AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

3. JENERASYON HIV TABANLI LENTİVİRAL VEKTÖRLERİN *IN VIVO* UYGULAMALAR İÇİN ÜRETİMİ VE PÜRİFİKASYON YÖNTEMLERİNİN OPTİMİZASYONU

Hazal Banu OLGUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2017 - ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

3. JENERASYON HIV TABANLI LENTİVİRAL VEKTÖRLERİN *IN VIVO* UYGULAMALAR İÇİN ÜRETİMİ VE PÜRİFİKASYON YÖNTEMLERİNİN OPTİMİZASYONU

Hazal Banu OLGUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (Proje No: TYL-2015-1027) ve TÜBİTAK (Proje No: 112S114) tarafından desteklenmiştir.

"Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir"

2017 – ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Programında, yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. **22/06/2017**

İmza

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Salih ŞANLIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Fahri UÇAR
Akdeniz Üniversitesi,

Üye : Yrd. Doç. Dr. Aslı Giray KURT
Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi

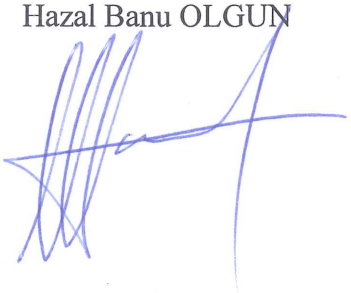
Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir

Prof.Dr. Narin DERİN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Hazal Banu OLGUN



Tez Danışmanı

Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU



TEŞEKKÜR

Öncelikle; lisans eğitimim boyunca, titizlikle ve kararlılıkla yolumu aydınlatan, harcanan tek bir saniyenin bile vazgeçilmeyecek kadar önemi olduğunu, öğrenmenin sınırsız, kaliteli öğrenimin ise eşsiz olduğunu idrak etmemi sağlayan Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü'nde geleceğin çağdaş, idealist ve umut dolu mühendislerini yetiştirmeye devam eden tüm hocalarıma, kariyerimin temellerini en sağlam şekilde atmama öncü oldukları için binlerce kere teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince, bana inanıp dahası için teşvik eden, fikir ve görüşlerime değer verip, bilimsel bakış açısı ile harmanlamama yardımcı olan ayrıca esprili tavırları ile karşılaştığım tüm zorlukları minimal düzeye indirgeyerek yolumdan vazgeçmememi öğreten sayın hocam Prof. Dr. Salih Şanlıoğlu'na, ülkemiz için çalışkan, azimli ve yılmayan daha nice öğrenciler yetiştireceğini için ;

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim dalımızın tüm değerli öğretim üyelerine,

Savunma sınavımda görev alan tüm jüri üyesi değerli hocalarıma,

Ayrıca geleceğin parlak bilim insanları, Gen ve Hücre Tedavi Uygulama Merkezi'ndeki Arş. Gör. Mükerrem Hale Taşyürek başta olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma, iyi niyetleri ve yardımları için,

Ve tabi ki dünyadaki en büyük şanslarım, ilelebet sevginin anlamı, birtanecik anneciğim, arkamda dağ gibi duran, güçlü ve sabırlı babacığım ve canımıniçi güzel kardeşlerim Canan Babadağ, Züleyha Olgun ve Nazlıcan Olgun'a daima benimle oldukları için,

Sonsuz teşekkürler..

ÖZET

Amaç: Lentiviral vektörler (LVV); güvenlik, etkinlik ve uzun süreli ekspresyon açısından tercih edilen, klinik gen tedavi denemelerinde kullanılan gen nakil araçlarıdır. Bu vektörlerin terapötik etkinlikleri, üzerlerinde taşıdıkları genlere bağlı olsa da, *in vivo* uygulamalarda kullanılmaları için, yüksek kalite ve saflıkta üretilmeleri gerekmektedir. Yapılan çalışmada, *in vivo* gen nakil uygulamalarında kullanılmak üzere, uygun titre ve kalitede; yüksek saflıkta, biyogüvenilir lentivirus eldesi için, vektör konsantrasyon ve pürifikasyon tekniklerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Yöntem: Döner hücre kültürü şişelerindeki 293T hücrelerinin, paketleme ve transfer plazmidleriyle, Chloroquine varlığında geçici $CaPO_4$ transfeksiyonu sonucu 3. nesil LVV üretildi. Düşük hızda santrifügasyon ve filtrasyon ile hücresel debris giderimi yapılıp, sükroz yataklı, yüksek hızlı ultrasantrifüj işlemi ile virus konsantrasyonu gerçekleştirildi. Konsantre edilen viral örneklerin; benzonaz ile hücresel nükleik asit yıkımı yapıldıktan sonra, iyon değişim kromatografisi ile saflaştırma işlemine tabi tutuldu. Elde edilen vektörlerin genoma entegre kopya sayıları kantitatif Real-Time PCR ile hesaplanırken, protein giderim oranları SDS-PAGE ile belirlendi ve MTT testi ile bu vektörlerin hücre canlılığına etkisi değerlendirildi.

Bulgular: Yapılan optimizasyon işlemleri ardından %10 FBS ve 25 uM Chloroquine içeren IMDM besiyerindeki transfeksiyonu takiben %10 FBS içeren OPTIMEM besiyerinde yapılan viral üretim metoduyla transdüksiyon etkin LVV'ler başarıyla elde edildi. Viral titre, fonksiyon ve saflık analizleri doğrultusunda, ultrasantrifüj ile 200 kat konsantre edilen örneklerin kromatografik pürifikasyonu ile safsızlıklarından %90 oranında arındırıldığı belirlenirken, viral titre $6{,}2 \times 10^{10}$ TU/mL olarak hesaplandı. LVV üretiminin başlangıcından son ürüne dek yapılan tüm alt akım işlemlerinin ardından HIV p24 ELISA testi ile toplam vektör geri kazanımı %53 olarak belirlendi.

Sonuç: Gerçekleştirdiğimiz bu çalışma ile, genel laboratuvar koşullarına uyarlanabilir özellikte ve oldukça pratik, optimize ve ölçeklendirilebilir bir üretim ve saflaştırma metodu geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Gen tedavisi, lentiviral vektör, pürifikasyon, kromatografi

ABSTRACT

Aim: Lentiviral vectors (LVV) are gene transfer tools, which have been preferred in clinical gene therapy trials in terms of their safety, efficacy and long-term gene expression. Despite the therapeutic effectiveness of these vectors is mostly dependent on the genes they carry, they must be produced in high quantity and purity for their successful *in vivo* applications. Thus, there is a need for a practical, scalable, a robust vector production method applicable to any basic laboratory settings. Thus, the aim of this study is to design a lentiviral production and purification technique to obtain high titered, bio-safe, 3rd generation LV vectors for *in vivo* gene transfer applications.

Methods: The 3rd generation LVV was produced in roller bottles, by temporarily transfecting 293T cells with packaging and transfer plasmids in the presence of Chloroquine and $CaPO_4$. Following clearance of cellular debris by low-speed centrifuge and filtration, virus was concentrated by high-speed ultracentrifugation in the presence of sucrose-cushion. Concentrated viral samples were then purified by anion-exchange chromatography after benzonase treatment to remove cellular DNA. Viral titers were quantified by RT-PCR, purity was determined by SDS-PAGE, and effect of virus on cellular viability was assayed by MTT test.

Results: Transfections performed in IMDM containing 10% FBS and 25µM Chloroquine resulted in successful production of LVVs in OPTIMEM with 10% FBS. Ultracentrifugation resulted in 200-fold concentration of viral vectors allowing samples to be loaded onto anion exchange columns. Following anion exchange chromatography, 90% purification was achieved resulting in a titer of $6.2x10^{10}$ TU/ml. p24 ELISA assays suggested a vector recovery rate of 53% after chromatography.

Conclusion: Based on our results, here we report a practical, optimized, scalable production of LVV suitable for laboratory scale lentiviral production.

Key words: Gene therapy, lentiviral vector, purification, chromatography

İÇİNDEKİLER

ÖZET i

ABSTRACT ii

İÇİNDEKİLER iii

TABLOLAR DİZİNİ v

ŞEKİLLER DİZİNİ vii

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ viii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 2

2.1 Gen Tedavisi 2

2.2 Non-viral Vektörlerle Gen Tedavisi 3

2.2.1 Fiziksel Aktarım 3

2.2.2 Kimyasal Aktarım 5

2.3 Viral Vektörlerle Gen Tedavisi 6

2.3.1 Adenoviral Vektörler 6

2.3.2 Adeno-Assosiye Vektörler 8

2.3.3 Lentiviral Vektörler 9

2.4 Lentiviral Vektör Üretimi 17

2.5 Lentiviral Vektör Saflaştıması 22

2.5.1 Kromatografi 25

3. GEREÇ VE YÖNTEM 31

3.1 Hücre Kültürü 31

3.2 Lentivirus Üretiminin Optimizasyonu 31

3.2.1 Vektör Üretiminde Gerekli Plazmidlerin Üretimi Ve İzolasyonu 31

3.2.2 $CaPO_4$ Transfeksiyon Metodu 32

3.2.3 Transfeksiyon ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu 34

3.2.4 Optimiza Lentivirus Üretimininin Ölçeklendirilmesi 36

3.3 Saflaştırma Yöntemleri 39

3.4 Transdüksiyon Ajanı Seçimi 41

3.5 Enfeksiyöz Viral Titrenin Hesaplanması 41

3.6 LV Vektörlerin Lentiviral Partikül Sayısının Hesaplanması 42
3.7 LV Vektörlerin Fonksiyonel Analizleri 43
3.8 LV Vektör Transdüksiyonunun Hücre Canlılığına Etkisinin Analizi 43
3.9 Saflaştırılan LV Vektörlerin Protein İçeriklerinin Analizi 44

4. BULGULAR 46

4.1. Vektör Üretiminde Kullanılacak Plazmidlerin Doğrulanması 46
4.2 Değişen Parametrelerle Yapılan Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular 46
4.2.1 Üretim Optimizasyonun Yapıldığı Denemelere Ait Bulgular 46
4.2.2 Transfeksiyon Ve Üretim Koşullarının İleri Optimizasyon Çalışmaları 51
4.3 Optimize Lentivirus Üretiminin Ölçeklendirilmesine Yönelik Bulgular 54
4.4 Optimize Parametrelerle Döner Hücre Kültürü Şişelerinde LVV Üretimi 55
4.5 Transdüksiyon Ajanı Seçimi İçin Yapılan Denemelerden Alınan Bulgular 57
4.6 LV Vektörlerin Pürifikasyon İşlemleri 58
4.6.1 Elde Edilen Viral Örneklerde Virus Miktarlarının İncelenmesi 61
4.7 Lentivirus Transdüksiyonunun Hücre Canlılığı Üzerinde Etkisinin Analizi 63
4.8 LV Vektörlerin Pürifikasyon Ardından Safsızlık Gideriminin Tayini 64
4.9 Optimize Edilen Parametrelerle Yapılan Çalışmalar 65
4.9.1 Kromatografik Pürifikasyon İşlemleri 65
4.9.2 Saflaştırılan LV'lerin Protein Analizleri ve Safsızlık Giderimi Tayinleri 66
4.9.3 Pürifikasyon Optimizasyonu Yapılan LVV'lerin Viral Partikül Analizleri 67
4.9.4 Pürifikasyonları Gerçekleştirilen LVV'lerin Fonksiyonel Analiz Testleri 69
4.9.5 LVV ile Transdükte Edilen Hücrelerin Morfolojik Analizleri 69
4.9.6. Transdükte Edilen Hücrelerin Metabolik Aktivite Analizleri 70

5. TARTIŞMA 71

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 82

KAYNAKLAR 86

EKLER

EK-1

EK-2

ÖZGEÇMİŞ 100

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1 AAV, AdV ve LV vektörlerin özellikleri 23

Tablo 2.2 LV vektörlerin saflaştırılmasından sonra vektör geri kazanım yüzdeleri 27

Tablo 3.1 Transfeksiyon işleminde kullanılan plazmid oranları 32

Tablo 3.2 $CaPO_4$ transfeksiyonunda kullanılan solüsyonların hazırlanışı 33

Tablo 3.3 Üç farklı koşulun detaylarını gösteren tablo 35

Tablo 3.4 Deneme planını gösteren tablo 36

Tablo 3.5 Farklı denemelerdeki dönme hızı/inkübasyon süresini gösteren tablo 37

Tablo 3.6 Plazmid miktarları ve kullanılan hacim için örnek hesaplamalar 38

Tablo 3.7 Değişik tipte kolonların bazı fizikokimyasal özellikleri 40

Tablo 3.8 Farklı kolon tiplerinde belirlenen optimum özellikler 40

Tablo 4.1 HIC p24 protein ELISA testleri sonucu alınan LV partikül sayıları. 61

Tablo 4.2 Hücrelerin canlılık oranları. 63

Tablo 4.3 Kantitiatif real-time PCR sonuçları. 68

Tablo 4.4. MTT hücre büyüme testi ile elde edilen yüzde canlılık oranları. 70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Replikasyon yeteneğinde lentivirusun yaşam döngüsü 10

Şekil 2.2 Vektör altyapısında temel alan lentivirus genom elementleri 12

Şekil 2.3 Naldini ve ark. tarafından oluşturulan vektör sistemi 13

Şekil 2.4 Yeniden oluşturulan 2. nesil LV vektör sistemi 14

Şekil 2.5 Yeniden tasarlanan 3. nesil LV vektör sistemi 15

Şekil 2.6 Transfer vektöründe yapılan biyogüvenlik modifikasyonları 16

Şekil 2.7 Transfer vektöründe gen ekspresyonuna yönelik modifikasyonlar 16

Şekil 2.8 LV vektör üretiminde transfeksiyon yöntemleri 18

Şekil 2.9 Lentiviral vektörlerde üretim kaynaklı kontaminant türleri 22

Şekil 2.10 LVV üretiminden alt akım proseslerine dek genel akım şeması 23

Şekil 2.11 Saflaştırılan LVV'lerde immünoblot görüntüsü 25

Şekil 2.12 İyon değişim kromatografisi kolon gçrüntüsü 27

Şekil 2.13 Jel filtrasyon kromatografisi kolon görüntüsü 28

Şekil 2.14 Affinite kromatografisi kolon görüntüsü 28

Şekil 2.15 Hidrofobik etkileşim kromatografisi kolon görüntüsü 30

Şekil 4.1 Kabarcık ve Vortex yöntemi ile yapılan transfeksiyon işlemi 47

Şekil 4.2 Transfeksiyon için besiyeri çalışmaları 52

Şekil 4.3 Transfeksiyon için Chloroquine miktar çalışmaları 53

Şekil 4.4 Tırtıklı döner şişelerde transfeksiyona hazır hücrelerin fotoğrafı 55

Şekil 4.5 $CaPO_4$ transfeksiyonu ile yapılan LVV üretiminin şematik gösterimi 56

Şekil 4.6 Transdüksiyon ajan belirleme çalışmaları 58

Şekil 4.7 Ultrasantrifüj işlemleri 59

Şekil 4.8 PBS ve HBSS ile yapılan AEX sonrası kromatogram görüntüleri 60

Şekil 4.9 p24 ELISA testi ile viral partikül tayini sonuçları 61

Şekil 4.10 p24 ELISA testi ile viral partikül tayini sonuçları 62

Şekil 4.11 MTT hücre canlılık test sonuçları 63

Şekil 4.12 Bradford ve SDS-PAGE analiz sonuçları 65

Şekil 4.13 AEX kromatografi sonucu kromatogram görüntüsü 66

Şekil 4.14 Bradford ve SDS-PAGE analiz sonuçları 67

Şekil 4.15 Kantitatif Real-Time PCR sonuçları 68

Şekil 4.16 LVV'lerin fonksiyonel etkinlik test sonuçları 69

Şekil 4.17 LVV'lerle transdükte hücrelerin morfolojik görüntüleri 70

Şekil 4.18 MTT hücre canlılık test sonuçları 70

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AAV	**:**	Adeno-Assosiye Virus
AdV	**:**	Adeno Virus
AEX	**:**	Anion Exchange Chromatography (Anyon Değişimli Kromatografi)
HBSS	**:**	Hank's Buffered Salt Solution
HIV	**:**	Human Immunodeficiency Virus (İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virusu)
LV	**:**	Lentivirus
PBS	**:**	Phosphate Buffered Saline
PCR	**:**	Polymerase Chain Reaction **(**Polimer Zincir Reaksiyonu)
RFP	**:**	Red Fluorescent Protein (Kırmızı Floresan Protein)
SDS-PAGE	**:**	Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresisis (Sodyum Dodesil Sülfat Jel Elektroforezi)
SEC	**:**	Size Exclusion Chromatography (Büyüklük Ayrım Kromatografisi)
SN	**:**	Süpernatant
US	**:**	Ultrasantrifüj
VSV-G	**:**	Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotei

1. GİRİŞ

Gen tedavi ile ilgili günümüze kadar yürütülen çeşitli çalışmalarda farklı viral vektör tipleri kullanılmış ve diğerlerine göre büyük avantajlara sahip, immünojenik olmayan, uzun süreli transgen ekspresyonu sağlamaya yönelik stratejilerle geliştirilen 3.nesil HIV tabanlı lentiviral vektörler odak noktası olmaya başlamıştır. LV vektörlerin gen aktarım çalışmalarında giderek artan kullanımları, yüksek saflıkta virus üretimi için geliştirilecek metotların önemini açığa çıkartmıştır. Bu doğrultuda, ölçeklendirilebilir, efektif ve güçlü üretim metotları ile yüksek verimli saflaştırma basamakları kritik önem taşımaktadır. Yapılan çalışmamızda, etkin gen aktarım araçlarından, son yıllarda özellikle *in vivo* uygulamalar için avantajlı özellikleri dolayısıyla kullanımı gittikçe yaygınlaşan bu lentiviral vektörlerin; yüksek konsantrasyonlarda üretimi ve terapötik hedefler doğrultusunda klinik uygulamalarda kullanılabilecek kalitede saflaştırılmasına yönelik metotların optimizasyonu amaçlanmıştır. LV vektörlerin tüm bu avantajlarından faydalanılarak olası tedavi imkanı sunabilmeleri için, yüksek titre ve saflıkta; ayrıca belirlenmiş kalite ve biyogüvenlik standartlarına uygun şekilde üretilmeleri gerekmektedir. Bahsedilen özellikteki LV vektörlerin elde edilebilmesi için bugüne dek araştırmacılar tarafından çok çeşitli saflaştırma metotları uygulanmıştır. Ülkemizde özellikle Akdeniz Üniversitesi Gen ve Hücre Tedavi Merkezi'nde Gen Tedavisine yönelik umut vaat eden terapötik çalışmaların yürütülüyor olmasıyla birlikte Sanlioglu ve ark. (Tasyurek ve ark. 2014, Tasyurek ve ark. 2014), bu ürünlerin klinik uygulanılabilirliği için belirli ve etkin bir saflaştırma metodunun mutlaka geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu doğrultuda çalışmamızda, viral vektörlerin saflaştırılması için kullanılan birçok farklı metodun arasında verimlilik ve kalite açısından en avantajlı olduğu düşünülen kromatografi temelli metotlar kullanılarak, farklı parametreler ışığında optimize edilmiş özgün bir saflaştırma metodunun geliştirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmanın hedefine ulaşması durumunda, *in vivo* uygulamalarda kullanıma uygun kalitede ve güvenilirlikte lentiviral vektörlerin elde edilmesi mümkün olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gen Tedavisi

Amerikan Gen ve Hücre Tedavisi Topluluğu'na göre, gen tedavisi "bireyin hedef genlerinin ifadesini değiştirmek veya hastalığa neden olan genleri değiştirmek için uygulanan yöntemler" olarak tanımlanmaktadır. Bu alandaki çalışmalar moleküler biyoloji ve rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmelerle paralel bir seyir izlemekle beraber, ilk klinik denemeler 1970'lerde başlamıştır (Wirth ve ark. 2013). Dr. Stanfield Rogers tarafından, arjinaz yetersizliği bulunan üç kız kardeşe, tavşanlarda arjinazı indüklediği bilinen tavşan papilloma virusü enjekte edilmiş fakat başarı sağlanamamıştır. 1980 yılına gelindiğinde ise Dr. Martin Cline iki talasemi hastasını rekombinant DNA ile tedavi etmeye çalışmış, fakat sonuçlarını yayınlayamamıştır (Sun 1982). FDA tarafından onaylanan ilk gen tedavi denemesi ise, 1990 yılında ADA-SCID hastalığının tedavisi için adenozin deaminaz kodlayan genin iki hastaya *ex vivo* olarak aktarılması olmuştur (Hacein-Bey-Abina ve ark. 2008, Wirth ve ark. 2013). Bu gelişmeyle beraber gen tedavi çağı başlamış ve umut vadeden bu yaklaşımlar pek çok bilim insanı tarafından araştırılmaya, kullanılmaya ve geliştirilmeye başlanmıştır.

Gen tedavi stratejileri her basamağında farklı özelliklerin bir arada değerlendirilmesini gerektiren çok bileşenli bilimsel yaklaşımlardır. Bu sebeple, gen tedavinin bilimsel temellerinin iyi bilinmesi ve farklı bileşenlerin özelliklerinin iyi değerlendirilmesi gerekmektedir.

Gen aktarım amacıyla ilgilenilen genetik materyalin hedef hücreye, dokuya veya organa taşınmasında kullanılan araçlara vektör adı verilmektedir. Optimum vektör sisteminin seçimi; hedef hücre/doku karakteristiği, immün yanıt oluşma kapasitesi, hedef gen büyüklüğü ve istenilen gen ekspresyon süresi gibi bir dizi faktöre bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Ponder 2001). Bu bağlamda; gen tedavisinde kullanılan gen aktarım araçları iki başlık altında toplanacak olursa; çeşitli stratejilerde viral ve viral olmayan (non-viral) vektörlerin kullanıldığı çalışmalarla karşılaşılmaktadır (Ansorge ve ark. 2009, Wirth ve ark. 2013).

2.2 Non-Viral Vektörlerle Gen Tedavisi

Plazmid DNA veya çıplak DNA moleküllerinin direkt olarak veya kimyasal/fiziksel yollarla hedef dokuya aktarıldığı sistemler non-viral vektör kategorisini oluşturmaktadır. Viral vektörlere kıyasla non-viral vektörlerle uygulanan yöntemlerin immünojenite, sitotoksisite ve mutajenitesinin düşük olmasının yanısıra düşük maliyetli ve kolay üretilebilir olması tercih sebebi olabilmektedir. Öte yandan, gen aktarım veriminin düşük olması ve hedef gen ifadesinin yetersiz veya kısa süreli olması non-viral sistemler ile ilgili temel dezavantajlar olarak gösterilmektedir (Glover ve ark. 2005). Non-viral yöntemlerle aktarılan başlıca nükleik asitler; oligonükleotit DNA, plazmid DNA, siRNA ve mRNA molekülleridir (Hsu ve Uludag 2012). Bu moleküllerin aktarımı için kullanılan yöntemler; fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki ana gruba ayırılabilir.

2.2.1 Fiziksel Aktarım

Fiziksel aktarım yöntemleri uygulama açısından daha kolay yöntemlerdir ve hücre zarı bariyerini fiziksel kuvvetlerle aşma stratejisine dayanırlar. Bu amaçla kullanılan araçlardan biri aktarılacak genetik materyalin iğne ile hücre içine direkt enjeksiyonunu hedefleyen yöntemdir. Terapötik genin, hedef doku ve organlara kolaylıkla doğrudan enjekte edilebildiği bu teknikle; başlıca kas, deri, karaciğer ve tümör dokularına gen aktarımı yapılmaktadır. Ancak, aktarılacak genin vücut sıvılarında bulunan nükleazlar tarafından çabucak yıkılmasıyla gen transfer etkinliği azalmakta ve bu durum söz konusu stratejinin zayıf yönü olarak karşımıza çıkmaktadır (Herweijer ve Wolff 2003).

Fiziksel aktarım yöntemleri kategorisinde değerlendirilebilecek bir diğer strateji balistik yöntemle gen aktarımıdır. Gen tabancası olarak da isimlendirilen bu yöntemde; altın, tungsten gibi ağır metallerle sarılan çıplak DNA, yüksek gaz basıncı altında tabancadan çıkan kurşuna benzer bir şekilde yapılan atışlarla nişan alınan hedef hücreye aktarılır. Gaz basıncına ve partikül büyüklüğüne bağlı olarak, belirli bir hıza ulaşan DNA-metal kompleksi hedef hücrenin zarını fiziksel olarak aşar ve hücre içine yerleşir. İlk olarak bitki hücrelerinde geliştirilen ve kullanılan bu yöntem gen tedavisinde daha çok over kanserinin araştırma çalışmalarında kullanılmaktadır (Li ve Huang 2006). Her ne kadar gen aktarımı açısından efektif olsa da, tüm doku ve organlara uygulanabilmesi mümkün olmayan bu yöntemin, özel teknikler ve yüksek maliyetli malzeme gereksinimi dolayısıyla kullanımı kısıtlı kalmıştır.

Bir diğer fiziksel aktarım metodu ise; elektrik akımı kullanarak hücre membranını aşmayı hedefleyen elektroporasyon yöntemidir. Hücreye, membran kapasitansından daha büyük bir elektrik alan uygulanması, membranın her iki tarafında da zıt yüklerin birikmesine neden olur. Böylece oluşturulan potansiyel fark, membranın yapısında bozulmalara ve porların açılmasına olanak verir. Deri altına, kas içine veya tümör dokusuna enjekte edilen DNA molekülleri, oluşan porlardan hücre içine alınır. Uygulanacak elektrik alanın büyüklüğü ve süresi söz konusu stratejinin püf noktasını oluşturmaktadır (Mir 2014).

Hücre membranında geçici porlar açmak için uygulanan bir diğer strateji ise; ses dalgalarının kullanıldığı sonoporasyon tekniğidir. Kısaca, lipid, protein veya sentetik biopolimerlerle kaplı; hava, nitrojen veya inert gazlar içeren mikro baloncuklar içine hapsedilmiş haldeki terapötik DNA molekülleri, sistemik dolaşıma verilir. Söz konusu baloncuklar 2-4 μm boyutundadır ve kırmızı kan hücrelerine benzerler. İşlemi takiben, dışardan uygulanan ultrason sayesinde genetik materyali taşıyan mikro baloncuklar hedef dokudaki hücrelerle birleşirler. Beyin, kornea, böbrek, periton boşluğu, kas ve kalp dokusu hedef doku ve organlar arasında sayılabilmektedir (Newman ve Bettinger 2007).

Manyetofeksiyon olarak adlandırılan bir diğer yöntemde ise genetik materyal, hedef dokulara, manyetik nanopartiküller ile kompleks halinde, intravenöz olarak enjekte edilir. Güçlü manyetik alan oluşturularak hedef dokuda hapsedilen partiküller; enzimatik yıkım, elektriksel yük interaksiyonu veya matriks degradasyonu gibi yöntemlerle parçalanıp, partiküllerin terapötik içeriğinin salınımı gerçekleştilir. Söz konusu yöntem daha çok *in vitro* araştırmalarda, alternatif yollarla transfeksiyonun zor olduğu hücrelerde uygulanmaktadır (Dobson 2006).

Bir diğer fiziksel aktarım yöntemi ise hidroporasyondur. Hidrodinamik gen transferi olarak da adlandırılan bu teknikte; çok kısa süreliğine yüksek hacimde DNA solüsyonu enjeksiyonuyla yaratılan hidrodinamik basınç sayesinde, hücre zarı bariyerinin aşılması hedeflenir. Söz konusu basınç ile kapiller endotelinin geçirgenliği artar ve endoteli çevreleyen hücrelerin membranında porlar oluşur. Hidroporasyon tekniği daha çok karaciğer hücrelerinde araştırma amaçlı kullanılmaktadır (Herweijer ve Wolff 2007).

2.2.2 Kimyasal Aktarım

Non-viral gen aktarım vektörleri genel olarak inorganik, lipid, polimer ve peptid bazlı olarak sınıflandırılabilecek kimyasal taşıyıcılarla kompleks halinde kullanılırlar (Jin ve ark. 2014).

Yaygın kullanılan inorganik taşıyıcılar; kalsiyum fosfat, silika, altın, manyetik nanopartiküller, karbon bileşikleri ve nanotüpleridir (Al-Dosari ve Gao 2009). Kalsiyum fosfat molekülleri gen aktarım amacıyla kullanılan ilk inorganik madde olup, biyouyumlu ve biyoçözünür özelliklere sahiptir. Kalsiyum, kolayca absorbe edilebilmesi ve yüksek bağlanma affinitesi gibi avantajlarının yanında hücre içine madde alımında (endositoz) önemli bir role sahiptir. Bununla birlikte, kalsiyum fosfat nanokristallerinin zamanla büyüme eğilimi göstermesi depolanma kapasitesini düşürmektedir. Bu sorun, komplekse magnezyum eklenmesiyle aşılabilir. Kalsiyum iyonları negatif yüklü DNA moleküllerine bağlanıp nötralize ederek hücre içine alınmalarını kolaylaştırır. Bu teknik non-viral gen transferi çalışmalarında yaygın kullanım alanına sahip bir yöntemdir (Maitra 2005).

Bir diğer inorganik taşıyıcı molekül olan silika, cam yapımında kullanılan önemli bir hammaddedir. Katyonik amin gruplarıyla modifiye edilen silika, DNA ile kompleks haline getirilerek güvenli, biyouyumlu ve etkili bir gen tedavi aracına dönüştürülmektedir (Bharali ve ark. 2005, Luo ve Saltzman 2006).

Gen aktarımında kullanılan inorganik moleküllerden bir diğeri ise altındır. Manipülasyonunun kolay olmasına ek olarak neredeyse sınırsız yüzey karakteristiğine sahip inert bir madde olan altın, gen tedavi alanında çalışma yapan bilim insanlarının ilgisini çekmiştir. Altın nanopartikülleri kızıl ötesi ışığı yüksek derecede absorbe edebilme özelliğine sahiptir. Kızıl ötesi ışınlar aynı zamanda dokuların derinliğine kadar ulaşabildiğinden, altın moleküllerinin yüzeyinin DNA ile modifikasyonu ve kızıl ötesi ışık aracılı fototermal etki sayesinde hücreleri transfekte etmek mümkün olmaktadır (Takahashi ve ark. 2005). Tüm bunlara rağmen, altının kimyasal stabilizasyonu ve düşük seviyedeki biyoçözünürlüğü gen tedavide kullanımını kısıtlamaktadır.

Lipid bazlı gen aktarım yöntemlerinde, katyonik lipidlerin negatif yüklü DNA ile interaksiyonundan faydalanılır (Pezzoli ve ark. 2013). Fizyolojik pH'da pozitif yüklü

olan katyonik lipidler, polianyonik yapıdaki DNA ile etkileşime girerek, lipopleksler oluşturur. Lipopleksler, *in vitro* koşullarda gen aktarımı için oldukça etkin araçlardır. *In vivo* koşullarda, immün reaksiyona yol açmamaları ve düşük toksisiteleri bir avantaj gibi görünse de, serum interaksiyonu ve fagositer hücreler tarafından hızlı bir şekilde ortadan kaldırılmaları, lipid bazlı gen aktarımının sürdürülebilir gen ekspresyonu sağlayamamasına neden olmaktadır (Nayerossadat ve ark. 2012).

2.3 Viral Vektörlerle Gen Tedavisi

Gen tedavi stratejilerinin temelinde, vektörlerde aranan en önemli özellik; terapötik genin hücre içine etkin aktarımıdır (Mulligan 1993, Ponder 2001, Herweijer ve Wolff 2003, Dobson 2006, Ansorge ve ark. 2009, Bouard ve ark. 2009, Ginn ve ark. 2013, Wirth ve ark. 2013).

Virusların sahip olduğu etkili gen aktarım yeteneği, gen tedavi araştırmalarında vektör olarak kullanılabilmelerinin yolunu açmıştır. Klinik denemelerde kullanılan gen tedavi vektörlerinin yaklaşık %70'i viral vektörlerdir (Ginn ve ark. 2013). Viral vektörlerin kullanıldığı ilk klinik deneme 1990 yılında Dr. Rosenberg ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Otolog tümör infiltre lenfositleri (Derouazi ve ark.) bir retrovirusle *ex vivo* enfekte eden bu grup, bu transgenik lenfositleri melanoma hastalarına geri enjekte etmişlerdir (Rosenberg ve ark. 1990). Bu çalışmalarla başlayan gen tedavi çağı, çok çeşitli viral vektörlerle ve farklı tekniklerle geliştirilmektedir. Günümüzde hala tedavisi olmayan hastalıklarda gen tedavinin terapötik potansiyeli ile ilgili çalışmalar sürdürülmekte ve geleceğe ışık tutacak bulgular elde edilmektedir.

Gen tedavinin tarihinde retroviruslarla başlayıp her geçen gün farklı viral vektörlerin kullanıldığı çalışmalar literatürde yer bulmaktadır. Bu vektörlerden en yaygın kullanım alanı bulanlardan bazılarıyla yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

2.3.1 Adenoviral Vektörler

Adenoviral (AdV) vektörler bölünen ve bölünmeyen hücreleri *in vivo* ve *in vitro* ortamda transdükte etme yeteneğine sahiptirler (Sanlioglu ve ark. 2001, Doerschug ve ark. 2002). Gen ekspresyon kaseti taşıma kapasitesi diğer vektörlere göre daha fazla olan ve yüksek titrelerde üretilebilen adenoviral vektörler, bu özelliklerinden

dolayı yapılan klinik gen tedavi denemelerinde (Sanlioglu ve ark. 2004, Terzioglu ve ark. 2007) %23 oranla en büyük pasta dilimini oluştururlar (Ginn ve ark. 2013).

Adenoviruslar, 65-80 nm boyutunda zarfsız, ikozahedral yapıda, kapsid içerisinde yaklaşık 40 kb uzunluğunda DNA molekülü taşıyabilen, çift zincirli DNA (dsDNA) virusudur. Coxsackie ve adenovirus reseptörlerine (CAR) tutunarak konak hücreyi tanıyan virionlar hücre yüzeyindeki integrin proteinleriyle etkileşime girerek reseptör aracılı endositoz ile hücre içine alınırlar. Böylece transdüksiyon işlemi başlamış olur. Hücre içine girdikten sonra endozomdan kaçan viral partikülün kapsid yapısı parçalanır ve açığa çıkan genom epizomal olarak replike olacağı çekirdeğe göç eder (Meier ve Greber 2004). Burada viral genom nüklear genoma entegre olmaz.

Rekombinant AdV vektörler intraselüler üretildiğinden, ancak hücrelerin parçalanmasıyla süpernatanta salınırlar. Dolayısıyla üretim sırasında süpernatant, host hücre kaynaklı nükleik asitler ve proteinlerle birlikte viral proteinler ve paketlenmemiş viral DNA'lar gibi safsızlıklar içermektedir. AdV vektörler; vektörlerin üretildiği hücre lizatlarının sezyum klorid (CsCl) gradiente tabi tutularak ultrasantrifügasyonu ile bu safsızlıklarından arındırılabilmektedir (Merten ve ark. 2014).

Adenoviral vektörler aracılığıyla pek çok hedef organda yüksek transgen ekspresyonu sağlanabilse de (Sanlioglu ve ark. 2006, Aydin ve ark. 2007, Dirice ve ark. 2009), bu durum sadece günlerle sınırlı kalmaktadır. Karaciğerdeki viral DNA seviyelerinin araştırıldığı bir çalışmada, uygulandıktan 24 saat sonra AdV vektörlerin yaklaşık %90'ının vücuttan temizlendiği saptanmıştır (Worgall ve ark. 1997)**.** Bu durumun temel sebebi ise virusa karşı gelişen doğal ve kazanılmış bağışıklık sonucu oluşan immun yanıttır (Hackett ve ark. 2000). AdV vektörler yüksek transdüksiyon etkinliğine sahip olmalarına rağmen (Yang ve ark. 2003), aktarıldıkları organizmada sitotoksisiteye neden olup immün yanıt oluşturduklarından kısa sürede infiltrasyona uğramaları nedeniyle, gen aktarım çalışmalarında yetersiz kalmaktadır.

Birinci nesil adenoviral vektörlerle septik fare modeline sistemik enjeksiyon yapılan bir çalışmada, mortalite artışı görülmüştür. Bu vektörlerde, replikasyon yeteneğini kısıtlamak amacıyla belirli bölgeler silinmiş olsa da hala bazı viral proteinler mevcuttur. Bu vektörlerin replikasyon yeteneğine sahip olan viruslarla kontamine

olması sonucunda gen tedavi uygulanan deneklerde inflamasyon indüklenmektedir. Şanlıoğlu ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada ikinci nesil AdV vektörlerle tekrarlanan deneylerde farelerde daha yüksek sağ kalım oranı görülmüştür. Bu ve benzeri çalışmalardan alınan bulgular araştırmacıları daha gelişmiş yeni nesil vektörler oluşturarak potansiyel gen tedavi araçları keşfetmeye yöneltmiştir (Doerschug ve ark. 2002).

2.3.2 Adeno-Assosiye Vektörler

Parvoviridae ailesine mensup olan Adeno-assosiye viruslar (AAV), 25nm boyutunda, zarfsız viruslardır. 4,7 kb büyüklüğünde, tek zincir DNA yapısında olan AAV genomu lineer olup (Monahan ve Samulski 2000), iki ucunda ters uç tekrarları (inverted terminal repeats, ITR), ITR'lar arasında ise Rep ve Cap genlerini içeren iki açık okuma çerçevesi içerir. Rep, viral replikasyondan sorumlu 4 proteini kodlarken; Cap, üç kapsid proteinini kodlar. ITR bölgeleri, viral DNA replikasyonu, paketleme ve hedef hücre integrasyonu için gereklidir (Young ve Samulski 2001).

Doğal ve sentetik olarak üretilen 100 farklı varyantta kapsid sekansına sahip olan AAV'lerin, yüzey karakteristikleri ile ilgili hedefe yönelik organ ve dokularda en çok çalışılan 12 serotipi bulunmaktadır (Sanlioglu ve ark. 2001). Farklı serotiplerin, farklı yüzey özellikleri saflaştırma proseslerinde değişiklik yapılmasını da gerektirmektedir (Merten ve ark. 2014).

