



# DNA Nanoparçacıklarının Nanotıp ve Nanobiyoteknolojideki Yeni Kullanım Alanları

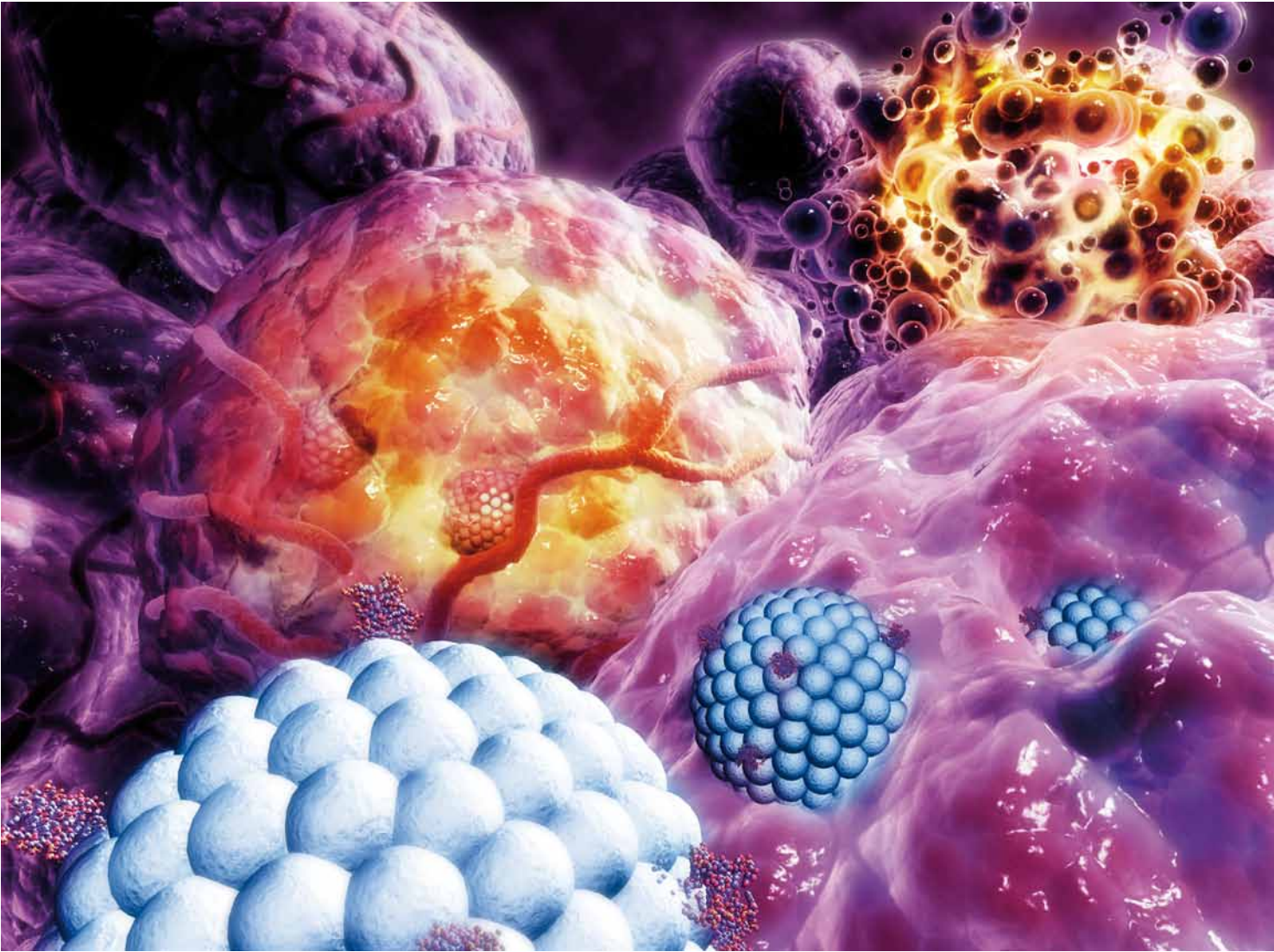
Nükleik asitler ve onların oluşturduğu DNA ve RNA gibi makromoleküller artık sadece genetik bilginin depolandığı yalın biyolojik ajanlar olarak kabul edilmemektedir. Yakın geçmişteki araştırmalar bu makromoleküllerin özellikle bağışıklık sistemini oluşturan hücrelere çok farklı işlevler kazandırdığını ve bu hücrelerin bağışıklık düzenleyici görev yelpazesini de genişlettiğini göstermiştir. Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde bu konuda yapılan çalışmalar, öncelikle söz konusu biyolojik ajanları bir nanoilaç olarak tasarlamayı ve model hayvan deneyleriyle bu ilaçların immünoterapideki uygulama potansiyellerini ve yelpazesini belirleyerek, klinik araştırmaların başlatılması için gerekli önbilgileri elde etmeyi amaçlamaktadır.

