



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**REPLİKASYON DEFEKTİF TİP 5 ADENOVİRAL
VEKTÖRLERİN TÜMÖR HÜCRELERİNDE SİTOKİN GEN
EKSPRESYONUNA ETKİLERİ**

İrem ZENGİN

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan AKBULUT**

ANKARA

2023

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REPLİKASYON DEFEKTİF TİP 5 ADENOVİRAL
VEKTÖRLERİN TÜMÖR HÜCRELERİNDE SİTOKİN GEN
EKSPRESYONUNA ETKİLERİ

İrem ZENGİN

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan AKBULUT

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün BAP-
TYL-2022-2363 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA
2023

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Replikasyon Defektif Tip 5 Adenoviral Vektörlerin Tümör Hücrelerinde Sitokin Gen Ekspresyonuna Etkileri” başlıklı tez; bilimsel, ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Tezde yer alan deneysel çalışmalar tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

İrem ZENGİN

Tarih:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Tümör Biyolojisi Yüksek Lisans programında İrem ZENGİN tarafından hazırlanan “Replikasyon Defektif Tip5 Adenoviral Vektörlerin Tümör Hücrelerinde Sitokin Gen Ekspresyonuna Etkileri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ-~~OYÇOKLUĞU~~ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13/1/2023

Prof. Dr. Hakan AKBULUT
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Filiz ÇAY ŞENLER
Ankara Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Saadettin KILIÇKAP
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Gen Tedavisi	1
1.2. Gen Dağıtım Yöntemleri	3
1.3 Adenoviral Vektörler	4
1.3.1 Adenovirüs Yapısı ve Genomu	4
1.3.2. Gen Tedavisinde Adenoviral Vektörlerin Kullanımı	6
1.3.2.1. Birinci Nesil Adenoviral Vektörler	7
1.3.2.2. İkinci Nesil Adenoviral Vektörler	7
1.3.2.3. Üçüncü Nesil Adenoviral Vektörler	8
1.3.2.4. Gen Tedavide Kullanılan Adenoviral Vektörlerin Hücre İçerisine Girmesi	11
1.4. Adenoviral Vektörlerin Hedef Dışı Etkileri	13
1.5. İnflamasyonda Etkin Rol Oynayan Faktörler	16
1.5.1. İnflamasyon ve İmmun Yanıt	16
1.5.2. İnterlökin-1Beta (IL-1B)	17
1.5.3. İnterlökin-6 (IL-6)	18
1.5.4. İnterlökin-8 (IL-8)	19
1.5.5. İnterlökin-10 (IL-10)	19
1.5.6. Tümör Nekroz Faktör-Alfa (TNF-a)	20
1.5.7. Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta (TGF-B)	21
2. GEREÇ ve YÖNTEM	22
2.1. Deneyde Kullanılan Kimyasallar ve Cihaz-Gereçler	22
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar	22
2.1.2. Kullanılan Cihaz ve Gereçler	24

2.2. Hücreler, Adenoviral Vektörler	25
2.3. Tip 5 Adenoviral Vektörlerin (AdV-5) Sitotoksik Etkilerinin Tayini	25
2.4. Adenoviral Vektörlerin Gen İfadelerine Etkisinin Test Edilmesi	26
2.5. Tümör Hücrelerinde Sitokin Genlerinin İfade Tayini / Ekspresyonlarının Belirlenmesi	26
2.5.1. RNA İzolasyonu	26
2.5.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	27
2.5.3. Primer Tasarımı	27
2.5.4. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	28
2.5.5. EZ-PZR Ürünlerinin Agaroz Elektroforezi ile Kontrolü	29
2.6. Western Blotlama Yöntemi ile Hedef Proteinlerin Tayini	29
2.6.1. Protein Miktar Tayini	29
2.6.2. Western Blotlama ile Protein Tayini	30
2.7. İstatiksel Analiz	31
3. BULGULAR	32
3.1. MTT Tayini Hücre Canlılığının Tespit Edilmesi	32
3.2. Hücrelerden İzole Edilen RNA'ların Konsantrasyon ve Saflikları	33
3.3. CoVacHG ve Ad-CD-GMCSF Viral Vektörlerin Tümör Hücre Hatlarındaki İnflamasyonda Etkin Rol Alan Genlerin İfadesi Üzerindeki Etkileri	35
3.3.1. CoVacHG ile Enfekte Edilmiş Hücrelerdeki Hedef Genlerin İfade Değişimleri	35
3.3.1.1. IL-1Beta mRNA Düzeyinde Gen İfadesi	35
3.3.1.2. IL-6 mRNA Düzeyinde Gen İfadesi	36
3.3.1.3. IL-8 mRNA Düzeyinde Gen İfadesi	37
3.3.1.4. IL-10 mRNA Düzeyinde Gen İfadesi	38
3.3.1.5. TNF-Alfa mRNA Düzeyinde Gen İfadesi	39
3.3.1.6. TGF-Beta mRNA Düzeyinde Gen İfadesi	40
3.3.2. Ad-D-GMCSF ile Enfekte Edilmiş Hücrelerdeki Hedef Genlerin İfade Değişimleri	41
3.3.2.1. IL-1Beta mRNA Düzeyinde Gen İfadesi	41
3.3.2.2. IL-6 mRNA Düzeyinde Gen İfadesi	42
3.3.2.3. IL-8 mRNA Düzeyinde Gen İfadesi	43
3.3.2.4. IL-10 mRNA Düzeyinde Gen İfadesi	44
3.3.2.5. TNF-Alfa mRNA Düzeyinde Gen İfadesi	45