Memeli veya böcek hücrelerinde intraselüler üretilen AAV vektörler, adenoviruslar gibi, bölünmeyen hücreleri *in vivo* ve *in vitro* ortamda transdükte etme yeteneğine sahiptirler; fakat bu virusların genomu, adenoviruslara nazaran çok daha küçüktür (Lai ve ark. 2002). AAV'lerin patojenik özellikte olmaması ve adenovirusun aksine immün reaksiyona yol açmaması önemli bir avantaj olsa da (Jooss ve Chirmule 2003), transgen kapasitesinin sınırlı olması AAV aracılı gen tedavisini kısıtlamaktadır (Wu ve ark. 2010). AAV'lere transgen aktarımı sonrasında, genom boyutu 6kb'ın üzerine çıktığından vektörler proteozomal degredasyona uğramaktadır (Grieger ve Samulski 2005).

Yabanıl tip AAV, enfekte ettiği hücrelerin genomunda 19 numaralı kromozomun q kolunda, 19q13.3-qter arasına entegre olabilir (Dutheil ve ark. 2000). Gen tedavi

uygulamalarında kullanılan rekombinant AAV vektörlerinde ise, genoma entegrasyon özelliği bulunmamaktadır (Daya ve Berns 2008).

AAV vektörlerin tüm bu özellikleri göz önünde bulundurulduğunda, genoma entegre olma özelliği olmayan rekombinant vektörlerin daha etkin gen aktarımı yapabilmesi için transdüksiyon etkinliğinin arttırılması gerekliliği ortaya çıkmıştır (Sanlioglu ve ark. 1999, Sanlioglu ve Engelhardt 1999). AAV vektörlerle ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda, rekombinant AAV serotip 2 vektörlerinin reseptöre bağlanma, endositoz ve nükleer sinyalleşme özellikleri, bu vektörlerin transdüksiyon yeteneğini etkileyen faktörler olarak tanımlanmıştır. Bir gen tedavi vektörü olarak rAAV-2 vektörünün transdüksiyon etkinliğinin arttırılması için hücre içi sinyalleşme ve gen konversiyon özelliklerini arttırıcı yönde çeşitli stratejiler geliştirilmiştir (Sanlioglu ve ark. 2000). Bu doğrultuda, Şanlıoğlu AD. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada daha yüksek rAAV transdüksiyon etkinliği amaçlanarak endositoz kapasitesinin arttırılması hedeflenmiştir. rAAV transdüksiyonu mekanizması üzerinde Rac1 proteininin de dahil olduğu sinerjetik etkilerin araştırıldığı bu çalışmayla farklı ajanlar kullanılarak AAV-2 vektörlerinin endositozunun indüklenebildiği gösterilmiştir (Sanlioglu ve ark. 2004).

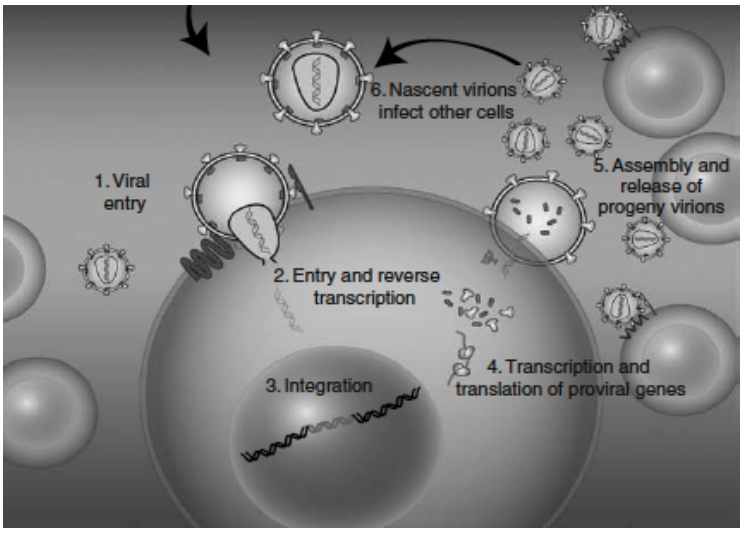
AAV vektörlerinin kısıtlayıcı özelliklerini ortadan kaldırmaya yönelik bu ve benzeri çalışmalarla (Duan ve ark. 1999, Sanlioglu ve ark. 2000) daha etkin gen aktarımı yapılabilecek AAV aracılı stratejiler geliştirilmektedir.

2.3.3 Lentiviral Vektörler

Lentiviral (LV) vektörler *Retroviridae* (retrovirus) ailesinin üyesi olup, çeşitli modifikasyonlar sonucu gen aktarım ajanları olarak kullanılmaktadır. Latincede "Lenti-" kelimesi "yavaş" anlamına gelmektedir ve bu isim lentivirusların uzun kuluçka dönemlerine ve kalıcı enfeksiyon özelliklerine atfedilmiştir (Ansorge ve ark. 2009). Lentivirus cinsi üyeleri, 1980'lerden itibaren özellikle AIDS hastalığının yayılması sonucu hem bilim insanlarının hem de toplumun ilgisini çekmiştir. En popüleri ve en iyi bilineni İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virusu (**H**uman **I**mmunodeficiency **V**irus Type I) (HIV) olmakla beraber, lentivirusların başka organizmaları da enfekte edebilen pek çok üyesi bulunmaktadır (Templeton 2009). Tümü patojenik olan bu viruslar, geçtiğimiz on yılda, enfeksiyöz özelliklerinin yanında gen aktarım vektörleri olarak kullanılabilme potansiyelleri bakımından da

araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Lentiviruslar, 9 kb'a kadar genetik materyal taşıma kapasitesi ve immün yanıt oluşturmama gibi özellikleriyle gen transfer çalışmalarında avantaj sağlamaktadır. Bununla birlikte, lentivirusların en dikkat çeken ve onları diğer viral vektörlerden ayıran en önemli özelliği bölünmeyen hücreleri de transdükte edebilme ve kalıcı olarak modifiye edilebilmeleridir (Templeton 2009, Tasyurek ve ark. 2014, Tasyurek ve ark. 2014) .

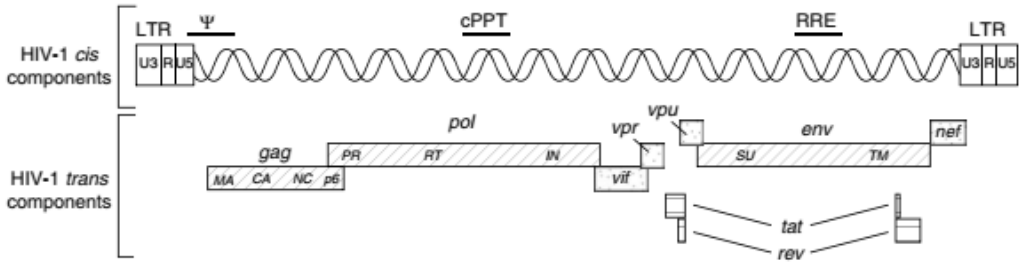
Lentiviruslar, diğer tüm retroviruslar gibi zarflı RNA viruslarıdır ve konak hücrenin plazma membranı ile füzyon gerçekleştirerek viral içeriğini hücre içine bırakırlar (Şekil 2.1). Burada, virusun genetik materyali viral reverse transkriptaz tarafından DNA'ya çevrilir ve bu DNA molekülü hücrenin genomuna entegre olur. Takiben, viral genomun terminal bölgelerinde bulunan LTR (long-terminal repeat) aracılı tanskripsiyon gerçekleşir ve konak hücre hem lentiviral RNA genomunu hem de lentiviral proteinleri üretmeye başlar. Böylece üretilen yeni viruslar tomurcuklanarak yeni konak hücreleri enfekte etmek üzere salınır (Vogt 1997, Goff 2001). Bu yaşam döngüsü; terapötik DNA dizilerini konak hücre genomuna entegre edebilme potansiyeli taşıyan lentivirusları, gen tedavi stratejileri için çekici kılmaktadır. Konak hücre genomunu istenilen dizilerle modifiye edebilme yeteneği gen terapi yaklaşımlarında aranan önemli bir özelliktir. Ancak, bu amaçla kullanılabilmeleri için öncelikle viral genomun modifiye edilmesi gerekmektedir (Simon ve Ho 2003). Lentivirus genomunu, hedeflenen gen tedavi yaklaşımı doğrultusunda modifiye etmek için, söz konusu genomun yapısı ve işleyişine dair bilgi sahibi olmak gerekir (Templeton 2009).



Şekil 2.1 Bir replikasyon yeteneğine sahip lentivirusun yaşam döngüsünün şematik gösterimi (Templeton 2009).

Lentivirus genomu, *cis* ve *trans* etki gösteren bileşenlerden oluşmaktadır. Bu cis elementlerden önemli olanları, uzun terminal tekrar dizileri (LTR), "Rev responsive element (RRE)" (Ayuso ve ark.) ve paketlenme sinyalidir (Ψ) (Vogt 1997). LTR dizileri genomun 5' ve 3' ucunda bulunan ve transkripsiyon için promotor görevi gören tekrar dizileridir. RRE dizisi *env* geninin içinde, Rev proteininin bağlanma bölgesidir ki bu protein bağlandığında transkriptin kırpılmamış halde çekirdekten çıkması sağlanır. Ψ sinyal dizisi ise viral genomun tanınıp kapsid içine alınmasında görevlidir (Lever ve ark. 1989, McBride ve Panganiban 1996). Lentiviral (HIV) genomun *trans* etki gösteren elementleri dokuz adet açık okuma çerçevesinden (ORF) oluşmaktadır. Bunlardan üçü viral "iskelet" olarak da adlandırılır ve replikasyon için şart olduklarından tüm retroviruslarda ortaktır. Bu üç ORF elementleri Gag, Pol ve Env poliproteinlerini kodlayan korunmuş genleri içermektedir. Söz konusu poliproteinler post-translasyonel olarak kesilerek virusun yaşam döngüsü için hayati fonksiyonlara sahip yapısal ve enzimatik proteinleri oluştururlar. Env dış zarf proteini gp160'ı oluşturan SU (surface) (gp120) ve TM (transmembrane) (gp41) yapısal proteinleri meydana getirmek üzere kırpılır. Gag da proteolitik olarak kırpılarak matriks (MA), kapsid (CA), nükleokapsid (Hacein-Bey-Abina ve ark.) ve p6 proteinlerini meydana getirir. Bu dört protein birlikte viral RNA genomunu içeren virion çekirdeğini oluştururlar. Pol ise kırpılarak yaşamsal önemdeki viral enzimler olan PR (proteaz), RT (ters transkriptaz) ve IN (integraz) proteinlerini oluşturur. Bunlar sırasıyla viral poliprotein öncüllerinin proteolitik kesimi, viral RNA genomunun DNA'ya çevrilmesi ve bu DNA molekülünün konak hücre genomuna entegre edilmesi görevlerini yerine getirirler (Frankel ve Young 1998). Tat viral proteini, transkripsiyonel uzamanın transaktivatörü olarak, entegre olmuş proviral genomdan yüksek miktarda mRNA üretilmesini sağlar. Spesifik olarak bu protein, hücresel RNA polimeraz II'nin (RNAPII) CTD (carboxyterminal domain) kuyruğunun fosforilasyonunu gerçekleştiren cyclin T1 ve CDK9 ile kompleks oluşturur (Herrmann ve Rice 1995). Bu fosforilasyon RNAPII'nin aktivitesini arttırarak transkripsiyonun 100 ile 500 kat artmasına neden olur (Jones ve Peterlin 1994). Rev proteini ise, RRE dizisine bağlanarak viral transkriptlerin kırpılmadan sitoplazmaya çıkabilmelerini sağlar (Pollard ve Malim 1998). Bu fonksiyon virus için yaşamsal öneme sahiptir çünkü yeni enfeksiyöz virusların oluşması için kırpılmamış transkriptlerin paketlenmesi gerekmektedir. Aksesuar

proteinler olarak bilinen, kalan dört protein ise (Vif, Nef, Vpr, Vpu) virusun *in vitro* replikasyonu için mutlaka gerekli olan faktörlerden değildir (Şekil 2.2).

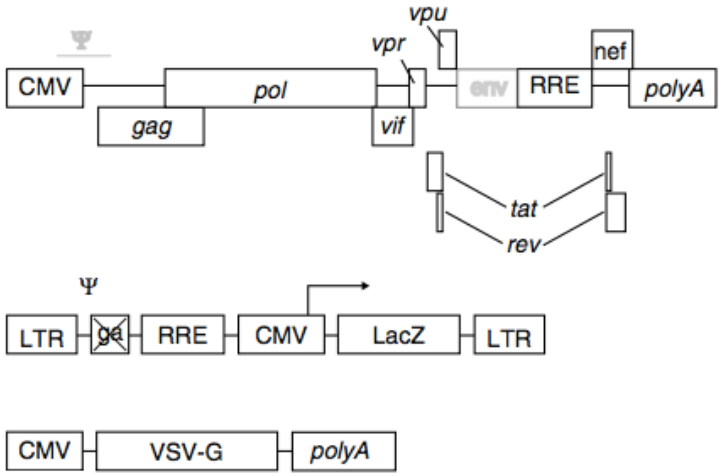


Şekil 2.2 Vektör altyapısında temel alan lentivirus genom elementleri. Yapısal proteinleri kodlayan genler çizgili, kontrol genlerini kodlayan genler yatay çizgili ve aksesuar genler noktalı gösterilmiştir. Ψ; paketleme sinyali, RRE; rev responsif element, cPPT; merkezi polipürin bölgesi ve LTR; long terminal tekrar (Templeton 2009).

Lentivirusların gen tedavisinde kullanılabilmesi için, yukarıda anlatılan temel özelliklerinde modifikasyonlar gerekmektedir. Lentivirusların amacı hücreyi enfekte etmek, genomunu hücre genomuna entegre etmek ve bu proviral genomdan transkripsiyon ve translasyon gerçekleştirerek başka hücreleri enfekte edecek yeni viruslar üretmektir. Öte yandan, lentiviral vektörler ise hedef hücre enfeksiyonu, terapötik transgenin hücre genomuna entegrasyonu ve sadece terapötik genin transkripsiyon ve translasyonunu sağlamalıdır. Bununla birlikte lentiviral vektörler, lentiviruslardan farklı olarak yeni virus üretimi yapma yeteneğinden yoksun bırakılmalıdır. Bu amaca ulaşabilmek, lentivirus genomunda bir dizi modifikasyonu gerektirmektedir. Bunlar kabaca virusun replikasyon kabiliyetini kısıtlamak ve genomda transgen için yer açmak adına, hayati önemi bulunmayan dizileri çıkartmak olarak özetlenebilir.

Biyogüvenlik sorunu viral gen tedavisi yaklaşımlarında büyük önem arz etmektedir. Bu anlamda ana hedef, vektörün replikasyon yeteneğini ortadan kaldırmak ve bu yeteneği tekrar kazanmasının önüne geçmektir. 1996 yılında Naldini ve ark.'nın geliştirdiği sistem gen tedavi yaklaşımlarında bir çığır açmıştır. "Replication Competent (replikasyon yeteneğine sahip) Lentivirus" (RCL) oluşumunu minimize eden bu sistemde vektör üretimi için 293T hücrelerini üç ayrı plazmid ile transfekte etme ve lentivirus replikasyonu için gerekli lentiviral faktörleri, farklı plazmidler aracılığıyla eksprese etme yaklaşımı benimsenmiştir (Naldini ve ark. 1996) (Şekil 2.3). Bu sayede, RCL oluşmasına neden olabilecek rekombinasyon riski oldukça

azaltılmıştır. Söz konusu üç plazmid, paketleme plazmidi, transfer plazmidi ve zarf proteini kodlayan plazmid olarak adlandırılır.

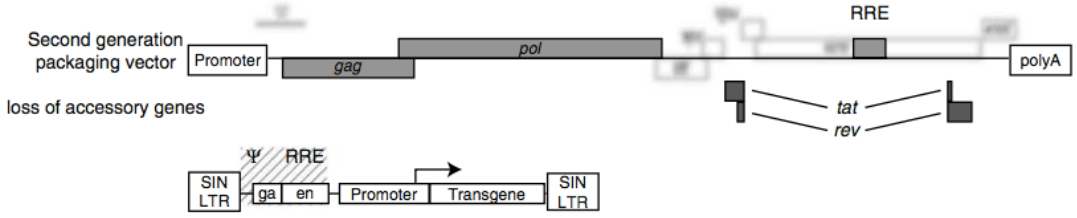


Şekil 2.3 Naldini ve ark. tarafından oluşturulan vektör sistemi. En üstte 1. nesil paketleme vektörü, ortada transfer vektörü ve altta VSV-G eksprese eden yapı gösterilmiştir. Gri gölgeli bölümler, delesyonu ve ga; gag proteininin ORF ile çerçeve kaymasına (frame-shift) uğramış halini göstermektedir (Naldini ve ark. 1996).

Bu plazmidlerden vektörün içine paketlenecek olan genomu kodlayan transfer plazmidi; transgen, transgenin transkripsiyonu için gerekli promotor dizisi (CMV), paketlenme sinyali (Ψ) ve hem RNA genomunun DNA'ya çevrilmesinde hem de entegrasyonda görev alan LTR dizilerini içermektedir. Vektör oluşumu için gerekli diğer tüm *trans* faktörler ise paketlenme plazmidinde yer alırlar. Bu faktörleri kodlayan dizilerin yanlışlıkla vektörün içine paketlenmemesi içinse Ψ dizisi silinmiştir. Ayrıca, virusun zarf proteinlerini üreten env geni de silinmiştir. Bunun yerine, "vesicular stomatitis virus" (VSV)-G (glycoprotein) kodlayan üçüncü bir plazmid kullanılmıştır (Naldini ve ark. 1996). Vektör üretiminde lentiviral gp160 yerine VSV-G kullanılması viral partiküllerin stabilitesini ve mekanik kuvvete dayanıklılığını arttırmaktadır. Bu sayede, vektör süpernatantları ultrasantrifüj ile 1000 kata kadar konsantre edilebilmekte ve *in vivo* gen tedavi araştırmalarında kullanmaya yetecek kadar bol miktarda (10^9 IU/mL) lentiviral vektör saflaştırılabilmektedir (Burns ve ark. 1993). Bu özellik, lentivirusların saflık kalitesinin arttırılmasına yönelik olarak yapılacak ek saflaştırma basamakları için de avantaj sağlamaktadır. Buna ek olarak, VSV-G psödotiplemesi vektörün hedef hücre çeşitliliğini de arttırmaktadır (geniş tropizm). Böylelikle, bölünmeyen hücreleri de transdükte edebilen yüksek titrede lentiviral vektörler üretmek mümkün hale gelmiştir. Öte yandan, VSV-G proteininin konstitütif ekspresyonu durumunda vektör

üreten hücre hatlarında membran füzyonu tetiklenerek toksik etki gözlenmektedir (Cronin ve ark. 2005). VSV-G psödotiplendirilmiş vektörlerin bir diğer dezavantajı ise insan serum komplemanı ile inaktive olmalarıdır (DePolo ve ark. 2000). *Ex vivo* gen tedavisinde geniş tropizmli vektörler rahatlıkla kullanılabilmektedir (Bouard ve ark. 2009). Spesifik bir dokunun hedeflendiği *in vivo* uygulamalarda; VSV-G gibi geniş doku tropizmine sahip vektörler, arzu edilmeyen dokuları da transdükte edeceğinden, kullanımı uygun değildir. Farklı hücre türlerini hedeflemek adına lentiviral vektörler Rhabdoviridae, Arenaviridae, Togaviridae, Filoviridae, Retroviridae ve Baculoviridae glikoproteinleri ile psödotiplendirilebilmektedir (Cronin ve ark. 2005). Tüm bu olasılık ve riskler göz önüne alındığında, bu risklerin giderilmesine yönelik vektör yapısı ve plazmid sistemleri ile ilgili çok çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Naldini ve ark.'nın geliştirdiği üç plazmidli sistem birinci nesil lentiviral vektörler olarak anılmaktadır (Naldini ve Verma 2000) (Şekil 2.3).

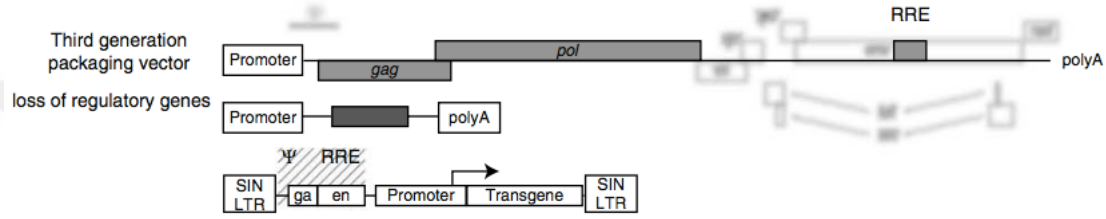
Yukarıda anlatılan sistem biyogüvenlik açısından başarılı olsa da, vektör üretiminde kullanılan plazmidlerin birbirleriyle veya plazmidlerin başka viruslarla rekombine olarak RCL oluşturma riski halen mevcuttur. Bu yüzden, araştırmalar lentiviral genomdaki virulans için gerekli, fakat vektör üretimi için gözden çıkarılabilir dizileri silmeye ve böylece rekombinasyon olasılığını minimize etmeye odaklanmıştır. Birinci nesil vektörlerin paketleme plazmidinde bulunan aksesuar genler (vif, vpr, vpu ve nef) çıkartılarak ikinci nesil vektörler üretilmiştir (Zufferey ve ark. 1997) (Şekil 2.4). Bunlar, RCL olasılığını düşürdüğü ve olası RCL'leri virulans faktörlerinden yoksun bıraktıkları için biyogüvenlik açısından daha gelişmiş vektörlerdir (Naldini ve Verma 2000).



Şekil 2.4 Aksesuar genlerinin delesyonu ile yeniden oluşturulan 2. nesil LV vektör sistemi. Gri kutular paketleme genlerini ve gölgeler delesyon bölgelerini temsil etmektedir (Templeton 2009).

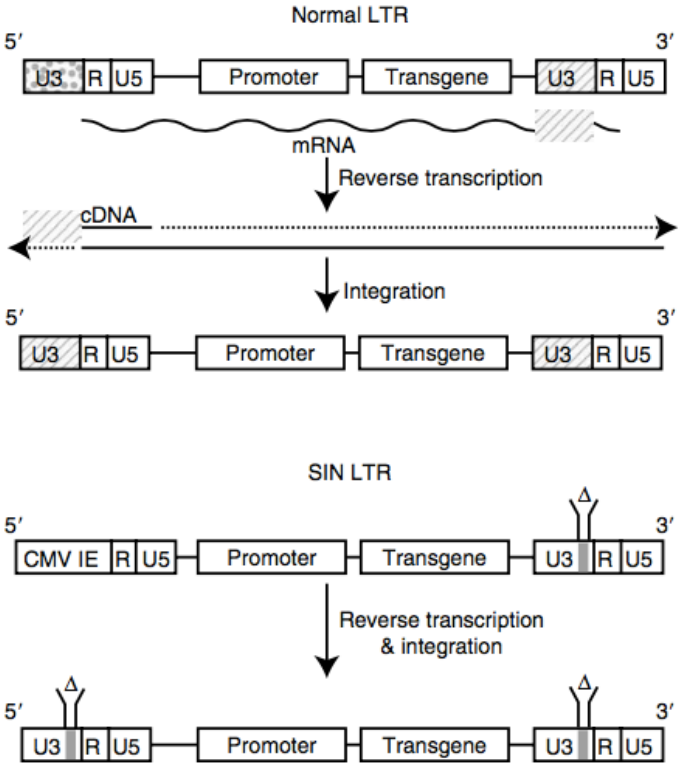
İkinci nesil vektör üretiminde kullanılan paketleme plazmidi üzerinde bulunan tat ve rev genleri çıkarılarak dizi homolojisi minimize edilmiştir. Böylece klinik denemeleri gölgeleme olasılığına karşı RCL riskini daha da elimine etmeye yönelik

adımlar atılarak 3. nesil lentiviral vektörler oluşturulmuştur. Viral tat proteininin transkripsiyon için gerekli olmasından dolayı, tat yokluğunda transkripsiyon gerçekleştirebilmek adına, LTR dizilerinin tat bağlanma bölgesi silinmiş ve onun yerine tat-bağımsız olarak transkripsiyonu gerçekleştirebilen avian-retrovirus promotor dizileri eklenerek kimerik LTR bölgeleri oluşturulmuştur (Dull ve ark. 1998). Rev proteini ise, görevi bakımından vektör üretimi için vazgeçilmezdir. Dolayısıyla rev genini silmek mümkün değildir. Bunun yerine, rev geni farklı bir plazmid üzerinde üretici hücre hattına transfekte edilerek, rekombinasyon olasılığı ve RCL oluşum riski azaltılmıştır (Şekil 2.5).



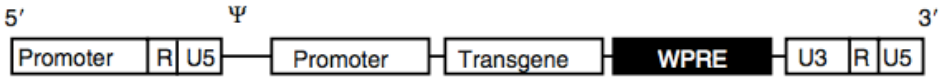
Şekil 2.5 Replikasyon kompetent virusların oluşma riskini ortadan kaldırmak için, kontrol genlerinin delesyona uğratılarak yeniden tasarlanan 3. nesil LV vektör sistemi. Gri kutular paketleme genlerini ve gölgeler delesyon bölgelerini temsil etmektedir (Templeton 2009).

3.nesil lentiviral vektör geliştirilirken vektör performansını ve biyogüvenliği arttırmak için; paketlenme, ters transkripsiyon ve entegrasyon için gerekli *cis* dizilerini ve terapötik transgeni taşıyan transfer plazmidinde de yaygın modifikasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu modifikasyonlardan ilki 3' LTR bölgesinde gerçekleştirilen bir delesyondur. Ters transkripsiyon aşamasında doğal olarak bu delesyon proviral DNA'nın 5' LTR bölgesine de taşınacaktır. Böylece LTR bölgelerinin transkripsiyonel inaktivasyonu gerçekleşeceğinden, transdükte hücrelerde viral RNA genomu oluşumu engellenmektedir. Bu şekilde, hücreyi transdükte ederken aslında kendi mobilizasyonunu da inaktive etme özelliği kazanan bu vektörler SIN (Self INactivating) vektörler olarak adlandırılmaktadır (Miyoshi ve ark. 1998, Zufferey ve ark. 1998) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Transfer vektöründe yapılan biyogüvenlik modifikasyonları. 5' U3 bölgesi promotor bölge olarak iş gördüğünden mRNA'ya transkribe olmamaktadır. Bu yüzden normal ters transkripsiyon süresince, 3' U3 bölgesinden yeni bir 5' U3 bölgesi oluşmalıdır. Böylece entegre vektörün her iki U3 bölgesi de, orijinal transfer vektörünün 3' U3 bölgesini yansıtan özellikte olacaktır. Dolayısıyla bir SIN vektör, promotor/enhancer U3 (Δ) bölgesinde oluşturulan delesyonun, ters transkripsiyon sırasında 5'LTR bölgesine de aktarılarak, LTR bölgelerini inaktive etmesiyle oluşturulur (Templeton 2009).

Transfer vektöründe yapılan bir diğer modifikasyon ise vektöre WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) dizisinin eklenmesidir. Bu dizi, transgen mRNA'sının posttranskripsiyonel düzenlenmesinde görev alarak transgen ekspresyonunu 2 ile 5 kat kadar arttırmaktadır (Zufferey ve ark. 1999) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Transfer vektöründe yapılan gen ekspresyonunu artırmaya yönelik modifikasyonlar. WPRE; woodchuck hepatitis virus posttranskripsiyonel kontrol elementi. (Templeton 2009).

Lentiviral vektörlerin gen aktarım aracı olarak kullanılma fikrinden yola çıkarak, yukarıda anlatılan tüm modifikasyonlar sonucunda araştırmacılar, yüksek transgen ekspresyonu yapan, transdüksiyon etkin ve biyogüvenilir lentiviral vektörlerin üretimine uygun bir vektör iskeleti oluşturmayı başarmıştır.

2.4 Lentiviral Vektör Üretimi

LV vektör üretimi için tanımlanan ilk protokoller, üç farklı plazmidin hücre hatlarına transfeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Geçen yıllar içerisinde bu vektörler sürekli olarak geliştirilse de, standart araştırma amaçlı deneyler için genel protokollerde büyük değişimler yapılmamıştır (Naldini ve ark. 1996, Dull ve ark. 1998).

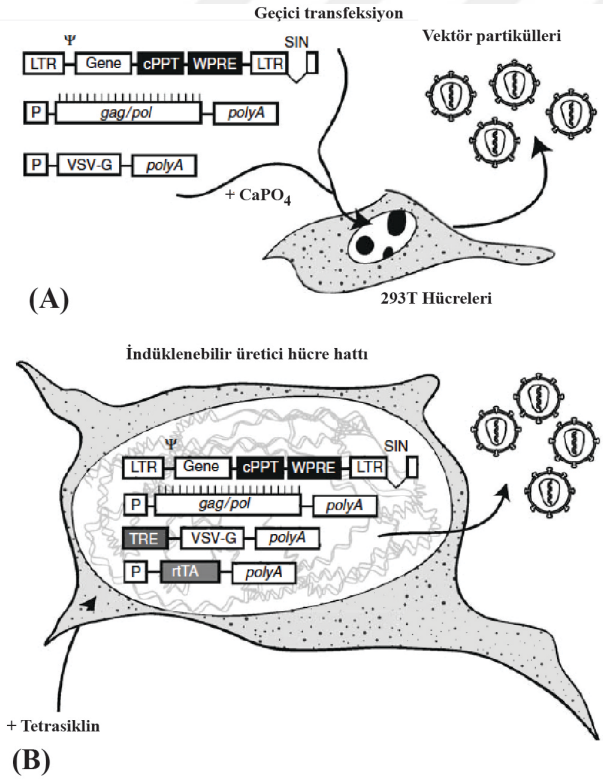
LV üretimi için en sık kullanılan hücreler; Human Embryonic Kidney (HEK) 293 hücreleri ve türevleridir (Stacey GN 2011). 1977 yılında Graham ve ark. tarafından üretilen HEK293 hücreleri günümüzde ekspresyon deneylerinde en çok kullanılan hücre hattıdır (Shaw ve ark. 2002). Bu hücrelerin popülerliği yüksek transfeksiyon başarısından ve serumsuz besiyerinde süspanse kültüre adaptasyon gösterebilmelerinden kaynaklanmaktadır (Segura ve ark. 2007). Ayrıca, insan orijinli olmalarından ötürü zarf proteinlerinin glikolizasyon paterni de insana özgüdür (Warnock ve ark. 2006). Bu durum *in vivo* uygulamalarda özellikle avantaj yaratmaktadır çünkü insan orijinli olmayan glikolizasyon paternleri, ilk 20 dakikada kompleman sistemi tarafından elimine edilirler.

HEK 293 hücrelerinin çok çeşitli varyantları bulunduğundan bu ve benzeri hücre hatları "HEK 293 hücre ailesi" olarak adlandırılmaktadır (Geisse 2009). Bu hücrelerin LV üretiminde en sık kullanılan varyantı ise konstitütif Simian Virus 40 (SV40) T antijeni eksprese eden HEK293T hücreleridir (Segura ve ark. 2007). LV üretiminde kullanılan plazmidlerin, SV40 replikasyon orijini taşıması halinde bu hücrelerde plazmid kaybı engellendiği gibi yüksek ekspresyon da sağlanabilmektedir. Ayrıca, SV40 T antijeni transfeksiyonla hücre içine alınan vektörlerin çekirdeğe taşınmasını da kolaylaştırmaktadır (Geisse 2009). Bununla birlikte, üretici hücre hatlarının spesifik bir ürünü olan SV40 T antijeni birçok hücre tipi için onkogenik özellik taşımaktadır. Bu sebeple lentivirus üretimi gerçekleştirildikten sonra elde edilen virusların saflaştırılmasında hücre kaynaklı kontaminantlar arasında uzaklaştırılması gereken en önemli protein SV40T antijenidir (Merten ve ark. 2011).

LV üretiminde HeLa, HT1080 ve maymun böbrek hücre hattı COS-1 gibi başka memeli hücreleri de kullanılmaktadır (Ikeda ve ark. 2003, Smith ve Shioda 2009). Özellikle COS-1 hücreleri 293T hücrelerine kıyasla kültür yüzeyine daha sıkı tutundukları için vektör içeren süpernatantın hücresel kontaminantlar bakımından

daha temiz olduğu bildirilmektedir (Smith ve Shioda 2009). Bu durum, vektör saflaştırmasında alt akım basamaklarının uygulanmasının mümkün olmadığı koşullarda avantaj sağlamaktadır.

Lentiviral vektörlerin üretiminde iki farklı strateji benimsenmektedir. Bunlardan ilki dört farklı plazmidin aynı anda üretici hücrelere transfekte edilmesi ve bu hücreler tarafından kısa süreliğine üretilmesidir. Diğer bir üretim stratejisi ise, transfer vektörü hariç tüm lentiviral vektör komponentlerini eksprese eden stabil paketleyici hücre hatlarının kullanıldığı yöntemlerdir (Şekil 2.8) (Ansorge ve ark. 2010). Bu yöntemlerde, üretici hücre hatları vektör üretimi için gerekli tüm plazmidlerle kalıcı olarak transfekte edilmişlerdir. Dolayısıyla, LV üretimi için hücrelere sadece transfer vektörünün transfeksiyonu yeterli olmaktadır (Warnock ve ark. 2006).



Şekil 2.8 LV vektör üretiminde kullanılan iki yaygın yöntem. (A) Geçici transfeksiyonda transfer vektörü, paketleme yapısı ve zarf proteinini kodlayan elementler, 293T hücrelerine $CaPO_4$ gibi bir transfeksiyon ajanı aracılığı ile verilirler. Hücreler transfeksiyondan bir kaç gün sonra vektör üretimini gerçekleştirir. (B) Vektör üreten hücre hatlarının kullanımında ise; hücreler kendiliğinden çeşitli vektör tiplerini kodlayacak genlere sahiptir. Tetrasiklin uygulaması ile üretim başlatılır (Templeton 2009).

LV üretiminde kısa süreli geçici transfeksiyon, stabil paketleyici hücre hatları ile kıyaslandığında, zaman ve esneklik kazandırması bakımından avantaj sağlamaktadır (Ansorge ve ark. 2009). Transfeksiyon yöntemi ayrıca sitotoksik ve sitostatik

transgenlerin ve vektör komponentlerinin de kullanılmasına imkan vermektedir. Bu yüzden, lentivirusların gen tedavisinde ilk kullanılmaya başlandığı 1990'lı yıllardan bu yana adherent hücrelerin kısa süreli transfeksiyonunu öneren pek çok protokol rapor edilmiş ve bu strateji genel olarak değişikliğe uğramamıştır.

LV üretiminin başarısı kullanılan hücre hattının yanında ekspresyon vektörü, transfeksiyon ajanı ve eksprese olan protein gibi farklı değişkenlerce belirlenmektedir (Geisse 2009). Serum içeren besiyerindeki adherent hücrelere yapılan transfeksiyon işlemlerinde en çok kalsiyum fosfat ($CaPO_4$) ve Polyethylenimine (PEI) transfeksiyon yöntemleri kullanılmaktadır (Follenzi ve Naldini 2002). $CaPO_4$ ve PEI dışında kullanılan yöntemler, LV vektör üretimleri açısından düşük verim göstermelerinin (Karolewski ve ark. 2003, Mitta ve ark. 2005) yanında yüksek maliyetli deney protokolleri gerektirdiklerinden tercih edilmemektedir (Coleman ve ark. 2003).

PEI temelli transfeksiyonlarda; PEI:DNA oranı ve hücre başına kullanılacak polipleks miktarları gibi proses koşulları deneyden deneye (besiyeri, hücre hattı, plasmid yapısı vs.) farklılık gösterdiğinden (Derouazi ve ark. 2004, Backliwal ve ark. 2008), bu koşulların her deney için optimize edilmesi gerekmektedir (Durocher ve ark. 2002, Ansorge ve ark. 2009).

$CaPO_4$ transfeksiyon yöntemi, komponentlerin kolay temini, düşük maliyetli olması, deney protokolünün kolaylıkla uygunabilmesi ve tekrarlanabilir olması nedeniyle; ve ayrıca çok çeşitli hücre tipleri için kullanılması dolayısıyla sıklıkla tercih edilmektedir (Pham ve ark. 2006, Toledo ve ark. 2009). Araştırma ve geliştirme çalışmalarında kullanılmak üzere küçük ölçekli üretimlerde oldukça uygun ve kolay bir yöntem olduğu belirtilmektedir. Ancak, transfeksiyon verimi yüksek olmasına rağmen pH, presipitasyon kinetiği veya solüsyonlardaki safsızlıklar gibi deney parametrelerindeki değişimlerden olumsuz etkilenmesinin yanında (Segura ve ark. 2007, Toledo ve ark. 2009) kalsiyum iyonlarının sitotoksik etkisini gideren serumlu besiyerinin her transfeksiyondan önce değiştirilme zorunluluğu, $CaPO_4$ presipitasyonunun geniş ölçekli LV üretimi için bazı dezavantajlara sahip olduğu sonucunu doğurmaktadır (Pham ve ark. 2006, Kuroda ve ark. 2009).

$DNA/CaPO_4$ presipitatının oluşumu, plazmid DNA, kalsiyum ve fosfat konsantrasyonları ile sıcaklık ve işlem süresi gibi parametrelere doğrudan bağlıdır (Fasbender ve ark. 1998). Transfeksiyon etkinliği, oluşan presipitatların büyüklüğünden oldukça etkilenmektedir. Bu bağlamda küçük presipitatların oluşumuyla transfeksiyon, etkin bir şekilde gerçekleşirken, artan presipitat hacmi ile etkinlik azalmaktadır. Aynı zamanda artan inkübasyon süresi, daha büyük presipitatların oluşmasına neden olduğundan, etkin bir transfeksiyon için kısa inkübasyon süreleri istenilmektedir. Bu nedenle özellikle büyük ölçekli üretimlerdeki uzun proses süreleri, presipitat hacmini arttırdığından, $CaPO_4$ yönteminin uygulanabilirliğini azaltmaktadır (Jordan ve ark. 1996). Ayrıca bu yöntemin, serumsuz besiyerlerinde transfekte edilen hücreler için uygun olmadığı, çünkü artan Ca^{2+} iyonlarının 37^0C, pH 7.5 koşullarında inkübasyonu devam eden hücrelerde presipitasyonu devam ettirdiği ve hücrelere toksik etki yaptığı belirtilmiştir (Jordan ve ark. 1996, Chowdhury ve ark. 2003).