**B**ilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoterapötik Oligonükleotid Araştırma Laboratuvarı, sentetik DNA dizinlerinin tasarım ve formülasyonlarını geliştirerek DNA temelli yeni nesil hedefe yönelik biyolojik kökenli ilaç geliştirilmesi konularına odaklanmıştır.

DNA'nın son yıllara kadar sadece "genetik kodun" depolandığı "yalın" bir makromolekül olarak işlev gördüğü düşünülmekteydi. Özellikle immüno­loji (bağışıklık sistemini inceleyen bilim dalı), hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji alanlarında son yıllarda sürdürülen çalışmalarla DNA'nın bağışıklık sistemi üzerindeki çok karmaşık "bağışıklık düzenleyici" etkileri de gün ışığına çıkmaya başlamıştır. Son yıllardaki araştırmalar, DNA'nın elde edilmiş olduğu kaynağın tipine bağlı olarak bağışıklık sistemi hücre-

lerini uyarabildiğini ya da etkinliklerini değiştirebildiğini ortaya koymuştur.

Elde edilen yeni bulgular, bu etkilere yol açan faktörlerin DNA dizininde bulunan özel motiflere ve DNA'nın elde edildiği kaynağın tipine (prokaryotik veya ökaryotik) bağlı olduğuna işaret etmektedir. Örneğin, bakteri DNA'sı memeli DNA'sına oranla çok yüksek miktarda metilsiz "CpG (*sitozin-fosfat-guanozin*)" motifi içermektedir. Bağışıklık sistemi hücreleri tarafından "tehlike sinyali" olarak algılanan bu motifler, antijen sunumunda rol alan hücreleri yani makrofajları, dendritik hücreleri ve B-Hücrelerini uarmaktadır. Memeli bağışıklık sistemi hücreleri üzerinde CpG motiflerini tanımakla görevli reseptörün de (Toll benzeri reseptör 9-TLR9) keşfiyle, bu olguyla ilgili araştırmalarda yeni bir çığır açılmıştır.

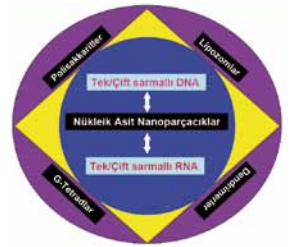


Öte yandan, memeli DNA'sının telomerik ucunda bulunan ve baz dizilimi TTAGGG şeklinde tekrarlayan motifler, CpG motiflerinin aksine memeli bağışıklık sistemi hücrelerinin etkinleşmesini baskılabilmektedir. Laboratuvar ortamında, klinik saflıkta ve kalitede sentezlenebilen bu kısa ve tek sarmallı dizinler (CpG ve TTAGGG motifleri), bakteri veya memeli DNA'sının bağışıklık düzenleyici özelliklerini taklit edebildiğinden immünoterapide kullanımının yolu açılmıştır.

Model hayvanlar (belirli bir biyolojik olgunun anlaşılması için üzerinde inceleme yapılan hayvanlar) üzerinde yapılan klinik öncesi çalışmalar, sentetik oligodeoksinükleotidlerin (DNA'yla benzer yapıda kısa nükleik asit zincirleri) etkinliklerini sınırlı düzeyde gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu düşük biyolojik etkinin başlıca nedeninin bu sentetik oligodeoksinükleotidlerin serum proteinlerine bağlanması veya nükleaz enzimleriyle parçalanması olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle tedavi için gerekli düzeyde etkinleştirme sağlanmasında sorunlar yaşanmaktadır.

