). Hyperthermia in oncology. *International Journal of Hyperthermia*, 17(1), 1–18. <https://doi.org/10.1080/02656730118511>
- Mehta, R. G., Murillo, G., Naithani, R., & Peng, X. (2010). Cancer chemoprevention by natural products: How far have we come? In *Pharmaceutical Research* (Vol. 27, Issue 6, pp. 950–961). <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0085-y>
- Mehta, R. G., & Pezzuto, J. M. (2002). Discovery of cancer preventive agents from natural products: from plants to prevention. In *Current oncology reports* (Vol. 4, Issue 6, pp. 478–486). <https://doi.org/10.1007/s11912-002-0059-2>
- Morris, T., Robertson, B., & Gallagher, M. (1996). Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(12), 2933–2936. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.12.2933-2936.1996>
- Mulligan, R. C. (1993). The basic science of gene therapy. *Science*, 260(5110), 926–932. <https://doi.org/10.1126/science.8493530>

- Mykhaylyk, O., Antequera, Y. S., Vlaskou, D., & Plank, C. (2007). Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro. *Nature Protocols*, 2(10), 2391–2411. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.352>
- National Cancer Institution. (2019). *Financial Burden of Cancer Care | Cancer Trends Progress Report*.
- Naylor, L. H. (1999). Reporter gene technology: The future looks bright. In *Biochemical Pharmacology*. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00096-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00096-9)
- NCI. (2022). *Targeted Therapy for Cancer*. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies>
- Nofech-Mozes, S., Trudeau, M., Kahn, H. K., Dent, R., Rawlinson, E., Sun, P., Narod, S. A., & Hanna, W. M. (2009). Patterns of recurrence in the basal and non-basal subtypes of triple-negative breast cancers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 118(1), 131–137. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0295-8>
- Ota, S., Yamazaki, N., Tomitaka, A., Yamada, T., & Takemura, Y. (2014). Hyperthermia Using Antibody-Conjugated Magnetic Nanoparticles and Its Enhanced Effect with Cryptotanshinone. *Nanomaterials*, 4, 319–330. <https://doi.org/10.3390/nano4020319>
- Otte, J. (1988). Hyperthermia in cancer therapy. *European Journal of Pediatrics*, 147(6), 560–569. <https://doi.org/10.1007/BF00442463>
- Overton, T. W. (2014). Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today*, 19(5), 590–601. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.008>
- Park, M., & Kim, H. (2017). Anti-cancer Mechanism of Docosahexaenoic Acid in Pancreatic Carcinogenesis: A Mini-review. *Journal of Cancer Prevention*, 22(1), 1–5. <https://doi.org/10.15430/JCP.2017.22.1.1>
- Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer*, 118(12), 3030–3044. <https://doi.org/10.1002/ijc.21731>
- Patil, S. D., Rhodes, D. G., & Burgess, D. J. (2005). DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: A comprehensive review. In *AAPS Journal* (Vol. 7, Issue 1). <https://doi.org/10.1208/aapsj070109>
- Peiravi, M., Eslami, H., Ansari, M., & Zare-Zardini, H. (2022). Magnetic hyperthermia: Potentials and limitations. In *Journal of the Indian Chemical Society*. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2021.100269>
- Pon-On, W., Tithito, T., Maneeprakorn, W., Phenrat, T., & Tang, I.-M. (2019). Investigation of magnetic silica with thermoresponsive chitosan coating for drug controlled release and magnetic hyperthermia application. *Materials Science and Engineering: C*, 97, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.076>
- Pozdnyakova, I., Guidry, J., & Wittung-Stafshede, P. (2001). Copper Stabilizes Azurin by Decreasing the Unfolding Rate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 390(1), 146–148. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2369>
- Pozdnyakova, I., & Wittung-Stafshede, P. (2001). Copper Binding before Polypeptide Folding Speeds Up Formation of Active (Holo) *Pseudomonas aeruginosa* Azurin. *Biochemistry*, 40(45), 13728–13733. <https://doi.org/10.1021/bi011591o>
- Pucci, C., Degl’Innocenti, A., Belenli Gümüş, M., & Ciofani, G. (2022). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia: recent advancements, molecular effects, and future directions in the omics era. *Biomaterials Science*. <https://doi.org/10.1039/d1bm01963e>