3.2.2.6. TGF-Beta mRNA Düzeyinde Gen İfadesi	46
3.4. CoVacHG ve Ad-CD-GMCSF Viral Vektörlerin İnflamasyonda Etkin Rol Alan Proteinlerin İfade Düzeyine Etkileri	47
3.4.1. Bradford ile Protein Miktar Tayini	47
3.4.2. CoVacHG ve Ad-CD-GMCSF Uygulanmış Hücrelerdeki Hedef Proteinlerin İfadeleri	48
3.4.2.1. CoVacHG Uygulanmış Hücrelerdeki Hedef Proteinlerin İfadeleri	49
3.4.2.1.1. IL-1Beta Protein Düzeyi	49
3.4.2.1.2. IL-6 Protein Düzeyi	49
3.4.2.1.3. IL-8 Protein Düzeyi	50
3.4.2.1.4. IL-10 Protein Düzeyi	50
3.4.2.1.5. TNF-Alfa Protein Düzeyi	51
3.4.2.1.6. TGF-beta Protein Düzeyi	52
3.4.2.2. AdCD-GMCSF uygulanmış hücrelerdeki Hedef Proteinlerin Düzeyleri	53
3.4.2.2.1. IL-1Beta Protein Düzeyi	53
3.4.2.2.2. IL-6 Protein Düzeyi	53
3.4.2.2.3. IL-8 Protein Düzeyi	54
3.4.2.2.4. IL-10 Protein Düzeyi	54
3.4.2.2.5. TNF-Alfa Protein Düzeyi	55
3.4.2.2.6. TGF-beta Protein Düzeyi	56
4. TARTIŞMA	57
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	61
ÖZET	62
SUMMARY	63
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ÖNSÖZ

Öncelikle yüksek lisans tez çalışmasında bana yol gösteren, tavsiyeleriyle destek olmanın yanı sıra sosyal hayatımda da birçok alana dokunan, bilim insanı nasıl olunur sorusunun cevabı danışmanım Prof. Dr. Hakan AKBULUT'a,

Kendi bilgi birikimlerini ve tecrübelerini şeffaf şekilde aktaran Tümör Biyolojisi Bölümü Laboratuvarı ekibinde yer alan doktora öğrencileri Cansu BABAHAN, Fatma Gizem SONUGÜR ve Samira ABDİ ABGARMİ'ye,

Hedeflerimiz için birbirimize her zaman destek olduğumuz, aynı görüşü benimsemiş bilimin ancak birikerek ilerleyeceğine inanıp fikirlerimizi paylaşarak birbirimize güç olduğumuz yüksek lisans öğrencisi Elif KORGAN'a,

Yüksek lisans hayatım boyunca karşıma çıkmış en büyük şanslarımdan, oda arkadaşlığından öte tek başına buradaki ailem olan Elif Hacer KARADAVUT'a,

En çok da her zaman kararlarımın arkasında duran, düşüğümde kaldıran, beni motive eden, tüm eğitim öğretim hayatım boyunca desteğini benden esirgemeyen, bana hem anne hem baba olan canım annem Gülten ZENGİN'e çok teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışmasına maddi destek sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne (BAP) katkılarından dolayı teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AdV-5	Tip 5 Adenovirüs
CAR	Coxsackie ve Adenovirüs Reseptörü
CXCL10	C-X-C motifli kemokin ligandı 10
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
E1A	Erken gen 1A
E1B	Erken gen 1B
E2	Erken gen 2
E3	Erken gen 3
E4	Erken gen 4
EMA	Avrupa Tıbbi Ürünler Ajansı
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
IFN-alfa	İnterferon alfa
IL-1B	İnterlökin-1Beta
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
IL-10	İnterlökin-10
ITR	Ters Terminal Tekrarları
Kb	Kilobaz
kDa	Kilo dalton
L1	Geç gen 1
L5	Geç gen 5
NK	Doğal Öldürücü Hücreler
nm	nanometre

μ	mikro
MOI	Enfeksiyon Çokluğu
pIIIa	protein IIIa
pIX	protein IX
pTP	Öncü Terminal Protein
pVI	protein VI
pVIII	protein VIII
TGF-B	Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta
TME	Tümör Mikro Çevresi
TNF-a	Tümör Nekroz Faktör-Alfa
Treg	Düzenleyici T hücreleri

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Klinik gen tedavi çalışmalarının dağılımı.	2
Şekil 1.2.	Gen tedavi yönteminde kullanılan vektörlerin çeşitleri.	4
Şekil 1.3.	Adenovirüs yapısı.	5
Şekil 1.4.	Çeşitli erken (E) ve geç (L) transkriptleri ve her transkript tarafından kodlanan proteinleri gösteren adenovirüs genom organizasyonu.	6
Şekil 1.5.	Geliştirilmiş adenoviral vektör tipleri.	8
Şekil 1.6.	Vahşi tip adenovirüs tip 5 (Ad5) genomunun şeması ve replikasyon defektör AdV-5 vektör.	8
Şekil 1.7.	Farklı tiplerde adenoviral vektörlerin hazırlanması.	9
Şekil 1.8.	Adenoviral vektörün hücreye girmesi.	12
Şekil 1.9.	Hücreye giren adenoviral vektörün genetik materyalinin nükleusa girişi.	12
Şekil 1.10.	Klinik araştırmalarda vektör kullanımı.	14
Şekil 1.11.	Virüs-hücre etkileşimi sonucu inflamasyon başlangıcı.	17
Şekil 2.1.	Deney planının şematik gösterimi.	22
Şekil 3.1.	HUVEC MOI değerlerine göre canlılık yüzdeleri.	32
Şekil 3.2.	HeLa MOI değerlerine göre canlılık yüzdeleri.	32
Şekil 3.3.	CoVacHG ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki IL-1Beta gen ifade değişimleri.	36
Şekil 3.4.	CoVacHG ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki IL-6 gen ifade değişimleri.	37
Şekil 3.5.	CoVacHG ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki IL-8 gen ifade değişimleri.	38
Şekil 3.6.	CoVacHG ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki IL-10 gen ifade değişimleri.	39
Şekil 3.7.	CoVacHG ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki TNF-alfa gen ifade değişimleri.	40
Şekil 3.8.	CoVacHG ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki TGF-Beta gen ifade değişimleri.	41
Şekil 3.9.	AD-CD-GMCSF ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki IL-1Beta gen ifade değişimleri.	42
Şekil 3.10.	AD-CD-GMCSF ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki IL-6 gen ifade değişimleri.	43