Genellikle $CaPO_4$ transfeksiyonunda presipitasyon, oda sıcaklığı ve pH 7.05 koşullarındaki Hepes buffered solution (HBS) içerisinde 0.75 mM Na_2HPO_4 içeren 125 mM Ca^{2+} iyonları ile gerçekleştirilmektedir (Yang ve Yang 1997). Transfeksiyon sırasında presipitattaki kalsiyum iyonları, Mg^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+} vs. ile yer değişirken, fosfat iyonları ise hücresel CO_2 veya besiyeri kaynaklı karbonatlar gibi negatif yüklü iyonlarla yer değişmektedir. Sonuçta değişen CO_2 ve CO_3^+ konsantrasyonları, ortam pH'sında değişikliklere neden olmakta dolayısıyla transfeksiyon etkinliğini etkilemektedir. Genelde, ani pH değişimlerinden korunabilmek amacıyla ortama Hepes gibi ikinci bir pH solüsyonları eklenmektedir (Jordan ve ark. 1996, Kingston ve ark. 2003).

Transfeksiyon verimini etkileyen bir diğer faktör ise; vektörlerin üretileceği hücre hattına aktarılan plasmid DNA miktarlarıdır. İzolasyon sonrası elde edilen plasmidlerin saflık analizleri; 260/280 nm spektorofotometrik oran temel alındığında 1.8'e oldukça yakın olmalıdır. Plazmid izolasyonunda ticari kitlerin yaygın kullanımları ile sezyum klorid ve etidyum bromid temelli izolasyon protokollerine kıyasla, oldukça saf ve yüksek konsantrasyonlarda DNA elde edilebilmektedir. LV vektörlerin $CaPO_4$ transfeksiyonu ile üretimi için gerekli rekombinant DNA miktarları genel olarak 1-15 ug/1x10^6 hücre olarak belirtilmektedir (Segura ve ark. 2007, Backliwal ve ark. 2008, Tom ve ark. 2008, Ansorge ve ark. 2009). Çoklu

plazmidlerin kullanıldığı transfeksiyon işleminde kullanılacak optimum plazmid oranlarının belirlenmesi için birçok çalışma yürütülmüş ve transfer plazmidinin, diğer paketleme plazmidlere oranla daha fazla miktarda kullanımının, çok daha yüksek verimli üretimle sonuçlandığı gösterilmiştir (Mitta ve ark. 2005, Segura ve ark. 2007). Yine de gereken bu oranlar, kullanılan vektör yapısına göre oldukça değişkenlik göstermektedir.

Bahsedildiği gibi LV vektörlerin yüksek verimli üretiminin, tercih edilen transfeksiyon ajanları; kullanılan hücre hattı, serum varlığı, ortamın fizikokimyasal koşulları veya üretim prosesinin özellikleri gibi parametrelere bağlı olması; oldukça hassas optimizasyon çalışmalarını gerektirmektedir. Özellikle büyük ölçekli üretimlerde $CaPO_4$ veya PEI gibi transfeksiyon yöntemleri tek başına yetersiz kalmakta, dolayısıyla verim arttırıcı ek ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda en çok tercih edilen destek maddeleri; Sodyum Bütirat ($C_4H_7NaO_2$), Chloroquine, kolesterol ve lipidlerdir (Sena-Esteves ve ark. 2004, Mitta ve ark. 2005, al Yacoub ve ark. 2007).

LV üretiminde 2 ila 10 mM konsantrasyonda kullanılan sodyum bütirat, güçlü bir indükleyici olarak tanımlanmaktadır. Bu indükleyici mekanizmayı; histon proteinlerinin hiperasetilasyonu sonucunda transkripsiyonun artması ve dolayısıyla transfekte edilen DNA'nın yüksek seviyede ekspresyonu açıklar (Kruh 1982, Gloger ve ark. 1985). Ancak, bu ajan HIV-1 LTR ve CMV promotor bölgelerinin aktivasyonunu stimüle etmektedir. Özellikle 3. nesil LV vektörlerde bu iki bölge birbirine çok yakın olduğundan, bu ajanın kullanıldığı üretimlerde promotor etkileşimleri nedeniyle üretim verimi oldukça düşmektedir (Jaalouk ve ark. 2006).

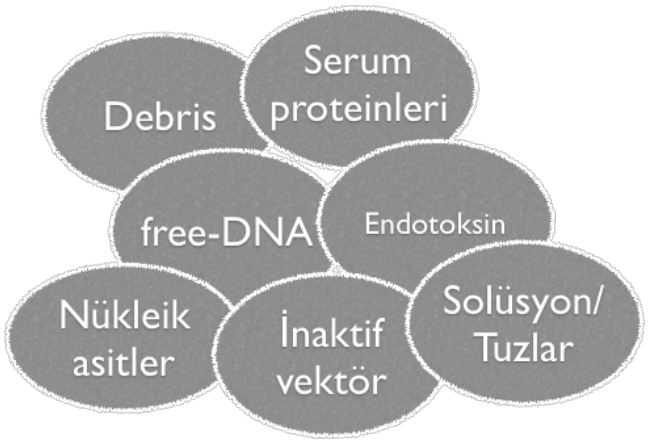
Lentivirus, Retrovirus, Influenza ve Ebola gibi zarf proteinli viruslar, üretildikleri hücrelerin membranlarından tomurcuklandıkları için host hücre türevli membran lipid tabakası ve kolesterol içermektedir. Enfeksiyöz viruslar için hücre kaynaklı kolesterolün önemli bir ihtiyaç olduğu, dolayısıyla transfeksiyon esnasında ortama eklenen lipofektamin gibi lipoproteinlerin ve/veya kolesterolün viral tomurcuklanmayı artırarak, hücrelerin daha fazla enfekte olmasını sağladığı belirtilmektedir (Holm ve ark. 2003, Chen ve ark. 2009). Ancak bu ajanların yüksek maliyette olmaları özellikle büyük üretimli prosesler için bir dezavantaj yaratmaktadır.

Bir diğer destekleyici transfeksiyon ajanı olan Chloroquine ise, endozom ve lizozomların pH seviyesini arttıran bir amindir. Ortama eklendiğinde lizozomal pH'yı arttırıp transfekte edilen DNA'nın degredasyonunu önlerken (Karolewski ve ark. 2003), fagositik vakuol membranlarını parçalayarak DNA'nın sitoplazmaya salınmasını sağlamaktadır. Hücrelerle uzun süre etkileşimi toksik etki yarattığından, transfeksiyon koşullarında konsantrasyon ve inkübasyon süresi dikkatlice optimize edilmelidir (Luthman ve Magnusson 1983). LV ve RV üretimlerinde sıklıkla kullanılan Chloroquine, $CaPO_4$ transfeksiyonunda oldukça yüksek verim sağlarken, PEI transfeksiyonlarında viral titreyi azaltmaktadır (Kuroda ve ark. 2009).

2.5 Lentiviral Vektör Saflaştırması

Lentiviral vektörlerin iki nedenle kültürden alındıktan sonra saflaştırılmaları gerekmektedir: (i) pek çok uygulama için hücre kültüründen alınan süpernatanttaki düşük virus konsantrasyonunu arttırmak (Takahashi ve ark.) ve biyogüvenlik ve etkinlik açısından supernatant kaynaklı kontaminant ve kirliliklerden arındırmak şarttır (Segura ve ark. 2006). Gerekli görülen saflık derecesi, gen tedavi uygulamasının *in vivo* veya *ex vivo* olmasına göre de değişkenlik göstermektedir.

Şekil 2.9'da lentiviral vektörlerin üretiminden kaynaklanan kirlilikler özetlenmiştir (Segura ve ark. 2013). Ana kirlilik kaynağı, hücre kültürüne eklenen plazmid DNA'sı ve serum proteinleri gibi materyaller ile konak hücre kaynaklı hücre artıkları, proteinler ve nükleik asitlerdir. Yüksek moleküler ağırlığa sahip proteoglikanlar ve DNA molekülleri, LV partikülleri gibi büyük ve negatif yüklü oldukları için bunlardan kurtulmak oldukça zordur.



Şekil 2.9 Lentiviral vektörlerde üretim kaynaklı kontaminant türleri

Tablo 2.1'de viral vektörlerin alt akım işlemlerine yön veren bazı özellikleri ile yüzey karakteristikleri gösterilmiştir. Büyüklükleri, stabilite durumları, hidrofobik özellikleri veya yüklerine göre pürifikasyon işlemleri farklılık göstermektedir (Merten ve ark. 2014).

Tablo 2.1 AAV, AdV ve LV vektörlerin özellikleri (Merten ve ark. 2014).

Viral Vektör	Büyüklük	Zarf	Stabilite	Nötral pH'da net yük	Batmama yoğunluğu
AAV	≅20 nm	Yok	Yüksek	Pozitif	1.39 (CsCl'de)
AdV	≅80 nm*	Yok	Yüksek	Negatif	1.34 (CsCl'de)
LV	≅100 nm*	Var	Düşük	Negatif	1.16 (Sükrozda)
***Farklı viruslardaki benzer değerler**					

Şekil 2.10'da LV üretiminde takip edilen basamaklar ana hatlarıyla gösterilmektedir. Akış sıralaması laboratuardan laboratuara değişiklik göstermekle birlikte, literatürde sıklıkla rapor edilen ve yaygın kullanılan yöntemsel şema gösterilmiştir.



Şekil 2.10 LV vektörlerin üretim işleminden alt akım proseslerine dek takip edilen genel akım şeması.

Virus saflaştırmasında genel kural minimum basamak sayısıyla maksimum saflık elde edilecek yöntemi kullanmaktır. Çünkü uygulanan her ekstra basamak vektörün transdüksiyon yeteneğini zayıflatmaktadır (Segura 2011). Viral saflaştırmada uygulanan pek çok teknik ilk olarak protein saflaştırması için geliştirilmiştir (Segura ve ark. 2005). Bazı proteinlerle kıyaslandığında virusler daha büyük ve karakterizasyonu daha zor yapılar olduğundan saflaştırılmaları da proteinlere göre daha zordur.

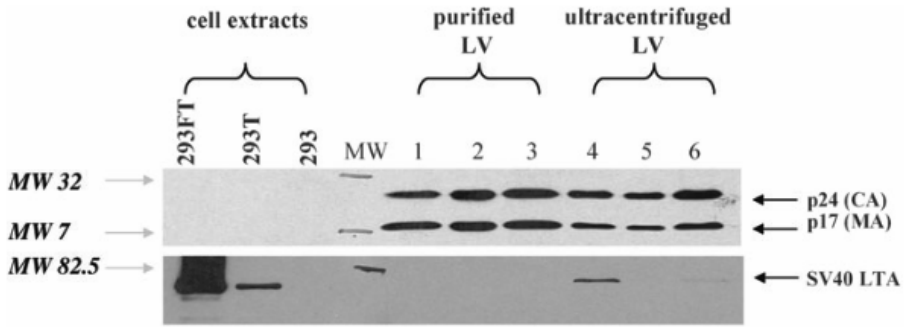
Viral süpernatanttan hücre ve hücre kalıntılarının uzaklaştırılması düşük hızda santrifüj ve mikrofiltrasyon ile sağlanmaktadır (Segura ve ark. 2006). Kaba santrifüj basamağı filtrasyondan önce daha büyük partiküllerin uzaklaştırılmasını sağlamakla

birlikte, filtrasyon aşamasında filtre tıkanması gibi karşılaşılabilecek sorunların engellenmesi ve işlemin daha kolay uygulanabilmesi için gereklidir. Protein saflaştırmasında kullanılan 0.22 μm filtreler vektör kaybına neden olacağı için tercih edilmemektedir. Öte yandan, literatürde çeşitli filtrasyon uygulamaları rapor edilmiştir. Bunlardan diafiltrasyon adı verilen teknik, virus konsantrasyonu ve tuz arındırması amacıyla kullanılmaktadır (Slepushkin V 2003, Merten ve ark. 2011). Tanjant akışlı filtrasyon (Tangential-Flow Filtration) (TFF) tekniği ise saflaştırılacak solüsyonun porlu membrana dik olarak belirli bir basınçla uygulandığı yöntemlerin aksine, membran üzerinden belirli bir açıda akıtılmasına dayanmaktadır. Bu sayede membran tıkanmasını da minimize ederek vektör konsantrasyonu sağlanmaktadır (Geraerts ve ark. 2005, Cooper ve ark. 2011). Ancak, söz konusu filtrasyon teknikleri primer olarak vektör konsantrasyonunu arttırmaya yönelik stratejiler olup, genellikle ultrasantrifüj ve kromatografik yöntemlerle beraber kullanılmaktadır. Ayrıca, piyasada mevcut ticari filtrelerin büyük bir kısmı pozitif yüklüdür. Bu durum negatif yüklü DNA moleküllerinin ayrıştırılması bakımından avantaj sağlasa da membranların negatif yüklü olan viral partikülleri de bağlaması söz konusu olacağından saflaştırma için tek başına yeterli olmamaktadır (Roush ve Lu 2008).

Viral vektörlerin filtrasyon basamağından sonra süpernatanttan izole edilmesinde ultrasantrifüj işlemi en sık kullanılan metotlardan biridir. 20.000-90.000xG hızlarda gerçekleştirilen ultrasantrifüj ile 100 kata kadar vektör konsantrasyonu sağlanabilse de transdüksiyon veriminde aynı oranda bir artış gözlenememektedir. Bunun sebebi ultrasantrifüj işleminin uzun sürmesinin yanısıra VSV-G psödotiplendirmesi ile yapısı güçlendirilen vektörlerin dayanıklılığının bu denli yüksek fiziksel kuvvete karşı yetersiz kalmasıdır. Maruz kaldıkları fiziksel kuvvet sonucu parçalanan, zarf proteinlerini kaybeden ve agregat oluşturan vektör partiküllerinin transdüksiyon yeteneğinde düşüş gözlenmektedir.

Ayrıca, ultrasantrifüj temelli metotlar, yüksek hacimlerle çalışılan prosesler için zaman ve iş yükü bakımından dezavantaj oluşturmaktadır (Burns ve ark. 1993, Slepushkin V 2003, Kutner ve ark. 2009). Ultrasantrifüj sonrası toplam hacim azalırken, konsantrasyonu artan vektörün *in vivo* uygulamalarda ve klinik denemelerde kullanılabilmesi için, filtrasyonla uzaklaştırılamayan ve santrifüj sırasında vektörle birlikte çöken safsızlıklardan arındırılması gerekmektedir (Transfiguracion ve ark. 2003). Şekil 2.11'da ultrasantrifüj ile kontaminantlardan

ayrıştırılan vektörlerin içerdikleri hücresel proteinler (SV40 T antijeni gibi) ve bu proteinlerin ancak kromatografik saflaştırma yöntemleriyle uzaklaştırılabildikleri görülmektedir (Merten ve ark. 2011).



Şekil 2.11 Saflaştırılan vektörlerde, HIV p24 kapsid ve p17 matriks proteinlerine spesifik antikorlar kullanılarak yapılan immunoblot görüntüsü. T antijenini içermeyen 293 hücrelerinde, beklenildiği üzere SV40 bandı gözlenmemiştir. Ultrasantrifüj örneklerinde (4, 5 ve 6. kuyular) bu bantlar gözlenirken, kromatografi örneklerinde (1, 2 ve 3. kuyular) başarıyla elimine edilmiştir. Saflaştırılan LV vektörlerde; SV40 T antijeninin giderimi ve temel viral proteinlerinden p24 ve p17 gösterilmiştir (Merten ve ark. 2011).

Lentiviral vektör stokları genellikle nükleik asitlerle kontamine halde izole edilmektedir. En önemli nükleik asit kaynağı transfeksiyonda kullanılan plazmidlerdir (Sastry ve ark. 2004). Ayrıca, süpernatantta hücre ölümü kaynaklı hücresel DNA ve RNA molekülleri de mevcuttur. Hasat süreleri uzadıkça, süpernatanttaki hücresel nükleik asit konsantrasyonu da artar (Segura ve ark. 2005). Nükleik asit kontaminasyonu sadece biyogüvenlik sorunu oluşturmaz, ayrıca viskoziteyi de etkileyerek saflaştırma basamaklarında zorluklar yaratabilir. Viral vektör partikülleriyle aynı elektriksel yüke sahip olması, DNA'nın uzaklaştırılmasını özellikle zorlaştırmaktadır. Bunun için, "Benzonaz" muamelesi önerilmekte ve uygulanmaktadır (Sastry ve ark. 2004). Benzonaz, DNA moleküllerini küçük fragmentlere böldüğünden hem bu fragmentlerin hem de Benzonaz'ın kendisinin ayrıca uzaklaştırılması gerekir. Viral stokta kabul edilebilir DNA kalıntısı <500bp ve Benzonaz kalıntısı ise <100 ng/mL olarak belirtilmektedir (Yu ve Schaffer 2006, Ausubel ve ark. 2012). Bu değerlere ulaşabilmek için de en etkili yöntem kromatografidir.

2.5.1. Kromatografi

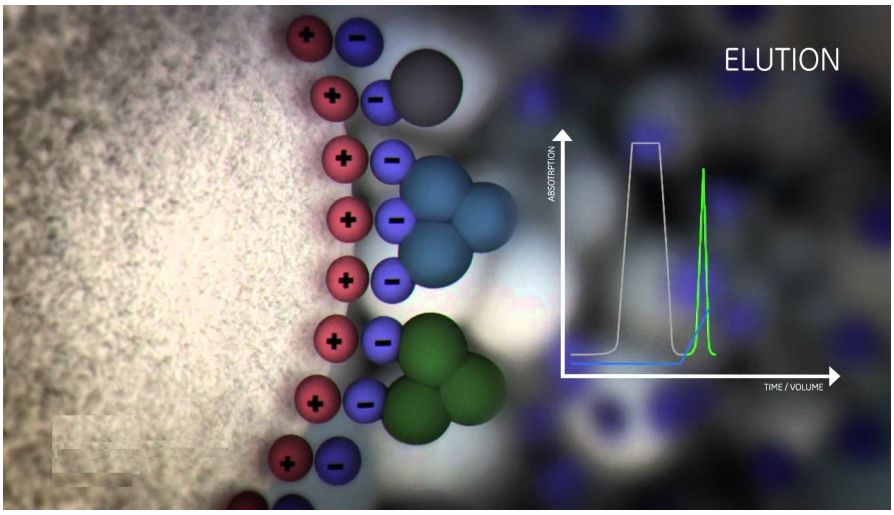
Kromatografi, sadece viral vektörler için değil, *in vivo* uygulamalarda kullanılan tüm biyomateryallerin saflaştırılması için altın standarttır. Özellikle klinik uygulamalarda kullanılacak vektörlerden, immünojenik etki yaratacak ve yetersiz transdüksiyon

etkinliğine sebep olacak bütün proses ve hücresel bazlı kontaminantların arındırılması gerekmektedir (Yu ve Schaffer 2006). Kromatografide temel prensip; biyoçözeltilerin, durağan fazdaki (kolon, membran vs.) parçacıklı veya porlu ortamdan geçirilmesine dayanmaktadır. Böylelikle, çözelti içindeki maddelerin; boyut, taşıdıkları elektriksel yük, sahip oldukları spesifik madde affinitesi veya hidrofobik özelliklerine göre ayrıştırılması sağlanmaktadır (Rodrigues ve ark. 2006, Merten ve ark. 2011).

İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişim kromatografisi (IEX), genelde farklı tipte viral vektörlerin saflaştırılmasında kullanılan, vektörün nötr pH koşullarında sahip olduğu net yüke bağlı olarak ayrıştırılmasını sağlayan basit ve ekonomik bir tekniktir. Vektörün yüküne gore kullanılan kolon tipleri anyon ve katyon değişimli olmak üzere ikiye ayrılır (Merten ve ark. 2014). Lentiviruslar nötr pH koşullarında genellikle negatif yük taşırlar (Michen ve Graule 2010). Bu durum, anyon değişim kromatografisi (AEX) ile saflaştırma yöntemine uygun oldukları anlamına gelmektedir. Viral çözelti durağan fazdan (kolon, membran) geçerken negatif yüklü partiküller durağan fazdaki pozitif yüklü boncuklara sıkıca tutunurlar. Kontaminantların arındırılmasından sonra LV vektörlerin kolondan geri kazanımı, yüksek konsantrasyonda tuz çözeltisi (0.5 - 1M NaCl) ile gerçekleştirilir (Scherr ve ark. 2002, Slepushkin V 2003, Yamada ve ark. 2003) (Şekil 2.12).

Anyon değişim kromatografisi lentiviral vektör saflaştırmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Tablo 2.2'de VSV-G ile psödotiplenmiş LV saflaştırmasında AEX uygulanan çalışmalar özetlenmiştir. Genel olarak iki farklı durağan faz içeren kromatografi kolonu kullanılmaktadır. Bunlardan Q (quaternary ammonium) kolonu daha güçlü ligand içerirken, DEAE (diethylaminoethyl) kolonu bağlanma gücü daha zayıf ligandlardan oluşmaktadır. Her iki durumda da transdüksiyon verimi düşmektedir. Lentiviruslerin yüksek tuz konsantrasyonundan olumsuz etkileniyor olabilecekleri, aktif virus oranındaki düşüşün olası sebebi olarak ileri sürülmektedir (Segura ve ark. 2013). Retroviral vektörlerle yapılan bir çalışmada vektörün aktivitesinin tuz konsantrasyonundan olumsuz etkilendiği rapor edilmiştir (Segura ve ark. 2005).



Şekil 2.12 Negatif yüke sahip biyomoleküllerin, bulundukları ortam safsızlıklarından ayrıştırılabilmeleri için, pozitif yüklü boncuklara sahip kolon sisteminden geçirilerek, iyon interaksiyonları sayesinde tutunup, safsızlıklarından arındırılmaları sağlanır. Daha negatif yüke sahip, yüksek tuz konsantrasyonlu solüsyonlar ile de elüsyon işlemleri gerçekleşir. (http://www.gelifesciences.com).

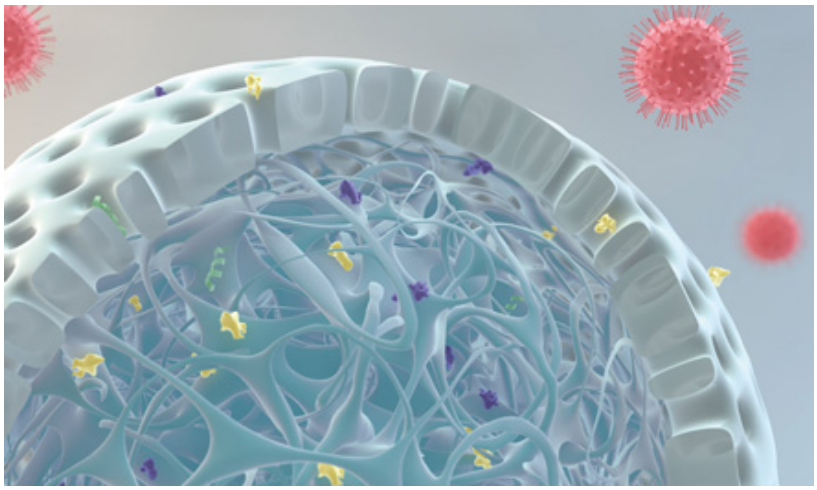
Tablo 2.2 LV vektörlerin iki farklı kolon kullanılan çalışmalar sonrası elde edilen vektör geri kazanım yüzdeleri (DEAE; dietilaminoetil ve Q; kuvaterner amonyum) (Segura ve ark. 2013).

Ligand	**DEAE**	**DEAE**	**DEAE**	**Q**	**Q**	**Q**
Verim (%)	45	29	28	56	56	65
Referans	(Scherr ve ark. 2002)	(Lesch, Laitinen et al. 2011)	(Bandeira, Peixoto et al. 2012)	(Kutner, Puthli et al. 2009)	(Zimmermann, Scheibe et al. 2011)	(Slepushkin V 2003)

Jel Filtrasyon Kromatografisi (Size Exclusion Chromatography)

Jel filtrasyon kromatografisi (SEC), biyoçözeltilerdeki maddeleri boyutlarına göre ayırmaya yarayan bir tekniktir. Moleküllerin liganda bağlanması söz konusu değildir. Durağan fazdaki boncukların porlarından içeri giren küçük proteinlerin akışı yavaşlarken, viral partiküller boncukların içine girmeden, arasından geçerek daha hızlı akarlar (Şekil 2.13).

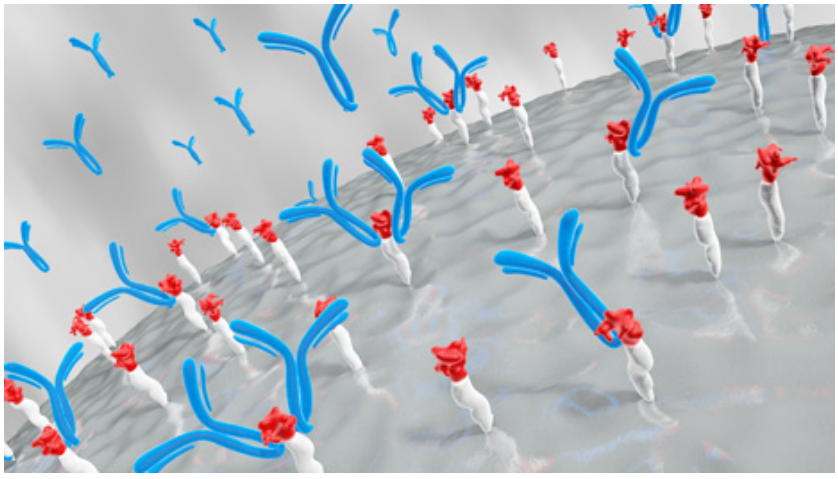
Jel filtrasyon tekniği AEX ile kıyaslandığında daha zayıf bir saflaştırma yöntemidir. Dolayısıyla daha çok, vektörün süspanse edildiği tamponun değişiminde, tuzlardan arındırılmasında ve son ürün kalitesinin arttırılmasında ek basamak olarak kullanılmaktadır (Slepushkin V 2003, Merten ve ark. 2011).



Şekil 2.13 Bir biyokompleks içerisindeki maddeler, moleküler boyutlarına göre kolon içerisindeki baloncukların içinden veya arasından geçerek büyüklüklerine göre ayrılırlar. Boyutça büyük olan maddenin elüsyonu, küçük boyuttaki maddelerden önce olur. (http://www.gelifesciences.com)

Affinite Kromatografisi

Affinite kromatografisinde biyomolekül açısından zengin ortamdan ayrılması istenen maddenin, yüzey karakteristiğine uygun olarak herhangi bir moleküle affinitesi olması gerekmektedir. Biyomoleküllerin pürifikasyonunda oldukça etkili bir yöntem olan bu kromatografi türünde, maddenin affinite gösterdiği spesifik molekülle absorbsiyonu sonucu ayrım sağlanır. Ancak affinite absorbantlarının viral vektörün zarf proteinine spesifik antikorları kullanması, saflaştırma sonucunda oluşan antijen-antikor kompleksinin tekrar yıkımını gerektirdiğinden, alt akım prosesleri ekstra hassasiyet gerektirmektedir (Rodrigues ve ark. 2006).



Şekil 2.14 Protein A affinitesi olan bir molekülün, içinde bulunduğu biyomolekülce zengin ortamdan, Protein A konjuge ligandlardan oluşmuş kromatografi kolonunda tutulmasının şematik gösterimi. (http://www.gelifesciences.com)

Bu kromatografi türünde sıklıkla, Protein A, heparin affinitesi, streptavidin-biotin affinitesi ve immobilize metal affinitesinden yararlanılmaktadır (Hughes ve ark.

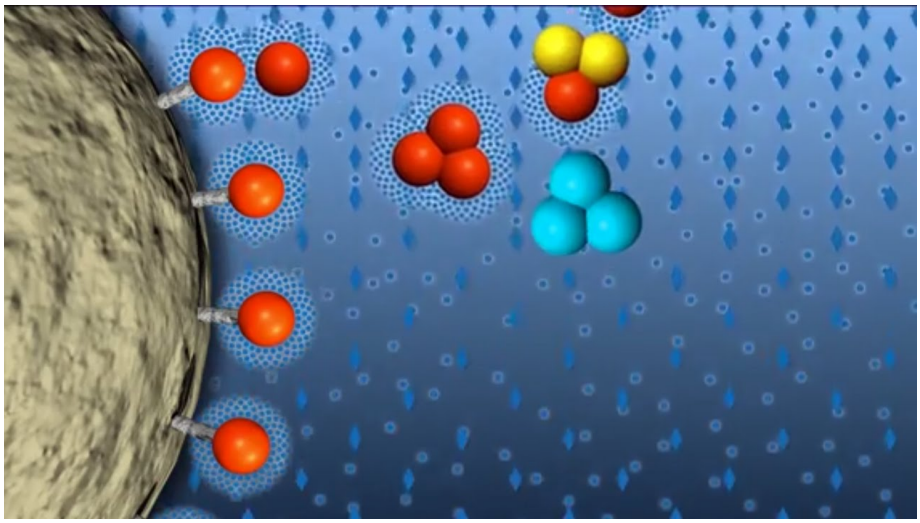
2001, Ye ve ark. 2004, Williams ve ark. 2005) (Şekil 2.14). Örneğin viral vektörler, kimyasal olarak biyotinlendikten sonra streptavidin aktif maddelere kolayca tutunabilmektedir. Vektör üretimi öncesinde, üretici hücrelerin biyotinleyici ajanlarla inkübe edilmesi, oluşan vektörlerin zarf proteinlerinde biyotin miktarını oldukça arttırmaktadır. Bu yöntemin viral titre ve vektör stabilitesi üzerinde bir etkisinin olmadığı iddia edilse de, kromatografisi esnasında virusun affinite gösterdiği streptavidin içeren solüsyonların viral vektörleri tamamıyla inaktive ettiği rapor edilmiştir (Williams ve ark. 2005)

Bir başka kromatografi çeşidi olan immobilize metal affinite kromatografisinde (IMAC), tasarlanan vektörlerin zarf proteinleri histidin ile etiketlenir. Bu histidin molekülünün immobilize metal iyonlarına karşı yüksek affinitesinden yararlanılarak, kontaminant proteinler ve nükleik asitlerin eliminasyonu sağlanır ve yüksek oranda saflaşma gerçekleşir. Ancak, kromatografiden sonra vektörlerin, metal iyonlarından ayrıştırılabilmesi için gereken imidazole ya da EDTA gibi solüsyonlar, vektörlere büyük hasar vermektedir (Ye ve ark. 2004).

Görüldüğü üzere; affinite kromatografisi ile yüksek hassasiyette ayrım sağlanırken, lentiviral vektörlerin, affinite gösterdikleri kolondan ayrılması için ekstra alt akım işlemleri gerekmektedir. Bunun için kullanılan solüsyon ve ayrım ajanları ise stabilite ve transdüksiyon etkinliğini düşürdüğünden, izlenecek protokolün dikkatle optimize edilmesi gerekmektedir (Rodrigues ve ark. 2006).

Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

Hidrofobisite, polar olmayan bileşiklerin polar özellikteki ortam ile arasında oluşan itme kuvvetidir. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi **(**HIC), molekülleri, protein ve viruslara karşı gösterdikleri hidrofobik etkileşime göre ayıran bir tekniktir. Buna göre, alifatik ve aromatik yan grupların eklenmesiyle viral proteinlerin yüzeyinde bir polarite yaratılarak, bu proteinlerin reçine gibi özel ligandlarla etkileşime girmesi sağlanmaktadır. Tutunma sağlandıktan sonra yapılan yıkama işlemi ile, safsızlıkların giderimi sağlanır ve ardından çeşitli solüsyonlar ile viral absorbant kolondan izole edilir (Merten ve ark. 2014, Ülgen İlknur Konak ve ark. 2014) (Şekil 2.15).



Şekil 2.15 Hidrofobik Etkileşim Kromatograsinin şematik gösterimi. (http://www.gelifesciences.com)

Tüm bu literatür araştırması sonucunda özetlenen bilgiler ışığında, *in vivo* gen tedavi stratejilerinde, özellikle klinik uygulamalarda kullanılabilecek lentiviral vektörlerin elde edilmesi için pürifikasyon işlemlerinin optimizasyonunun önemi ortaya çıkmaktadır. Ülkemizde gen tedavi uygulamaları ile ilgili yapılan çalışmaların önemli bir kısmı Akdeniz Üniversitesi Gen ve Tedavi Merkezi bünyesinde yürütülmektedir. Birçok farklı hastalığın tedavisine yönelik geliştirilmeye çalışılan lentiviral vektörlerin fonksiyonel ve terapötik etkinliklerinin araştırılmasının yanısıra, bu vektörlerin ileri klinik faz denemelerine geçilebilmesi için etkin ve optimize bir saflaştırma metodu geliştirilmesi gerekliliği söz konusudur. Bu bakış açısıyla; sunulan tez projesinin amacı 3. nesil lentiviral vektörlerin terapötik stratejilerde kullanılabilmesine yönelik lentiviral vektör üretimi ve pürifikasyon yöntemlerinin optimizasyonudur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hücre Kültürü

Lentivirus üretimi ve vektörlerin *in vitro* etkinlik ve titrasyonunda kullanılmak üzere hücre hatları ATCC'den tedarik edildi. Bu amaçla 293T hücreleri virus üretimi ve transdüksiyon deneylerinde kullanılırken, HT1080 hücreleri titrasyon deneylerinde ve *in vitro* transdüksiyon etkinlikleri deneylerinde kullanıldı. 293T ve HT1080 hücreleri, %10 FBS (Fetal Dana Serumu) (Biochrom, 50115) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma-Aldrich, D5648) besiyerinde çözdürüldü. Hücreler üretilip pasajlandıktan sonra, çalışmalarda kullanılmak üzere %10 DMSO (dimetilsülfoksit) (Sigma, D2650) içeren besiyeri içinde -80^0C'de dondurulduktan sonra sıvı azot tankında saklandı.

Virüs üretiminde hücre üretimi ve üretim optimizasyonu için 150 cm^2 'lik yüzey alanına sahip olan petriler kullanıldı (150 mm, CELLSTAR, Greiner). Daha büyük miktarlarda virüs üretimi gerçekleştirmek için yapılan ölçeklendirme aşamasında ise 1700 cm^2 yüzey alanına sahip olan, tırtıklı döner hücre kültürü şişeleri (Roller Bottle CELLMASTER, ribbed, Greiner) kullanıldı. Döner hücre kültürü şişeleri ile yapılan üretimde, şişelerin belirli bir hızda dönerek inkübasyonunu sağlamak için Thermo HeraCell240i CO_2 'li inkübatör kullanıldı.

3.2 Lentivirus Üretiminin Optimizasyonu

3.2.1 Vektör Üretiminde Gerekli Plazmidlerin Üretimi Ve İzolasyonu

Lentivirus üretiminde paketleme için gerekli olan faktörler için 3 farklı plazmid (pMDLg/pRRE (HIV-1 pGag-Pol 12251), Rev-Plazmid (pRSV-Rev 12253) ve pMD2.G (pVSV-G 12259), Addgene firmasından bakteri kültürü olarak tedarik edildi. *In vitro* denemelerde LV vektörlerin hücrelerdeki transdüksiyon etkinliklerinin ve ekspresyon kontrolünün takibinde reporter gen olarak RFP geni eksprese eden vektörler kullanılacağından, LV-RFP plazmidi de (Plasmid 26001) ekspresyon plasmidi olarak Addgene firmasından tedarik edildi.

Satın alınan tüm bakteriler önce selektif antibiyotik içeren LB agar (Sigma-Aldrich, L2897) petrilerde, daha sonra da büyük ölçekli sıvı besiyeri LB broth (Merck, 10285) içerisinde üretildikten sonra, Qiagen Plasmid Mega Kit İzolasyon Kiti

(Qiagen, 10083) ile bakterilerin plasmid içerikleri izole edildi. Elde edilen plazmidlerin restriksiyon enzim kesimleri ardından %1'lik agaroz (Sigma, A9539) jelde validasyonu sağlandı.

3.2.2 $CaPO_4$ Transfeksiyon Metodu

$CaPO_4$ transfeksiyonu iki farklı şekilde gerçekleştirildi. İki farklı uygulama metodunda da aynı solüsyonlar ve plazmid oranları kullanıldı. Plazmid oranları için literatürde yapılan farklı çalışmalar referans alındı. Bu doğrultuda 1 adet 150 mm'lik petri için kullanılan plazmid oranları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 %80-90 hücre doluluk oranına sahip 150 mm 'lik petrilerde yapılan transfeksiyon işleminde kullanılan plazmid oranları.

Plazmid Adı	Gereken miktar (ug)
Gag/pol	14
Rev	6
VSV-G	7,5
RFP	22,5

$CaPO_4$ transfeksiyonunda literatürden alınan protokollere uygun şekilde 0,1X Tris-EDTA (TE) solüsyonu, 2M $CaCl_2$ solüsyonu, 2X Hepes-Buffered Saline (HBS) solüsyonu ve transfeksiyonda kullanılmak üzere 2:1 oranında 0,1XTE:dH_2O karışımı hazırlandı. Solüsyonların içerdiği kimyasallar ve miktarları Tablo 3.2' de verilmiştir.

Tablo 3.2 $CaPO_4$ transfeksiyonunda kullanılan solüsyonların hazırlanışı

Solüsyon Adı	Solüsyon içeriği
Tris EDTA (1X)	10 mM TRIS, pH 8.0 1 mM EDTA, pH 8.0
$CaCl_2$	22,1 g CaCl2 100 ml ddH_2O
HBS (2X)	8 g NaCl 0,38 g KCl 0,1 g Na_2HPO_4 5 g Hepes 1 g Glukoz 500 ml ddH_2O pH 7.05

Kabarcık Yöntemi

Plazmid izolasyonu ile elde edilen 4 farklı plazmidin konsantrasyonlarına göre, Tablo 3.1'de verilen miktarları elde etmek için gerekli hacimler hesaplandı. Hesaplanan hacimde plazmidler falkon tüp içerisine eklendi. 0,1XTE:dH_2O karışımından, toplam hacim 875 ul olacak şekilde plazmidlerin üzerine eklendi. Ardından 2M $CaCl_2$'den, plazmid karışımındaki son konsantrasyonu 0,25 M olacak şekilde, 125 ul alınarak karışım 1 ml'ye tamamlandı. Ayrı bir tüpe 1 ml 2X HBS solüsyonu eklendi. Pipetör yardımıyla HBS'nin içerisine sürekli hava verilerek kabarcık oluşumu sağlandı. Bu sırada, DNA-$CaCl_2$ karışımı damla damla kabarcıkların üzerine eklendi. Son karışım 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

Vortex Yöntemi

Plazmid izolasyonu ile elde edilen 4 farklı plazmidin konsantrasyonlarına göre, Tablo 3.1'de verilen miktarları elde etmek için gerekli hacimler hesaplandı. Hesaplanan hacimde plazmidler falkon tüp içerisine eklendi. 0,1XTE:dH_2O karışımından, toplam hacim 875 ul olacak şekilde plazmidlerin üzerine eklendi. Ardından 2M $CaCl_2$'den, plazmid karışımındaki son konsantrasyonu 0,25 M olacak şekilde, 125 ul alınarak karışım 1 ml'ye tamamlandı. Ayrı bir tüpe 1 ml 2X HBS solüsyonu eklendi. HBS içeren tüp vortexin üzerine yerleştirildi. Vortex orta hızda sürekli çalıştırılarak solüsyon içerisinde sürekli bir vortex oluşumu sağlandı. Bu sırada DNA-$CaCl_2$ karışımı damla damla vortexlenen solüsyon üzerine eklendi. Son karışım 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

3.2.3 Transfeksiyon ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu

Transfeksiyon Metodu, Besiyerlerindeki FBS Oranı Ve Üretim Süresi Optimizasyonu

Yapılan iki farklı transfeksiyon metodu sonucu oluşturulan transfeksiyon kokteylleri 150 cm^2 yüzey alanına sahip petrilerde %80-90 doluluk oranındaki 293T hücrelerine ayrı ayrı eklendi. Bu aşamada hücrelere transfeksiyon besiyeri eklendi.