- Punj, V., Bhattacharyya, S., Saint-Dic, D., Vasu, C., Cunningham, E. A., Graves, J., Yamada, T., Constantinou, A. I., Christov, K., White, B., Li, G., Majumdar, D., Chakrabarty, A. M., & Das Gupta, T. K. (2004). Bacterial cupredoxin azurin as an inducer of apoptosis and regression in human breast cancer. *Oncogene*, 23(13), 2367–2378. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207376>
- Rahman, G. (2011). Breast conserving therapy: A surgical technique where little can mean more. *Journal of Surgical Technique and Case Report*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.4103/2006-8808.78459>
- Ramamoorthi, M. (2015). Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*, 9(1), GE01-GE6. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/10443.5394>
- Ramsey, J. D., Vu, H. N., & Pack, D. W. (2010). A top-down approach for construction of hybrid polymer-virus gene delivery vectors. *Journal of Controlled Release*, 144(1), 39–45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.031>
- Rauf, A., Uddin, G., Khan, H., Raza, M., Zafar, M., & Tokuda, H. (2016). Anti-tumour-promoting and thermal-induced protein denaturation inhibitory activities of β -sitosterol and lupeol isolated from *Diospyros lotus* L. *Natural Product Research*, 30(10), 1205–1207. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1046381>
- Recillas-Targa, F. (2006). Multiple Strategies for Gene Transfer, Expression, Knockdown, and Chromatin Influence in Mammalian Cell Lines and Transgenic Animals. *Molecular Biotechnology*, 34(3), 337–354. <https://doi.org/10.1385/MB:34:3:337>
- Renahan, A. G., Booth, C., & Potten, C. S. (2001). What is apoptosis, and why is it important? Education and debate. *BMJ*, 322(7301), 1536 LP – 1538. <https://doi.org/10.1136/bmj.322.7301.1536>
- Robbins, P. D., & Ghivizzani, S. C. (1998). Viral vectors for gene therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 80(1), 35–47.
- Roh, K. H., Choi, S. B., Kwak, B.-K., Seo, S.-C., & Lee, S.-B. (2014). A single cupredoxin azurin production in transplastomic tobacco. *Plant Biotechnology Reports*, 8(6), 421–429. <https://doi.org/10.1007/s11816-014-0333-4>
- Rubia-Rodríguez, I., Santana-Otero, A., Spassov, S., Tombácz, E., Johansson, C., De La Presa, P., Teran, F. J., Morales, M. del P., Veintemillas-Verdaguer, S., Thanh, N. T. K., Besenhard, M. O., Wilhelm, C., Gazeau, F., Harmer, Q., Mayes, E., Manshian, B. B., Soenen, S. J., Gu, Y., Millán, Á., ... Ortega, D. (2021). Whither Magnetic Hyperthermia? A Tentative Roadmap. *Materials*, 14(4), 706. <https://doi.org/10.3390/ma14040706>
- Salunkhe, A. B., Khot, V. M., & Pawar, S. H. (2014). Magnetic Hyperthermia with Magnetic Nanoparticles: A Status Review. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(5), 572–594. <https://doi.org/10.2174/1568026614666140118203550>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning - Sambrook & Russel. In *Human Mutation*. <https://doi.org/10.1002/humu.1186.abs>
- Santha Moorthy, M., Subramanian, B., Panchanathan, M., Mondal, S., Kim, H., Lee, K. D., & Oh, J. (2017). Fucoidan-coated core-shell magnetic mesoporous silica nanoparticles for chemotherapy and magnetic hyperthermia-based thermal therapy applications. *New Journal of Chemistry*, 41(24), 15334–15346. <https://doi.org/10.1039/c7nj03211k>

- Scherer, F., Anton, M., Schillinger, U., Henke, J., Bergemann, C., Krüger, A., Gänsbacher, B., & Plank, C. (2002). Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Therapy*, 9(2), 102–109. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301624>
- Schillinger, U., Brill, T., Rudolph, C., Huth, S., Kro, F., Hirschberger, J., Bergemann, C., & Plank, C. (2005). Advances in magnetofection — magnetically guided nucleic acid delivery. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293, 501–508. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.01.032>
- Sellins, K. S., & Cohen, J. J. (1991). Hyperthermia induces apoptosis in thymocytes. *Radiation Research*. <https://doi.org/10.2307/3578175>