Şekil 3.11.	AD-CD-GMCSF ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki IL-8 gen ifade değişimleri.	44
Şekil 3.12.	AD-CD-GMCSF ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki IL-10 gen ifade değişimleri.	45
Şekil 3.13.	AD-CD-GMCSF ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki TNF-alfa gen ifade değişimleri.	46
Şekil 3.14.	AD-CD-GMCSF ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki TGF-Beta gen ifade değişimleri.	47
Şekil 3.15.	BSA Standart Eğri Grafiği.	48
Şekil 3.16.	CoVacHG uygulanmış hücrelerdeki IL6 proteinine ait bant görüntüleri.	49
Şekil 3.17.	CoVacHG uygulanmış hücrelerdeki IL-6 protein ifade değişimleri.	50
Şekil 3.18.	CoVacHG uygulanmış hücrelerdeki IL-10 proteinine ait bant görüntüleri.	51
Şekil 3.19.	CoVacHG uygulanmış hücrelerdeki IL-10 protein ifade değişimleri.	51
Şekil 3.20.	CoVacHG uygulanmış hücrelerdeki TNF-alfa proteinine ait bant görüntüleri.	52
Şekil 3.21.	CoVacHG uygulanmış hücrelerdeki TNF-alfa protein ifade değişimleri.	52
Şekil 3.22.	CoVacHG uygulanmış hücrelerdeki TNF-alfa proteinine ait bant görüntüleri.	52
Şekil 3.23.	Ad-CD-GMCSF uygulanmış hücrelerdeki IL-6 proteinine ait bant görüntüleri.	53
Şekil 3.24.	Ad-CD-GMCSF uygulanmış hücrelerdeki IL-6 protein ifade değişimleri.	54
Şekil 3.25.	Ad-CD-GMCSF uygulanmış hücrelerdeki IL-10 proteinine ait bant görüntüleri.	54
Şekil 3.26.	Ad-CD-GMCSF uygulanmış hücrelerdeki IL-10 protein ifade değişimleri.	55
Şekil 3.27.	Ad-CD-GMCSF uygulanmış hücrelerdeki TNF-alfa proteinine ait bant görüntüleri.	55
Şekil 3.28.	Ad-CD-GMCSF uygulanmış hücrelerdeki TNF-alfa protein ifade değişimleri.	56
Şekil 3.29.	Ad-CD-GMCSF uygulanmış hücrelerdeki TNF-alfa proteinine ait bant görüntüleri.	56

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Transgenin etkin bir şekilde taşınması için vektörlerin sahip olması gereken bazı özellikler.	13
Çizelge 2.1. Komplementer DNA sentezi reaksiyonu koşulları.	27
Çizelge 2.2. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için tasarlanmış primerler.	28
Çizelge 2.3. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.	29
Çizelge 3.1. Farklı konsantrasyonlarda CoVacHG ile enfekte edilmiş ve kontrol hücre örneklerinin RNA izolasyon konsantrasyon ve saflık değerleri.	33
Çizelge 3.2. Farklı konsantrasyonlarda Ad-CD-GMCSF ile enfekte edilmiş ve kontrol hücre örneklerinin RNA izolasyon konsantrasyon ve saflık değerleri.	34
Çizelge 3.3. Hücrelerin içerdiği protein miktarlarının ölçümleri.	48