Bilkent'te yapılan araştırmaların hedeflerinden biri, işte bu düşük biyolojik etkinin artırılması için değişik stratejiler geliştirmektir. Şema 1, alternatif yaklaşımları özetlemektedir. Buradan da görüleceği gibi, DNA veya RNA gibi immünojenik (bağışıklıkla ilgili) etkinlikleri bilinen makromoleküllerin, dört farklı yaklaşımla daha kararlı hale gelmelerini ve bağışıklık hücrelerine ulaşana kadar dolaşımında daha uzun süre kalmalarını sağlamak hedeflenmektedir. Özetle, DNA ile RNA moleküllerini, dendrimerik yapılarla veya G-tetraların yardımı ile kompleksleştirmek mümkündür. Ayrıca polisakaritlerle bu ajanların nanoyapılara dönüştürülmesi de uygulanmaktadır. Son olarak laboratuvarımızda geliştirilen lipozomlarla da DNA ve RNA'yı nano-kesicilere dönüştürebilmekteyiz.

Şema 1, alternatif yaklaşımları özetlemektedir. Buradan da görüleceği gibi, DNA veya RNA gibi immünojenik (bağışıklıkla ilgili) etkinlikleri bilinen makromoleküllerin, dört farklı yaklaşımla daha kararlı hale gelmelerini ve bağışıklık hücrelerine ulaşana kadar dolaşımında daha uzun süre kalmalarını sağlamak hedeflenmektedir. Özetle, DNA ile RNA moleküllerini, dendrimerik yapılarla veya G-tetraların yardımı ile kompleksleştirmek mümkündür. Ayrıca polisakaritlerle bu ajanların nanoyapılara dönüştürülmesi de uygulanmaktadır. Son olarak laboratuvarımızda geliştirilen lipozomlarla da DNA ve RNA'yı nano-kesicilere dönüştürebilmekteyiz.

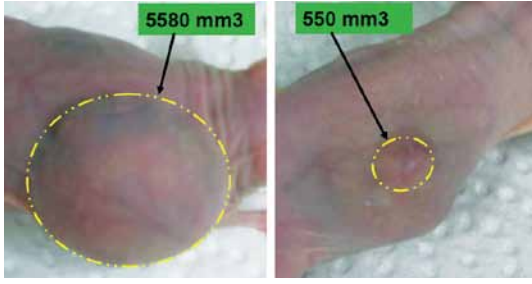


Şema 1. Nükleik Asit nanoparçacıklarının değişik yöntemlerle hazırlanma prensipleri

**Nanoparçacık ODN'lerin Anti Tümör Etkisi**

Tümör oluşumundan 35 gün sonra (tedavi görmemiş fare) (Solda)

NP-4200DN uygulanmış fare (tedaviden 42 gün sonra) (Sağda)

**DNA Nanoparçacıklarının İn Vivo Etkileri**

Yaygın ve konvansiyonel kanser tedavileri denince akla hemen kemoterapi ve radyasyon tedavisi gelmektedir. Bu yaklaşımlar ilk etapta belli düzeyde yararlılık gösterebilir de ciddi yan etkileri nedeniyle hastalarda büyük sorunlara yol açmaktadırlar. Bu tarz tedaviler tümör dokusunun yok olmasını sağlarken aynı zamanda tümöre karşı savaş verme yeteneği en yüksek olan bağışıklık hücrelerini de yok etmektedirler. Sonuç olarak yetersiz kalan savunma sistemi işlevini yerine getiremediğinden, kanseri sınırlandıracak herhangi bir engel kalmamakta ve hastalık yeniden baş gösterebilmektedir. Dahası hasta başka hastalıklara yakalanma riskiyle de karşı karşıya kalabilmektedir.

CpG motifleri içeren DNA'ların bağışıklık sistemini etkinleştirebildiğinin anlaşılmasıyla, bu dizilerin kemoterapi/radyasyon tedavisine alternatif bir yöntem olarak kullanılma potansiyeli de araştırılmaya başlanmıştır.

Bilkent'te geliştirilen, kendi kendine nano boyutta parçacık oluşturabilen yeni nesil oligonükleotidlerin hepatosellüler karsinoma (karaciğerin primer kanseri) modelindeki etkinliği grubumuz tarafından araştırılmıştır. Fare modelinde oluşturulan tümör, hayvanlara birer gün arayla üç kez enjekte edilerek tedavi edilmeye çalışılmış, tedavinin etkinliği, farelerdeki tümörlerin büyüklüğündeki değişim takip edilerek araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, DNA nanoparçacıklarıyla yapılan bu tedavinin, bağışıklık hücrelerini etkinleştirerek farelerdeki tümör hacmini % 90'dan fazla azalttığını göstermiştir.