En verimli transfeksiyonun ve virüs üretiminin hangi koşullarda gerçekleşeceğinin belirlenmesi amacıyla 3 farklı koşulun denemesi gerçekleştirildi.

Literatürden alınan bilgiler doğrultusunda transfeksiyon işlemi için optimize edildiği ileri sürülen OPTIMEM ile hazırlanan besiyeri transfeksiyon besiyeri olarak kullanıldı. Üretim aşamasında ise DMEM besiyeri kullanıldı. Bu iki denemede de FBS oranının transfeksiyon verimi ve virüs üretimi üzerine etkisinin belirlenebilmesi için %2 ve %10 olmak üzere iki farklı oranda FBS içeren besiyerleri hazırlandı. Transfeksiyon ve üretim aşamasında bu FBS oranlarının farklı kombinasyonları kullanılarak 3 farklı koşulda üretim denemesi gerçekleştirildi.

Bu denemeler hem kabarcık hem de vortex yöntemiyle hazırlanan transfeksiyon kokteylleri için ayrı ayrı 150 mm petrilerde gerçekleştirildi. Dolayısıyla 3 farklı koşul ve 2 farklı metod olmak üzere toplamda 6 farklı deneme ile en uygun $CaPO_4$ transfeksiyon tekniğinin belirlenmesi ve aynı zamanda transfeksiyon sırasında ve sonrasında kullanılacak besiyerlerinde FBS oranının belirlenmesi hedeflendi. Bu koşullar Tablo 3.3'de özetlenmiştir.

Tablo 3.3 Kabarcık ve vortex yönteminin kullanımını takiben transfeksiyon ve üretim besiyeri içerikleri açısından değişkenlik gösteren 3 farklı koşulun detaylarını gösteren tablo.

	Transfeksiyon Besiyeri	**Üretim (Hasat) Besiyeri**
Koşul A	OPTIMEM %2 FBS , %1 Penisilin/Streptomisin	DMEM %2 FBS %1 Penisilin/Streptomisin
Koşul B	OPTIMEM %2 FBS , %1 Penisilin/Streptomisin	DMEM %10 FBS %1 Penisilin/Streptomisin
Koşul C	OPTIMEM %10 FBS , %1 Penisilin/Streptomisin	DMEM %10 FBS %1 Penisilin/Streptomisin

Bu denemelerde transfeksiyon metodu ve üretim koşullarının optimizasyonu ile birlikte optimum virüs üretim süresinin de belirlenmesi amacıyla transfeksiyonu takip eden 24. , 48. , 72. ve 96. saatte petrilerdeki RFP ışımaları takip edilerek mikroskop görüntüleri kaydedildi.

Virüs Üretim Etkinliğinin Stabilitesi Ve Yüksek Verimde Üretilebilmesi İçin Gerekli Koşulların Belirlenmesi

Deneysel olarak yapılan her bir virüs üretimi sırasında, aynı miktar hücreden aynı verimde virüs elde edilmesi için optimizasyonu yapılan transfeksiyon işleminin stabilize edilmesinde literatür çalışmalarında kullanımı yaygın olan Chloroquine transfeksiyon ajanı kullanıldı. Transfeksiyon aşamasında daha önceki denemelerde kararlaştırılan %10 FBS oranı kullanılarak, iki farklı besiyerinde Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM, Sigma Aldrich) ve OPTIMEM; Chloroquine transfeksiyon ajanının 25 uM ve 40 uM olmak üzere iki farklı konsantrasyonu denendi. Ayrıca transfeksiyon ve üretim aşamasında kullanılan modifiye besiyerlerinin virüs üretim verimine etkisinin belirlenebilmesi için IMDM ve OPTIMEM besiyerlerinin %2 ve %10 olmak üzere farklı FBS oranı içeren kombinasyonlarıyla oluşturulan; 8 farklı koşul denemesi için deney planlaması gerçekleştirildi. Bu koşullar Tablo 3.4'de özetlenmiştir. Bu durumda üretim (hasat) besiyeri olarak OPTIMEM'in kullanıldığı %10 FBS oranı ile 4; % 2 FBS oranı ile 4 olmak üzere toplamda 8 farklı üretim denemesi karşılaştırılmış oldu.

Tablo 3.4 Chloroquine transfeksiyon ajanının farklı konsantrasyonlarının; farklı transfeksiyon ve üretim besiyeri kombinasyonlarının deneme planını gösteren tablo.

	Transfeksiyon Besiyeri	**Üretim (Hasat) Besiyeri**
Koşul 1	IMDM, 25 uM Chloroquine %10 FBS , %1 Penisilin/Streptomisin	OPTIMEM %10 FBS %1 Penisilin/Streptomisin
Koşul 2	IMDM, 40 uM Chloroquine %10 FBS , %1 Penisilin/Streptomisin	OPTIMEM %10 FBS %1 Penisilin/Streptomisin
Koşul 3	OPTIMEM, 25 uM Chloroquine %10 FBS , %1 Penisilin/Streptomisin	OPTIMEM %10 FBS %1 Penisilin/Streptomisin
Koşul 4	OPTIMEM, 25 uM Chloroquine %10 FBS , %1 Penisilin/Streptomisin	OPTIMEM %10 FBS %1 Penisilin/Streptomisin
Koşul 5	IMDM, 25 uM Chloroquine %10 FBS , %1 Penisilin/Streptomisin	OPTIMEM %2 FBS %1 Penisilin/Streptomisin
Koşul 6	IMDM, 40 uM Chloroquine %10 FBS , %1 Penisilin/Streptomisin	OPTIMEM %2 FBS %1 Penisilin/Streptomisin
Koşul 7	OPTIMEM, 25 uM Chloroquine %10 FBS , %1 Penisilin/Streptomisin	OPTIMEM %2 FBS %1 Penisilin/Streptomisin
Koşul 8	OPTIMEM, 25 uM Chloroquine %10 FBS , %1 Penisilin/Streptomisin	OPTIMEM %2 FBS %1 Penisilin/Streptomisin

Yapılan tüm bu deneyler sonucunda transfeksiyon için, metot ve ajan konsantrasyonu ile, hem üretim hem de transfeksiyon aşaması sırasında kullanılacak besiyeri ve FBS oranı belirlendi.

3.2.4 Optimize Lentivirus Üretiminin Ölçeklendirilmesi

Döner Hücre Kültürü Şişelerinde Transfeksiyona Uygun Oranda Hücre Doluluk Oranının Sağlanması

Yapılan optimizasyon çalışmalarını takiben büyük ölçekte virüs üretimi için yöntemin modifiye edilerek ölçeklendirilmesi hedeflendi. Bu amaçla tek bir petride üretilen virusların döner hücre kültürü şişelerinde üretilebilmesi için öncelikle

hücrelerin döner şişelerde tutunması ve %80-90 doluluk oranına ulaşması için denemeler gerçekleştirildi. Döner hücre kültürü şişelerinde hücrelerin tutunarak büyüyebildiği yüzey alanı 1700 cm^2'dir. 150 mm'lik bir petrinin hücre yüzey alanı ise 150 cm^2'dir. Dolayısıyla 1 döner hücre kültürü şişesinde, yaklaşık olarak 12 petride üretilen sayıda hücre üretilebilmektedir. 293T hücrelerinin hücre kültürü şişelerinin yüzeyini %80-90 oranında kaplamasının ne kadar süreceğinin belirlenmesi için öncelikle tek bir flaskta transfeksiyona uygun yoğunlukta olan hücreler tripisinize edilerek sayıldı. Buna göre hücre kültürü şişelerine 200 ml DMEM besiyeri kullanılarak hücre ekimi yapıldı. Öncelikle 12 petriden tripsinize edilen hücreler döner hücre kültürü şişelerine ekilerek, 0,3 rpm ve 1 rpm olmak üzere iki farklı hızda gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün yapılan tripsinizasyon sonrasında hücrelerin %90 oranında yüzeye tutunduğu hızın belirlenmesi sağlandı. Tutunma hızı belirlendikten sonra farklı oranlarda hücre ekimi yapılan şişeler farklı hızlarda ve farklı sürelerde inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyonu takiben döner hücre kültürü şişeleri ayrı ayrı tripsinize edilerek hücre sayımı yapıldı ve 12 petriye eşdeğer hücre sayısının elde edildiği parametrelerin belirlenmesi sağlandı (Tablo 3.5).

Tablo 3.5 Döner hücre kültürü şişelerine yapılacak hücre ekimi oranları ile farklı denemelerdeki dönme hızı/inkübasyon süresini gösteren tablo.

	Ekilen Hücre Sayısı	**Dönme Hızı/inkübasyon süresi**
1.deneme	2 petri (40 * 10^6 hücre)	0,3 rpm / 48 saat
2.deneme	3 petri (60 * 10^6 hücre)	0,3 rpm / 48 saat
3.deneme	4 petri (80 * 10^6 hücre)	0,3 rpm / 48 saat
4.deneme	4 petri (80 * 10^6 hücre)	0,3 rpm / 24 saat 1 rpm / 24 saat
5.deneme	4 petri (80 * 10^6 hücre)	0,3 rpm / 24 saat 1 rpm / 16 saat

Döner Hücre Kültürü Şişelerinde $CaPO_4$ Transfeksiyonuyla Lentivirus Üretimi

Daha önce petrilerde optimize edilen koşullar kullanılarak döner hücre kültürü şişelerinde $CaPO_4$ transfeksiyonu işlemiyle RFP genini kodlayan 3.nesil HIV tabanlı lentiviral vektör üretimi gerçekleştirildi. Tek petride transfeksiyon işlemi için kullanılan oranlar petri/hücre sayısı bazında hücre kültürü şişelerine uyarlandı. Bu doğrultuda her bir hücre kültürü şişesinin yüzey alanı 12 petrinin kapladığı yüzey alanına eş değer olduğundan, kullanılan tüm solüsyonlar 12 ile çarpılarak miktarlar belirlendi. Bu oranlar ve plazmid izolasyonu sonrasında elde edilen konsantrasyonlara göre örnek hacim hesaplamaları Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6 $CaPO_4$ transfeksiyonunda kullanılmak üzere gerekli plazmid miktarları ve kullanılan hacim için örnek hesaplamalar.

Plazmid Adı	Gereken miktar	Konsantrasyon (İzolasyon sonucunda) ug/ul	Kullanılacak hacim (ul)
Gag/pol	176	3.02	58
Rev	68	2.9	24
VSV-G	95	5.4	18
RFP	270	3.1	87

Üretim öncesinde 293T hücreleri üretime yetecek miktarda 15 cm büyüklüğündeki petrilerde üretilip pasajlandı. Yapılan optimizasyon çalışmasına göre 4 petriden yapılan ekim sonrasında; döner şişeler hücrelerin tutunması için 24 saat 0,3 rpm devirde, hücre tutunması gerçekleştikten sonra ise 16 saat süreyle 1 rpm devirde döndürüldü. 293T hücreleri hazır hale getirildikten sonra transfeksiyon işlemi, %10 FBS (Biochrom, 50115) içeren IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (Sigma, I7633) içerisinde gerçekleştirildi. IMDM besiyerine, transfeksiyon ajanı Chloroquine (Sigma, C6628) son konsantrasyonu 25 uM olacak şekilde ilave edilip, hücreler 30 dakika boyunca 0,3 rpm devirde döndürüldü. Bu esnada, izolasyonları yapılan plazmidlerin konsantrasyonları göz önünde bulundurularak, Tablo 3.6'da çerçeve ile belirtilen miktarları karşılayacak şekilde hesaplandı. Her bir plazmid gerekli hacimde alınıp, falkon şişelerde birleştirildi. Ardından toplam hacim 10500 uL olacak şekilde yeterli miktarda 0,1X TE : dH_2O solüsyonu ile tamamlandı. Üzerlerine son konsantrasyonu 0.25 M olacak şekilde, 1.5 mL 2M $CaCl_2$ solüsyonu eklenerek, son hacim 12 mL'ye tamamlandı. Farklı bir falkon şişedeki aynı miktarda (12 mL) 2X Hepes Buffered Saline (HBS) solüsyonu üzerine, plazmid ve $CaCl_2$ karışımı kabarcık yöntemi ile uygulanarak, damla damla aktarıldı. Bu işlem her bir döner şişe için ayrı ayrı tekrarlandı. Plazmidlerin yüzey nötralizasyonunun sağlanması için son karışım 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübatörden çıkarılan döner şişelerin üzerine, bu karışımın tamamı damla damla ilave edildi. Tekrar inkübatöre konulan döner şişeler, 8 saat süresince 0,3 rpm hızda, 37^0C de inkübe edildi. Hücrelerde transfeksiyon işleminin gerçekleşmesi için döner hücre kültürü şişeleri, 8 saat inkübasyon ardından Chloroquine içeren besiyerinden uzaklaştırılıp, transfeksiyonu takiben 72. Saat dolana kadar %10 FBS (Biochrom, 50115) içeren OPTIMEM (Gibco, 26600134) besiyerinde 1 rpm hızda döndürülmeye devam edildi.

Hasat zamanı geldiğinde (72 saat sonra), virus içeren süpernatantlar toplandı, kabaca ön saflaştırma amacıyla, kısa süreli düşük hızda (2000 xG, 15 dk) santrifügasyon ve 0,45 um porlu vakum filtrelerle filtrasyon işlemi gerçekleştirildi.

UV ile sterilizasyonu gerçekleştirilmiş ultrasantrifüj tüplerine 30 mL hacminde süpernatantlar eklendi. Üzerlerine gradient farkı oluşturmasının yanı sıra kültür bazlı safsızlıkların (plazma membranı, serum komponentleri, debris vs.) giderimine yardımcı olan sükroz yatak yöntemi için, %10 sükroz solüsyonundan 5 mL eklendi. Ardından konsantrasyon işlemi için ultrasantrifüj cihazında (Beckman Coulter, Optima L-90 K, 365670) uygun rotor (Beckman SW28, 342204) başlıkla 25000 rpm hızda, 4^0C de 2.5 saatlik ultrasantrifugasyon yapıldı. Ultrasantrifüj sonrasında tüplerin dibine çöken pellet halindeki konsantre viruslar, süpernatantlarından uzaklaştırılarak, daha sonraki deneylerde vektör stabilizasyonunun denenmesi adına Phosphate Buffered Saline (PBS) ve Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) solüsyonlarında resüspanse edilip, -80^0C de ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere depolandı.

3.3 Saflaştırma Yöntemleri

Alt akım işlemleri alternatiflerinin ilkinde, ultrasantrifügasyon için üretimi ve ön konsantrasyon işlemi gerçekleştirilmiş lentiviral vektörlerin süpernatantı, yukarıda bahsedildiği gibi, yüksek hıza dayanıklı ultrasantrifüj tüplerine aktarılıp, sükroz yatak yöntemi ile Beckman Coulter Optima L-90 K cihazında Beckman SW28 rotoru kullanılarak, ultrasantrifüjlendi. Ultrasantrifüj sonrasında PBS ve HBSS içerisinde bir gün süreyle bekletilen virus pelletlerinin resüspansiyonunun ardından lentiviruslar *in vitro* çalışmalarda kullanılmak üzere alikotlanarak -80 °C'de saklandı.

İkinci alternatif pürifikasyon işlemi olan kromatografi temelli pürifikasyon için ön saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiş LV vektörlerin süpernatantı, optimum değerleri bulmak adına farklı süre ve miktardaki Benzonaz endonükleaz (Thermo Pierce Universal Nuclease for Cell Lyzis, 88700) ile muamele edilerek genomik DNA'dan uzaklaştırıldı ve ardından anyon değişim kromatografi (AEX) kolonu (HiTrap Q HP, 17-1153-01, GE Healthcare Inc.), tuz giderim (desalting) kolonu (SP Sephadex C25, 17-0230-01, GE Healthcare Inc.) ve son ürün kalitesini arttırıcı ek basamak için polishing kolonu (HiTrap Captocore 700, 17-5481-51, GE Healthcare Inc.); peşpeşe kullanılarak saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Tablo 3.7'de kolonlara ait bazı

fizikokimyasal özellikler belirtilmektedir. Tüm kromatografik işlemlerde ÄKTA Purifier UPC 10 (18-1119-48 AF, GE Healthcare Inc.) saflaştırma cihazı kullanıldı.

Tablo 3.7 Kromatografik pürifikasyonda kullanılan değişik tipte kolonların bazı fizikokimyasal özellikleri.

	HiTrap Q (AEX)	SP Sephadex C25 (tuzdan arındırma)	HiTrap Captocore 700 (parlatma)
Matrix	%6 küresel çapraz-bağlı agaroz	Çapraz bağlı dekstran	Sıkı çapraz bağlı agarose
Kolon Boyutları	0.7 x 2.5	1.4 x 5	0.7 x 2.5
Hacim (mL)	1	5	1
Akış hızı (mL/dk)	1.0	5	1
Max. basınç (MPa)	0.5	1	0.3
Saklama Koşulları	%20 etoH	%20 etoH	%20 etoH

Saflaştırma işlemlerinin kromatografi basamağında, optimize edilmesi gereken birçok parametre olduğundan, tampon konsantrasyonları, pH ve besleme hızlarında yapılan değişikliklerle optimum pürifikasyon koşullarını saptamaya yönelik çalışıldı. AEX için optimum besleme hızı 1 mL/dk, optimum solüsyon pH değerleri 7.5 ve dengeleme (equilibration) tampon 100 mM TRIS ile elüsyon tamponu 100 mM TRIS + 1M NaCl olarak belirlendi. Desalting ve polishing için optimum değerler tabloda belirtilmiştir (Tablo 3.8).

Tablo 3.8 Kromatografik pürifikasyon işlemleri için farklı kolon tiplerinde optimum olarak belirlenen besleme parametreleri ile solüsyon özellikleri.

	Akış Hızı (mL/dk)	Tampon Konsantrasyonu	pH
AEX	1	EQ: 100 mM Tris EL: 100 mM Tris/1 M NaCl	7.5
Desalting	5	1X PBS	7.5
Polishing	1	1X PBS	7.0

Belirlenen optimum koşullar altında gerçekleştirilen bir çalışmadan, lineer gradient elüsyonu ile yürütülen AEX sonucu elde edilen virus pikine karşılık toplanan virus örneği, tuz giderimi için desalting kolon ve son ürün kalitesini arttırıcı ek basamak için Captocore 700 kolonundan geçirildi. Bu işlemler daha önce bahsedildiği gibi hem PBS hem de HBSS solüsyonları içerisinde resüspanse edilip dondurulan virus örnekleri için ayrı ayrı gerçekleştirildi.

3.4 Transdüksiyon ajanı seçimi

Her iki metot ile saflaştırılması yapılan vektörlerin her birinin viral partikül içeriklerinin belirlenmesi amacıyla HT1080 hücreleri transdükte edildi. Transdüksiyon işlemi için 24-kuyulu petrilere 100.000 hücre/kuyu oranında hücre ekimi yapıldı. Hücre ve virion yüzeyinde yük nötralizasyonu yaparak, transdüksiyon etkinliğini arrtırma özelliğine sahip transdüksiyon ajanlarından hangisinin kullanılacağına karar vermek için Polybrene ve Protamine sulfate kulanılarak viral transdüksiyon yapıldı. Virus örnekleri artan hacimlerde (1 uL, 2 uL, 4 uL ve 8 uL) iki farklı ajan eşliğinde HT1080 hücrelerine verildi. Hücreler 24 saat boyunca 37^0 C, %5 CO_2'li etüvde inkübe edildi. 24 saatin ardından transfeksiyon ajanı ve virus içeren besiyeri uzaklaştırılıp, hücrelere taze DMEM eklendi. LV vektörle transdükte edilen HT1080 hücreleri 48 saat daha 37^0 C de inkübe edildi. Transdükte hücrelerde RFP ışıması gözlenerek daha etkin transdüksiyon ajanı belirlendi.

3.5 Enfeksiyöz Viral Titrenin Hesaplanması

Ultrasantrifüj ve kromatografi ile saflaştırılan virus örneklerininde titrasyonun belirlenmesi içn HT1080 hücrelerine transdüksiyon gerçekleştirildi. Transdüksiyon etkinliğini neredeyse 100-1000 kat artıran bir transdüksiyon ajanı olan polybrene (hekzadimetrin bromid) (Sigma, 107689) 1/1000 oranında seyreltilerek, son konsantrasyonu 6 ug/mL olacak şekilde kullanıldı. Virus örnekleri artan hacimlerde (1 uL, 2 uL, 4 uL ve 8 uL) HT1080 hücrelerine polibren ve besiyeri eşliğinde verildi. Hücreler 24 saat boyunca 37^0 C, %5 CO_2'li etüvde inkübe edildi. 24 saatin ardından polibren ve viruslu besiyeri uzaklaştırılıp, polibrensiz DMEM ile değiştirildi. LV vektörle transdükte edilen HT1080 hücreleri 48 saat daha 37^0 C de inkübe edildi.

Süre sonunda besiyerleri uzaklaştırılan hücrelere 200 uL/kuyu hacminde hücre liziz tamponu verilerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Örneklerin her biri ayrı tüplere alınarak, buz üzerinde kantitatif PCR için bekletildi. Örneklerdeki viral genomun kantitatif analizi için; WPRE primeri (Fwd: 5'-CCGTTGTCAGGCAACGTG-3'; Rev:5'-AGCTGACAGGTGGTGGCAAT -3') ve internal kontrol için Albumin primeri (Fwd: 5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3' ; Rev:5'- ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC-3') kullanıldı. Standart grafiği ise farklı dilüsyonlardaki Albumin ve WPRE primerleri kullanılarak belirlendi. Toplam reaksiyon hacmi 25 uL olacak şekilde deney planlandı. İleri ve geri primerlerin son konsantrasyonları 0.03 uM olacak şekilde hesaplama yapıldı. Tüm örnek ve

standartlardan 8 uL hacimde deney karışımı, Quantitech SYBR Green PCR Kit (Qiagen, 204143) ile ABI 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems Inc.) cihazına yüklendi.

Reaksiyon bitiminde hem WPRE hem de Albumin örnekleri için Ct değerleri kaydedildi. Örnekler ve standartlar için $2^{-\Delta Ct}$ değerleri hesaplandı. Kalibrasyon eğrisi x eksenine $2^{-\Delta Ct}$ ve y eksenine bilinen Albumin plazmidinin kopya sayısı yazılacak şekilde elde edildi. Eğim çizginin eklenmesi ile elde edilen denklemden yola çıkarak, her bir reaksiyon için genoma entegre kopya sayısı hesaplandı. Elde edilen bu sayılar toplam reaksiyon hacmi olan 8'e bölünüp, mikrolitredeki kopya sayısı elde edildi. Her kuyudaki 100.000 hücreden elde edilen toplam lizat hacmi 200 uL olduğundan, bulunan değerler 200 ile çarpılıp, verilen virus miktarlarına bölündü. Mikrolitredeki her bir hücre için viral kopya sayısı, bu değerlerin 100.000'e bölünmesiyle hesaplandı. Böylelikle her bir mikrolitredeki virusun transfeksiyoz ünitesi (TU/uL) elde edildi.

3.6 LV Vektörlerin Lentiviral Partikül Sayısının Hesaplanması

Her iki metot ile saflaştırılan ve saflaştırılmayan vektörlerin her birinin lentiviral partikül içeriklerinin ve Multiplicity of Infection (MOI) miktarlarının belirlenmesi amacıyla, HIV p24 protein ELISA Testi (Quicktiter HIV Lentivirus Quantitation Kit, Cell Biolabs, VPK-108-H) yapıldı. Kitin içerdiği protokol uygulanarak, standartlar ve örnekler uygun dilüsyonlarda hazırlanıp, herbirinden 225 uL alınıp, 25 uL TritonX-100 Buffer (Sigma, T8632) ile karıştırıldı. 37^0 C de 30 dakika inkübasyon ile virus inaktivasyonu sağlandı. Ardından 96-kuyulu petrilerde kuyu başına örnek ve standartların her birinden 110 uL eklendi, kör kuyusuna PBS eklendi. Gece boyunca $+4^0$C de inkübasyona bırakıldı.

Ertesi sabah kuyuların sıvı içerikleri uzaklaştırıldıktan sonra, bir kaç kere yıkama yapılıp, FITC-konjuge anti-p24 monoklonal antikor dilüsyonları eklendi. Örnekler oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda yine yıkama işlemi gerçekleştirilip, kuyulara HRP-konjuge anti-FITC monoklonal antikor eklenip, 1 saat oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübasyon yapıldı. Ardından yıkama işlemini takiben substrat solüsyonu eklenip, çalkalayıcı üzerinde mavi renk oluşumu gözlendi.

Kuyularda artan p24 konsantrasyonuna bağlı olarak, daha koyu renkte mavi renk gözlemlendi. Reaksiyonu durdurmak için tüm kuyulara kitle beraber gelen durdurucu tampon eklendi. Hemen ardından 450 nm dalga boyunda Thermo Multiskan Spektrum cihazı ile absorbans okuması yapılarak, optik dansite (OD) değerleri kaydedildi.

Sonuçların analizi için standard kuyularının OD değerleri y eksenine, konsantrasyonları x eksenine gelecek şekilde yazılıp, standart grafiği elde edildi. Eğim çizgisinin eklenmesi ile elde edilen denklemde, y değeri yerine örneklerden okunan absorbans değerleri konularak x değerleri hesaplandı. Hesaplanan konsantrasyon değerleri, dilüsyon faktörleri ile çarpıldı ve örnekteki p24 miktarı ng/mL cinsinden elde edildi. Farklı dilüsyonlardan elde edilen değerlerin ortalaması alınıp, p24 miktarları belirlendi ve bu değerler virus stok miktarları ile çarpılarak toplam virus titresi belirlendi. 1 ng p24 = 1.25 * 10^7 LP olduğundan, elde edilen p24 miktarı 1.25 * 10^7 ile çarpılıp, her bir örneğin Lentiviral partikül sayısı belirlendi. Böylece süpernatant, ultrasantrifüjle konsantre edilen virus ve kromatografi ile saflaştırılan virus ürünlerinin farklı hacimlerde elde edilmelerine rağmen, aynı MOI miktarına sahip olabilecekleri şekilde miktar tayinleri yapıldı.

3.7 LV Vektörlerin Fonksiyonel Analizleri

In vitro koşullarda farklı konsantrasyonlardaki LentiRFP viruslarıyla transdükte edilen hücrelerde gen ekspresyonlarının doğrulanması için, HT1080 hücrelerindeki RFP ışımaları Olympus IX-81 floresan mikroskopu ile görüntülenerek kaydedildi. Ayrıca beyaz ışık altında hücre morfolojileri de görüntülenerek kaydedildi.

3.8 LV Vektör Transdüksiyonunun Hücre Canlılığına Etkisinin Analizi

Lentiviral vektörlerle transdüksiyonun hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etki gösterip göstermeyeceğinin belirlenmesi için MTT Hücre Büyüme Kiti (Merck Millipore, 475989) kullanıldı. 96-kuyulu petrilere 30.000 hücre/kuyu miktarında ekilen HT1080 hücrelerine yapılan virus transdüksiyonu sonrasında, 3. gün MTT testi yapıldı. Her bir kuyuda 100 uL besiyerine 20 uL MTT solüsyonu eklenip, hücreler 4 saat boyunca 37^0C de karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda besiyeri uzaklaştırılan hücrelere formazan oluşumunu sağlamak için 100 uL DMSO eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirildi. MTT testi sonucunda oluşan kolorimetrik reaksiyonun absorbans ölçümü 595 nm dalga boyunda, Thermo

Multiskan Spektrum cihazı ile tayin edildi. Canlı hücreler metabolik aktiviteleri sayesinde MTT substratını formazana dönüştürme yeteneğine sahip olduğundan, daha yüksek canlılık olan kuyularda daha yüksek absorbans ölçümü kaydedildi. Bu doğrultuda virus transdüksiyonunun hücre canlılığı üzerindeki etkisi test edildi.

3.9 Saflaştırılan LV Vektörlerin Protein İçeriklerinin Analizi

LV vektörlerin üretimi ardından ultrasantrifüj ve kromatografik pürifikasyon işlemleri sonucunda, safsızlık gideriminin miktar tayini için, Bradford Protein Kolorimetrik Assay Kit (Biorad, 5000002, 10 ug/mL hassasiyet) ile hiçbir saflaştırma işlemi uygulanmamış supernatant, ultrasantrifüj sonrası elde edilen örnek ve kromatografi ürünü virusların toplam protein miktarları belirlendi. Bradford Assay Kitin standart grafiği için kitle beraber gelen stok Bovine Serum Albumin (BSA) ve virus üretiminde kullanılan süpernatantın bulunduğu OPTIMEM besiyeri kullanıldı. BSA'nın son konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde sulandırılıp, 96-kuyulu petriye farklı hacimlerde eklendi. Üzerine 100 uL Bradford ajanı eklendi. Aynı işlem OPTIMEM besiyeri ile de yapıldı. US ve kromatografi örnekleri de 3 tekrarlı olacak şekilde, farklı hacimlerde kuyulara konulduktan sonra, Bradford ajanı eklenip, tüm kuyularda 595 nm dalga boyunda Thermo Multiskan Spektrum cihazı ile absorbans okuması gerçekleştirildi.

Standart kuyularının OD değerleri belirlendikten sonra kör kuyusunun OD'si bu değerlerden çıkarılarak x eksenine, kuyulara konulan örnek hacimleri ise y eksenine gelecek şekilde bir grafik elde edildi. Bu grafikten yola çıkarak elde edilen eğilim çizgisinin denkleminde, y/x oranı hesaplanarak, mikrolitredeki miligram protein miktarları tespit edildi.

Bradford Protein Assay Kit sonucunun hesaplamaları ile elde edilen protein miktarları ile, aynı miktarda protein içeren farklı örneklerin, Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) analizi için %10'luk jele yüklenmesi gereken örnek hacimleri belirlendi.

Daha önce bahsedildiği gibi hem PBS hem HBSS de resüspanse edilen örneklerin, pürifikasyondan sonraki protein içeriklerini belirlemek için Bradford Protein Assayden sonra, SDS-PAGE analizi için jele yüklenerek, Commassie Blue (Biorad, Commassie Brilliant Blue R-250, 161-0436) boyaması yapıldı.

%10’luk jel hazırlanıp, dikey elektroforez tankına alındıktan sonra, uygun hacimlerdeki örnekler ß-merkaptoetanol içeren yükleme boyasıyla birlikte jelin kuyucuklarına yüklendi. Yaklaşık 5 saat boyunca 150 V’da yürütme yapıldı. Ardından boyadan arındırma tamponunda bekletilen jellerde, marker boyaya göre örnek proteinleri belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Vektör Üretiminde Kullanılacak Plazmidlerin İzolasyon Ardından Doğrulanması

Lentivirus üretiminde paketleme için gerekli olan faktörler için 3 farklı plazmid pMDLg/pRRE (HIV-1 pGag-Pol 12251), Rev-Plazmid (pRSV-Rev 12253) ve pMD2.G (pVSV-G 12259), bakteri kültürü olarak tedarik edilirken, *in vitro* denemelerde LV vektörlerin hücrelerdeki transdüksiyon etkinliklerinin takibinde ve ekspresyon kontrolünde reporter gen olan RFP geni eksprese eden vektörler, LV-RFP plazmidi (Plasmid 26001) olarak Addgene firmasından tedarik edildi. Bakteriler önce selektif antibiyotik olarak ampisilin içeren LB agar petrilerde, daha sonra da büyük ölçekli sıvı besiyeri LB broth içerisinde üretildikten sonra, Qiagen Plasmid Mega İzolasyon Kiti ile bakterilerin plasmid içerikleri izole edildi.

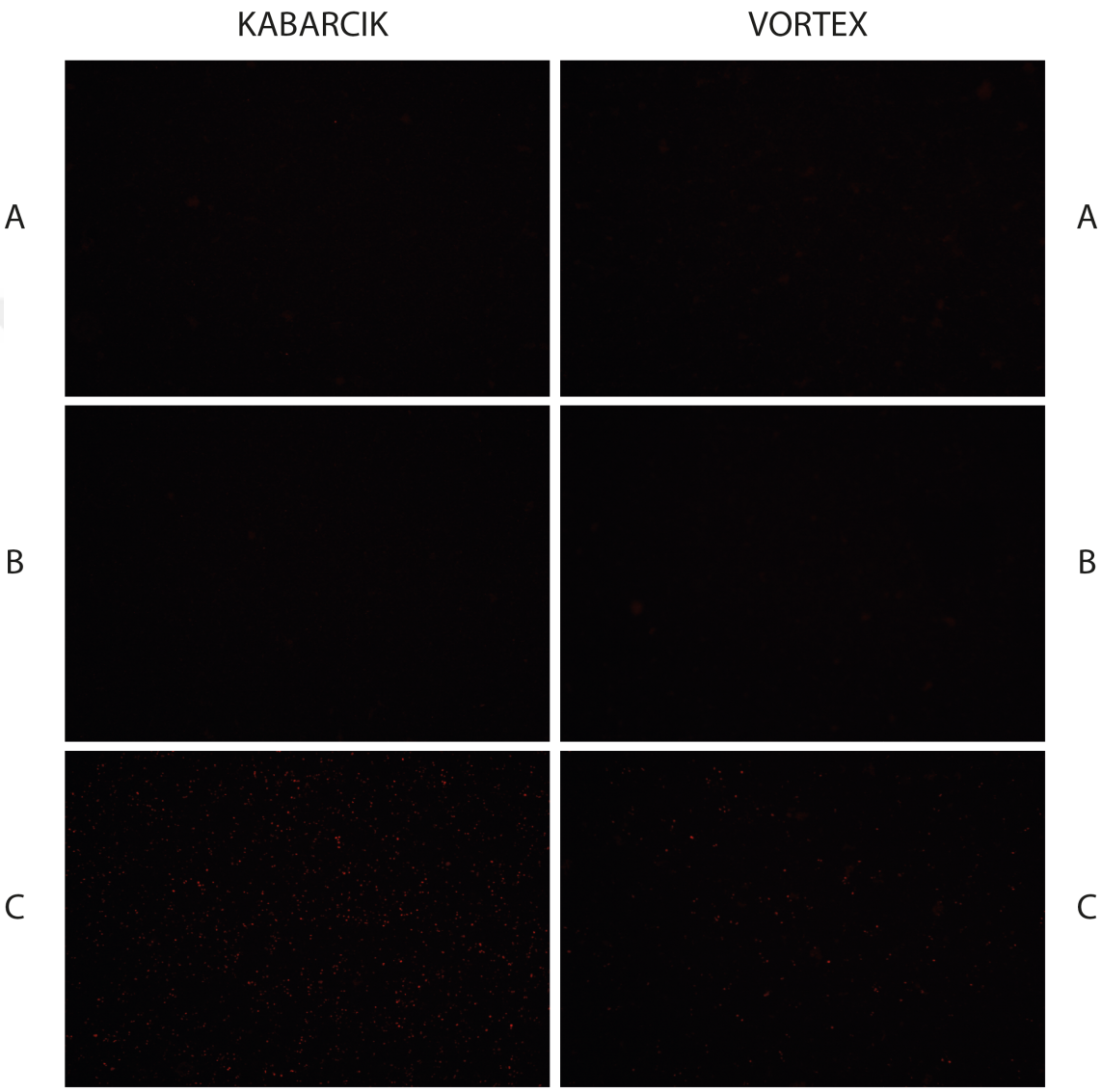
Transfeksiyon işlemine geçmeden önce, izole edilen plazmidlerle iyi bir saflaştırma yapıldığının doğrulanması için restriksiyon enzim kesimleri yapılıp, agaroz jel elektroforezinde bant görünümlerine bakıldı. Her üç paketleme plazmidi ve ekspresyon plazmidinin, restriksiyon enzim kesimleri sonucu elde edilen bantlarının, plazmidlerin literatür bilgileri ve veri listesiyle (Stabell ve ark. 2016) eşleştiği görüldü.