1.GİRİŞ

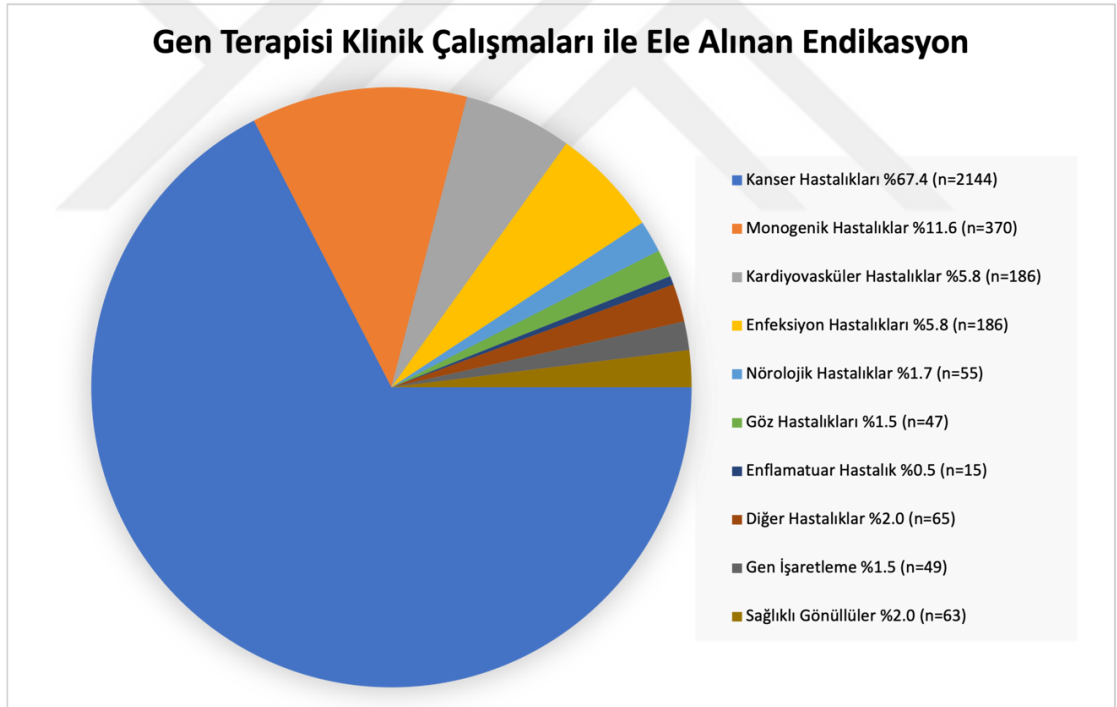
1.1. Gen Tedavisi

Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) kurumunun tanımlamasına göre insan gen tedavisi, bir gen ürününün ekspresyonunu düzenlemek veya terapötik kullanım amacıyla konakçı dokuya yabancı genomik materyalin verilmesi ve biyolojik özellikleri değiştirmenin amaçlanmasıdır (FDA ve Cber, 2020). Genetik hastalıkların tedavisi için geliştirilse de şimdilerde başta kanser olmak üzere farklı hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Çeşitli gen düzenlemelerine olanak sağlamaktadır: (i) hastalığa neden olan bir genin, sağlıklı bir kopyası ile yer değiştirilmesi, (ii) düzgün çalışmayan, hastalığa neden olan bir genin susturulması, (iii) bir hastalığın tedavisine yardımcı olmak için vücuda yeni veya modifiye edilmiş bir genin sokulması, (iv) kanser, genetik hastalıklar ve bulaşıcı hastalıklar gibi hastalıkları tedavi etmek için gen terapisi ürünleri geliştirilmektedir. 2021 yılına kadar, klinik gen tedavi çalışmalarının %67,4'ü kanser hastalıkları ile ilişkilidir (Wiley Veri Tabanı, 2021). Genom mühendisliği teknolojilerinin ilerlemesi, hastalıkları önleme ve yönetmede gen terapisi uygulamasını kolaylaştırmıştır ve tedavinin başarısını önemli ölçüde etkilemiştir (Belete, 2021). Viral vektörler de gen terapisi için geliştirilen ürünlerden biridir ve kanser hastalığında terapötik amaç ile kullanılmaya başlanmıştır. 2003 yılında gen tedavisi için geliştirilen bir ürünün klinik uygulamasını onaylayan ilk ülke Çin'dir. Böylece ilk ticari onayı alan gen tedavi ürünü Gendisin, hücre döngüsü kontrolünde önemli olan insan p53 cDNAsı ile E1 geni değiştirilmiş bir replikatif olmayan bir adenoviral vektördür ve baş-boyun yassı hücreli karsinom tedavisinde kullanılmıştır (Daley, 2019).

19 Temmuz 2012 yılında Avrupa Komisyonu, şiddetli lipoprotein lipaz eksikliği ile ortaya çıkan genetik metabolik bozukluğun tedavisi için gerekli genetik materyalin transferini taşınmasını adenovirüs kullanılan Glibera isimli ilacı onaylamıştır (Wirth ve ark., 2020). Batı ülkelerinde kullanımı onaylanan ilk gen terapisi olan Glibera'nın

maliyeti çok yüksek olduğu için yalnızca 31 hasta kullanmıştır ve 2017 yılında ilaç piyasadan çekilmiştir (Daley, 2019).

Avrupa Tıbbi Ürünler Ajansı'nın (EMA) tanımına baktığımızda, gen tedavi ilacı insanlara uygulandığında hastalıkla ilgili genetik dizinin düzenlenmesi, onarılması, değiştirilmesi, silinmesi veya eklenmesi gibi değişikliklerde yer alacak rekombinant nükleik asitlerden oluşan DNA veya RNA aktif bileşenler içermelidir. Ek olarak, gen tedavi ilacının profilaktik veya diagnostik etkisinin direkt olarak içerdiği rekombinant nükleik asit dizisinden veya bu dizinin ifadesi ile oluşan RNA, protein gibi üründen kaynaklanması gerektiğini dile getirmiştir. Bu tanıma baktığımızda; EMA, enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için geliştirilen ürünleri gen tedavi ilacı kapsamına almamaktadır (EMA, 2022).

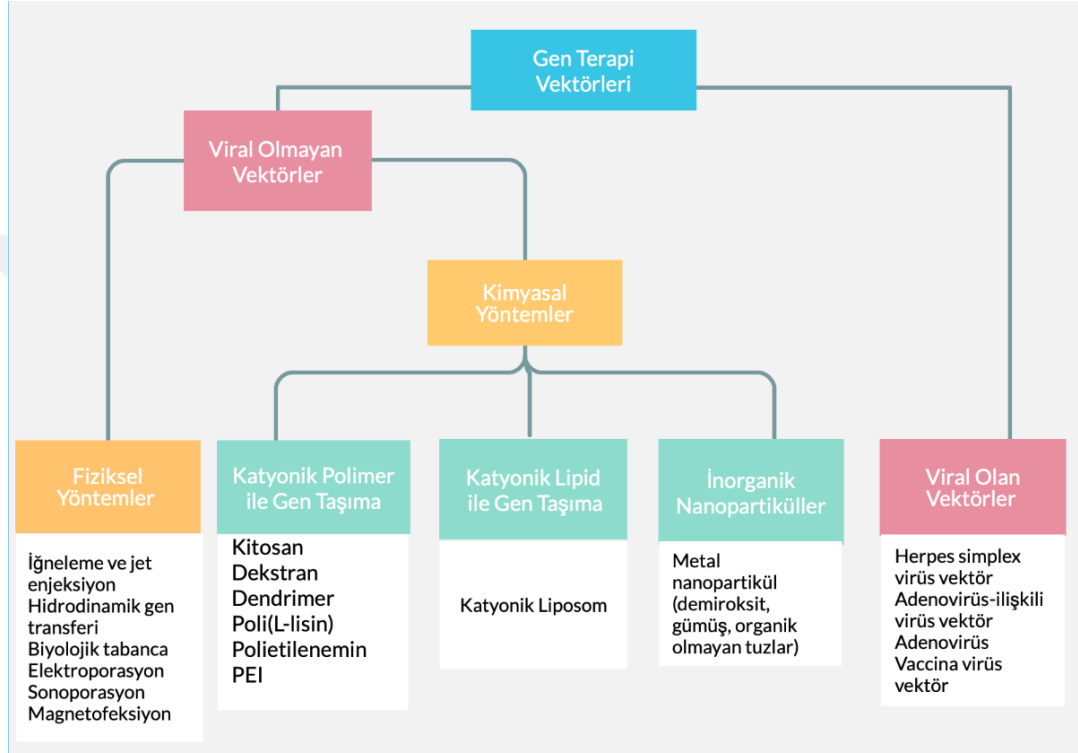


Şekil 1.1. Klinik gen tedavi çalışmalarının dağılımı (Wiley Veri Tabanı, 2021).