**Baskılayıcı DNA Nanoparçacıklarıyla Otoimmün Hastalıkların Tedavisi**

Memeli DNA'sındaki TTAGGG motiflerinin etkinleşen bağışıklık sistemi hücrelerinin saldırdığı birçok medyatörü baskıladığı anlaşıncı bu DNA nanoparçacıklarının otoimmün hastalıkların baskılanması için tedavi amacıyla kullanılması fikri ortaya atıldı. İlk kez Bilkent laboratuvarlarında tasarlanan ve uluslararası

patentleri alınan bu DNA parçacıklarının bağışıklığı baskılayıcı etkisi, dizinlerinde bulunan G bazlarının kendi aralarındaki etkileşimleri (G-Tetratlar) sonucu nanoparçacık halinde bulunmasına bağlıdır.

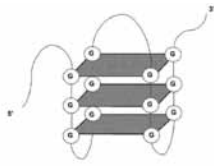
Daha sonra yapılan *in vitro* (canlı organizma dışındaki) hücre kültürü çalışmaları, bu baskılayıcı DNA'ların bağışıklık sistemi hücrelerinden salınan çeşitli sitokin ve kemokinlerin (hücreler arası iletişim sağlayan özel moleküller) oluşumunu engellediğini göstermiştir. Paralelinde yürütülen *in vivo* (canlı organizma içindeki) çalışmalar ise baskılayıcı DNA'nın romatoid artirit, sistemik lupus eritematozus (SLE), akciğer iltihabı, silikozis, diyabet, toksik şok, deneysel otoimmün ensefalomyelit gibi birçok otoimmün ve otoenflamatuvar hastalığın şiddetini azaltabildiğini veya semptomlarını ortadan kaldırdığını göstermiştir.

Yakın geçmişte, Biyoterapötik ODN Araştırma Laboratuvarı'nda yapılan bir çalışmada, fare ve tavşan modellerinde oluşturulan otoimmün üveit (üvea iltihabı) hastalığının tedavisinde bu baskılayıcı DNA nanoparçacıkları kullanılmıştır. Bu çalışmada, baskılayıcı DNA nanoparçacıklarının, otoimmün üveit semptomlarının hem lokal (gözde) hem de sistemik olarak (tüm vücutta) şiddetini ve sıklığını azalttığı gösterilmiştir.

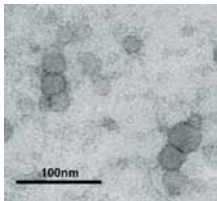
Kısa sarmallı bir DNA parçası olarak hazırlanan ve hayvanlara serbest halde enjekte edilebilen bu biyolojik kökenli etken madde, immün baskılamayı diğer kimyasal kökenli baskılayıcı ilaçlardan çok farklı bir şekilde gerçekleştirdiğinden kullanımının herhangi bir yan etki oluşturmaması, sağlık alanında kullanılabilirliği açısından fark yaratmaktadır. İnsanlar üzerinde yapılacak klinik deneylerle insanda kullanımının uygunluğu belirlenmelidir.

**Nükleik Asit İçeren Nanolipozomların Bağışıklığa Olan Etkileri**

Yine bizim laboratuvarımızda hazırlanan ve patentleri de bize ait olan bir teknolojiyi kullanarak nükleik asitleri aşı çalışmalarında kullanıyoruz. Lipozomlar (fosfolipid içeren sentetik zarlar) değişik özelliklerde hazırlanabilen ve içlerine DNA veya RNA moleküllerini hapsedebilen zarsı nanoyapılardır. Bu nedenle biz de lipozomları aşı taşıyıcı sistemler olarak tasarlayarak farelerin hastalıklara karşı bağışıklık yanıtlarını geliştirmeye uğraştık. Bulgularımız, ovalbümin antijeninin, nanolipozomların içine hapsedilerek DNA'larla birlikte vücuda verildiğinde çok etkin immün tepkilere yol açabildiğini göstermiştir. Bu bilgiler yeni ve etkin aşı formülasyonlarının geliştirilmesinin de önünü açacaktır.