- Seto, M., Honma, K., & Nakagawa, M. (2010). Diversity of genome profiles in malignant lymphoma. *Cancer Science*, 101(3), 573–578. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01452.x>
- Sharma, G. and. (2021). Therapeutic response differences between 2D and 3D tumor models of magnetic hyperthermia. *Nanoscale Advances*. <https://doi.org/10.1039/D1NA00224D>
- Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R. P., & Canaani, E. (1985). Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*, 315(6020), 550–554. <https://doi.org/10.1038/315550a0>
- Silva, A., Lopes, C., Sousa Lobo, J., & Amaral, M. (2015). Nucleic Acids Delivery Systems: A Challenge for Pharmaceutical Technologists. *Current Drug Metabolism*, 16(1), 3–16. <https://doi.org/10.2174/1389200216666150401110211>
- Smolders, S., Kessels, S., Smolders, S. M. T., Poulhes, F., Zelphati, O., Sapet, C., & Brône, B. (2018). Magnetofection is superior to other chemical transfection methods in a microglial cell line. *Journal of Neuroscience Methods*, 293, 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.09.017>
- Solak, K., Mavi, A., & Yılmaz, B. (2021). Disulfiram-loaded functionalized magnetic nanoparticles combined with copper and sodium nitroprusside in breast cancer cells. *Materials Science and Engineering: C*, 119, 111452. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111452>
- Steeves, R. A. (1992). Hyperthermia in cancer therapy: Where are we today and where are we going? In *Bulletin of the New York Academy of Medicine: Journal of Urban Health* (Vol. 68, Issue 2, pp. 341–350).
- Steitz, B., Hofmann, H., Kamau, S. W., Hassa, P. O., Hottiger, M. O., von Rechenberg, B., Hofmann-Antenbrink, M., & Petri-Fink, A. (2007). Characterization of PEI-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for transfection: Size distribution, colloidal properties and DNA interaction. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311(1 SPEC. ISS.), 300–305. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.10.1194>
- Stockwell, B. R., Friedmann Angeli, J. P., Bayir, H., Bush, A. I., Conrad, M., Dixon, S. J., Fulda, S., Gascón, S., Hatzios, S. K., Kagan, V. E., Noel, K., Jiang, X., Linkermann, A., Murphy, M. E., Overholtzer, M., Oyagi, A., Pagnussat, G. C., Park, J., Ran, Q., ... Zhang, D. D. (2017). Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. In *Cell* (Vol. 171, Issue 2, pp. 273–285). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.021>
- Sun, S. N., Wei, C., Zhu, Z. Z., Hou, Y. L., Venkatraman, S. S., & Xu, Z. C. (2014). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications. In *Chinese Physics B* (Vol. 23, Issue 3). <https://doi.org/10.1088/1674-1056/23/3/037503>

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tao, Y., Ju, E., Ren, J., & Qu, X. (2014). Immunostimulatory oligonucleotides-loaded cationic graphene oxide with photothermally enhanced immunogenicity for photothermal/immune cancer therapy. *Biomaterials*, 35(37), 9963–9971. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.08.036>
- Tazawa, H., Kagawa, S., & Fujiwara, T. (2013). Advances in adenovirus-mediated p53 cancer gene therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 13(11), 1569–1583. <https://doi.org/10.1517/14712598.2013.845662>
- Toucheffeu, Y., Harrington, K. J., Galmiche, J. P., & Vassaux, G. (2010). Review article: gene therapy, recent developments and future prospects in gastrointestinal oncology. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 32(8), 953–968. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04424.x>
- Vighi, E., Montanari, M., Ruozi, B., Tosi, G., Magli, A., & Leo, E. (2010). Nuclear localization of cationic solid lipid nanoparticles containing Protamine as transfection promoter. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.07.012>
- Wang, H., Li, X., Xi, X., Hu, B., Zhao, L., Liao, Y., & Tang, J. (2011). Effects of magnetic induction hyperthermia and radiotherapy alone or combined on a murine 4T1 metastatic breast cancer model. *International Journal of Hyperthermia*. <https://doi.org/10.3109/02656736.2011.583618>
- Wang, X., Zhou, L., & Gu, H. (2009). *Charged Magnetic Nanoparticles for Enhancing Gene Transfection*. 8(2), 142–147.