1.2. Gen Dağıtım Yöntemleri

Gen dağıtım sistemi, ilgilenilen hücre içindeki gen fonksiyonunu düzenleyen plazmit bazlı gen ekspresyon sistemi, hedef proteini temsil eden bir gen ve plazmit DNA'nın spesifik geni vücuda verilmesine yardımcı olan bir dağıtım sistemi olmak üzere 3 bileşenden oluşur (Han ve ark.,2000). Gen iletim sistemleri sayesinde transgen yani genetik materyal hedef dokuya taşınır. Bunun için geçmişten günümüze kadar birçok gen taşıma sistemi üzerine çalışılmaktadır. İdeal gen iletiminin sağlanması için yeterli miktarda transgen taşınmalı ve yeterli ekspresyon düzeyine güvenli bir şekilde çıkabilmelidir. Bu şartları sağlayabilmek için de viral ve viral olmayan taşıma sistemleri geliştirilmiştir (Wang ve ark., 2021). Viral olmayan sistemlerde fiziksel ve kimyasal yöntemler gibi fizikokimyasal yaklaşımlar üzerinden gidilir. Kimyasal yöntemlere baktığımızda uzun süreli gen ifadesi görülse de immünojenisite, hedefe özgüllüğün az olması, kanserojenite, yüksek maliyet ve yeterli boyutta transgen taşımayı sağlamaması gibi önemli sınırlamaları vardır (Bouard ve Cosset, 2009). Viral olmayan gen iletim yöntemlerine baktığımızda DNA enjeksiyonu, elektroporasyon, gen tabancası, sonoparasyon, manyetofeksiyon ve lipopleksler gibi birçok çeşit sistem karşımıza çıkmaktadır (Şekil 1.1.). Genleri hedef dokuya ulaştırmak için virüslerin seçilmesinin bu noktada ayırt edici özellikleri vardır. Virüsler üzerindeki yüzey proteinleri konakçı hücrede endositozu aktive ederek onunla etkileşime girer (Goswami ve ark., 2019). Viral olan gen iletim sistemlerinde en çok lentiviral, retroviral, herpes simpleks viral, adenoviral ve adeno-ilişkili viral vektörlere odaklanılmıştır. Kanser tedavisinde, tümör baskılayıcı genleri, tümörle ilişkili antijenleri, inflamatuvar destekleyici faktörleri, immün kontrol noktası inhibitörlerini, anti-anjiyojenik proteinleri, küçük enterferans RNA'yı (siRNA), kanser stromasını bozan enzimleri ve sitotoksik dönüştürücüleri içerir (Wan ve ark., 2021). Lentiviral vektörlere baktığımızda konakçı genomuna entegre olduğu ve onkogen genleri aktive edip tümör baskılayıcı genleri inaktive edici riskinin olduğu bilinmektedir (Fischer ve ark., 2005). Herpes simpleks virüsüne (HSV), adenovirüs ile karşılaştırıldığında hedef bölgede geçici ekspresyonu kısıtlaması sebebiyle konakçıya fazla miktarda vermek gerekmektedir bu da konakçıya ağır gelmektedir. Adeno-ilişkili virüs (AVV) de güvenilir bir taşıma sistemi olsa da büyük boyuttaki transgeni taşımak için yeterli

değildir (Nayerossadat ve ark., 2012). Virüsler mutajenez ve sitotoksisite riski taşıyarak bu riski ortadan kaldırmak için de epizomal yani konakçı genomuna entegre olmayan vektörler geliştirilmiştir. Bu vektörlerin başarılı gen iletimini yapması için konakçının genomuna entegre olmadan hedef dokuda iletilen genin yeterli ekspresyonunu sağlanması ve sabit kalması gerekir (Sung ve ark., 2019 ve Lee ve ark., 2017).



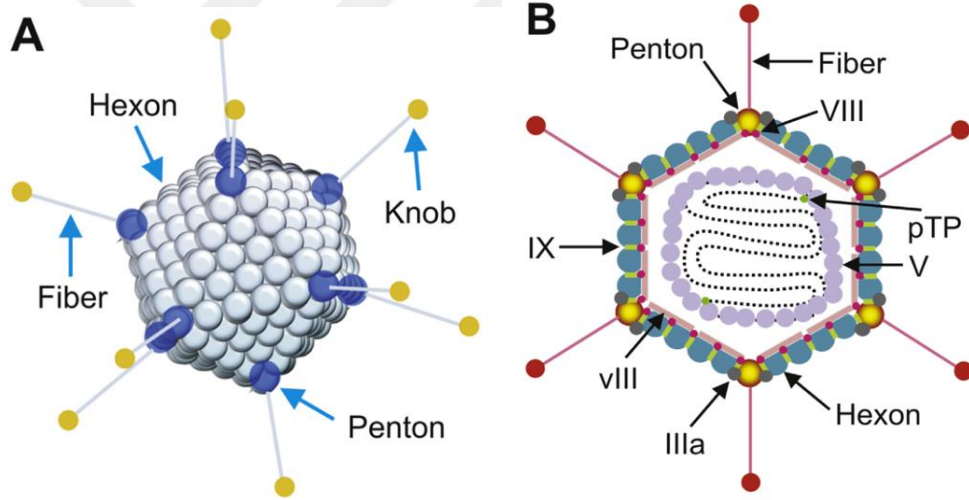
Şekil 1.2. Gen tedavi yönteminde kullanılan vektörlerin çeşitleri (Belete,2021).

1.3 Adenoviral Vektörler

1.3.1 Adenovirüs Yapısı ve Genomu

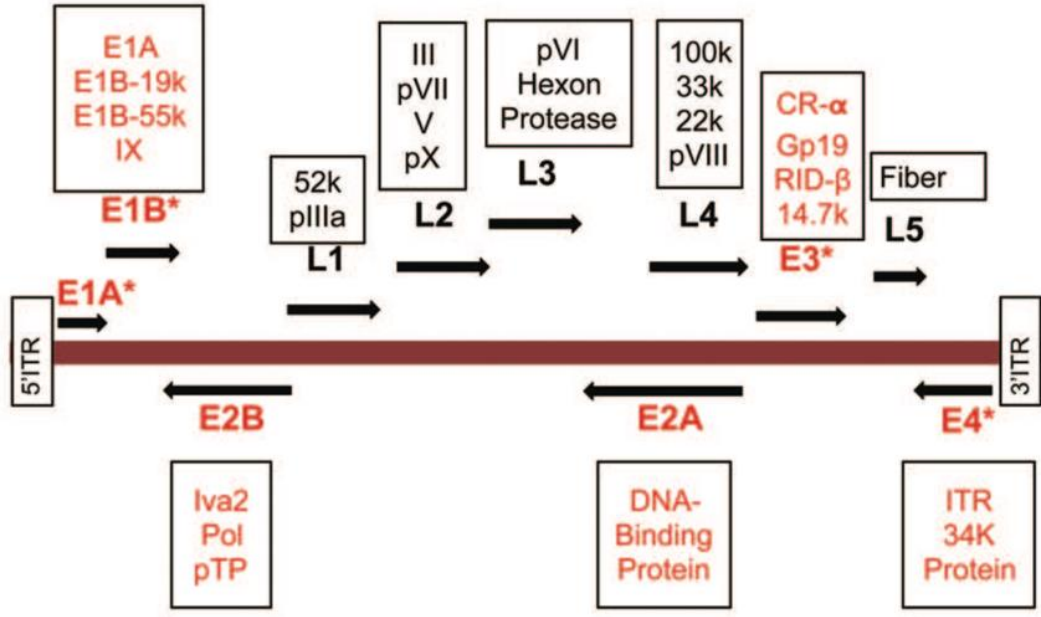
Adenovirüs, içerisindeki 26-45 kb. uzunluğundaki çift sarmallı DNA genomunu çevreleyen dış protein kabuk ile oluşmuş yaklaşık 70-90 nm boyutunda gelişmemiş bir ikosahedral parçacıktır (Singh ve ark., 2019). Virüs kapsid yapısı esasen hekson protein trimerlerinden ve protein IIIa (pIIIa), pVI, pVIII ve pIX içeren diğer