Telomerik DNA'nın G-Tetratlar oluşturma prensibi



Eksozomların ultra yapılarının geçirimli elektron mikroskopisindeki görüntüleri

## Hücrelerden Salınan Eksozomların (Nano-keseciklerin) Nanotipteki Olası Kullanımları

Bilkent Üniversitesi Biyoterapötik ODN Araştırma Laboratuvarı'nda nanotıp alanında yapılan çalışmalar sadece bağışıklık yanıtı artırıcı ve baskılayıcı DNA parçacıkları ile sınırlı değildir. Araştırma grubumuz bu DNA parçacıklarının yanı sıra, hücrelerin çevrelerine saldıkları nano büyüklükteki keseciklerle de ilgilenmektedir. Hemen hemen tüm hücreler tarafından salınan nano-keseciklerin büyüklüğü 30-100 nm arasında değişir. Salınan bu nano-keseciklere genel olarak *eksozom* denir. Vücut sıvılarına salınan bu eksozomlar çeşitli biyolojik olaylar (örneğin farklı etkinleşme durumu veya farklı fizyolojik stres durumu) sonucu ortaya çıktıkları için, hem zar kompozisyonları hem de içerinde taşıdıkları yükler farklılık gösterir.

Eksozomların en önemli özelliklerinden biri de, içerikleri ne olursa olsun bu keseciklerin özellikle bağışıklık hücreleri tarafından fagositoz yoluyla yutulması ve o hücrenin biyolojik durumunu etkilemesidir. Dolayısıyla bu kesecikleri alan hücreler ya farklı işlevler kazanır ya da çeşitli biyolojik etkiler altında kalır. Son yıllardaki çalışmalar, bağışıklık hücrelerinin alınan eksozomların bu hücrelerde

- etkinleştirme sinyalinin elde edilmesini
  - etkinleştirme sinyalinin artırılmasını
  - etkinleştirme sinyalinin kontrol edilmesini
- yönlendirebildiğini gösteriyor.

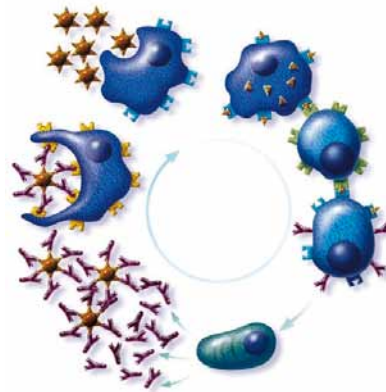
Kıscacası bağışıklık hücreleri nano-kesecikleri taşıdığı anda bu hücrelerin bağışıklık tepkileri üzerinde bir düzenleme gerçekleşiyor. Ayrıca eksozomların birçok vücut sıvısından saflaştırılabilmesi, farklı hastalık koşullarında vücut içindeki miktarlarının tayinini sağlıyor.

Eksozomların, hücre biyolojisi ve immüno-biyolojik çalışmalarda kullanılmasının yanı sıra biyotıp uygulamalarında tanı ve tedavi amaçlı kullanılması da son yıllarda giderek artıyor. Bu çalışmalardan biri, Behçet Hastalığında, hücreler tarafından salınan eksozomların kandaki miktarlarının ve hücrelerin yüzeylerinde bağışıklığın etkinleştiğine dair göstergelerin miktarının arttığını gösteriyor. Bu bulgu otoimmün hastalıklarda eksozomların etkili rollerinin olduğuna dair bir kanıt olarak kabul ediliyor. Behçet hastalarından izole edilen eksozomların içeriğinin de belirlenmesi ile birlikte bu nano-kesecikler hastalığın tanısı için de önemli bir araç olacak.