- Wang, Y., Gao, S., Ye, W.-H., Yoon, H. S., & Yang, Y.-Y. (2006). Co-delivery of drugs and DNA from cationic core-shell nanoparticles self-assembled from a biodegradable copolymer. *Nature Materials*, 5(10), 791–796. <https://doi.org/10.1038/nmat1737>
- Wang, Z., Tan, J., McConville, C., Kannappan, V., Tawari, P. E., Brown, J., Ding, J., Armesilla, A. L., Irache, J. M., Mei, Q.-B., Tan, Y., Liu, Y., Jiang, W., Bian, X., & Wang, W. (2016). Poly lactic-co-glycolic acid controlled delivery of disulfiram to target liver cancer stem-like cells. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.08.001>
- Wu, W., He, Q., & Jiang, C. (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Research Letters*, 3(11), 397. <https://doi.org/10.1007/s11671-008-9174-9>
- Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., Felix, R., & Schlag, P. (2002). Hyperthermia in combined treatment of cancer. In *Lancet Oncology* (Vol. 3, Issue 8, pp. 487–497). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(02\)00818-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(02)00818-5)
- Xia, T., Kovichich, M., Liong, M., Meng, H., Kabehie, S., George, S., Zink, J. I., & Nel, A. E. (2009). Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs. *ACS Nano*, 3(10), 3273–3286. <https://doi.org/10.1021/nn900918w>
- Yagati, A., Lee, T., & Choi, J.-W. (2017). Azurin/CdSe-ZnS-Based Bio-Nano Hybrid Structure for Nanoscale Resistive Memory Device. *Materials*, 10(7), 803. <https://doi.org/10.3390/ma10070803>

- Yaghoubi, A., Khazaei, M., Avan, A., Hasanian, S. M., Cho, W. C., & Soleimanpour, S. (2020). p28 Bacterial Peptide, as an Anticancer Agent. *Frontiers in Oncology*, 10(August), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01303>
- Yamada, T., Goto, M., Punj, V., Zaborina, O., Chen, M. L., Kimbara, K., Majumdar, D., Cunningham, E., Das Gupta, T. K., & Chakrabarty, A. M. (2002a). Bacterial redox protein azurin, tumor suppressor protein p53, and regression of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), 14098–14103. <https://doi.org/10.1073/pnas.222539699>
- Yamada, T., Goto, M., Punj, V., Zaborina, O., Chen, M. L., Kimbara, K., Majumdar, D., Cunningham, E., Das Gupta, T. K., & Chakrabarty, A. M. (2002b). Bacterial redox protein azurin, tumor suppressor protein p53, and regression of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), 14098–14103. <https://doi.org/10.1073/pnas.222539699>
- Yamada, T., Goto, M., Punj, V., Zaborina, O., Kimbara, K., Das Gupta, T. K., & Chakrabarty, A. M. (2002). The bacterial redox protein azurin induces apoptosis in J774 macrophages through complex formation and stabilization of the tumor suppressor protein p53. *Infection and Immunity*, 70(12), 7054–7062. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.7054-7062.2002>
- Yamada, T., Hiraoka, Y., Ikehata, M., Kimbara, K., Avner, B. S., Das Gupta, T. K., & Chakrabarty, A. M. (2004). Apoptosis or growth arrest: Modulation of tumor suppressor p53's specificity by bacterial redox protein azurin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(14), 4770–4775. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400899101>
- Yang, H., Li, Y., Li, T., Xu, M., Chen, Y., Wu, C., Dang, X., & Liu, Y. (2015). Multifunctional Core/Shell Nanoparticles Cross-linked Polyetherimide-folic Acid as Efficient Notch-1 siRNA Carrier for Targeted Killing of Breast Cancer. *Scientific Reports*, 4(1), 7072. <https://doi.org/10.1038/srep07072>
- Yi, D. K., Lee, S. S., Papaefthymiou, G. C., & Ying, J. Y. (2006). Nanoparticle architectures templated by SiO₂/Fe₂O₃ nanocomposites. *Chemistry of Materials*, 18(3), 614–619. <https://doi.org/10.1021/cm0512979>