bileşenlerden oluşur. Kapsid köşelerinde bulunan pentonlar, hücre yüzeyine bağlanmadan sorumlu lif proteinini tutturmak için hareket eder (Watanabe,2021). Adenovirüslerin DNA genomu, her iki ucunda 100-140 baz çifti (bç.) iki ters terminal tekrarı (ITR) içerir. Küçük genom boyutuna sahip olduğu için de faaliyetlerini sürdürebilmek ve yaşamına devam etmek için farklı yollar kullanır. Örneğin, her iki DNA ipliğinden de protein kodlar, alternatif birleştirme uygular ve mRNA'sını farklı poliA modifikasyonlarını kullanır. Adenoviral genler, 5 erken ve 5 geç gen olarak adlandırılır. Adenovirüs hedef hücrelere verildiğinde, protein sentezi ve replikasyonu için gerekli E1A, E1B, E2, E3 ve E4 genlerini konakçı gen ekspresyonunu düzenleyerek bu genleri ifade eder. Geç gen olarak sınıflandırılan L1-L5 genleri de konakçı hücrenin serbestleşmesi ve parçalanması için gereklidir (Singh ve ark., 2018 ve McConnell ve Imperiale,2004).



(A) Adenovirüs, ikosahedral simetri sergileyen büyük, zarfsız bir virüstür. Hekson, penton baz ve düğümlü lif, gen iletimi için en önemli kapsid proteinleridir. (B) Hekson, viral kapsidin 20 üçgen yüzünü oluşturan ana proteindir. Kapsidin 240 altıgen kapsomerinin her biri diğer altı trimerle etkileşime giren trimerlerdir. 12 köşe penton kapsomerinden, üç fiber kopyadan oluşan penton tabanının beş kopyadan oluşan bir kompleksten oluşur. Her penton kapsomer, beş yüzün her biri üstte birleşen beş altıgen kapsomer ile etkileşime girer. Düğümlü lif, lif tabanından çıkıntı yapar. Ek olarak, adenovirüs genomunun 50 termini, öncü terminal proteinine (pTP) kovalent olarak bağlıdır. Viral genom DNA'sı histon benzeri bir proteine sarılır ve replikasyonun kökeni olarak işlev gören ters terminal tekrarlarını (ITR'LER) içerir (Cody ve ark., 2017).

Şekil 1.3. Adenovirüs yapısı.



(*) ile kırmızı ile gösterilen bölgeler çeşitli adenoviral vektörlerde silinir. E1 ve E3 bölgeleri birinci nesilde silindi ve ikinci nesil adenoviral vektörlerde E1, E2, E3 ve/veya E4 silindi. Yardımcı bağımlı adenoviral vektörler olarak adlandırılan en yeni adenoviral vektörler, yalnızca ITR'leri ve paketleme sinyallerini içerir (Singh ve ark., 2018).

Şekil 1.4. Çeşitli erken (E) ve geç (L) transkriptleri ve her transkript tarafından kodlanan proteinleri gösteren adenovirüs genom organizasyonu.

1.3.2. Gen Tedavisinde Adenoviral Vektörlerin Kullanımı

Adenovirüslerde, belirli gen dizilerini silerek kanser ve gen tedavi vektörleri olarak insanda kullanımı için güvenli ve etken hale getirilmesi üzerine uzun süredir çalışmalar yapılmaktadır ve bu konu üzerine önemli gelişmeler elde edilmektedir (McConnell ve Imperiale, 2004). İnsan adenovirüsleri, A-G olarak 7 alt gruba ve serolojik özelliklerine göre de 80 üzerinde serotip olarak ayrılır (Dhingra ve ark., 2019). Adenovirüslerin C alt tipinde bulunan serotip 5 (AdV-5), hedef hücrelere verimli şekilde ulaştığı ve ilgili geni ilettiği için kanser gen tedavisinde yaygın olarak vektör olarak kullanılmaktadır (Uchino ve ark., 2014). Replikasyon eksikliği olan adenoviral vektörler aşı taşıyıcı ve gen tedavisi vektörleri olarak çalışmalarda araştırılmaktadır (Dahlman ve ark., 2020). Bu tedavilerin yarar sağlayabilmesi için genin hedeflenen bölgeye ulaşması ve toksisiteyi sınırlamak için olabildiğince sadece hedeflenen bölgeyi enfekte etmesi gerekli ve orada başarılı bir tedavi cevabı için uygun

olabilecek yeterli sürede ekspresyonun sağlanması gerekir (Dhingra ve ark., 2019). Tedavi cevabını olumsuz etkileyebilecek bu tip sorunların üstesinden gelmek için şimdiye kadar birçok ilerleme kaydedilmiştir ve bu gelişmeler her geçen gün devam etmektedir. Geliştirilen stratejiler 3 ana başlık altında toplanmaktadır.