Eksozomlar hastalıkların tanısının yanı sıra hastalıkların kontrolü ve tedavisi için de önemli bir araç olma potansiyeli taşıyor. Buna en önemli kanıt ise Bil-

kent Biyoterapötik ODN Araştırma Laboratuvarı'nda eksozomların DNA parçacıkları ile yüklendiği deneylerden elde edilen bulguların bunu destekler nitelikte olması. Yapılan çalışmada makrofaj hücre hattından (laboratuvar ortamında yaşatılan hücre soyu) izole edilen eksozomlar, bağışıklık yanıtını artırıcı ve baskılayıcı farklı DNA parçacıkları ile yüklendi. DNA yüklü bu eksozomların aynı hücre hattına ait hücrelerle bir arada bekletilmesi, bu keseciklerin doğal taşıyıcı olabileceğini ortaya çıkardı. Bu çalışma vücut içerisinde doğal olarak bulunan bir nano-kesecik için vücut sıvısından elde edildikten sonra bir taşıyıcı olarak kullanılarak otoimmün hastalıklardan kansere kadar birçok hastalıkta ilaçların etkisini düzenleyebilecek bir araç olabileceğini gösteriyor.

Sonuç olarak, DNA ve RNA gibi biyolojik kökenli nanoparçacıkların immün terapide kullanımları yeni bir araştırma alanını oluşturmaktadır. Bu biyomoleküllerin daha yaygın ve değişik alanlardaki etkilerinin anlaşılması ile klinikte yan etkisi çok az nano-ilaçların tasarımı da mümkün olacaktır. Bu alanlarda yapılacak ileri çalışmaların ışığında ve prelinik araştırmaların oluşturacağı deneyimle kanserden alerjik hastalıklara, otoimmün hastalıklardan bulaşıcı hastalıkların kontrolüne uygun, yeni nesil nano-ilaçların kliniğe geçmesinin de önü açılacaktır.



### Kaynaklar

- Erikiç, E., Gürsel, M., Gürsel, İ., "Differential immune activation following encapsulation of CpG oligodeoxynucleotides in nanoliposomes", *Biomaterials*, (in press), 2010.
- Yağcı, F. C., Aslan, O., Gürsel, M., Tinçer, G., Özdamar, Y., Karatepe, K., Akçalı, C. K., Gürsel, İ., "Mammalian Telomeric DNA Suppresses Endotoxin Induced Uveitis", *J. Biol. Chem.*, Cilt 285, Sayı 37, s.28806-11, 2010.
- Gürsel, M., Gürsel, İ., Mostowski, H. S., Klinman, D. M., "CXCL16 influences the nature and specificity of CpG-induced immune activation", *J. Immunol.*, Cilt 177, Sayı 3, s. 1575-1580, 2006.
- Klinman, D. M., Gürsel, İ., Klaschik, S., Dong, L., Currie, D., Shirota, H., "Therapeutic potential of oligonucleotides expressing immunosuppressive TTAGGG motifs", *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, Sayı 1058, s. 87-95, 2005.
- Xie, H., Gürsel, İ., Ivins, B., O'Hagan, D., Ulmer, J., Klinman, D. M., "CpG oligodeoxynucleotides adsorbed onto PLG microparticles improve the immunogenicity and efficacy of anthrax vaccine", *Infect. Immun.*, Cilt 73, Sayı 2, s. 828-833, 2005.

- Klinman, D. M., Currie, D., Gürsel, İ., Verthelyi, D., "Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants", *Immunol. Rev.*, Sayı 199, s. 201-216, 2004.
- Takeshita, F., Gürsel, İ., Ishii, K. J., Suzuki, K., Gürsel, M., Klinman, D. M., "Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with toll-like receptor 9", *Semin. Immunol.*, Sayı 16, s. 17-22, 2004.
- Ishii, K. J., Kawakami, K., Gürsel, İ., Joshi, B. H., Klinman, D. M., Puri, R. K., "Anti-tumor therapy with bacterial DNA and toxin: complete regression of established tumor induced by liposomal CpG ODN plus IL-13 cytotoxin", *Clin. Cancer Res.*, Cilt 9, Sayı 17, s. 6516-6522, 2003.
- Gürsel, İ., Gürsel, M., Yamada, H., Takeshita, F., Ishii, K. J., Klinman, D. M., "Repetitive elements present in mammalian telomeres suppress CpG DNA induced immune activation", *J. Immunol.*, Sayı 171, s. 1393-1400, 2003.
- Gürsel, İ., Gürsel, M., Ishii, K. J., Klinman, D. M., "Sterically stabilized cationic liposomes improve the uptake and immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides", *J. Immunol.*, Cilt 167, Sayı 6, s. 3324-3328, 2001.

Deneyel olarak tavşan gözünde endotoksin uygulamasıyla oluşturulan üveit modeli