4.2 Değişen Parametrelerle Yapılan Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

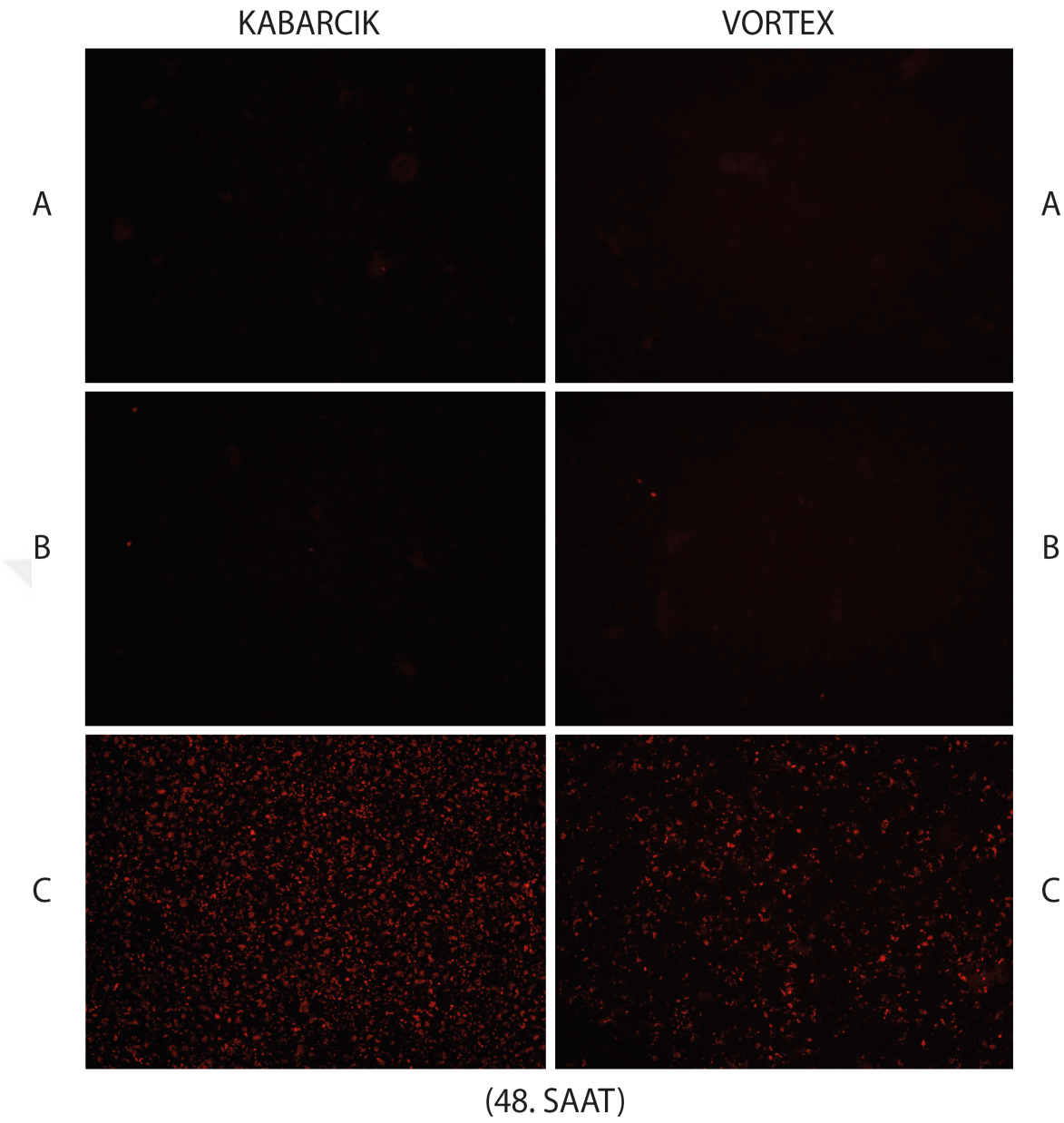
4.2.1 Kabarcık Ve Vortex Yönteminin Karşılaştırıldığı, 3 Farklı Koşulda Üretim Optimizasyonun Yapıldığı Denemelere Ait Bulgular

$CaPO_4$ transfeksiyonu, çok sayıda plazmidle yapılan virüs üretimlerinde kullanılan geleneksel bir yöntem olmakla birlikte transfeksiyon esnasında plazmidlerin bir araya getirilerek fosfat bağlarının kurulmasına yardımcı olmak için farklı teknikler kullanılmaktadır. Bunlardan en bilinen iki tanesi kabarcık yöntemi ve vortex yöntemidir. Literatürde metodolojik olarak her iki yöntemle ilgili protokoller doğrultusunda en verimli lentivirus üretimini gerçekleştirmek adına bu iki tekniğin karşılaştırılması sonucunda kabarcık yönteminin daha etkin transfeksiyon sağladığı belirlendi. Bununla birlikte, transfeksiyon aşamasında kullanılan sıvı besiyerleri ve bu besiyerlerinin içeriklerinde yapılan değişikliklerin transfeksiyon etkinliği üzerindeki etkisi, 3 farklı koşulda hem kabarcık hem de vortex yöntemi ile

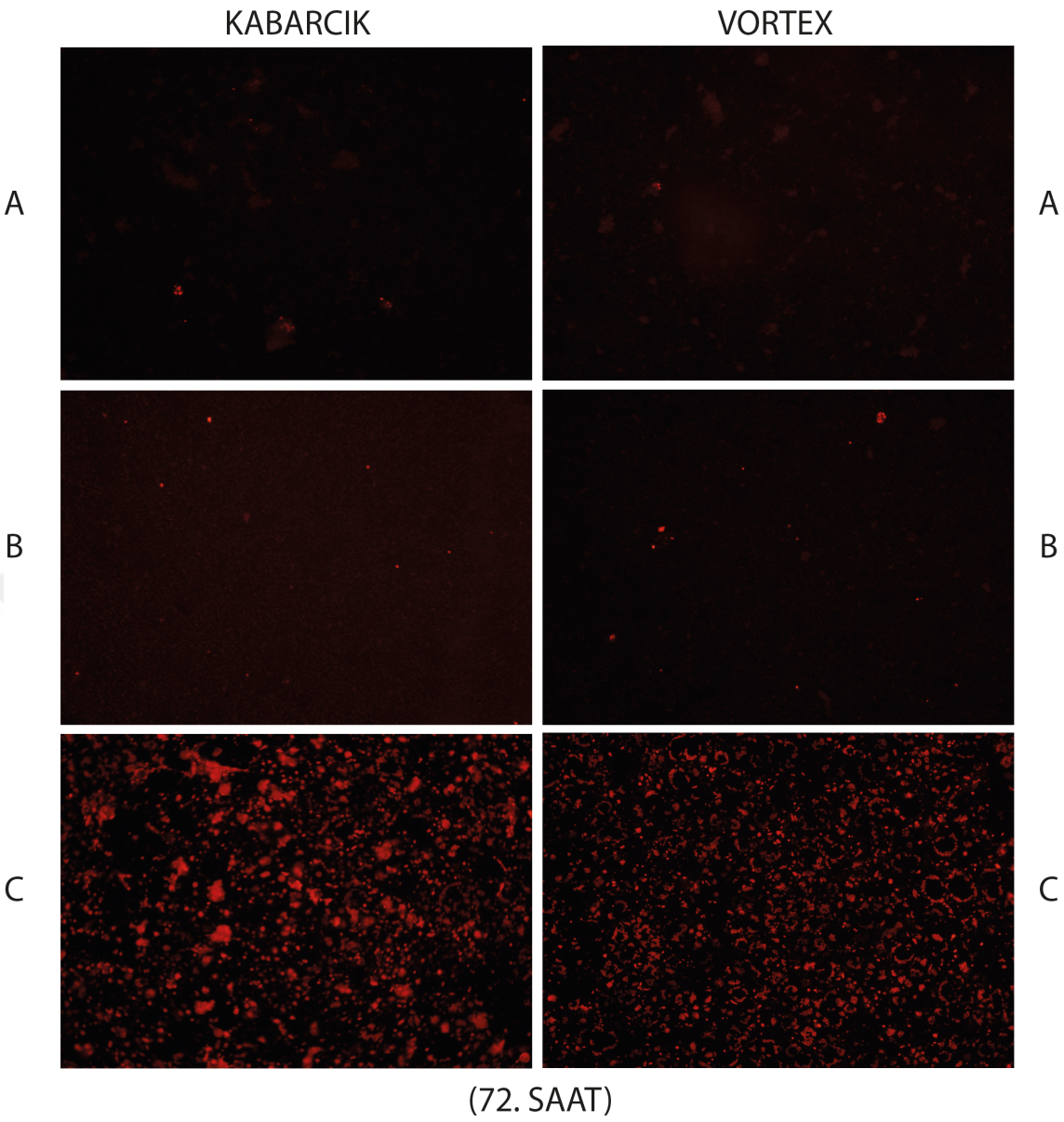
transfeksiyon yapılan örneklerdeki RFP ışımalarının takibiyle belirlendi. Ek bir parametre olarak ise, transfeksiyonu takiben ne kadar süre sonra virusların hasat edilmesinin uygun olduğunun belirlenmesi doğrultusunda; transfeksiyonu takiben 24., 48., 72. ve 96. saatlerde petrilerdeki RFP ışımaları görüntülenerek kaydedildi (Şekil 4.1).



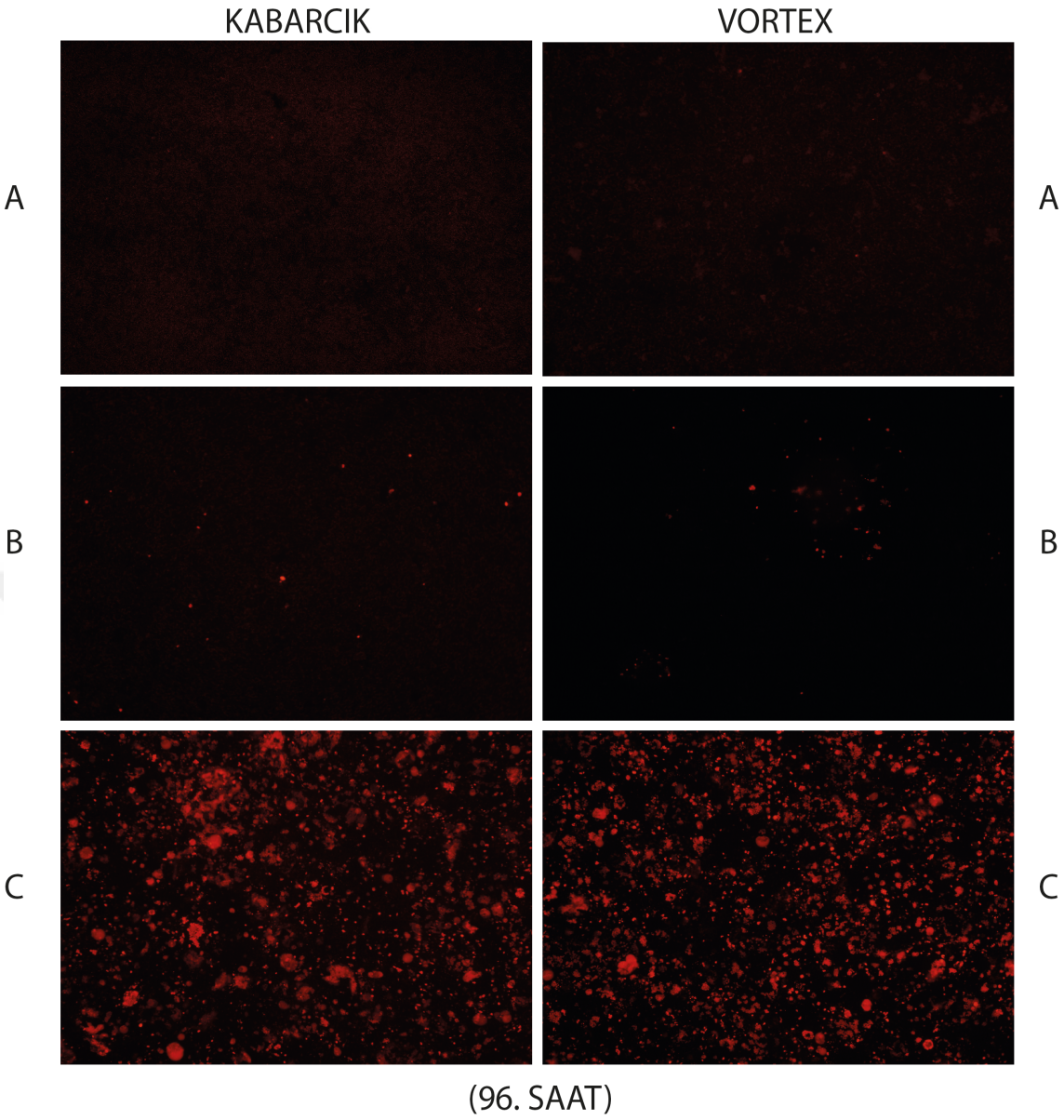
Şekil 4.1 (a) Kabarcık ve Vortex yöntemi ile yapılan 3 farklı koşuldaki transfeksiyon işleminden 24 saat sonra 293T hücrelerinde lentiviral üretime bağlı RFP ışımaları. (A,B ve C panelleri Tablo 3.3.'de verillen koşulları ifade etmektedir.)



Şekil 4.1(b) Kabarcık ve Vortex yöntemi ile yapılan 3 farklı koşuldaki transfeksiyon işleminden 48 saat sonra 293T hücrelerinde lentiviral üretime bağlı RFP ışımaları. (A,B ve C panelleri Tablo 3.3.'de verillen koşulları ifade etmektedir.)



Şekil 4.1 (c) Kabarcık ve Vortex yöntemi ile yapılan 3 farklı koşuldaki transfeksiyon işleminden 72 saat sonra 293T hücrelerinde lentiviral üretime bağlı RFP ışımaları. (A,B ve C panelleri Tablo 3.3.'de verillen koşulları ifade etmektedir.



Şekil 4.1 (d) Kabarcık ve Vortex yöntemi ile yapılan 3 farklı koşuldaki transfeksiyon işleminden 96 saat sonra 293T hücrelerinde lentiviral üretime bağlı RFP ışımaları. (A,B ve C panelleri Tablo 3.3.'de verillen koşulları ifade etmektedir.

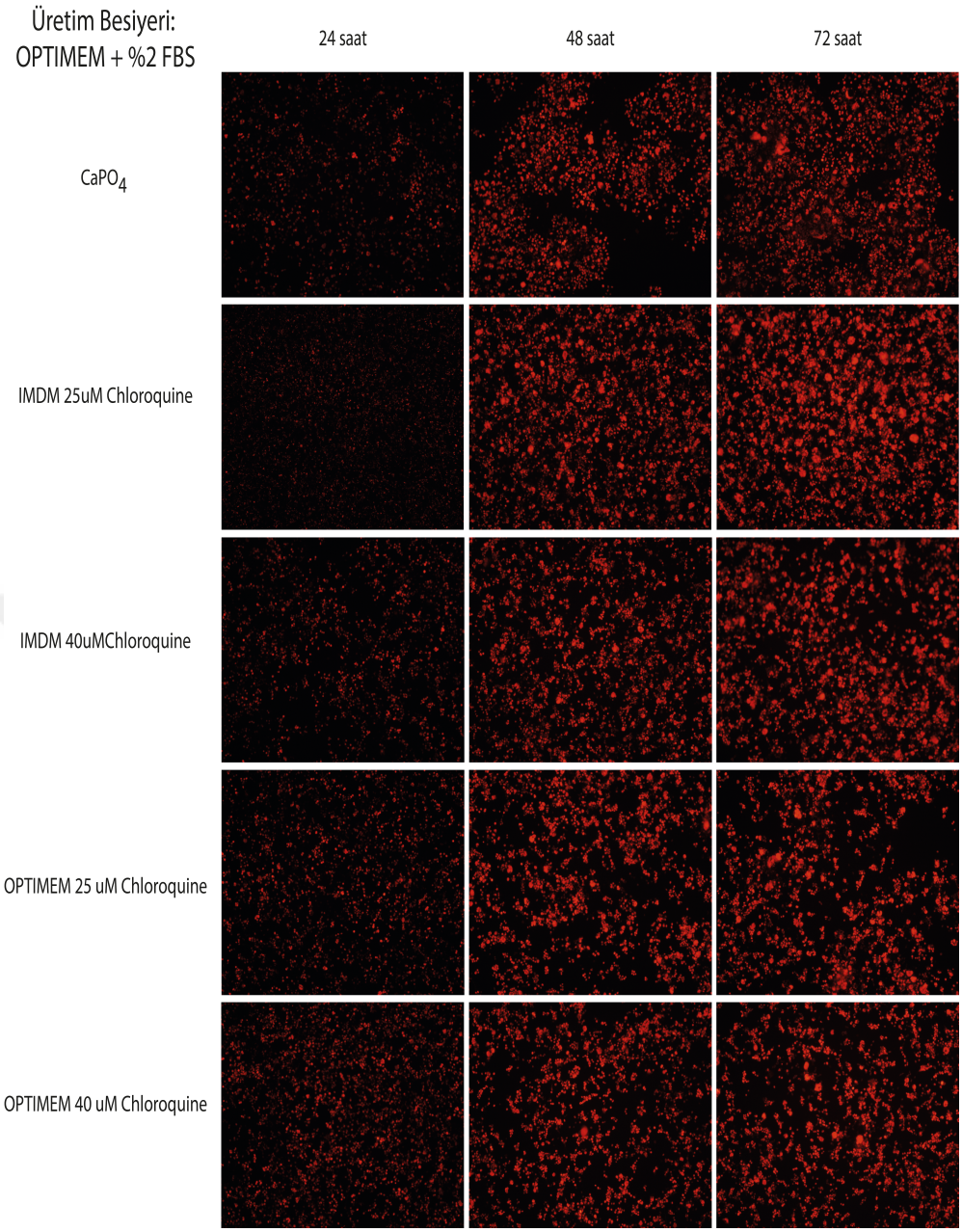
Şekil 4.1'deki bulgulara göre, her 3 koşul için de kabarcık ve vortex yöntemi karşılaştırıldığında, kabarcık yöntemi ile çok daha etkin bir transfeksiyon gerçekleştirilebildiği gözlendi. 3 farklı koşulun etkisi incelendiğinde, transfeksiyon aşamasında %2 FBS oranına sahip OPTIMEM besiyerinin kullanıldığı şartlarda (Koşul A ve B) etkin bir transfeksiyon ve belirgin bir RFP ışıması gözlenmezken, %10 FBS kullanılan şartlarda daha etkin bir transfeksiyon gerçekleştirilebildiği belirlendi. Lentivirus üretiminin en verimli olduğu sürenin saptanması amacıyla 24., 48., 72. ve 96. saatteki RFP ışımaları incelendiğinde; 72. saate kadar zamanla artan oranda RFP ışıması olduğu gözlendi. Ancak 72. ve 96. saatte alınan bulgular karşılaştırıldığında RFP ışımaları arasında belirgin bir fark olmadığı gözlendi.

Bu bulgular doğrultusunda, 150 mm petrilerde 293T hücrelerine $CaPO_4$ transfeksiyonu için, kabarcık yönteminin kullanılmasına karar verildi. En iyi RFP ışımasının gözlendiği üretim koşulu (Tablo 3.3.C) olarak transfeksiyon aşamasında %10 FBS içeren OPTIMEM; üretim sırasında ise %10 FBS içeren DMEM besiyerinin kullanılmasına karar verildi. Bununla birlikte süre optimizasyonu açısından bakıldığında, 72 saat ile 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda, RFP ışımalarında kayda değer bir artış gözlenmemiştir. Bu sebeple, inkübasyon süresinin bir gün daha fazla olmasının üretim verimi açısından hiçbir etkisi olmayacağı düşünüldüğünde, 72 saatin optimum süre olduğuna karar verilmiştir.

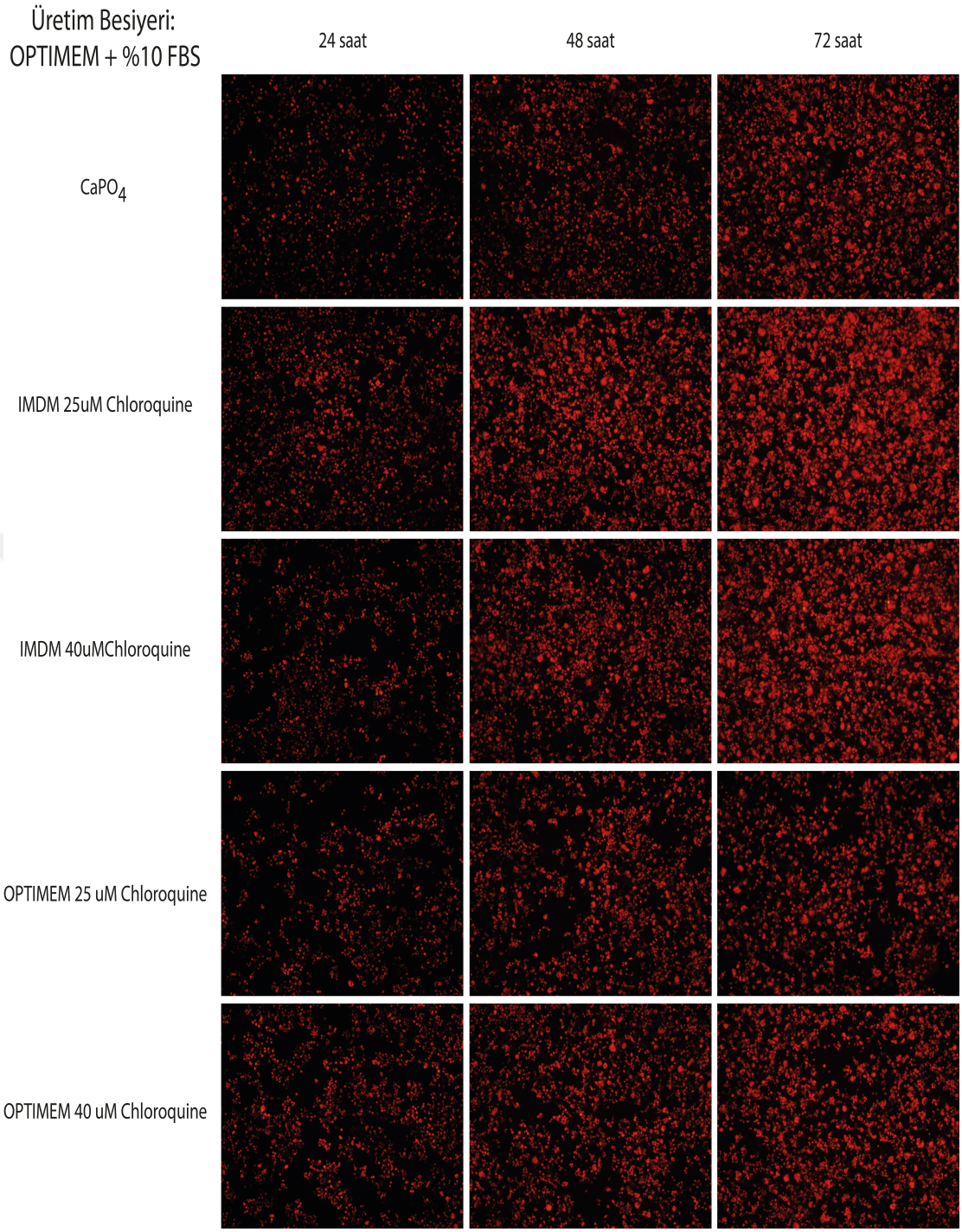
Bu koşullarda en iyi görünen yöntem seçilmiş olmakla beraber, transfeksiyon ve üretim koşullarının daha iyi optimize edilmesi ve stabil olarak her üretimde aynı verimin alınabilmesi için ileri optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.

4.2.2 Transfeksiyon Ve Üretim Koşullarının İleri Optimizasyon Çalışmaları

RFP vektörü ile yapılan teknik metot, süre ve FBS oranı optimizasyonunun ardından; $CaPO_4$ transfeksiyon işleminin her uygulamada stabil olmaması ve her uygulamada farklı üretim verimleri elde edilmesi nedeniyle protokolün standardizasyonu için Chloroquine isimli transfeksiyon ajanının kullanımına karar verildi. Bu amaçla belirlenen DNA oranları değiştirilmeden farklı koşullarda ve farklı Chloroquine oranlarında $CaPO_4$ transfeksiyonları gerçekleştirildi. Yapılan literatür araştırmalarında, OPTIMEM besiyerinin virus üretimi sırasında kullanıldığında daha yüksek lentiviral vektör titresine olanak sağladığı görüldü. Bu amaçla virusların hasat öncesi üretim aşamasında OPTIMEM kullanılmasına karar verildi. Üretim aşaması için iki farklı koşulda deneme yapıldı. Bunlardan biri %2 (Şekil 4.2) oranında FBS içerirken diğeri %10 oranında (Şekil 4.3) FBS içermektedir. Transfeksiyon aşamasında IMDM ve OPTIMEM'in kullanıldığı ve her ikisi içinde iki farklı konsantrasyonda Chloroquine ajanının kullanıldığı 4 farklı kombinasyonla olmak üzere, farklı FBS içeriğindeki üretim koşulları için toplamda 8 deneme yapıldı (Tablo 3.4).



Şekil 4.2 Üretim ortamı olarak %2 FBS içeriğine sahip OPTIMEM kullanılan, transfeksiyon aşamasında ise IMDM ve OPTIMEM besiyerlerinin 25 veya 40 uM, Chloroquine içerdiği 4 farklı kombinasyon sonucu 24., 48. Ve 72. Saatte lentiviral vektör üretimine bağlı oluşan RFP ışımaları.



Şekil 4.3 Üretim ortamı olarak %10 FBS içeriğine sahp OPTIMEM kullanılan, transfeksiyon aşamasında ise IMDM ve OPTIMEM besiyerlerinin 25 veya 40 uM, Chloroquine içerdiği 4 farklı kombinasyon sonucu 24., 48. Ve 72. Saatte lentiviral vektör üretimine bağlı oluşan RFP ışımaları.

%2 ve %10 FBS içeren üretim ortamlarının her ikisinde de transfeksiyon aşamasında IMDM kullanılan koşulda RFP ışımalarının daha kuvvetli olduğu görüldü. Test edilen iki farklı Chloroquine konsantrasyonunun belirgin bir etkisi olmadığı gözlendi. Hücrelerin uzun süre ve yüksek dozda Chloroquine'e maruz kalması durumunda toksik etki gözlendiği bilindiğinden, 25 uM Chloroquine içeren IMDM

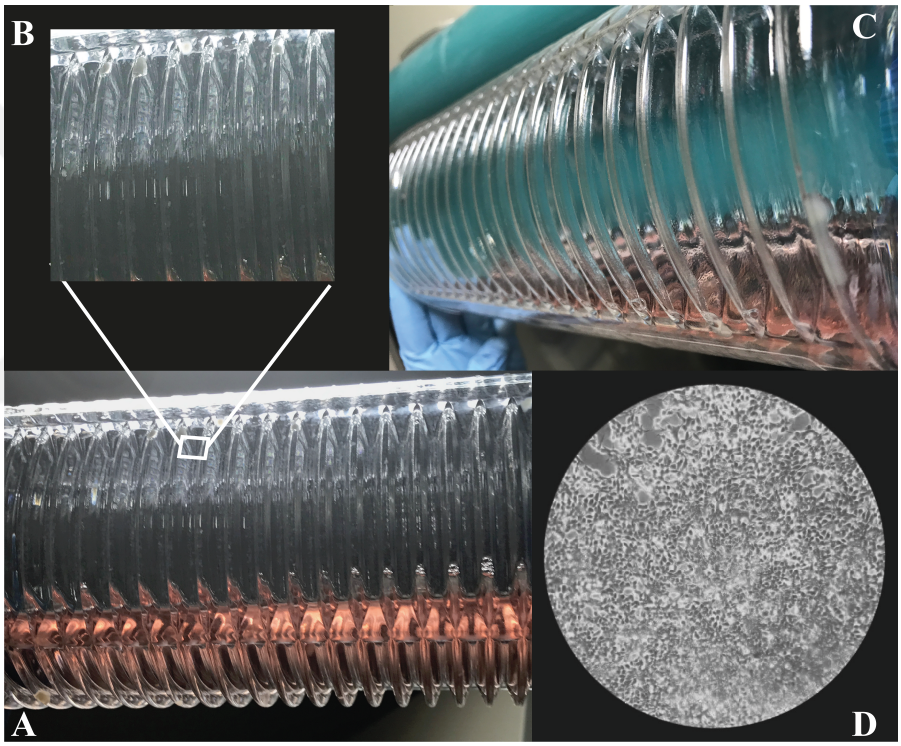
ile transfeksiyon aşamasının gerçekleştirilmesine karar verildi. Bu koşuldaki transfeksiyon sonrası elde edilen ışımalar üretim ortamının %2 ve %10 FBS içermesi durumunda karşılaştırıldığında %10 FBS içeriği olan üretim koşulunda daha yüksek lentiviral üretim verimi alındığı gözlendi. Dolayısıyla bu denemeler sonucunda hem transfeksiyon hem de üretim aşaması için kullanılacak besiyerlerinin içerikleri ve transfeksiyon ajan konsantrasyonu optimize edildi.

4.3 Optimize Lentivirus Üretiminin Ölçeklendirilmesine Yönelik Bulgular

Yapılan optimizasyon işlemlerinin hepsi petrilerde gerçekleştirildi. Ancak *in vivo* çalışmalarda kullanıma uygun lentivirusların üretilmesi büyük ölçekli üretimleri de gerektirdiğinden, optimize edilen parametreler döner hücre kültürü şişelerinde üretime uygun olacak şekilde uyarlandı. Bu şekilde laboratuvar şartlarında, büyük ölçekli üretimlere bir ara basamak teşkil edecek nitelikteki üretim optimizasyonunun gerçekleştirilmesi sağlandı. Bu amaçla öncelikle döner hücre kültürü şişelerine ekilecek hücre sayıları ve transfeksiyon öncesinde ne kadar süreyle inkübasyonun gerçekleştirileceği belirlendi.

150 mm'lik bir petrinin yüzey alanı 150 cm^2'dir. %100 dolulukta bir petrideki 293T hücreleri (Şekil 4.4 D) tripsinize edilerek sayıldı ve bir petride yaklaşık $20x10^6$ hücre olduğu tespit edildi. Transfeksiyon işlemi için hücrelerin %80-90 oranında olması gerekmektedir. Bu açıdan optimize edilen transfeksiyon parametrelerinin yaklaşık olarak $15x10^6$ hücreyi transfekte etmekte yeterli olduğu belirlendi. 1 döner hücre kültürü şişesinin yüzey alanı (Şekil 4.4 C) 1700 cm^2 'dir ve daha önce belirtildiği üzere %100 dolu olması durumunda 12 petriden elde edilen hücre sayısını barındırır. Ancak %80-90 oranında bir doluluk oranı istendiğinden, bir döner hücre kültürü şişesinde transfeksiyondan hemen önce yaklaşık 180 milyon ($180x10^6$) hücre olması beklenmektedir. Bu sayıya ulaşabilmek için farklı oranlarda ekim gerçekleştirildi. %100 doluluk oranına sahip 2 petriden ($40x10^6$ hücre) ve 3 petriden ($60x10^6$) hücre tripsinize edilerek döner şişelere aktarıldıktan sonra 2 gün süreyle 0,3 rpm hızda döndürüldü. Süre sonunda hücreler tripsinize edilerek sayıldığında, her iki ekim sonucunda da 100 milyondan daha az sayıda hücre elde edildi. Dolayısıyla, ekim hacminin yetersiz kaldığı düşünülerek 4 petriden ($80x10^6$ hücre) alından hücreler döner şişelere aktarıldı. 0,3 rpm'de 2 gün süreyle bekletilen şişelerde yapılan sayım sonucunda yaklaşık 120 milyon hücre sayıldı. Bu sürede belirli aralıklarla gözlenen şişelerde, hücrelerin bir gün içerisinde tutunduğu ancak 0,3 rpm hızda dönerken

besiyeriyle daha az etkileşime girmesi nedeniyle yüzeye tutunamayarak sıvı içerisine düştükleri ve çoğalamadıkları kanısına varıldı. Bu sebeple ekim sonrası dönme hızlarında değişiklik yapıldı. 4 petriden ($80x10^6$ hücre) tripsinize edilerek döner şişelere pasajlanan 293T hücreleri, 1 gün süreyle 0,3 rpm'de döndürüldü. Hücrelerin yüzeye tutunması sağlandıktan sonra, hız 1 rpm'e çıkartılarak hücrelerin besiyeriyle daha fazla etkileşime girmeleri sağlandı. 1 rpm hızda 12-16 saat süreyle inkübe edilen hücreler tripsinize edilerek sayıldığında 180-190 $x10^6$ sayıda hücre elde edildi. Bir döner şişenin %80-90 doluluk oranına sahip olması için 180 milyon hücre gerektiği düşünülürse, bu parametrelerle üretilen hücrelerin ekimi takiben 1,5 gün içerisinde transfeksiyona hazır hale geldikleri saptandı (Şekil 4.4).

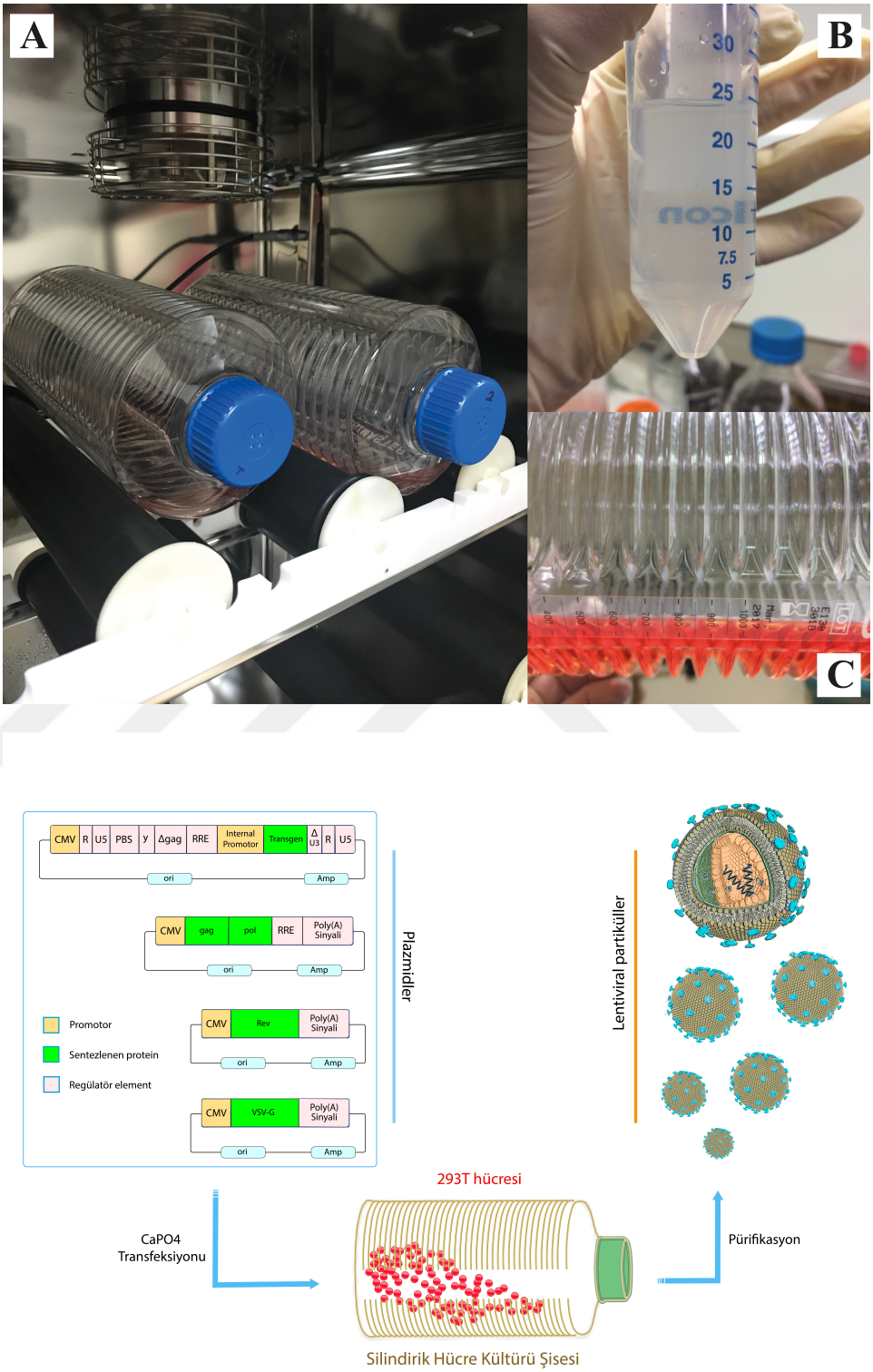


Şekil 4.4 Tırtıklı döner şişelerde transfeksiyona hazır hale gelen hücrelerin fotoğrafı (A: Döner hücre kültürü şişesinde transfeksiyona hazır hale gelen hücreler B: Tırtıklı yüzeydeki hücrelerin yakınlaştırılmış görüntüsü C: 1700 cm^2 yüzey alanına sahip döner hücre kültürü şişesi görüntüsü D: 150 mm petrilerde %100 doluluk oranında 293 T hücreleri.)

4.4 Optimize Parametrelerle Döner Hücre Kültürü Şişelerinde Lentiviral Vektör Üretimi

Birçok parametrenin belirlenmesinin ardından son olarak protokolün optimizasyonu gerçekleştirildi. 80 milyon 293T hücresi 150 mm petrilerde kültüre edildikten sonra döner hücre kültürü şişelerine pasajlandı. %10 FBS içeren DMEM besiyerinde 24 saat 0,3 rpm'de, 16 saat 1 rpm'de inkübe edilen hücrelere (Şekil 4.5(a)A), 25 uM

Chloroquine varlığında (Şekil 4.5(a)C), 4 farklı plazmidin $CaPO_4$ ile kotransfeksiyonu (Şekil 4.5(a)B) gerçekleştirildi.