1.3.2.1. Birinci Nesil Adenoviral Vektörler

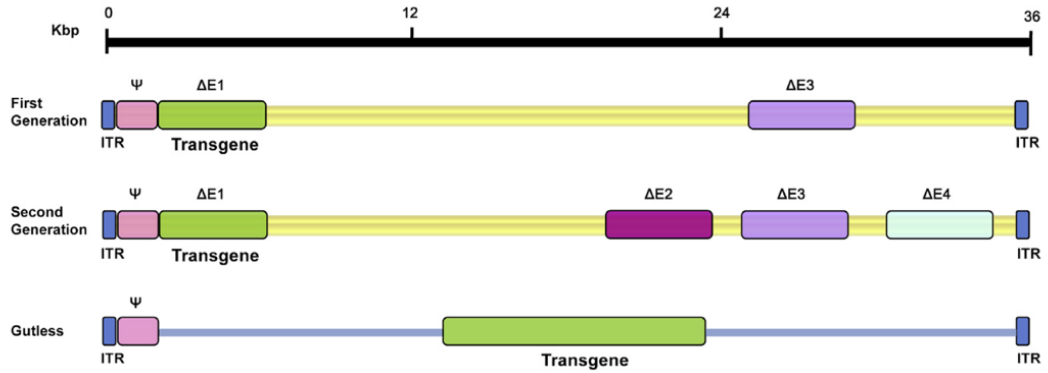
Adenoviral vektörlerden viral promotörlerin aktivasyonu ve dolayısıyla genlerinin ekspresyonu için gerekli olan E1 dizisi çıkarılarak replikasyon kusurlu hale getirilmiş ve transgen için 4.5 kb'ye kadar alan oluşturulmuştur (McGrory ve ark., 1988 ve McConnell ve Imperiale, 2004). Ayrıca, E1 bölgesi virüsün onkojenik dönüşüm fonksiyonlarını da kodlar. Bu nedenlerden dolayı, E1 bölgesinin transgenlerle değiştirilmesi, adenovirüs vektörlerinin yapımında kullanılan ve birinci nesil vektörlere yol açan ilk stratejidir. Adenoviral vektörün replikasyonunu sağlayabilmesi için ise viral E1 bölgesi içeren insan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK293) geliştirilmiştir (Graham ve ark., 1977). İleriki yıllarda, adenoviral E3 bölgesi proteinlerinin immünolojik yolakları inhibe ettiği aydınlatılmıştır (Wold ve ark., 1995). Bu yüzden de E3 bölgesi *in vivo* viral amplifikasyonu etkilemeden kısmen veya tamamen silinmiştir (Wold ve ark., 1999).

1.3.2.2. İkinci Nesil Adenoviral Vektörler

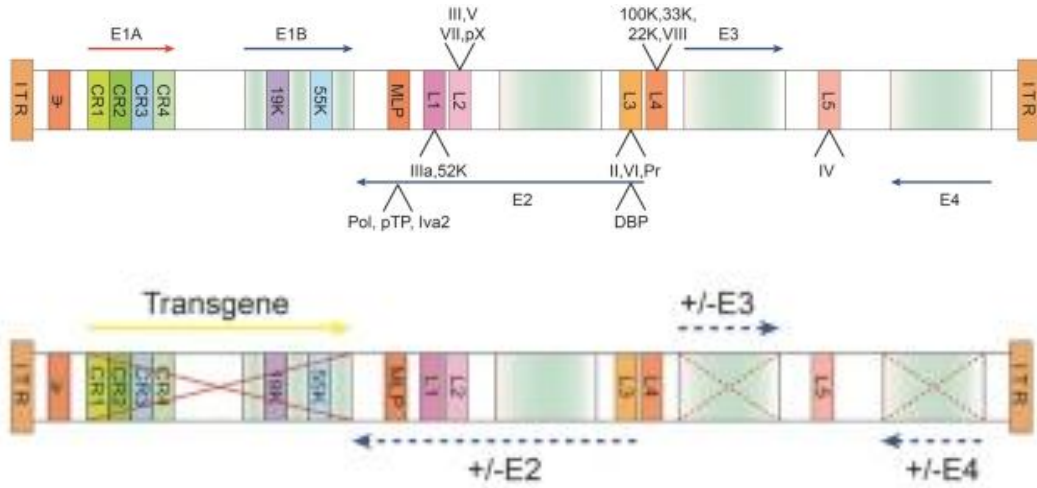
Birinci nesil vektörlerdeki E1 bölgesi silinmesine ek olarak hedef hücrede replikasyonu için gerekli proteinleri kodlayan E2 veya E4 bölgelerinde de silinmeler yapılmıştır ve birinci nesilde olduğu gibi HEK293 hücreleri (insan embriyonik böbrek hücre hattı) ile bu eksiklik tamamlanmıştır (Engelhardt ve ark., 1994 ve Lusky ve ark., 1998). Böylece 10.5 kb boyuta kadar ek alan sağlanmıştır fakat düşük verimli vektör amplifikasyonu gözlenmiştir ve buna bağlı olarak daha düşük transgen ekspresyonu ile sonuçlanmıştır. Konakçı tarafından immünolojik tanınma ve hücresele toksisite oluşmasından endişe duyulmaktadır (Bett ve ark., 1995 ve Wang ve ark., 1996).

1.3.2.3. Üçüncü Nesil Adenoviral Vektörler

En yüksek kapasiteli adenoviral vektörlerdir, 36 kb'ya kadar transgen yerleştirilebilir. ITR ve paketlenme sinyali dışındaki tüm viral dizinin silinmesiyle oluşturulmuşlardır (Kochanek ve ark., 1996 ve Ishizaki ve ark., 2018). Çoğu viral genin yoksunluğundan dolayı hücre kültürü ile tamamlamak yerine adenoviral proteinlerin sentezlenmesi ek bir yardımcı adenovirüs ile sağlanmaktadır (Fisher ve ark., 1996 ve Hardy ve ark., 1997).