- Yin, P. T., Shah, S., Pasquale, N. J., Garbuzenko, O. B., Minko, T., & Lee, K. B. (2016). Stem cell-based gene therapy activated using magnetic hyperthermia to enhance the treatment of cancer. *Biomaterials*, 81, 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.023>
- Zhang, C., Wang, Q.-T., Liu, H., Zhang, Z.-Z., & Huang, W.-L. (2011). Advancement and prospects of tumor gene therapy. *Chinese Journal of Cancer*, 30(3), 182–188. <https://doi.org/10.5732/cjc.010.10074>
- Zhang, Y., Gostissa, M., Hildebrand, D. G., Becker, M. S., Boboila, C., Chiarle, R., Lewis, S., & Alt, F. W. (2010). The Role of Mechanistic Factors in Promoting Chromosomal Translocations Found in Lymphoid and Other Cancers. In *Advances in immunology* (Vol. 106, pp. 93–133). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(10\)06004-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(10)06004-9)
- Zhao, J., Wang, S. Z., Tang, X. F., Liu, N., Zhao, D., & Mao, Z. Y. (2011). Analysis of thermochemotherapy-induced apoptosis and the protein expressions of Bcl-2 and Bax in maxillofacial squamous cell carcinomas. *Medical Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s12032-010-9736-4>
- Zhao, X., Meng, Z., Wang, Y., Chen, W., Sun, C., Cui, B., Cui, J., Yu, M., Zeng, Z., Guo, S., Luo, D., Cheng, J. Q., Zhang, R., & Cui, H. (2017). Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers. *Nature Plants*, 3(12), 956–964. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0063-z>

- Zhao, Y., Huang, Z., & Peng, H. (2021). Molecular Mechanisms of Ferroptosis and Its Roles in Hematologic Malignancies. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.743006>
- Zhou, J., Wang, X., Du, L., Zhao, L., Lei, F., Ouyang, W., Zhang, Y., Liao, Y., & Tang, J. (2011). Effect of hyperthermia on the apoptosis and proliferation of CaSki cells. *Molecular Medicine Reports*, 4(1), 187–191. <https://doi.org/10.3892/mmr.2010.401>
- Zhu, X. M., Wang, Y. X. J., Leung, K. C. F., Lee, S. F., Zhao, F., Wang, D. W., Lai, J. M. Y., Wan, C., Cheng, C. H. K., & Ahuja, A. T. (2012). Enhanced cellular uptake of aminosilane-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in mammalian cell lines. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 953–964. <https://doi.org/10.2147/IJN.S28316>



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Fatma TURHAN
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Nenehatun Anadolu Kız Lisesi (2014)
Lisans:	Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi (2019)
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bil. Ens., Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı (2022)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta
Bildiriler	
- F. Turhan, K. Solak, S. Kalakenger, Y. Ünver & A. Mavi, Hücre İçermeyen Ortamda DNA'nın Nanoparçacıklara Yüklenmesi ve Elüsyonu, IGSCONG'21 Uluslararası Lisansüstü Çalışmalar Kongresi, 2021, Online/Türkiye (Özet) - F. Turhan, M. Acar, K. Solak, S. Yıldız, Y. Ünver, A. Mavi, Investigation of the Effect of Magnetic Hyperthermia Application on Cancer and Healthy Cells, 2nd International Conference on Applied Engineering and Natural Sciences, 2022, Online/Türkiye (Tam Metin) - M. Acar, K. Solak, F. Turhan, S. Yıldız, A. Mavi, Y. Ünver, Magnetic Hyperthermia and Gene Therapy for Breast Cancer Treatment, 16th Nanoscience & Nanotechnology Conference, 2022, Ankara / Türkiye, (Özet)	
Projeler	
-Sağlıklı Hücreler ve Kanser Hücreleri Üzerine Manyetik Hipertermi Uygulamasının Etkilerinin Araştırılması, Atatürk Üniversitesi, BAP, Araştırmacı, 2021-2022 -118Z150, Meme Kanseri Tedavisinde Yeni Bir Yaklaşım: Manyetik Hipertermi ve Gen Terapisi, 1001 Araştırma Projesi, Bursiyer, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 02.10.2020-15.04.2022,	