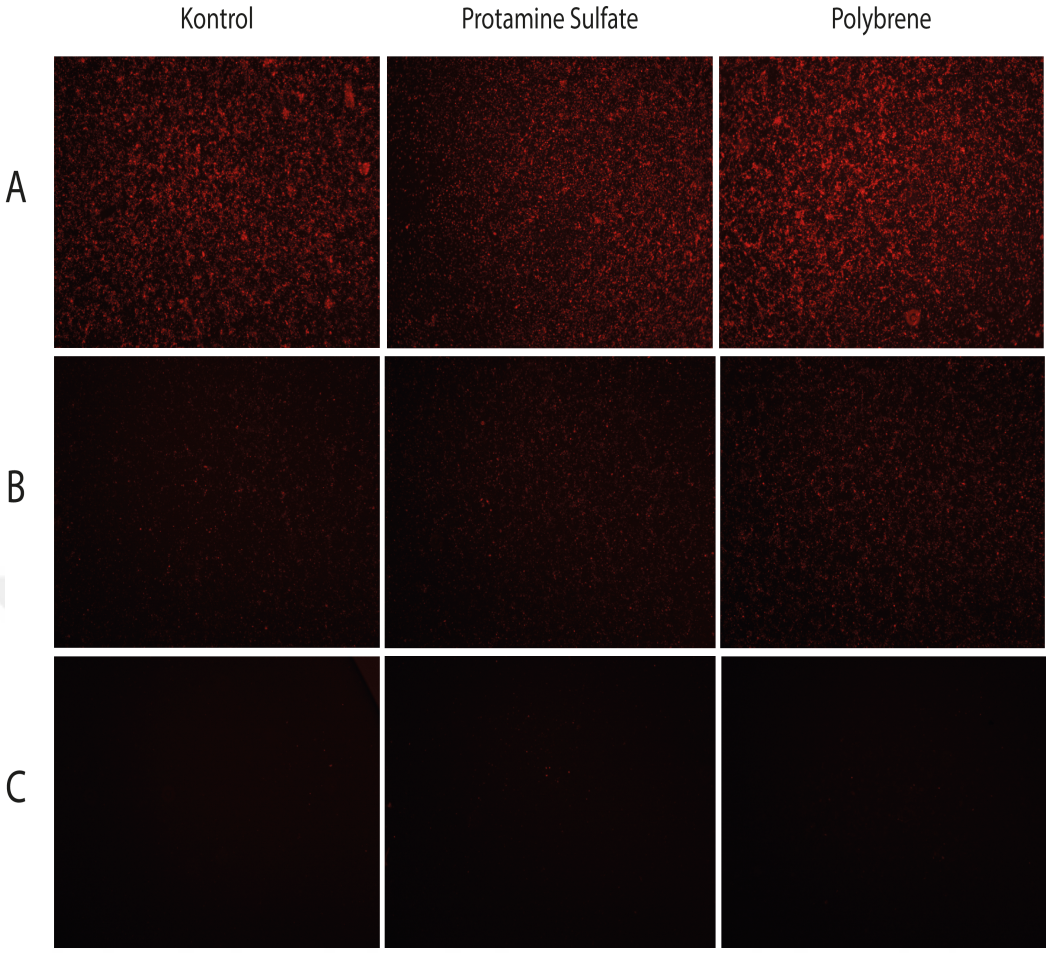


Şekil 4.5 (a) Hücre üretimini takiben yapılan $CaPO_4$ transfeksiyonu ve Chloroquine içeren besiyerine aktarımıyla lentivirus üretimini gösteren şekil. A: Transfeksiyona hazır hale getirilen hücrelerin inkübasyonu B: Transfeksiyon kokteylinin hazırlanışı C: Chloroquine içeren IMDM besiyerindeki hücrelere transfeksiyon kokteylinin aktarımı (b) HIV tabanlı 3. Nesil lentiviral vektörlerin döner hücre kültürü şişelerinde $CaPO_4$ transfeksiyonu yöntemi ile üretimini şematize eden şekil.

Transfeksiyonun ardından %10 FBS içeren OPTIMEM besiyerinde 2.5 gün süreyle 1 rpm hızda inkübe edilen hücrelerin ürettiği viruslar süre sonunda hasat edildi. Hasat sonrasında elde edilen virusların titrasyon analizleri yapıldığında 1 döner hücre kültürü şişesi başına yaklaşık $10^{11} – 10^{12}$ lentiviral partikül (10^{8}-10^{9} TU) elde edildiği belirlendi. Kullanılan transfeksiyon ajanın da yardımıyla her bir üretimde benzer viral titre ile virüs üretiminin stabilizasyonu ve optimizasyonu sağlandı (Şekil 4.5(a,b)).

4.5 Transdüksiyon Ajanı Seçimi İçin Yapılan Denemelerden Alınan Bulgular

Virus pelletleri elde edildikten sonra saflaştırma işlemlerine geçmeden önce viral etkinliğin belirlenmesi için ileri çalışmalarda yapılacak transdüksiyon işlemlerinin optimize edilmesi amacıyla kullanılacak transdüksiyon ajanının seçimi için yapılan analizler doğrultusunda, farklı iki ajanla yapılan transdüksiyon işleminin etkinliği RFP ışımaları ile belirlendi. Elde edilen bulgulara göre, Polybrene ile yapılan transdüksiyon işleminin Protamine Sülfat ile yapılana göre daha etkin olduğu belirlendi. Bu doğrultuda viral fonksiyon ve titrasyon analizleri için yapılacak tüm transdüksiyon işlemleri Polybrene varlığında gerçekleştirildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 İki farklı transdüksiyon ajanı kullanılarak farklı hacimlerde virus ile HT1080 hücrelerine yapılan transdüksiyon sonrasında gözlenen RFP ışımaları. A: 8 ul LV-RFP B: 4 ul LV-RFP C: 2 ul LV-RFP

4.6 LV Vektörlerin Pürifikasyon İşlemleri

Üretimi yapılan lentiviruslar, gereç ve yöntemler kısmında belirtilen protokol ile ultrasantrifügasyona tabii tutuldu (Şekil 4.7).

Ultrasantrifüjün ardından PBS ve HBSS solüsyonları içerisinde bir gün süreyle bekletilip, virus pelletlerinin resüspansiyonu yapıldı. Ardışık kolon sistemi ile yapılan kromatografi temelli pürifikasyondan önce, ultrasantrifüjlü konsantrasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve farklı solüsyonlarda resüspanse edilmiş LV vektörler, son konsantrasyonu 1/1000 olan Benzonase endonükleaz (Thermo Pierce Universal Nuclease for Cell Lyzis, 88700) ile 15 dakika oda sıcaklığında muamele edilip, genomik DNA'dan uzaklaştırıldı. Ardından anyon değişim kromatografi (AEX) kolonu (HiTrap Q HP, 17-1153-01, GE Healthcare Inc.), tuz giderim (desalting) kolonu (SP Sephadex C25, 17-023-01, GE Healthcare Inc.) ve son ürün kalitesini

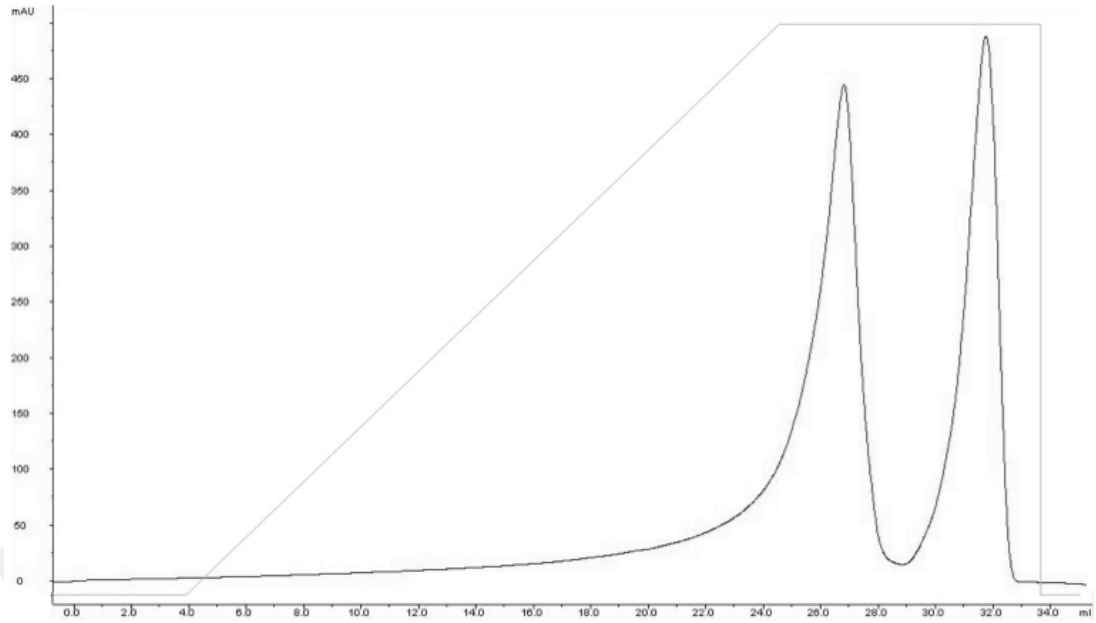
arttırıcı ek basamak için polishing kolon (HiTrap Captocore 700, 17-5481-51, GE Healthcare Inc.) sistemleri peşpeşe kullanılarak saflaştırma işlemleri gerçekleştirildi.

AEX kromatografi sonucunda HBSS'li virus örneğinden, lineer gradient elüsyon yapılırken iki adet pik toplandı (Şekil 4.8 A). Aynı protokol gereç ve yöntemlerde belirtildiği gibi PBS'li virus örnekleri için de yapıldığında, elüsyon basamağında tek bir pik elde edildi. (Şekil 4.8. B)

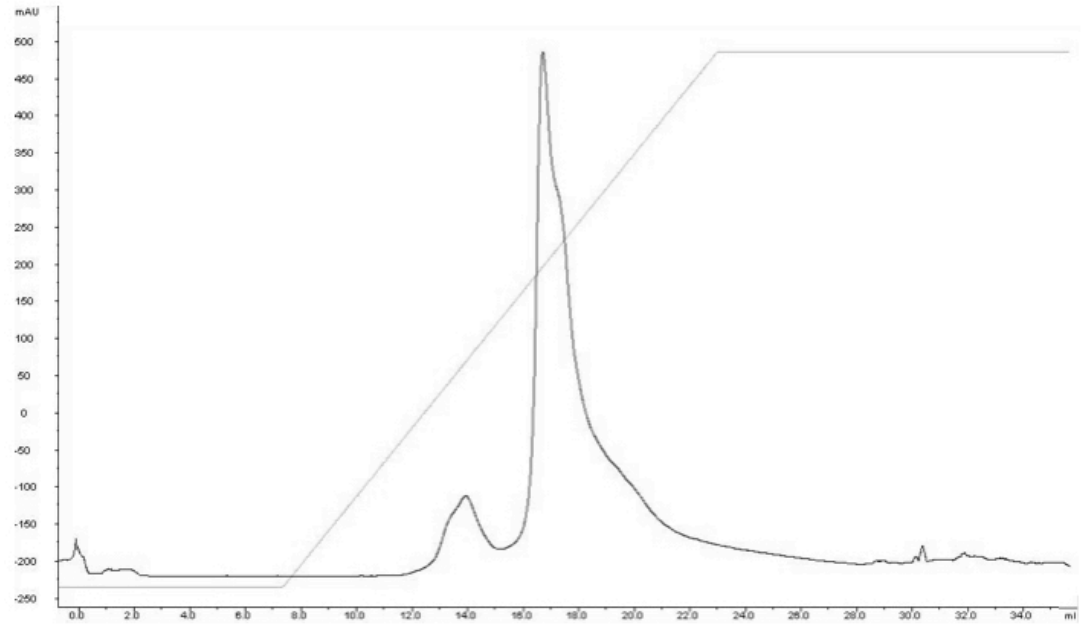


Şekil 4.7. Üretimi takiben ultrasantrifügasyon işlemi **A:** Ultrasantifüj cihazı **B:** Ultrasantrifüj sonrası elde edilen virus pelletleri **C:** Lentivirusun şematik gösterimi

A



B



Şekil 4.8 Ultrasantrifüj ile konsantrasyonu yapılan LV vektörler Benzonaz endonükleaz inkübasyonları ardından, ÄKTA Purifier UPC 10 FPLC cihazı ile, sırasıyla AEX, tuz giderimi ve cilalama kolonlarından geçirilerek pürifiye edildi. (A) US sonrası HBSS solüsyonu ile çözdürülen lentivirusların saflaştırma ardından elde edilen kromatogram görüntüsü, (B) US sonrası PBS solüsyonu ile çözdürülen lentivirusların saflaştırma ardından elde edilen kromatogram görüntüsü. [Yeşil: Konduktivite eğrisi (Lineer Gradient Elüsyon), Lacivert: UV eğrisi (Maurisse ve ark.), y ekseni; 280 nm dalgaboyunda ölçülen mAU değeri, x ekseni; Elüsyon süresince hacim değişimi (mL)]

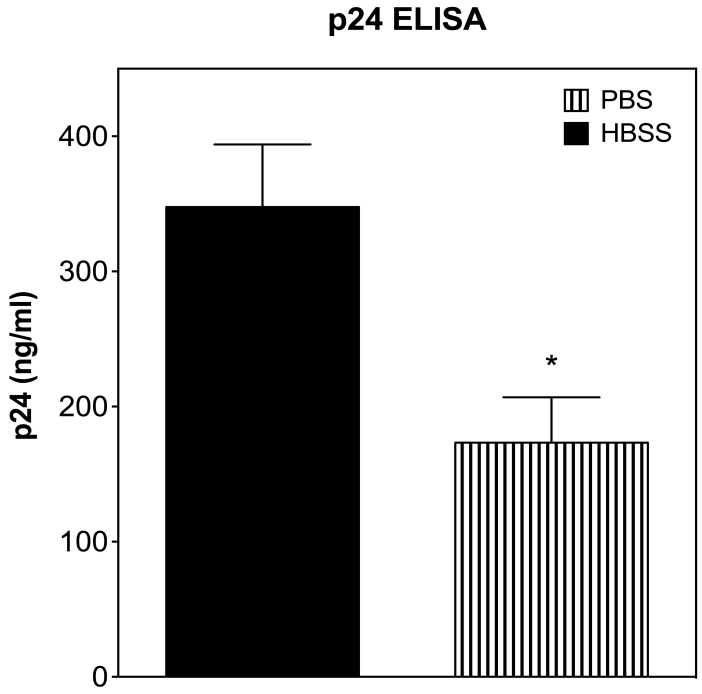
4.6.1 Elde Edilen Viral Örneklerde Virus Miktarlarının İncelenmesi

HBSS ve PBS ile çözdürülen viral örneklerden hem tek başına konsantrasyon ürünleri, hem de pürifikasyon sonrası toplanan piklerin viral partikül miktarının belirlenebilmesi için HIV p24 Protein ELISA yapıldı. Elde edilen verilerin sayısal hesaplamaları sonucunda, örneklerin mililitre başına içerdikleri nanogram partikül miktarları belirlendi. (Tablo 4.1)

Tablo 4.1 Viral grupların HIV p24 protein ELISA testleri sonucu elde edilen lentiviral partikül sayıları.

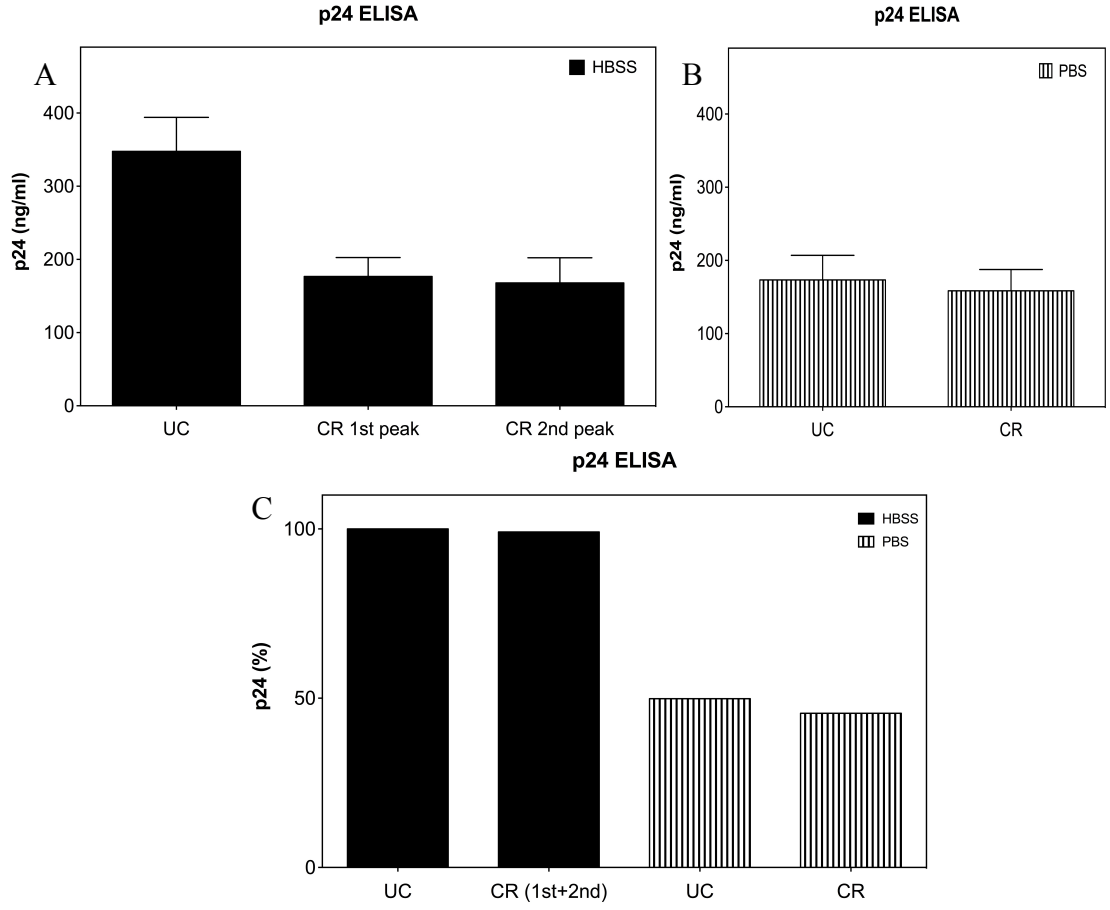
p24 ELISA	HBSS			PBS	
(ng/mL)	US	KR 1. pik	KR 2. pik	US	KR
1. örnek	2676,51176	1318,880978	1086,418096	1151,24973	1089,02337
2. örnek	4272,91862	2212,466525	2279,508729	2314,45589	2082,80522
3. örnek	3476,71519	1761,673751	1673,963413	1738,35281	1581,41430
ortalama	**3475,38186**	**1764,34042**	**1679,96341**	**1734,68614**	**1584,41446**

Şekil 4.9'da ultrasantrifüj sonrası elde edilen örneklerin farklı solüsyonlarda resüspanse edilmesinin viral partikül miktarına etkisi olduğu gösterilmiştir. Özellikle PBS solüsyonunda çözdürülen viruslarda, dondurup çözdürmeye bağlı olarak HBSS'de çözdürülen viruslara oranla istatistiksel anlamlı düzeyde viral partikül kaybı belirlendi. (Unpaired U test; p=0,0381)



Şekil 4.9 HIV p24 protein ELISA testi ile gruplardaki viral partikül miktarının tespiti yapıldı.

Virusların ultrasantrifüj sonrası farklı solüsyonlarda çözdürülmesinin yanısıra, ultrasantrifüjü takiben yapılan kromatografi işlemlerinin viral partikül sayısına etkisi p24 analizi ile belirlendi. HBSS'de çözdürülen virus örneğinin kromatogramından iki pik alınırken, PBS ile çözünen virus örneklerinin kromatografisi sonucunda tek pik elde edildi (Şekil 4.10A). HBSS örnekleri için ultrasantrifüjü takiben yapılan kromatografide partikül kaybı var gibi görünse de toplanan her iki pikin tek bir virus örneğine ait olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bu sebeple, her iki pikten alınan örneklerde hesaplanan partikül sayıları birlikte değerlendirildiğinde ultrasantrifügasyonu takiben yapılan kromatografik işlemlerle önemli oranda bir kayıp olmadan viral partiküllerin saflaştırılabildiği belirlendi (Şekil 4.10B) Sayısal analizler göz önüne alınarak, ultrasantrifügasyon ile konsantrasyon sonrası elde edilen virus miktarı referans alındığında (%100), kromatografik pürifikasyon işlemlerinde viral partikül miktarının büyük oranda (%98) korunduğu görüldü. (Tablo 4.1)



Şekil 4.10 HIV p24 protein ELISA testi ile gruplardaki viral partikül miktarının tespiti yapıldı. (UC: Ultrasantrifüj, CR: Kromatografi sonrası ürünleri temsil etmektedir. Koyu bar: HBSS ile çözdürülen LVV, Açık bar: PBS ile çözdürülen LVV gruplarını simgelemektedir.)

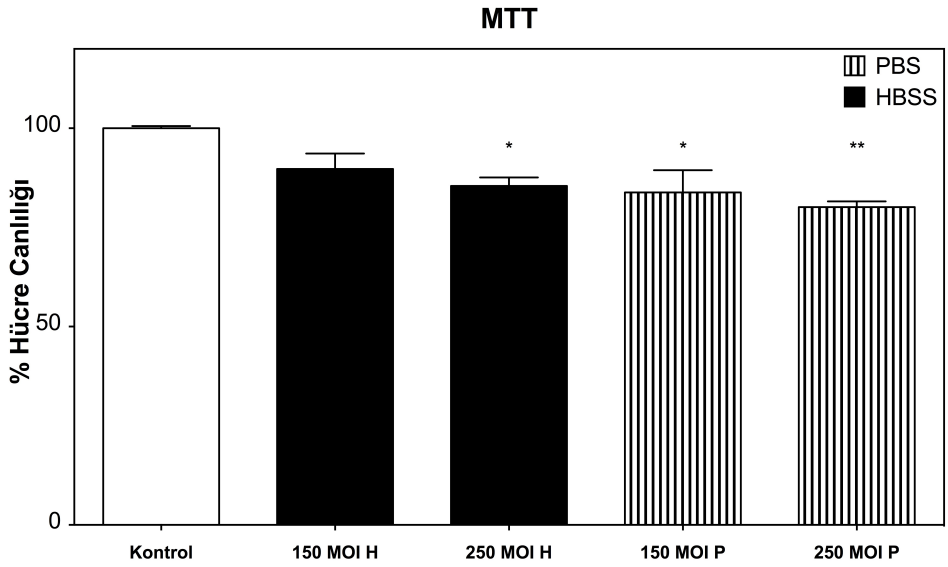
4.7 Lentivirus Transdüksiyonunun Hücre Canlılığı Üzerinde Etkisinin Analizi

Lentiviral vektörlerle transdüksiyonun hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etki gösterip göstermeyeceğinin belirlenmesi için MTT Hücre Büyüme Kiti kullanıldı. 96-kuyulu petrilere ekilen HT1080 hücrelerine yapılan, farklı solüsyonlarda çözdürülen ve farklı MOI düzeyindeki lentivirusların transdüksiyonları sonrasında takip eden 3. gün hücrelerin canlılık analizi yapıldı. MTT proliferasyon testi sonucunda oluşan kolorimetrik reaksiyonun absorbans ölçümü 595 nm dalga boyunda, Thermo Multiskan Spektrum cihazı ile tayin edildi.

Yapılan hesaplamalarla, hücrelerin canlılık oranları analiz edildiğinde, her iki metotla pürifikasyonları gerçekleştirilen virusların, eşit MOI değerlerindeki transdüksiyonları ardından, hücrelerin metabolik aktivitelerine etkileri belirlendi. Kontrol gruplar referans alındığında, 250 MOI'da yaklaşık %82 hücre canlılığı görülürken, 150 MOI'da %86 oranında hücre canlılığı kaydedildi (Şekil 4.11).

Tablo 4.2 İki farklı solüsyonla çözdürülmüş, aynı MOI düzeyine sahip viruslarla enfekte edilen hücrelerin canlılık oranları.

MTT (%)	150 MOI HBSS	250 MOI HBSS	150 MOI PBS	250 MOI PBS
1. örnek	89,75349859	85,45746861	83,81370152	80,10730796
2. örnek	83,0672998	89,18859127	93,54695149	77,61826523
3. örnek	96,43969737	81,72634595	74,08045155	82,59635069
ortalama	**89,75349859**	**85,45746861**	**83,81370152**	**80,10730796**



Şekil 4.11 MTT hücre canlılık testi ile viral transdüksiyon ardından gruplardaki hücre canlılığı yüzdesinin tespiti yapıldı. (Açık Bar: (+) kontrol, Koyu bar: HBSS ile çözdürülen LVV grupları, Dolgulu bar: PBS ile çözdürülen LVV gruplarını simgelemektedir.)

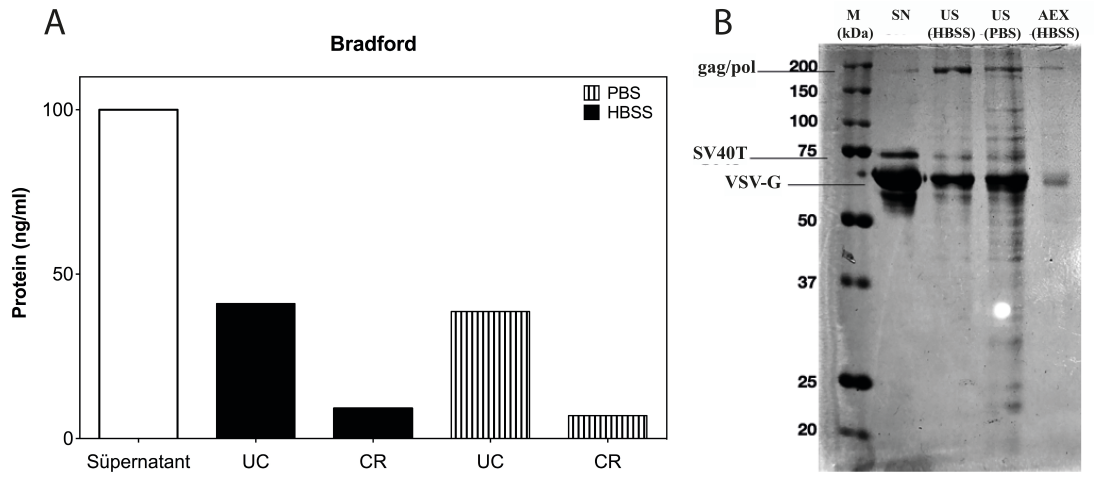
4.8 LV Vektörlerin Pürifikasyon Ardından Safsızlık Gideriminin Tayini

Ultrasantrifüj ve kromatografik işlemlerin ardından, örneklerde benzer viral partikül miktarı saptandı. Ancak pürifikasyon prosesiyle, örneklerdeki safsızlıkların hangi oranda giderilebildiğinin belirlenmesi amacıyla; süpernatanttan başlayarak, alt akım işlemleri öncesi ve sonrası ürünlerin her birinde Bradford Protein analizi (Şekil 4.12 A) ile SDS-PAGE elektroforezi (Şekil 4.12 B) yapıldı.

Yapılan Bradford protein tayininde, süpernatantın protein içeriği %100 ve referans kabul edildi. Beklenildiği üzere; ultrasantrifüj sonrası her iki solüsyonda çözdürülen viruslar için yaklaşık %60'lık bir total protein kaybı gözlendi. Buna rağmen belirgin miktarda protein moleküllerinin virus pelleti ile beraber çöktüğü görüldü. Ancak kromatografik pürifikasyon sonrasında safsızlık oluşturan proteinlerin uzaklaştırıldığı ve total protein miktarında yaklaşık %85 oranında bir azalma olduğu görüldü (Şekil 4.12 A)

SDS-PAGE elektroforez için %10'luk jele her bir gruptan eşit miktarda (30 ug) proteine sahip örnekler yüklendi. Elde edilen jel görüntüsü ile protein saflaştırılma oranları incelendiğinde; özellikle süpernatanttan alınan ve ultrasantrifüj sonrasında elde edilen örneklerde, 293T hücre kaynaklı SV40 T antijen bandı da dahil olmak üzere, çoğu viral protein bantları gözlenirken, kromatografik pürifikasyona tabi tutulmuş örnekte bu ekstra safsızlık yaratan bantların hepsinin elimine edildiği gözlendi (Şekil 4.12 B).

Bu durumun Bradford protein analizinde elde edilen %85 oranında safsızlık giderimi ile korale olması, yapılan saflaştırma işlemini doğrular niteliktedir.



Şekil 4.12 (A) Bradford protein testi ile tüm grupların total protein miktarlarının analiz grafiği. (Gri bar: SN, Koyu bar: HBSS ile çözdürülen LVV grupları, Açık bar: PBS ile çözdürülen LVV gruplarını temsil etmektedir.) (B) %10'luk jele yüklenen, eşit miktarlarda (30 ug) virus içeren grupların SDS-PAGE elektroforez bantlaşma görüntüsü. M: Marker, SN: Süpernatant, US: Ultrasantrifüj, AEX: Anyon değişimli kromatografi)

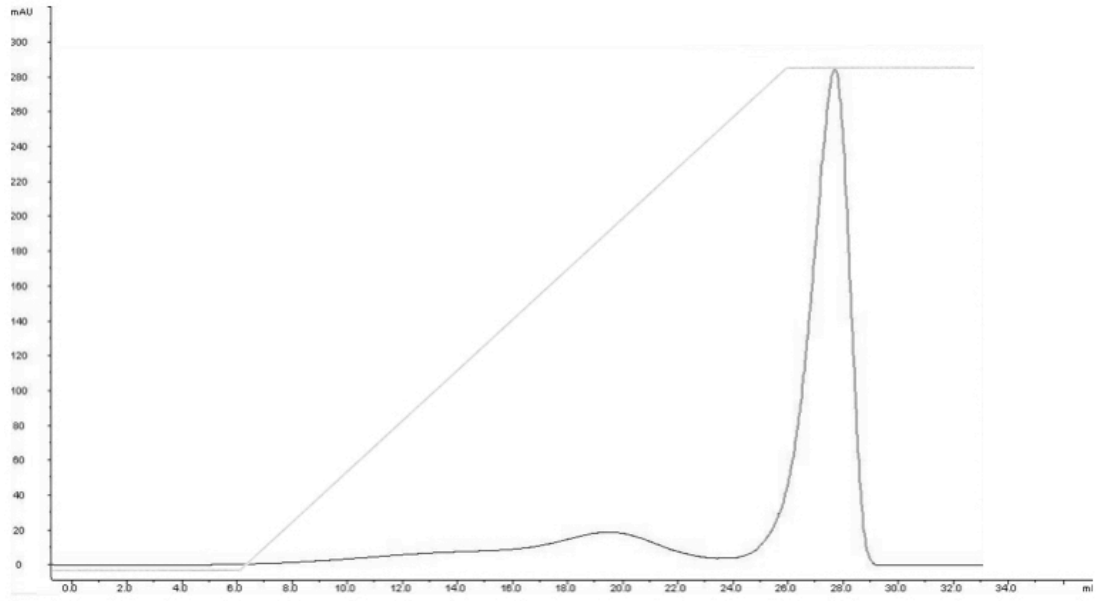
Konsantre edilen LV vektörler için uygun solüsyon HBSS olarak belirledikten sonra, pürifikasyon optimizasyonu çalışmaları bu doğrultuda devam ettirildi.

4.9 Optimize Edilen Parametrelerle Yapılan Çalışmalar

4.9.1 Kromatografik Pürifikasyon İşlemleri

Üretimi yapılan lentiviruslar, gereç ve yöntemler kısmında verilen protokol ile ultrasantrifügasyona tabii tutuldu. Ardından önceki çalışmalarda uygunluğu belirlenen HBSS solüsyonu içerisinde bir gün süreyle bekletilip, ertesi gün virus pelletlerinin resüspansiyonu yapıldı.

Sırasıyla saflaştırma, tuz giderimi ve son ürün kalitesini arttırıcı ek basamak uygulamalarından oluşan kromatografik işlem öncesinde, ultrasantrifüjle konsantre edilmiş ve HBSS solüsyonunda resüspanse edilmiş LV vektörler, son konsantrasyonu 1/1000 olan Benzonaz endonükleaz ile oda sıcaklığında, 15 dakikalığına muamele edildi. Daha önce de ifade edildiği gibi, genomik DNA'dan arındırılan ve ardından sırasıyla AEX, tuz giderimi ve son ürün kalitesini arttırıcı ek basamak işlemleri peşpeşe uygulanarak, saflaştırma işlemi ÄKTA Purifier UPC 10 cihazı ile gerçekleştirildi. AEX kromatografisi sonucunda virus örneğinden, lineer gradient elüsyon ile elde edilen virus, ileri analizlere tabii tutuldu (Şekil 4.13).

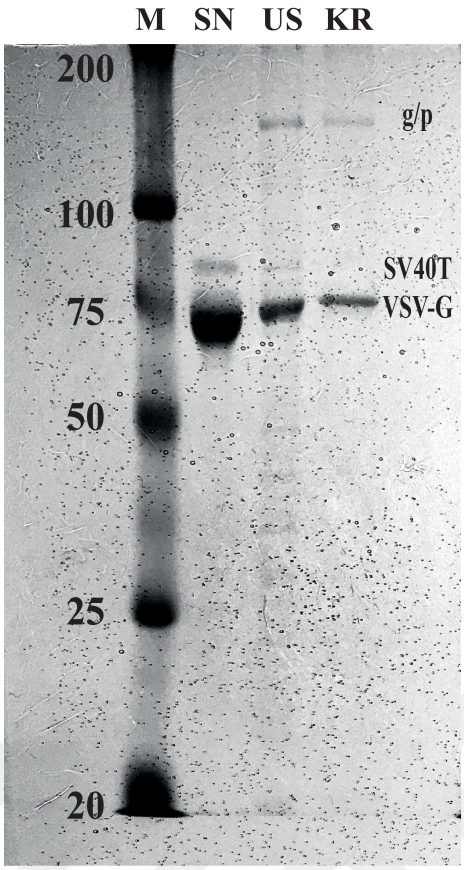


Şekil 4.13 HBSS ile çözdürülen LV vektörlerin AEX kromatografi sonrası kromatogram görüntüsü. [Yeşil: Konduktivite eğrisi (Lineer Gradient Elüsyon), Lacivert: UV eğrisi (Maurisse ve ark.), y ekseni; 280 nm dalgaboyunda ölçülen mAU değeri, x ekseni; Elüsyon süresince hacim değişimi (mL)]

4.9.2 Saflaştırılan Lentivirusların Protein Analizleri ve Safsızlık Giderimi Tayinleri

Süpernatant, ultrasantrifüj sonrası elde edilen örnek ve kromatografik ürünlerde; ekstra protein ve hücresel metabolitlerin hangi oranda giderildiğinin saptanabilmesi için Bradford total protein testi ardından SDS-PAGE elektroforez gerçekleştirildi (Şekil 4.14).

SDS-PAGE elektroforez için %10'luk jele her bir gruptan eşit miktarda (20 ug) proteine sahip örnekler yüklendi. Elde edilen jel görüntüsü daha önce yapılan deney ile korelasyon gösterdi (Bakınız Bulgular kısmı 4.8). Çalışmanın amaçladığı doğrultuda; safsızlık gideriminin, kromatografik pürifiye örnekte diğer gruplara oranla daha başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği tespit edildi.



Şekil 4.14 Bradford analizi ile protein içeriği belirlenen örneklerden, eşit miktarda viral protein içerecek hacimde kuyulara yüklenen örneklerin safsızlık içeriklerinin belirlenmesi için yapılan SDS-PAGE analizi sonucunda elde edilen jel görüntüsü (M: Marker SN: Süpernatant US: Ultrasantrifüj ve KR: Kromatografi.)

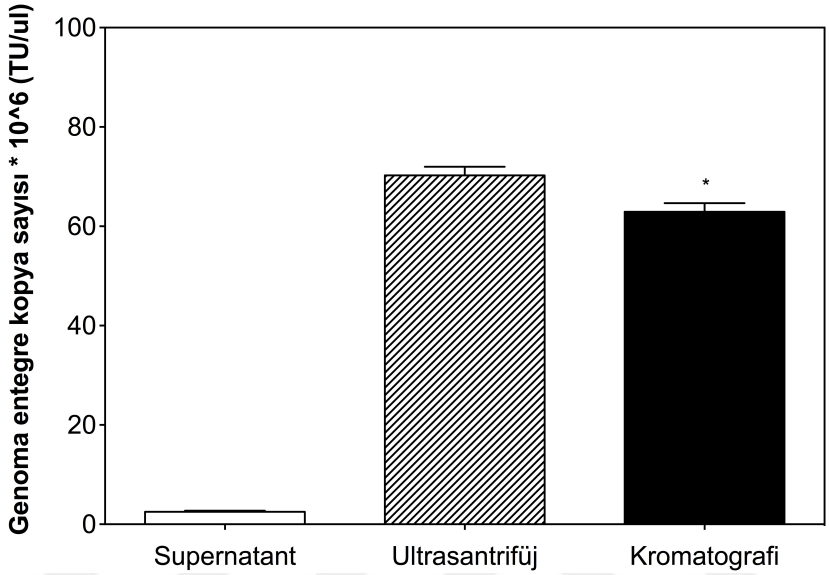
4.9.3 Pürifikasyon Optimizasyonu Yapılan LV Vektörlerin Viral Partikül Analizleri

Kısa süreli, geçiçi $CaPO_4$ transfeksiyonu ile üretimi gerçekleştirilen LV vektörlerin, 72 saat sonundaki süpernantantları, viral partikül içerikleri açısından kantitatif olarak analiz edildi. Süpernatanttaki viruslar ile US ve seri kromatografik işlemlerle saflaştırılan vektörler viral partikül içeriklerinin belirlenmesi amacıyla HT1080 hücrelerine transdükte edildi. Transdüksiyon işlemi için 24-kuyulu petrilere 100.000 hücre/kuyu oranında hücre ekimi yapıldı. Takip eden gün süpernatant, ultrasantrifüj ve kromatografi ile saflaştırılan virus örnekleri ile hücreler, son konsantrasyonu 1/1000 olan polybrene varlığında transdükte edildi.

Kantitatif real-time PCR ile elde edilen sonuçlara (Tablo 4.3) göre, süpernatant, ultrasantrifüj ve kromatografi final ürünlerinin genoma entegre viral kopya sayıları, TU/mL cinsinden birbirleriyle, anlamlılık derecelerine göre kıyaslandı (Şekil 4.15).

Tablo 4.3 Kantitatif real-timeüüü PCR sonuçları

Ks (x10^6 TU/uL)	Süpernatant	Ultrasantrifüj	Kromatografi
1. örnek	2,5	70,25	62,83
2. örnek	2,9	73,25	65,97
3. örnek	2,1	67,25	59,93
Ortalama	**2,5**	**70,25**	**62,91**



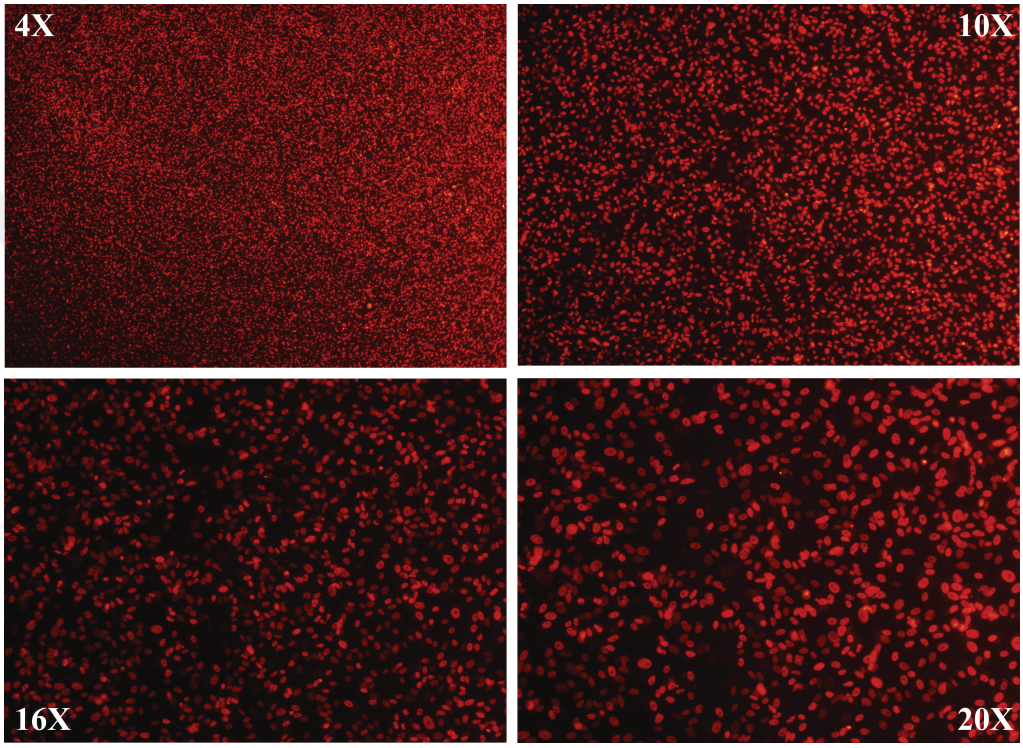
Şekil 4.15 HBSS ile çözdürülen LV vektörlerin 72. saat bulk süpernatant (açık bar), ultrasantrifüj (noktalı bar) ve AEX kromatografi (koyu bar) sonrası kantitatif real-time PCR analizleri.

Süpernatant örneklerinin, herhangi bir konsantrasyon işlemine tabii tutulmadıkları, dolayısıyla diğer örneklere göre hacminin oldukça yüksek ancak konsantrasyonunun daha düşük olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bu sebeble; mikrolitre başına düşen virus sayısı, süpernantantlarda, beklendiği üzere; konsantrasyon işlemi gören örneklere kıyasla çok daha az miktardadır.

Ek olarak, ultrasantrifüj ile konsantrasyon işlemleri ardından bir seri kromatografiye tabii tutulan viral örneklerin, yalnızca ultrasantrifüj prosesiyle konsantre edilen örneklerle benzer seviyede titreye sahip olmaları, yapılan kromatografik pürifikasyon işlemlerinin, geri kazanım oranı bakımından umut vaad edici olduğunu gösterdi. Birbirinden bağımsız gruplar arasındaki farklılık düzeyleri, One-way Analysis of Variance (ANOVA) (Graphpad Prism 6) analizine göre hesaplandı ve barların üzerinde anlamlılık dereceleri belirtildi.

4.9.4 Pürifikasyonları Gerçekleştirilen LV Vektörlerin Fonksiyonel Analiz Testleri

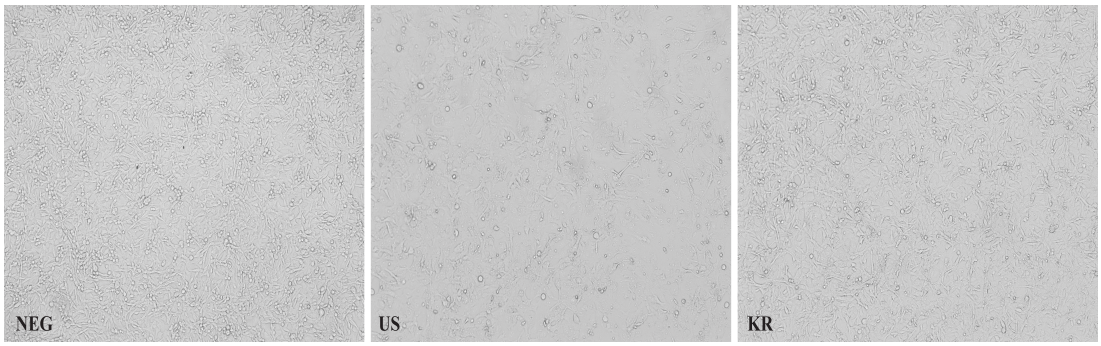
Elde edilen viral örneklerin kromatografi sonrasında *in vitro* transdüksiyon etkin olup olmadıklarının belirlenmesi amacıyla, HT1080 hücrelerine yapılan transdüksiyon sonucu RFP ışımaları, Olympus IX-81 floresan mikroskopu ile görüntülenerek kaydedildi. Saflaştırma işlemleri ile safsızlıklarından arındırılan LentiRFP viruslarının gen ekspresyonları doğrulandı ve transdüksiyon etkin lentivirusların elde edildiği gösterildi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 Kromatografik pürifikasyonu yapılan LentiRFP viruslarının fonksiyonel olarak etkin olduklarını gösteren RFP ışımaları.

4.9.5 LVV ile Transdükte Edilen Hücrelerin Morfolojik Analizleri

Konsantre ve pürifiye viruslarla transdükte edilen HT1080 hücrelerinin, transdüksiyon ardından 3. gün hücre morfolojileri Olympus IX-81 floresan mikroskopu ile görüntülenerek kaydedildi (Şekil 4.17). Yalnızca ultrasantrifugasyon yapılan viral örneklerle transdükte hücrelerin, kromatografik pürifikasyona tabii tutulan viral örneklerle enfekte hücrelere oranla daha fazla hasar gördüğü ve ayrıca hücre adhezyon özelliklerinin de daha az olduğu belirlendi. Elde edilen bulguların doğrulanması amacıyla MTT hücre büyüme kiti ile kantitatif analizler gerçekleştirildi.



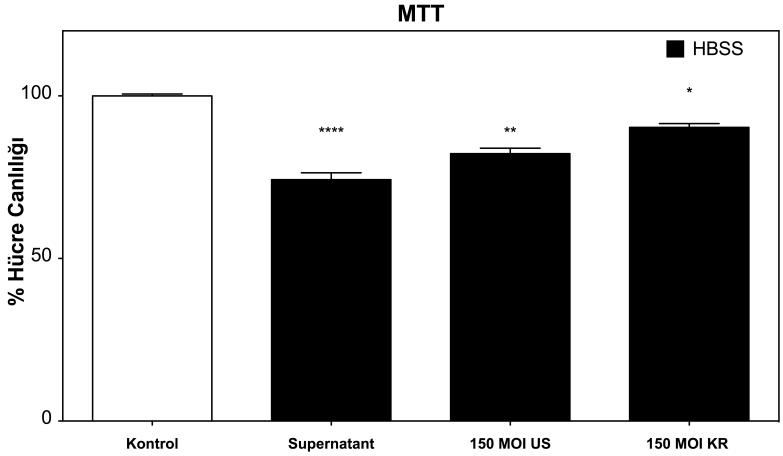
Şekil 4.17 Ultrasantrifüj ve kromatografik pürifikasyonu yapılan LentiRFP viruslarının transdüksiyonu sonrası hücreler üzerindeki morfolojik etkileri. Transdüksiyon için HT1080 hücre hattı kullanıldı. Transdüksiyonun ardından 3. gün ışık mikroskobu ile 10X büyütmede görüntüler kaydedildi.

4.9.6. Transdükte Edilen Hücrelerin Metabolik Aktivite Analizleri

Transdükte edilen hücrelerin metabolik aktivitelerinin ölçümü, Bölüm 3.7'de deney protokolü verilen MTT Hücre Büyüme Kiti (Merck Millipore, 475989) ile gerçekleştirildi. Eşit MOI miktarına sahip viruslarla transdükte edilen HT1080 hücrelerinde canlılık yüzdeleri her üç grup açısından değerlendirildi (Tablo 4.4). Buna göre; pürifiye virusla enfekte edilen hücrelerde (%90), ultrasantrifüj (%82) ve süpernatant (%74) örnekleriyle transdükte olan hücrelere oranla anlamlı derecede daha yüksek oranda metabolik aktivite olduğu saptandı (Şekil 4.18).

Tablo 4.4 MTT hücre büyüme testi ile elde edilen yüzde canlılık oranları

MTT (%)	SÜPERNATANT	150 MOI US	150 MOI KR
1. örnek	73,7865	83,45314	88,87249
2. örnek	78,12604	78,85602	92,60814
3. örnek	70,87592	84,37121	89,47031
ortalama	**74,26282**	**82,22679**	**90,31698**



Şekil 4.18 MTT testi ile saflaştırma işlemlerinden geçirilen viruslarla ve süpernatanttan alınan viruslarla yapılan transdüksiyon sonrası hücre canlık oranları analiz edildi. Transdükte edilmeyen Kontrol hücreler referans alınarak yapılan yüzde hesabı sonucunda, kromatografik pürifkasyon işlemlerine tabi tutulan viruslarla transdükte hücrelerde canlılık oranının %90 olduğu belirlendi.

5. TARTIŞMA

Gen tedavisi teknolojik olarak ileri düzeyde moleküler genetik yöntemlerin kullanıldığı, genlere ilaç özelliği kazandırılmak üzere geliştirilen yeni bir tedavi metodudur. Metabolik hastalıklar, kanser, kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde dahi büyük gelecek vaad eden potansiyel bir uygulama alanıdır. Somatik hücrelere yapılan gen tedavi stratejileri iki gruba ayrıldığında; *ex vivo* uygulamalarda, vücuttaki hedef dokudan izole edilen hücrelerin *in vitro* koşullarda gen aktarımıyla modifikasyonu sonucu bu hücrelerin vücuda tekrar geri verilmesi söz konusudur. Bu yöntem genelde kan hücreleri gibi kolayca izole edilip, tekrar verilebilecek özellikte olan sınırlı hücre tipiyle uygulanabilir. Diğer bir yöntem olan *in vivo* uygulamalarda ise, vektör hedef hücrelere direkt olarak uygulanır. Doğrudan etkilenen dokuya lokal uygulanabileceği gibi hastanın sistemik kan dolaşımına verilerek, dolaylı yollardan uygulanması da mümkündür (Segura ve ark. 2006).

Gen tedavi çalışmalarını aktarım aracı olarak kullanılan vektörleri esas alarak viral ve viral olmayan yöntemler olarak iki gruba ayırmak mümkündür. Araştırmaların başlangıcında lipofeksiyon ve elektroporasyon gibi tekniklerle, viral olmayan vektörler kullanılarak farklı gen nakil çalışmaları yapılmıştır. Fakat viral olmayan vektörlerle yapılan gen aktarımlarındaki düşük gen nakil etkinliği bu yöntemin kullanımını sınırlandırmaktadır (Basudev ve ark. 1995, Benhamou ve ark. 1997, Lakey ve ark. 2001, Mahato ve ark. 2003). Diğer yandan viral vektörler, çok daha yüksek transdüksiyon etkinliği sağlaması dolayısıyla gen tedavi yaklaşımlarında tercih sebebi olmuştur (Mukai ve ark. 2007)

Adenoviral ve adeno-assosiye viral vektörlerle yapılan bir çok çalışmada *in vitro, ex vivo* ve *in vivo* uygulamalarla başarılı bir gen aktarımı gerçekleştirilebildiği gösterilmiştir. Fakat bu vektörlerle yapılan gen aktarımları sonrasında, organizmada gelişen immün yanıt ve vektör kaynaklı sitotoksisite gibi kısıtlamalar, bu vektörlerin *in vivo* uygulamalarda kullanım açısından yetersiz kaldığını göstermektedir (Mulligan 1993, McClane ve ark. 1997, Ayuso ve ark. 2004, Wang ve ark. 2004).

Literatürdeki bu bilgiler doğrultusunda, immünojenik olmayan, uzun süreli transgen ekspresyonu sağlamaya yönelik stratejilerle 3.nesil HIV tabanlı lentiviral vektörler

geliştirilmiş ve bu vektörler gen tedavi çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Retroviral vektörlerden köken alan bu vektörler genoma entegre olma yeteneğine sahip olmalarının yanısıra, retroviral vektörlerin aksine kanser oluşturma riski taşımayan gen aktarım araçlarıdır. Retroviruslar, stabil olarak konakçı genomuna entegre olabilirler ancak farklılaşmış nöronlar, iskelet kasları ve antijen sunan hücreler, kök hücreler gibi bölünmeyen hücreleri enfekte edebilme özellikleri yoktur (Ansorge ve ark. 2009, Merten ve ark. 2011, Merten ve ark. 2014). Lentiviral vektörler, konak hücrenin genomuna entegre olabilme yetenekleri ile; aktarılan genin diğer vektörlere oranla konak hücrede daha uzun süreli ekspresyonunu sağlamaktadır. Ayrıca hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri transdükte edebilme özelliklerinin yanı sıra aktarım yapılan organizmada immünojeniteye sebep olmamaları dolayısıyla gen aktarım çalışmalarında umut vaad edicidir (Lewis ve ark. 1992, Summerford ve Samulski 1999, Transfiguracion ve ark. 2003).

LV vektörlerin ihtiva ettiği tüm bu avantajlarla birlikte etkin gen aktarımları ve olası tedavi imkanı sunabilmeleri için, yüksek titre ve saflıkta ayrıca belirlenmiş kalite ve biyogüvenlik standartlarına uygun şekilde üretilmeleri gerekmektedir. (MacGregor 2001, Segura ve ark. 2013).

Yürütülen tez çalışmasında, gag/pol, rev, VSV-G ve RFP transgeni içeren transfer plazmidleriyle geçici $CaPO_4$ transfeksiyonu ile Chloroquine varlığında, döner hücre kültürü şişelerinde 3. Nesil lentiviral vektörlerin üretimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5.(a)(b)). Optimize üretim koşulları ve saflaştırma işlemleri doğrultusunda transdüksiyon etkin lentiviruslar başarıyla üretilmiştir (Şekil 4.16).

Lentiviral vektör üretimi, birçok geleneksel protokolün kullanıldığı ancak farklı bir takım parametrelerden etkilenen çok bileşenli bir işlemdir. Bu sebeple, vektör üretiminde kullanılan hücre hatlarından başlayarak transfeksiyon metodunun ve konsantrasyon işlemlerinin optimize edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla çalışmamızda, lentiviral vektör üretiminde sıklıkla kullanılan 293T hücreleriyle üretim yönteminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3. nesil lentiviral vektörlerin oluşturulması için esansiyel elementlerin 4 farklı plazmid aracılığıyla hücrelere kotransfekte edilmesi gerekmektedir. Dolayısıyla kullanılan plazmid oranları ve transfeksiyon metodu vektör üretiminin başarısına

doğrudan etki eder. Bu metodun seçilmesi amacıyla petrilerde %80-90 doluluk oranına gelen hücrelere Tablo 3.1'de verilen oranlarda plazmid kullanılarak transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon metodu olarak ise $CaPO_4$ transfeksiyon metodu kullanılmıştır. Ancak bu metodun uygulanma şekliyle ilgili olarak farklı literatür bilgilerinin olması nedeniyle, iki metodun viral vektör üretim verimine etkisi yapılan denemelerle belirlenmiştir. Bu tekniklerde oluşturulacak presipitatların büyüklüğü ve yoğunluğu büyük önem arz etmektedir (Jordan ve ark. 1996, Chowdhury ve ark. 2003). Presipitat boyutlarının çok büyük olması halinde hücrelere aktarım sağlanamayacağından viral vektör üretimi gerçekleştirilemeyecktir. Bununla birlikte, kullanılan tekniğe ve solüsyonların hazırlanışına bağlı olarak 4 plazmidle presipitat oluşturulamadığı durumlarda da viral vektör üretimi için yeterli kotransfeksiyon yapılamayacaktır. Hücrelere plazmid aktarımının yapılabileceği uygun boyutta ve konsantrasyonda presipitatların hazırlanması amacıyla RFP transgeninin kullanıldığı lentiviral vektörler farklı tekniklerle üretilmiştir. 293T hücrelerinde zamana bağlı olarak değişen RFP ışımalarının takibi sonucunda, kabarcık yöntemi ile gerçekleştirilen transfeksiyonla, vortex yöntemine oranla daha fazla lentiviral vektör ürettilebildiği belirlenmiştir. Beklenildiği üzere, oluşturulan hava kabarcıklarının yüzey gerilimi yardımıyla kurulan kimyasal bağlar sayesinde (Lee ve ark. 2012) 4 farklı plazmidin bir araya gelerek oluşturduğu presipitatlar hücrelerde kotransfeksiyon başarısını arttırmıştır.

Kabarcık ve vortex tekniğinin karşılaştırıldığı denemelerde, presipitat oluşumunun yanısıra hücrelerin transfeksiyonu için uygun koşulların ve üretim süresinin de optimize edilmesi gerektiğinden 3 farklı transfeksiyon ve besiyeri kombinasyonu kullanılarak, en yüksek RFP ışımasının gözlendiği koşul saptanmıştır. Kabarcık tekniğiyle; %10 FBS içeren OPTIMEM ve DMEM kombinasyonunun kullanıldığı üretimde 72. saate kadar yapılan üretimin yeterli olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1). Her ne kadar belirlenen koşullarda diğer denemelere göre daha yüksek RFP ışımaları gözlenmiş olsa da bu denemelerle sadece presipitat oluşturma tekniği ve üretim süresine kesin karar verilmiştir. Belirlenen koşulların daha da iyileştirilebilme ihtimaline karşı farklı besiyeri içerikleri ile ileri optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.

Transfeksiyonda ve üretimde kullanılan besiyerlerinin FBS içeriğinin, transfeksiyon verimine etkisi olduğu farklı çalışmalarda raporlanmıştır (Pham ve ark. 2006, Kuroda

ve ark. 2009). Aynı zamanda özellikle transfeksiyonda kullanılmak üzere farklı araştırma gruplarının geliştirdiği ve halihazırda kullanılan modifiye besiyerleri ticari olarak mevcuttur (Maurisse ve ark. 2010). Bu doğrultuda IMDM ve OPTIMEM besiyerlerinin kullanıldığı, FBS oranının ise %2 ile %10 arasında değiştiği farklı denemelerle daha etkin virus üretiminin gerçekleştirilebildiği koşulların belirlenmesine yönelik denemeler yapılmıştır.

Laboratuvar ölçekli çalışmalarda, transfeksiyon için kullanılan $CaPO_4$ tekniği her ne kadar etkili bir yöntem olsa da her denemede aynı verimin alınamadığı, stabil olmayan bir yöntem olarak rapor edilmiştir (Sena-Esteves ve ark. 2004, Mitta ve ark. 2005). Bu doğrultuda transfeksiyon verimini arttırıcı özellik gösterecek farklı ajanlar geliştirilmiştir. Bu ajanlar arasından, sıklıkla kullanılan ve transfekte edilen DNA'nın degredasyonunu önleme özelliğine sahip olan Chloroquine kimyasalı seçilmiş olup bu ajanın iki farklı konsantrasyonu kullanılarak üretim verimine etkisi incelenmiştir. Hiçbir ajan kullanılmadan ve daha önceki denemede belirlenen üretim koşulları kontrol olarak değerlendirilirken yapılan 8 farklı denemenin karşılaştırılması sonucunda, %10 FBS ve 25 uM konsantrasyonda Chloroquine içeren IMDM besiyerinde transfeksiyonu takiben, %10 FBS içeren OPTIMEM besiyerinde yapılan viral vektör üretiminin en etkin metot olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).

Lentiviral vektörlerin üretimi için standart üretim koşullarının ve transfeksiyon metodunun önemi ayrıntılarıyla anlatılmıştır. Fakat lentiviral vektörlerin *in vivo* uygulamalarda kullanılabilmesi için daha yüksek miktarlarda ve kalitede üretilmesi önemli bir gerekliliktir. Bu sebeple bu aşamaya kadar yapılan optimizasyon çalışmaları istenilen üretim metodunun belirlenmesi için yeterli değildir. Bu bakış açısıyla, 1700 cm^2 yüzey alanıyla 180 milyon hücrenin sadece 200 ml besiyeri kullanılarak tek seferde üretilmesine olanak sağlayan döner hücre kültürü şişelerinde viral vektör üretiminin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda öncelikle hücre kültürü şişelerinde hücrelerin istenilen sayıda üretimi için optimizasyon çalışmaları yapılmış ve ardından optimize edilen koşulların bu ölçeğe uyarlanmasıyla bir şişeden 10^{11}-10^{12} lentiviral partikülün elde edilebildiği bir üretim gerçekleştirilebilmiştir (Şekil 4.5 (a), (b))

Yapılan tüm bu optimizasyon çalışmaları doğrultusunda, literatürdeki farklı kaynaklardan alınan farklı bilgilerin tek bir çalışma altında toplanarak

karşılaştırılması sağlanmıştır. Bu şekilde her bir basamağı tek tek değerlendirilmiş bir lentiviral vektör üretim protokolü belirlenmiştir. Kullanılan hücre sayısının temel alındığında, doğru orantılı miktar artımı yapılarak transdüksiyon etkin lentivirusların elde edildiği, ölçeklendirilmeye uygun bir yöntemin geliştirilmesi mümkün olmuştur. Lentiviral vektörlerin genetik hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere üretildiği göz önüne alındığında, klinik uygulamalar için yüksek konsantrasyonda vektör elde edilmesi gerekliliği büyük önem arz etmektedir. Dolayısıyla, vektörlerin sadece laboratuvar koşullarında Ar-Ge amaçlı üretilmesi, bu tedavilerin klinik uygulanabilirliğini sınırlandırmaktadır. Bu çalışma; döner hücre kültürü şişelerine kadar ölçeklendirilmiş bir protokol optimizasyonunu özetlese de, yapılacak ileri ölçeklendirme çalışmalarıyla biyoreaktörlerin kullanıldığı daha büyük ölçekli üretimler için bir basamak teşkil edebilir.

Az sayıda hücreyle petrilerde başlayan lentiviral vektör üretiminin, döner hücre kültürü şişelerinde çok sayıda hücrede gerçekleştirilmesiyle, vektör titresinin artışı sağlanabilmiştir. Ne var ki; klinik uygulanabilirlik için hala optimize edilmesi gereken bir diğer basamakta alt akım işlemleridir. Bir gen tedavi vektörünün klinik denemelerde kullanılabilmesi için, transdüksiyon etkinliğini kaybetmeden, hücre ve ortam kaynaklı diğer safsızlıklarından arındırılması gerekmektedir (Segura ve ark. 2013). Bu amaç doğrultusunda ileri aşamalarda viral vektörlerin saflaştırılması için gerekli tekniklerin optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Ancak bu aşamaya geçmeden hemen önce üretilen lentiviral vektörlerin transdüksiyon etkin olup olmadığının belirlenmesi için denemeler yapılmıştır. Viruslar doğası gereği hücreleri transdükte edebilme yeteneğine sahiptir. Fakat optimizasyon çalışmalarının karşılaştırılmasına engel teşkil etmemesi için her bir işlemde, virusların transdüksiyon etkinliklerinin işleme bağlı değişiklik göstermemesi gerekir. Bu amaçla transdüksiyon stabilizasyonunu arttırıcı çeşitli kimyasallar kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın kullanım alanına sahip olan Polybrene ve Protamine Sülfat ajanlarıyla (Denning ve ark. 2013) farklı denemeler yapılmış olup, Polybrene ile daha etkin ve stabil bir lentiviral transdüksiyon gerçekleştirilebildiği gösterilmiştir (Şekil 4.6).

Sonuç olarak, yüksek transdüksiyon yeteneğine ve yüksek titreye sahip 3. nesil lentiviral vektörlerin döner hücre kültürü şişelerinde üretimi gerçekleştirilmiş, birçok farklı parametrenin bir arada değerlendirildiği optimize bir üretim metodu başarıyla

geliştirilmiştir. Çalışmanın ana hedeflerinden ilk basamak üretim işlemlerinin başarıyla tamamlanmasının ardından, yüksek kalite ve saflıkta vektör eldesi amacıyla alt akım işlemlerinin optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.

Kromatografik alt akım işlemleri etkin bir biçimde kullanılan pürifikasyon yöntemlerindendir. Virusların iyonik ve polar özelliklerine göre afinitelerinden yararlanarak ayrımlarını sağlayan bir temele dayanmaktadır. Virusun fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre kolonların ve tamponların seçimi yapılabilmektedir (Yamada ve ark. 2003, Segura ve ark. 2013). Yapılan çalışmada, gen aktarım işlemleri açısından en avantajlı özelliklere sahip lentiviruslar kullanıldığından ve bu viruslar fizyolojik pH'ta negatif yüklü olduklarından, safsızlık giderim işleri için anyon değişim kromatografisi kullanılmıştır. Anyon değişim kromatografi (AEX) kolonu, tuz giderim kolonu ve son ürün kalitesini arttırıcı ek basamak işlemi için polishing kolon sistemleri peşpeşe kullanılarak pürifikasyon prosesi sonlandırılmıştır. Bu metot sayesinde virusların yüksek konsantrasyonlarda elde edilmesi ve etkin bir şekilde izolasyonu sağlanmıştır.

Virusların saklama solüsyonunun belirlenmesi için HBSS ve PBS olarak iki buffer tercih edilmiş ve elde edilen vektör geri kazanımı ve viral titre miktarı başta olmak üzere, yapılan çoklu analizler ile optimum tampon kararlaştırılmıştır. Şekil 4.8 A'da görüldüğü üzere, HBSS'li örneklerin AEX kromatografisi ardından iki adet pik elde edilmiştir. Bu her iki pikten alınan örneklerin de lentivirus ihtiva ettiğine dikkat çekmek gerekmektedir. Bunun sebebine gelecek olursak, kolona örnek yüklendikten sonra yük özelliklerine bağlı olarak lentiviruslar kolona bağlanmaya başlayacaktır. Bu ilk bağlanma aşamasında oldukça kuvvetli bağlanma gerçekleşecektir. Ancak zamanla kolon kapasitesi dolmaya başlayacağından örnekteki virus partiküllerinin hepsi kolona aynı kuvvetle bağlanamaz. Dolayısıyla elüsyon tampon kolondan geçirilmeye başlandığında, daha az kuvvetle bağlanan lentiviruslar kolondan önce ayrılarak, tüpe toplanır ve kromatogramdaki görülen ilk pik bu partiküllerin göstergesidir. Elüsyon işlemi devam ettikçe, artık kolonda tutunamayan lentiviral partiküller izole edilir ve kromatogramda ikinci bir pik olarak görülür. Bu durum literatürde yapılan benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında da, kromatogramlarda benzer şekilde çift pik görülen kromatogramlar raporlandırılmıştır. Yapılan farklı çalışmalarda bu iki pik görülen durumda kolon kapasitesinden bağımsız olarak, vektörün transdüksiyonel aktivitesinden de kaynaklı olduğu belirtilmiştir. Elde edilen

ilk pikteki viral partiküllerin, hedef hücreleri transdükte etme etkinliği açısından, ikinciye göre 4-8 kat daha etkin olduğu gösterilmiştir (Yamada ve ark. 2003).

Kromatogramda görülen iki farklı pikin aynı virusun fragmentleri olması dolayısıyla, bir arada değerlendirilmesi mümkündür. Buna bağlı olarak yapılan HIV p24 protein ELISA analizinde pikler birlikte değerlendirilmiş (Şekil 4.10 ve Tablo 4.1) ve PBS'li örneklerle kıyaslanmıştır. Sonuç olarak viral partikül sayıları kıyaslandığında; HBSS'li örneklerde kromatografi sonrası partikül sayısı çok büyük oranda korunurken (%98), PBS'li örneklerde, dondurup çözdürmeye bağlı büyük oranda (%53) kayıp olduğu görülmüştür. Bunlara ek olarak her iki solüsyondaki viruslarla HT1080 hücreleri transdükte edilerek, MTT hücre canlılık test kiti ile % canlılık oranları karşılaştırıldığında da kontrol hücrelere göre HBSS'de çözülen lentiviral partiküllerle transdükte hücrelerin canlılık oranı %88 değerindeyken, PBS'li örneklerde hücre canlılığı %80 olarak belirlenmiştir. Çalışmalara başlamadan önce HBSS tamponunun yüksek tuzluluk oranının viral partiküller ve hücreler üzerinde bir dezavantaj olma ihtimali değerlendirildiğinde, alınan bulgular bu hipotezi destekleyici nitelikte değildir. Aksine, bu tampondaki yüksek tuzluluk oranı bir kriyoprotektan özellik göstererek, virusların dondurulup çözdürülme işlemlerine daha dayanıklı olmasını sağlamıştır. Bununla birlikte, HBSS tamponunda çözdürülen viruslarla yapılan transdüksiyon sonrasında hücre canlılıkları üzerinde negatif bir etki gözlenmemiş ve tüm bu bulgular değerlendirilerek çalışmanın geri kalan kısmında resüspansiyon tamponu olarak HBSS kullanımına karar verilmiştir. (Tablo 4.2 ve Şekil 4.9).

Tampon seçimini takiben yapılan pürifikasyon işlemlerinden elde edilen örneklerde HIV p24 protein ELISA testi ile (Şekil 4.10 ve Tablo 4.1) viral partikül sayısı belirlenmiş ve hem ultrasantrifüj hem de kromatografi sonucunda elde edilen lentiviral partikül sayısı ortalama 5,2 x 10^{10} LP/mL olarak hesaplanmıştır. Ancak p24 ELISA testinin her zaman transdüksiyon etkin viral partikül sayısına işaret etmediği bilinmektedir. Dolayısıyla bu test sadece kaba bir analiz olup üretim sonrasında elde edilen partikül miktarı hakkında ön data özelliği taşımaktadır. İşlemler sonucunda elde edilen örneklerdeki transdüksiyon üniteleri ancak genoma entegre kopya sayısının karşılaştırılmasıyla değerlendirilebilir. Bu amaçla; süpernatant, ultrasantrifüj ve kromatografi örnekleri ile transdükte edilen HT1080 hücrelerinde LV vektörlerin genoma entegre kopya sayıları kantitatif real-time PCR analizi ile

hesaplanmıştır. p24 analizi sonucunda kromatografi ve ultrasantrifüj sonrası alınan örneklerde birbirine çok yakın değerler elde edildiğinden bu hesaptan yola çıkarak qPCR analizi için aynı hacimde virus örnekleriyle transdüksiyon yapılmıştır. Ancak süpernatant örneği herhangi bir konsantrasyon işlemine tabi tutulmadığından, bir üretimden çok yüksek hacimde (yaklaşık 200 ml) virus elde edilmektedir. Bu sebeple örnek içerisinden alınan çok küçük hacimlerle yapılan p24 analizi sonucunda sağlıklı bir lentiviral partikül hesaplaması yapılması mümkün olmamıştır. p24 analizi ile süpernatant örneği için lentiviral partikül sayısı belirlenemediğinden, kantitatif real-time PCR analizi için yapılan transdüksiyonda diğer örneklerle eşit hacimde örnek kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre (Tablo 4.3) viral titre, süpernatant için $2.5x10^9$ TU/mL, ultrasantrifüjle konsantre edilen viruslarda $7,02x10^{10}$ TU/mL ve kromatografik pürifikasyon sonucu elde edilen viruslarda ise $6,2x10^{10}$ TU/mL olarak hesaplanmıştır. Süpernatanttaki düşük kopya sayısının nedeni, herhangi bir konsantrasyon işlemi yapılmaması dolayısıyla, içerdiği virus miktarının yüksek hacime yayılması olarak açıklanabilmektedir (Takahashi ve ark. 2005). Eşit hacimdeki örnekler kıyaslandığından, örnekleme için alınan süpernatantın mikrolitresindeki virus sayısı, konsantre örneklere göre oldukça az kalmıştır. Dolayısıyla süpernatanttaki genoma entegre kopya sayılarının ultrasantrifüj ve kromatografi örnekleriyle tam olarak kıyaslanması sağlıklı değildir.

Bununla birlikte, kromatografi ve ultrasantrifüj sonrası elde edilen örneklerin lentiviral partikül sayıları birbirine yakın olduğundan eşit MOI oranında transdüksiyon yapılabilmiştir. Genoma entegre kopya sayıları kıyaslandığında, konsantre edilmiş virusların, ek olarak kromatografik işlem görmeleriyle kopya sayılarının, $7,02x10^{10}$ TU/mL'den $6,2x10^{10}$ TU/mL'ye düştüğü belirlenmiştir. Bu azalmanın sebebi ise kromatografi esnasında kullanılan solüsyonların ihtiva ettiği tuz konsanstrasyonlarının, viral transdüksiyon etkinliğini negatif yönde etkilemesi olarak açıklanabilmektedir (Scherr ve ark. 2002, Rodrigues ve ark. 2006). Hesaplanan genoma entegre kopya sayıları değerlendirildiğinde, kromatografik saflaştırma sonucunda, US ile konsantre edilen virusların % 89,6'sının geri kazanıldığı belirlenmiştir. Ancak lentiviral vektör üretiminin başlangıcından son ürüne dek yapılan tüm alt akım işlemlerinin ardından toplam vektör geri kazanımı %53 olarak belirlenmiştir. Segura ve ark., toplam işlem veriminin düşük olmasını, uygulanan her

bir alt akım işleminin virusların transdüksiyon etkinliklerine olan negatif etkisine bağlamışlardır (Segura 2011).

Transfiguracion ve ark.; yüksek titrede ve saflıkta viral vektörlerin ultrasantrifüj ile elde edilebilmesinin yanısıra hücrelere toksik etki yapabilecek bazı kontaminantların uzaklaştırılamaması nedeniyle, yapılan gen transferinin veriminin azaldığını, dolayısıyla kromatografi gibi daha özgün ve etkin saflaştırma metotlarının bu sorunları aşabildiğini belirtmiştir. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen US ve KR temelli saflaştırma basamaklarından sonra safsızlıkların hangi oranda giderildiği analiz edilmiştir. Buna bağlı olarak yapılan Bradford toplam protein ve SDS-PAGE analizleri sonucunda, ultrasantrifüjle konsantre edilen vektörlerde süpernatanta göre %60 oranında protein saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Buna ek olarak, beklenildiği üzere ultrasantrifüjü takiben kromatografiye tabi tutulan örneklerde %90 oranında protein saflaştırması yapılabildiği belirlenmiştir (Şekil 4.12B ve Şekil 4.14) (Slepushkin V 2003, Yamada ve ark. 2003, Segura ve ark. 2013).

Ayrıca, Transfiguracion ve ark.'larının vurguladığı üzere, ultrasantrifüj sonrası toplam hacim azalırken, konsantrasyonu artan vektörün *in vivo* uygulamalarda ve klinik denemelerde kullanılabilmesi için, filtrasyonda uzaklaştırılamayan ve santrifüj sırasında vektörle birlikte çöken ekstra safsızlıklardan arındırılması gerekmektedir (Transfiguracion ve ark. 2003). Burada altının çizilmesi gereken en önemli noktalardan bir tanesi, lentivirus üretimi 293T hücre hattı üzerinde yapıldığından, hücre kaynaklı SV40 T antijeni gibi hücresel proteinlerin, özellikle in vivo uygulamalarda kullanılacak vektörlerden arındırılması gerektiğidir (Şekil 2.11) (Merten ve ark. 2011, Merten ve ark. 2014). Elde edilen SDS-PAGE görüntülerine bakıldığında, hem süpernatantta hem de ultrasantrifüj ile konsantre edilen örneklerde SV40 T antijen bandı gözlenirken, kromatografi ürününde bu proteinin başarıyla saflaştırıldığı gösterilmiştir. Bunlara ek olarak; özellikle ultrasantrifüj yapılan örneklerde kalın bir VSV-G bandı gözlenmektedir. Bunun en büyük nedeni; yüksek hızlarda döndürülen viral süpernatantta, benzer yoğunluktaki viral proteinlerin bir arada aggregratlar oluşturarak tek bir noktada toplanmasıdır (Şekil 4.12 B ve Şekil 4.14) (Transfiguracion ve ark. 2003, Merten ve ark. 2011).

Saflaştırma metotlarının virus etkinliği ve partikül sayıları üzerine etkilerinin incelenmesinden sonra, hücrelerin bu viruslarla transdüksiyon sonrasında hücre

morfolojisi ve canlılığının nasıl etkilendiğinin belirlenmesi için, HT1080 hücrelerinde yapılan transdüksiyonu takiben mikroskopik görüntüleme ve MTT canlılık analizleri gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.4 ve Şekil 4.18'de, örneklerin yüzde canlılık oranları verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, süpernatant örnekleriyle transdükte edilmiş hücrelerde %74 oranında hücre canlılığı saptanırken, ultrasantrifüj örneklerinde %82, kromatografi örneklerinde ise %90 canlılık oranı belirlenmiştir. Bu durum saflaştırılmaya tabi tutulmamış süpernatant örneklerinde proses ve hücre kaynaklı kontaminant ve safsızlıkların hücreler üzerinde toksik etki yaratmasına bağlanmaktadır. Ultrasantrifüj ve kromatografi sonrası örneklerin hücre canlılığına etkisi kıyaslandığında, SDS-PAGE analizini doğrular nitelikte sonuçlar elde edilmiş olup, kromatografik yöntemle saflaştırılan virusların diğer yöntemlere oranla hücre canlılığına en az etki ettiği gösterilmiştir (Şekil 4.18 ve Tablo 4.4).

Hücreler mikroskop altında incelendiğinde de, kromatografik yöntemle saflaştırılan viruslarla transdükte hücrelerin, sayısal verileri doğrular nitelikte, diğer yöntemlerdekine kıyasla çok daha sağlıklı bir morfolojiye sahip olduğu belirlenmiştir Bu hücrelerin büyüme veya adhezyon özelliklerinde herhangi bir negatif etki gözlenmemiş, hücreler daha parlak ve hacimsel olarak daha büyük morfolojide görüntülenmiştir (Şekil 4.17).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Projenin belirlenen amaç ve planlanan hedefler doğrultusunda gerçekleştirilmesiyle, gen tedavisinde büyük umut vaad eden lentiviral vektörlerin, in vivo çalışmalar öncesinde biyogüvenilir kalitede üretilebilmesi için ekonomik, ölçeklenebilir bir saflaştırma metodu tanımlanmıştır. Bugüne kadar bu konu ile ilgili yapılan bilimsel çalışmalar incelendiğinde birçok farklı teknik geliştirildiği ancak net ve optimize edilmiş bir geleneksel metodun açıkça yayınlanmadığı görülmektedir. Dolayısıyla, bu konu ile ilgili yapılan tez çalışması sonucunda, in vivo uygulamalarda kullanılabilecek titrede lentiviral vektör üretimiyle birlikte belki de klinik uygulamalara temel oluşturabilecek nitelikte bir saflaştırma metodunun optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen bulguların; büyük ölçekli üretimlere uyarlanması halinde, bu çalışma; klinik denemelerde kullanılabilecek özellikte ve yüksek saflıkta gen tedavi ilaçlarının üretimi açısından önemli bir basamak oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

Al-Dosari M. S. and Gao X. (2009). "Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress." AAPS J 11(4): 671-681.

Ansorge S., Henry O. and Kamen A. (2010). "Recent progress in lentiviral vector mass production." Biochemical Engineering Journal 48(3): 362-377.

Ansorge S., Lanthier S., Transfiguracion J., Durocher Y., Henry O. and Kamen A. (2009). "Development of a scalable process for high-yield lentiviral vector production by transient transfection of HEK293 suspension cultures." J Gene Med 11(10): 868-876.

Ausubel L. J., Hall C., Sharma A., Shakeley R., Lopez P., Quezada V., Couture S., Laderman K., McMahon R., Huang P., Hsu D. and Couture L. (2012). "Production of CGMP-Grade Lentiviral Vectors." Bioprocess Int 10(2): 32-43.

Aydin C., Sanlioglu A. D., Karacay B., Ozbilim G., Dertsiz L., Ozbudak O., Akdis C. A. and Sanlioglu S. (2007). "Decoy receptor-2 small interfering RNA (siRNA) strategy employing three different siRNA constructs in combination defeats adenovirus-transferred tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in lung cancer cells." Hum Gene Ther 18(1): 39-50.

Ayuso E., Chillon M., Agudo J., Haurigot V., Bosch A., Carretero A., Otaegui P. J. and Bosch F. (2004). "In vivo gene transfer to pancreatic beta cells by systemic delivery of adenoviral vectors." Hum Gene Ther 15(8): 805-812.

Backliwal G., Hildinger M., Hasija V. and Wurm F. M. (2008). "High-density transfection with HEK-293 cells allows doubling of transient titers and removes need for a priori DNA complex formation with PEI." Biotechnol Bioeng 99(3): 721-727.

Basudev H., Jones P. M. and Howell S. L. (1995). "Protein phosphorylation in the regulation of insulin secretion: the use of site-directed inhibitory peptides in electrically permeabilised islets of Langerhans." Acta Diabetol 32(1): 32-37.

Benhamou P. Y., Moriscot C., Prevost P., Rolland E., Chroboczek J. and Halimi S. (1997). "A methodology for an efficient and reproducible gene transfer into porcine islets using cationic liposomes." Transplant Proc 29(4): 2203.

Bharali D. J., Klejbor I., Stachowiak E. K., Dutta P., Roy I., Kaur N., Bergey E. J., Prasad P. N. and Stachowiak M. K. (2005). "Organically modified silica nanoparticles: a nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain." Proc Natl Acad Sci U S A 102(32): 11539-11544.

Bouard D., Alazard-Dany D. and Cosset F. L. (2009). "Viral vectors: from virology to transgene expression." Br J Pharmacol 157(2): 153-165.

Burns J. C., Friedmann T., Driever W., Burrascano M. and Yee J. K. (1993). "Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A 90(17): 8033-8037.

Chen Y., Ott C. J., Townsend K., Subbaiah P., Aiyar A. and Miller W. M. (2009). "Cholesterol Supplementation During Production Increases the Infectivity of Retroviral and Lentiviral Vectors Pseudotyped with the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein (VSV-G)." Biochem Eng J 44(2-3): 199-207.

Chowdhury E. H., Sasagawa T., Nagaoka M., Kundu A. K. and Akaike T. (2003). "Transfecting mammalian cells by DNA/calcium phosphate precipitates: effect of temperature and pH on precipitation." Anal Biochem 314(2): 316-318.

Coleman J. E., Huentelman M. J., Kasparov S., Metcalfe B. L., Paton J. F., Katovich M. J., Semple-Rowland S. L. and Raizada M. K. (2003). "Efficient large-scale production and concentration of HIV-1-based lentiviral vectors for use in vivo." Physiol Genomics 12(3): 221-228.

Cooper A. R., Patel S., Senadheera S., Plath K., Kohn D. B. and Hollis R. P. (2011). "Highly efficient large-scale lentiviral vector concentration by tandem tangential flow filtration." J Virol Methods 177(1): 1-9.

Cronin J., Zhang X. Y. and Reiser J. (2005). "Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping." Curr Gene Ther 5(4): 387-398.

Daya S. and Berns K. I. (2008). "Gene therapy using adeno-associated virus vectors." Clin Microbiol Rev 21(4): 583-593.

Denning W., Das S., Guo S., Xu J., Kappes J. C. and Hel Z. (2013). "Optimization of the transductional efficiency of lentiviral vectors: effect of sera and polycations." Mol Biotechnol 53(3): 308-314.

DePolo N. J., Reed J. D., Sheridan P. L., Townsend K., Sauter S. L., Jolly D. J. and Dubensky T. W. (2000). "VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum." Mol Ther 2(3): 218-222.

Derouazi M., Girard P., Van Tilborgh F., Iglesias K., Muller N., Bertschinger M. and Wurm F. M. (2004). "Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells." Biotechnol Bioeng 87(4): 537-545.

Dirice E., Sanlioglu A. D., Kahraman S., Ozturk S., Balci M. K., Omer A., Griffith T. S. and Sanlioglu S. (2009). "Adenovirus-mediated TRAIL gene (Ad5hTRAIL) delivery into pancreatic islets prolongs normoglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats." Hum Gene Ther 20(10): 1177-1189.

Dobson J. (2006). "Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery." Gene Ther 13(4): 283-287.

Doerschug K., Sanlioglu S., Flaherty D. M., Wilson R. L., Yarovinsky T., Monick M. M., Engelhardt J. F. and Hunninghake G. W. (2002). "First-generation adenovirus vectors shorten survival time in a murine model of sepsis." J Immunol 169(11): 6539-6545.

Duan D., Sharma P., Dudus L., Zhang Y., Sanlioglu S., Yan Z., Yue Y., Ye Y., Lester R., Yang J., Fisher K. J. and Engelhardt J. F. (1999). "Formation of adeno-associated virus circular genomes is differentially regulated by adenovirus E4 ORF6 and E2a gene expression." J Virol 73(1): 161-169.

Dull T., Zufferey R., Kelly M., Mandel R. J., Nguyen M., Trono D. and Naldini L. (1998). "A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system." J Virol 72(11): 8463-8471.

Durocher Y., Perret S. and Kamen A. (2002). "High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells." Nucleic Acids Res 30(2): E9.

Dutheil N., Shi F., Dupressoir T. and Linden R. M. (2000). "Adeno-associated virus site-specifically integrates into a muscle-specific DNA region." Proc Natl Acad Sci USA 97(9): 4862-4866.

Fasbender A., Lee J. H., Walters R. W., Moninger T. O., Zabner J. and Welsh M. J. (1998). "Incorporation of adenovirus in calcium phosphate precipitates enhances gene transfer to airway epithelia in vitro and in vivo." J Clin Invest 102(1): 184-193.

Follenzi A. and Naldini L. (2002). "Generation of HIV-1 derived lentiviral vectors." Methods Enzymol 346: 454-465.

Frankel A. D. and Young J. A. (1998). "HIV-1: fifteen proteins and an RNA." Annu Rev Biochem 67: 1-25.

Geisse S. (2009). "Reflections on more than 10 years of TGE approaches." Protein Expr Purif 64(2): 99-107.

Geraerts M., Michiels M., Baekelandt V., Debyser Z. and Gijsbers R. (2005). "Upscaling of lentiviral vector production by tangential flow filtration." J Gene Med 7(10): 1299-1310.

Ginn S. L., Alexander I. E., Edelstein M. L., Abedi M. R. and Wixon J. (2013). "Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update." J Gene Med 15(2): 65-77.

Gloger I., Arad G. and Panet A. (1985). "Regulation of Moloney murine leukemia virus replication in chronically infected cells arrested at the G0/G1 phase." J Virol 54(3): 844-850.

Glover D. J., Lipps H. J. and Jans D. A. (2005). "Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans." Nat Rev Genet 6(4): 299-310.

Goff S. (2001). Retroviridae: The retroviruses and their replication. Fields Virology. D. K. a. P.Howley. Philadelphia, Lippincott, Williams and Wilkins: 1871-1939.

Grieger J. C. and Samulski R. J. (2005). "Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps." J Virol 79(15): 9933-9944.

Hacein-Bey-Abina S., Garrigue A., Wang G. P., Soulier J., Lim A., Morillon E., Clappier E., Caccavelli L., Delabesse E., Beldjord K., Asnafi V., MacIntyre E., Dal Cortivo L., Radford I., Brousse N., Sigaux F., Moshous D., Hauer J., Borkhardt A., Belohradsky B. H., Wintergerst U., Velez M. C., Leiva L., Sorensen R., Wulffraat N., Blanche S., Bushman F. D., Fischer A. and Cavazzana-Calvo M. (2008). "Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1." J Clin Invest 118(9): 3132-3142.

Hackett N. R., Kaminsky S. M., Sondhi D. and Crystal R. G. (2000). "Antivector and antitransgene host responses in gene therapy." Curr Opin Mol Ther 2(4): 376-382.

Herrmann C. H. and Rice A. P. (1995). "Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor." J Virol 69(3): 1612-1620.

Herweijer H. and Wolff J. A. (2003). "Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy." Gene Ther 10(6): 453-458.

Herweijer H. and Wolff J. A. (2007). "Gene therapy progress and prospects: hydrodynamic gene delivery." Gene Ther 14(2): 99-107.

Holm K., Weclewicz K., Hewson R. and Suomalainen M. (2003). "Human immunodeficiency virus type 1 assembly and lipid rafts: Pr55(gag) associates with membrane domains that are largely resistant to Brij98 but sensitive to Triton X-100." J Virol 77(8): 4805-4817.

Hsu C. Y. and Uludag H. (2012). "Nucleic-acid based gene therapeutics: delivery challenges and modular design of nonviral gene carriers and expression cassettes to overcome intracellular barriers for sustained targeted expression." J Drug Target 20(4): 301-328.

Hughes C., Galea-Lauri J., Farzaneh F. and Darling D. (2001). "Streptavidin paramagnetic particles provide a choice of three affinity-based capture and magnetic concentration strategies for retroviral vectors." Mol Ther 3(4): 623-630.

Ikeda Y., Takeuchi Y., Martin F., Cosset F. L., Mitrophanous K. and Collins M. (2003). "Continuous high-titer HIV-1 vector production." Nat Biotechnol 21(5): 569-572.

Jaalouk D. E., Crosato M., Brodt P. and Galipeau J. (2006). "Inhibition of histone deacetylation in 293GPG packaging cell line improves the production of self-inactivating MLV-derived retroviral vectors." Virol J 3: 27.

Jin L., Zeng X., Liu M., Deng Y. and He N. (2014). "Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers." Theranostics 4(3): 240-255.

Jones K. A.and Peterlin B. M. (1994). "Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter." Annu Rev Biochem 63: 717-743.

Jooss K. and Chirmule N. (2003). "Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy." Gene Ther 10(11): 955-963.

Jordan M., Schallhorn A. and Wurm F. M. (1996). "Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation." Nucleic Acids Res 24(4): 596-601.

Karolewski B. A., Watson D. J., Parente M. K. and Wolfe J. H. (2003). "Comparison of transfection conditions for a lentivirus vector produced in large volumes." Hum Gene Ther 14(14): 1287-1296.

Kingston R. E., Chen C. A. and Rose J. K. (2003). "Calcium phosphate transfection." Curr Protoc Mol Biol Chapter 9: Unit 9 1.

Kruh J. (1982). "Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture." Mol Cell Biochem 42(2): 65-82.

Kuroda H., Kutner R. H., Bazan N. G. and Reiser J. (2009). "Simplified lentivirus vector production in protein-free media using polyethylenimine-mediated transfection." J Virol Methods 157(2): 113-121.

Kutner R. H., Puthli S., Marino M. P. and Reiser J. (2009). "Simplified production and concentration of HIV-1-based lentiviral vectors using HYPERFlask vessels and anion exchange membrane chromatography." BMC Biotechnol 9: 10.

Lai C. M., Lai Y. K. and Rakoczy P. E. (2002). "Adenovirus and adeno-associated virus vectors." DNA Cell Biol 21(12): 895-913.

Lakey J. R., Young A. T., Pardue D., Calvin S., Albertson T. E., Jacobson L. and Cavanagh T. J. (2001). "Nonviral transfection of intact pancreatic islets." Cell Transplant 10(8): 697-708.

Lee M. S., Song K. D., Yang H. J., Solis C. D., Kim S. H. and Lee W. K. (2012). "Development of a type II diabetic mellitus animal model using Micropig(R)." Lab Anim Res 28(3): 205-208.

Lever A., Gottlinger H., Haseltine W. and Sodroski J. (1989). "Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions." J Virol 63(9): 4085-4087.

Lewis P., Hensel M. and Emerman M. (1992). "Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle." EMBO J 11(8): 3053-3058.

Li S. D. and Huang L. (2006). "Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery." Gene Ther 13(18): 1313-1319.

Luo D. and Saltzman W. M. (2006). "Nonviral gene delivery: thinking of silica." Gene Ther 13(7): 585-586.

Luthman H. and Magnusson G. (1983). "High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells." Nucleic Acids Res 11(5): 1295-1308.

MacGregor R. R. (2001). "Clinical protocol. A phase 1 open-label clinical trial of the safety and tolerability of single escalating doses of autologous CD4 T cells

transduced with VRX496 in HIV-positive subjects." Hum Gene Ther 12(16): 2028-2029.

Mahato R. I., Henry J., Narang A. S., Sabek O., Fraga D., Kotb M. and Gaber A. O. (2003). "Cationic lipid and polymer-based gene delivery to human pancreatic islets." Mol Ther 7(1): 89-100.

Maitra A. (2005). "Calcium phosphate nanoparticles: second-generation nonviral vectors in gene therapy." Expert Rev Mol Diagn 5(6): 893-905.

Maurisse R., De Semir D., Emamekhoo H., Bedayat B., Abdolmohammadi A., Parsi H. and Gruenert D. C. (2010). "Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages." BMC Biotechnol 10: 9.

McBride M. S. and Panganiban A. T. (1996). "The human immunodeficiency virus type 1 encapsidation site is a multipartite RNA element composed of functional hairpin structures." J Virol 70(5): 2963-2973.

McClane S. J., Chirmule N., Burke C. V. and Raper S. E. (1997). "Characterization of the immune response after local delivery of recombinant adenovirus in murine pancreas and successful strategies for readministration." Hum Gene Ther 8(18): 2207-2216.

Meier O. and Greber U. F. (2004). "Adenovirus endocytosis." J Gene Med 6 Suppl 1: S152-163.

Merten O. W., Charrier S., Laroudie N., Fauchille S., Dugue C., Jenny C., Audit M., Zanta-Boussif M. A., Chautard H., Radrizzani M., Vallanti G., Naldini L., Noguiez-Hellin P. and Galy A. (2011). "Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene therapy application." Hum Gene Ther 22(3): 343-356.

Merten O. W., Schweizer M., Chahal P. and Kamen A. (2014). "Manufacturing of viral vectors: part II. Downstream processing and safety aspects." Pharmaceutical Bioprocessing 2(3): 237-251.

Merten O.W., Stacey G. N. (2011). “Host cells and cell banking.” Viral vectors for gene therapy (737): 45-88.

Michen B. and Graule T. (2010). "Isoelectric points of viruses." J Appl Microbiol 109(2): 388-397.

Mir L. M. (2014). "Electroporation-based gene therapy: recent evolution in the mechanism description and technology developments." Methods Mol Biol 1121: 3-23.

Mitta B., Rimann M. and Fussenegger M. (2005). "Detailed design and comparative analysis of protocols for optimized production of high-performance HIV-1-derived lentiviral particles." Metab Eng 7(5-6): 426-436.

Miyoshi H., Blomer U., Takahashi M., Gage F. H. and Verma I. M. (1998). "Development of a self-inactivating lentivirus vector." J Virol 72(10): 8150-8157.

Monahan P. E. and Samulski R. J. (2000). "Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons?" Mol Med Today 6(11): 433-440.

Mukai E., Fujimoto S., Sakurai F., Kawabata K., Yamashita M., Inagaki N. and Mizuguchi H. (2007). "Efficient gene transfer into murine pancreatic islets using adenovirus vectors." J Control Release 119(1): 136-141.

Mulligan R. C. (1993). "The basic science of gene therapy." Science 260(5110): 926-932.

Naldini L., Blomer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F. H., Verma I. M. and Trono D. (1996). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." Science 272(5259): 263-267.

Naldini L. and Verma I. M. (2000). "Lentiviral vectors." Adv Virus Res 55: 599-609.

Nayerossadat N., Maedeh T. and Ali P. A. (2012). "Viral and nonviral delivery systems for gene delivery." Adv Biomed Res 1: 27.

Newman C. M. and Bettinger T. (2007). "Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer." Gene Ther 14(6): 465-475.

Pezzoli D., Kajaste-Rudnitski A., Chiesa R. and Candiani G. (2013). "Lipid-based nanoparticles as nonviral gene delivery vectors." Methods Mol Biol 1025: 269-279.

Pham P. L., Kamen A. and Durocher Y. (2006). "Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein." Mol Biotechnol 34(2): 225-237.

Pollard V. W. and Malim M. H. (1998). "The HIV-1 Rev protein." Annu Rev Microbiol 52: 491-532.

Ponder K. P. (2001). Vectors of Gene Therapy. An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy. T. F. Kresina, Wiley-Liss, Inc.: 77-112.

Rodrigues T., Carvalho A., Roldao A., Carrondo M. J., Alves P. M. and Cruz P. E. (2006). "Screening anion-exchange chromatographic matrices for isolation of onco-retroviral vectors." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 837(1-2): 59-68.

Rosenberg S. A., Aebersold P., Cornetta K., Kasid A., Morgan R. A., Moen R., Karson E. M., Lotze M. T., Yang J. C., Topalian S. L. and et al. (1990). "Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction." N Engl J Med 323(9): 570-578.

Roush D. J. and Lu Y. (2008). "Advances in primary recovery: centrifugation and membrane technology." Biotechnol Prog 24(3): 488-495.

Sanlioglu A. D., Aydin C., Bozcuk H., Terzioglu E. and Sanlioglu S. (2004). "Fundamental principals of tumor necrosis factor-alpha gene therapy approach and implications for patients with lung carcinoma." Lung Cancer 44(2): 199-211.

Sanlioglu A. D., Karacay B., Balci M. K., Griffith T. S. and Sanlioglu S. (2012). "Therapeutic potential of VIP vs PACAP in diabetes." J Mol Endocrinol 49(3): R157-167.

Sanlioglu A. D., Karacay B., Benson P. K., Engelhardt J. F. and Sanlioglu S. (2004). "Novel approaches to augment adeno-associated virus type-2 endocytosis and transduction." Virus Res 104(1): 51-59.

Sanlioglu A. D., Koksal I. T., Karacay B., Baykara M., Luleci G. and Sanlioglu S. (2006). "Adenovirus-mediated IKKbetaKA expression sensitizes prostate carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis." Cancer Gene Ther 13(1): 21-31.

Sanlioglu S., Benson P. and Engelhardt J. F. (2000). "Loss of ATM function enhances recombinant adeno-associated virus transduction and integration through pathways similar to UV irradiation." Virology 268(1): 68-78.

Sanlioglu S., Benson P. K., Yang J., Atkinson E. M., Reynolds T. and Engelhardt J. F. (2000). "Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation." J Virol 74(19): 9184-9196.

Sanlioglu S., Duan D. and Engelhardt J. F. (1999). "Two independent molecular pathways for recombinant adeno-associated virus genome conversion occur after UV-C and E4orf6 augmentation of transduction." Hum Gene Ther 10(4): 591-602.

Sanlioglu S. and Engelhardt J. F. (1999). "Cellular redox state alters recombinant adeno-associated virus transduction through tyrosine phosphatase pathways." Gene Ther 6(8): 1427-1437.

Sanlioglu S., Luleci G. and Thomas K. W. (2001). "Simultaneous inhibition of Rac1 and IKK pathways sensitizes lung cancer cells to TNFalpha-mediated apoptosis." Cancer Gene Ther 8(11): 897-905.

Sanlioglu S., Monick M. M., Luleci G., Hunninghake G. W. and Engelhardt J. F. (2001). "Rate limiting steps of AAV transduction and implications for human gene therapy." Curr Gene Ther 1(2): 137-147.

Sastry L., Xu Y., Cooper R., Pollok K. and Cornetta K. (2004). "Evaluation of plasmid DNA removal from lentiviral vectors by benzonase treatment." Hum Gene Ther 15(2): 221-226.

Scherr M., Battmer K., Eder M., Schule S., Hohenberg H., Ganser A., Grez M. and Blomer U. (2002). "Efficient gene transfer into the CNS by lentiviral vectors purified by anion exchange chromatography." Gene Ther 9(24): 1708-1714.

Segura M. M., Garnier A., Durocher Y., Coelho H. and Kamen A. (2007). "Production of lentiviral vectors by large-scale transient transfection of suspension cultures and affinity chromatography purification." Biotechnol Bioeng 98(4): 789-799.

Segura M. M., Kamen A. and Garnier A. (2006). "Downstream processing of oncoretroviral and lentiviral gene therapy vectors." Biotechnol Adv 24(3): 321-337.

Segura M. M., Kamen A., Trudel P. and Garnier A. (2005). "A novel purification strategy for retrovirus gene therapy vectors using heparin affinity chromatography." Biotechnol Bioeng 90(4): 391-404.

Segura M. M., Kamen A. A., Garnier, A. (2011). “Overview of current scalable methods for purification of viral vectors.” Viral vectors for gene therapy. Humana Press: 89-116.

Segura M. M., Mangion M., Gaillet B. and Garnier A. (2013). "New developments in lentiviral vector design, production and purification." Expert Opin Biol Ther 13(7): 987-1011.

Sena-Esteves M., Tebbets J. C., Steffens S., Crombleholme T. and Flake A. W. (2004). "Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes." J Virol Methods 122(2): 131-139.

Shaw G., Morse S., Ararat M. and Graham F. L. (2002). "Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells." FASEB J 16(8): 869-871.

Simon V. and Ho D. D. (2003). "HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy." Nat Rev Microbiol 1(3): 181-190.

Slepushkin V C. N., Cohen R (2003). "Large-scale purification of a lentiviral vector by size exclusion chromatography or mustang Q ion exchange capsule." Bioprocessing J 2: 89-95.

Smith S. L. and Shioda T. (2009). "Advantages of COS-1 monkey kidney epithelial cells as packaging host for small-volume production of high-quality recombinant lentiviruses." J Virol Methods 157(1): 47-54.

Stabell A. C., Hawkins J., Li M., Gao X., David M., Press W. H. and Sawyer S. L. (2016). "Non-human Primate Schlafen11 Inhibits Production of Both Host and Viral Proteins." PLoS Pathog 12(12): e1006066.

Summerford C. and Samulski R. J. (1999). "Viral receptors and vector purification: new approaches for generating clinical-grade reagents." Nat Med 5(5): 587-588.

Sun M. (1982). "Martin Cline loses appeal on NIH grant." Science 218(4567): 37.

Takahashi H., Niidome Y. and Yamada S. (2005). "Controlled release of plasmid DNA from gold nanorods induced by pulsed near-infrared light." Chem Commun (Camb)(17): 2247-2249.

Tasyurek H. M., Altunbas H. A., Balci M. K. and Sanlioglu S. (2014). "Incretins: their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus." Diabetes Metab Res Rev 30(5): 354-371.

Tasyurek M. H., Altunbas H. A., Canatan H., Griffith T. S. and Sanlioglu S. (2014). "GLP-1-mediated gene therapy approaches for diabetes treatment." Expert Rev Mol Med 16: e7.

Templeton N. S. (2009). “Gene and cell therapy : therapeutic mechanisms and strategies.” Boca Raton, CRC Press.

Terzioglu E., Bisgin A., Sanlioglu A. D., Ulker M., Yazisiz V., Tuzuner S. and Sanlioglu S. (2007). "Concurrent gene therapy strategies effectively destroy synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis." Rheumatology (Oxford) 46(5): 783-789.

Toledo J. R., Prieto Y., Oramas N. and Sanchez O. (2009). "Polyethylenimine-based transfection method as a simple and effective way to produce recombinant lentiviral vectors." Appl Biochem Biotechnol 157(3): 538-544.

Tom R., Bisson L. and Durocher Y. (2008). "Transfection of HEK293-EBNA1 Cells in Suspension with 293fectin for Production of Recombinant Proteins." CSH Protoc 2008: pdb prot4979.

Transfiguracion J., Jaalouk D. E., Ghani K., Galipeau J. and Kamen A. (2003). "Size-exclusion chromatography purification of high-titer vesicular stomatitis virus G glycoprotein-pseudotyped retrovectors for cell and gene therapy applications." Hum Gene Ther 14(12): 1139-1153.

Konak İ. Ü., Turhan İ. and Certel M. (2014). "Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması." Academic Food Journal 12(2): 79-87.

Vogt P. K. (1997). Historical introduction to the general properties of retroviruses. Retroviruses. S. H. a. H. V. JM Coffin. NY, CSHL Press: 1-69.

Wang A. Y., Peng P. D., Ehrhardt A., Storm T. A. and Kay M. A. (2004). "Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo." Hum Gene Ther 15(4): 405-413.

Warnock J. N., Merten O. W. and Al-Rubeai M. (2006). "Cell culture processes for the production of viral vectors for gene therapy purposes." Cytotechnology 50(1-3): 141-162.

Williams S. L., Eccleston M. E. and Slater N. K. (2005). "Affinity capture of a biotinylated retrovirus on macroporous monolithic adsorbents: towards a rapid single-step purification process." Biotechnol Bioeng 89(7): 783-787.

Wirth T., Parker N. and Yla-Herttuala S. (2013). "History of gene therapy." Gene 525(2): 162-169.

Worgall S., Leopold P. L., Wolff G., Ferris B., Van Roijen N. and Crystal R. G. (1997). "Role of alveolar macrophages in rapid elimination of adenovirus vectors

administered to the epithelial surface of the respiratory tract." Hum Gene Ther 8(14): 1675-1684.

Wu Z., Yang H. and Colosi P. (2010). "Effect of genome size on AAV vector packaging." Mol Ther 18(1): 80-86.

Yamada K., McCarty D. M., Madden V. J. and Walsh C. E. (2003). "Lentivirus vector purification using anion exchange HPLC leads to improved gene transfer." Biotechniques 34(5): 1074-1078, 1080.

Yang J., Marden J. J., Fan C., Sanlioglu S., Weiss R. M., Ritchie T. C., Davisson R. L. and Engelhardt J. F. (2003). "Genetic redox preconditioning differentially modulates AP-1 and NF kappa B responses following cardiac ischemia/reperfusion injury and protects against necrosis and apoptosis." Mol Ther 7(3): 341-353.

Yang Y. W. and Yang J. C. (1997). "Calcium phosphate as a gene carrier: electron microscopy." Biomaterials 18(3): 213-217.

Ye K., Jin S., Ataai M. M., Schultz J. S. and Ibeh J. (2004). "Tagging retrovirus vectors with a metal binding peptide and one-step purification by immobilized metal affinity chromatography." J Virol 78(18): 9820-9827.

Young S. M. and Samulski R. J. (2001). "Adeno-associated virus (AAV) site-specific recombination does not require a Rep-dependent origin of replication within the AAV terminal repeat." Proc Natl Acad Sci U S A 98(24): 13525-13530.

Yu J. H. and Schaffer D. V. (2006). "Selection of novel vesicular stomatitis virus glycoprotein variants from a peptide insertion library for enhanced purification of retroviral and lentiviral vectors." J Virol 80(7): 3285-3292.

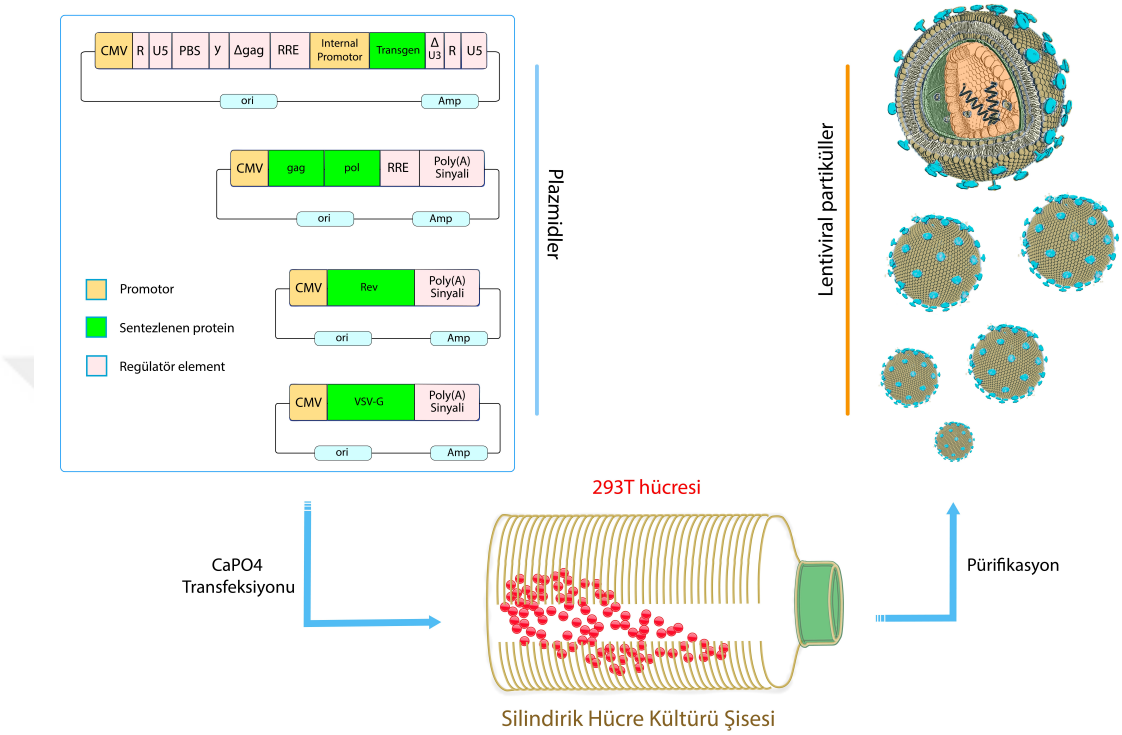
Zufferey R., Donello J. E., Trono D. and Hope T. J. (1999). "Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors." J Virol 73(4): 2886-2892.

Zufferey R., Dull T., Mandel R. J., Bukovsky A., Quiroz D., Naldini L. and Trono D. (1998). "Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery." J Virol 72(12): 9873-9880.

Zufferey R., Nagy D., Mandel R. J., Naldini L. and Trono D. (1997). "Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo." Nat Biotechnol 15(9): 871-875

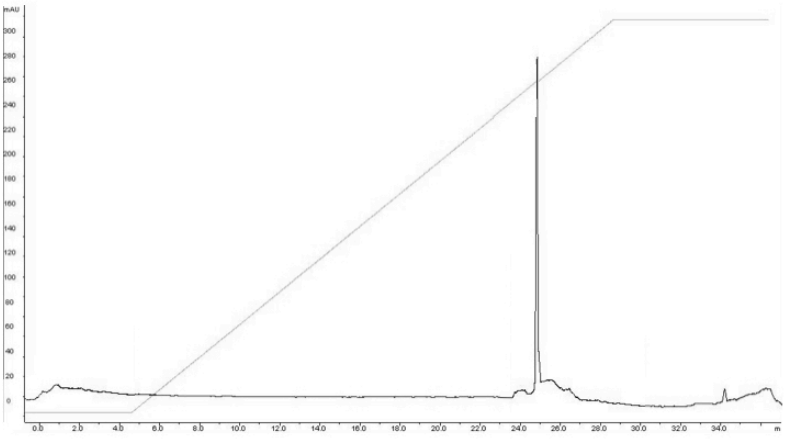
EKLER

EKLER-1

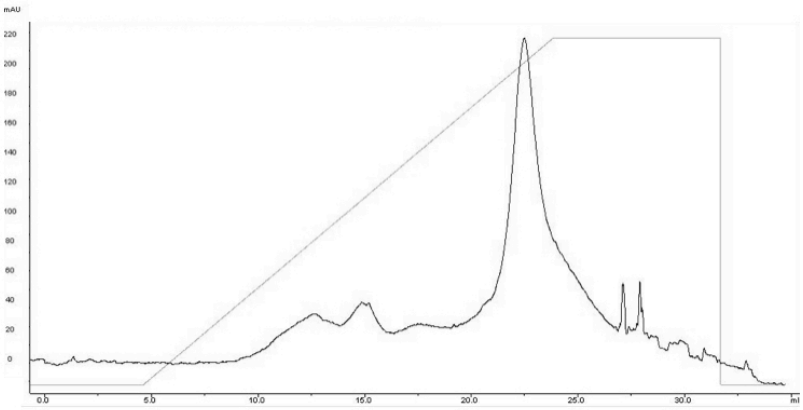


Silindirik hücre kültürü şişelerinde Lentiviral Gen Tedavi Vektör Üretim Yöntemi bilgilerinin koruma altına alınabilmesi için fikri ve sınai mülkiyet hakları kapsamındaki kanun gereğince patent başvurusu (Evrak No: TPE- 2016-GE-122976, Başvuru No: 2016/03933) yapılmıştır.

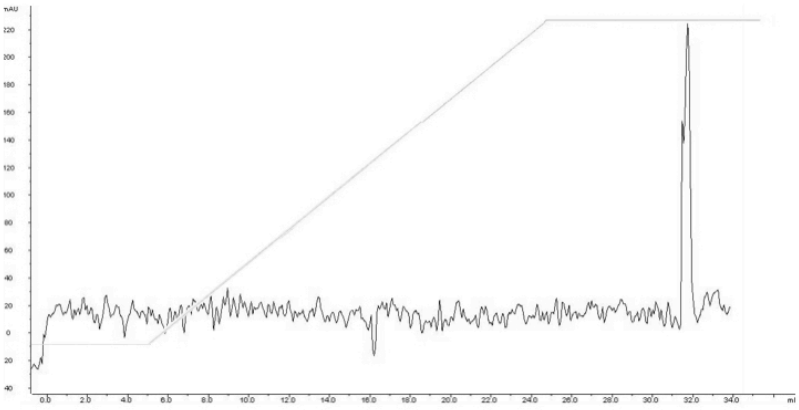
A)



B)



C)



Ek-Şekil 1.1 (A) AEX esnasında lineer gradient elüsyon ile toplanması gereken ideal koşullarda virus piki görüntüsü. (B) Elüsyon parametrelerinden buffer tuz konsantrasyonunun yetersiz kalması sonucunda, izole edilmesi istenen viral örneğin, aynı elektriksel yük karakteristiğine sahip proteinlerden ayrımlanmaması sonucunda elde edilen pik görüntüsü. Resolüsyonun artırılması için pH yada tuz konsantrasyonunda iyileşme yapılmalıdır. (C) Elde edilen viral örneğin pik kalitesi iyi olsa da arka planın noisy (dalgalı) olması cihazın hava kabarcıkları içermesi ve dolayısıyla kontaminantların tam olarak ayrıştırılmadığını gösterir. Dalgalanmanın giderilmesi amacıyla cihaza bir kaç dakika %20'lik etanol ile yıkama yapılmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	HAZAL BANU	**Uyruğu**	T.C.
Soyadı	OLGUN	**Tel no**	5547930110
Doğum tarihi	09.06.1989	**e-posta**	hbolgun@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		**Mezuniyet yılı**
Lise	Hacı Ömer Tarman And.Lis. ANKARA	2007
Lisans	Biyomühendislik, Ege Üni. İZMİR	2013
Yüksek Lisans	Tıbbi Biyoloji ve Genetik, Akdeniz Üni. ANTALYA	2017

İş Deneyimi

Görevi	**Kurum**	**Süre (yıl-yıl)**
Kalite Kontrol Ar-Ge Mühendisi	TÜRKLAB Tıbbi Malzemeler A.Ş., İZMİR	2

Yabancı Dilleri	**Sınav türü**	**Puanı**
Türkçe	ALES	81
İngilizce	YDS	77

Proje Deneyimi

Proje Adı	**Destekleyen kurum**	**Süre (Yıl-Yıl)**
01038.STZ.2011-2	Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı	1
01040.STZ.2011-2	Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı	1

Burslar-Ödüller

14. Ulusal Fizik Olimpiyatları, 2006 (1. Aşama) Birincilik Ödülü

Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, San-Tez Proje No: 01040.STZ.2011-2 : Araştırmacı Mühendis Bursiyer

TÜBİTAK 1001 Proje No: 112S114 – Y.Lisans Bursiyer

Yayınlar ve Bildiriler

Hazal Banu Olgun, Hale M. Tasyurek, Hasan Ali Altunbas, ve Salih Sanlioglu. *Diyet Bağımlı Obez Spraque Dawley Sıçanlarda STZ ile Diyabet İndüksiyonu Pankreatik Adacıklarda İnkretin Hormonu (GLP-1) Sentezini Azaltır.* 51. Ulusal Diyabet Kongresi, Antalya, 2015.

Hazal Banu Olgun, Hale M. Tasyurek, Hasan Ali Altunbas, ve Salih Sanlioglu. *Obese and Diabetic Sprague Dawley rats exhibited reduced GLP-1 expression in pancreatic islets of Langerhans*. XIII. European Society of Gene and Cell Theraphy Congress, Finland, 2015.

Hazal Banu Olgun, Hale M. Tasyurek, Hasan Ali Altunbas, Halit Canatan ve Salih Sanlioglu. *GLP1 gen replasman tedavisinin Tip 2 Diyabet Sprague Dawley sıçanlarda rezidüel adacık replikasyon ve rejenerasyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi*. XIV. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Fethiye, 2015.

Hazal Banu Olgun ve Salih Sanlioglu. *Diyabet tedavisinde in vivo gen nakil uygulamalarına uygun ölçekte ve kalitede lentiviral vektör üretimi*. 53. Ulusal Diyabet Kongresi, Girne, 2017.

Hazal Banu Olgun, Mustafa Kemal Balcı ve Salih Sanlioglu. *3. jenerasyon HIV tabanli lentiviral vektörlerin in vivo uygulamalar için üretimi ve pürifikasyon yöntemlerinin optimizasyonu.* XV. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Fethiye, 2017.

Hazal Banu Olgun, Mustafa Kemal Balcı ve Salih Sanlioglu. *A practical method for production and purification of 3rd generation HIV based lentiviral vectors for in vivo applications.* XV. European Society of Gene and Cell Theraphy Congress, Germany, 2017.