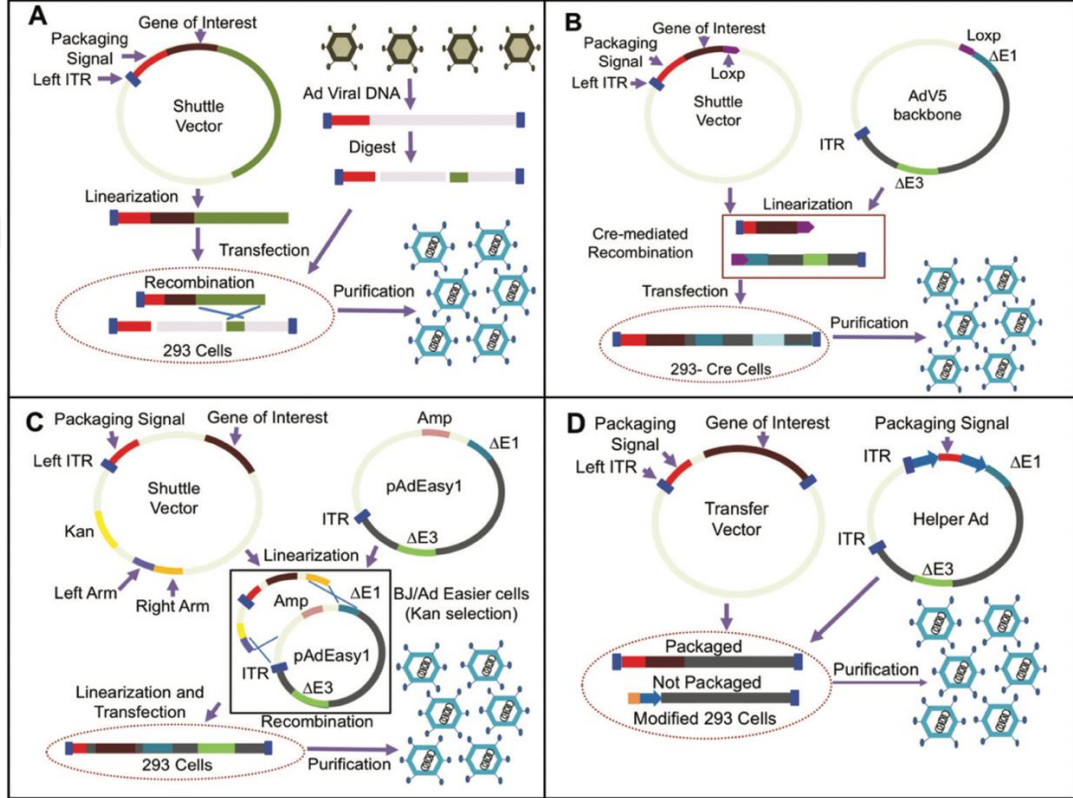
Şekil 1.5. Geliştirilmiş adenoviral vektör tipleri (Cody ve ark., 2017).



Şekil 1.6. Vahşi tip adenovirüs tip 5 (Ad5) genomunun şeması ve replikasyon defektör AdV-5 vektör (Bulcha ve ark., 2021).

Vahşi tip Ad5, 36 kb genom, dört erken transkripsiyon elemanından (E1, E2, E3 ve E4), beş geç ekspresyon geninden (L1–L5), cis-paketleme elemanlarından ve iki ITR'den oluşur. E1A (kırmızı ok) geni, her biri özel hücrel proteinlerle etkileşime giren dört korunmuş alan (CR1-4) içerir. E1B geni, iki farklı tümör antijeni, 19kDa (19K) ve 55kDa (55K) proteinleri kodlar. E2 geni, DNA bağlayıcı

proteini (DBP), terminal proteini (pTP), IVa2 ve DNA polimerazı (Pol) kodlar. E4 geni 1-7 açık okuma çerçevesini kodlar. Başlıca geç haberci mna'lar (L1-L5) esas olarak virion yapısal proteinleri için kodlar ve alternatif ekleme ve poliadenilasyon yoluyla büyük bir geç promotör (MLP) tarafından bir öncül mna'dan türetilir. L1, IIIa ve 52K için kodlar. L2, penton baz geni (kapsid protein III) ve çekirdek proteinler V, pVII ve pX için kodlar. L3, hekson (kapsid protein II), kapsid protein öncüsü (pVI) ve proteaz (Pr) genlerini kodlar. L4, 100K, 33K, 22K ve pVIII için kodlar. L5, lif genini kodlar (kapsid proteini IV). rAd vektörlerinin b-e diyagramları. b Çoğaltma-arızalı (RD) vektör. E1A ve E1B bölgeleri silinir ve eksojen bir promotör ve ilgilenilen bir transgen içeren bir ekspresyon kaseti ile değiştirilir (katı kırmızı X ve sarı okla gösterilir). E3 ve E4 bölgeleri genellikle daha büyük eklemlere uyum sağlamak için silinir ve diğer viral genlerin sızdıran ekspresyonunu ortadan kaldırır (Bulcha ve ark., 2021).



(A) Birinci nesil. Hedef gen, 5'-ITR, bir paketleme sinyali ve homolog rekombinasyon dizisini içeren bir mekik vektörüne klonlanır. Bu mekik vektörü ve bir adenoviral omurga vektörü HEK-293 hücrelerine transfekte edilir ve iki vektör arasında homolog rekombinasyon yoluyla adenoviral vektör oluşturulur. (B) Birinci veya ikinci nesil. Hedef gen, 5'-ITR, bir paketleme sinyali ve bir LoxP bölgesi (ler) içeren bir mekik vektörüne klonlanır. Bu mekik vektörü ve LoxP içeren bir adenoviral omurga vektörü, in vitro veya HEK-293 hücrelerinde Cre rekombinaz aracılı rekombinasyon yoluyla bir araya getirilir. (C) Birinci veya ikinci nesil. Hedef gen, 5'-ITR, bir paketleme sinyali ve iki homolog kolla çevrili kanamisin içeren bir bakteri replikasyon dizisi içeren bir mekik vektörüne klonlanır. Doğrusallaştırılmış mekik vektörü ile ampisiline dirençli adenoviral omurga vektörü arasındaki homolog rekombinasyon bakteri hücrelerinde (BJ5183) gerçekleşir ve adenoviral plazmidler kanamisin üzerinde seçilir. Bu plazmid, adenoviral vektör üretimi için HEK-293 hücrelerinde doğrusallaştırılır ve transfekte edilir. (D) Üçüncü nesil. Hedef gen, yalnızca ITR'LER ve bir paketleme sinyali içeren bir transfer vektörüne klonlanır. Adenoviral vektörü oluşturmak için bir yardımcı adenovirüs kullanılır. Modifiye HEK-293 hücreleri, paketleme sinyalinin silinmesi nedeniyle yardımcı adenovirüsün paketlenmesini önleyen adenoviral üretim için kullanılır (Singh ve ark., 2018).

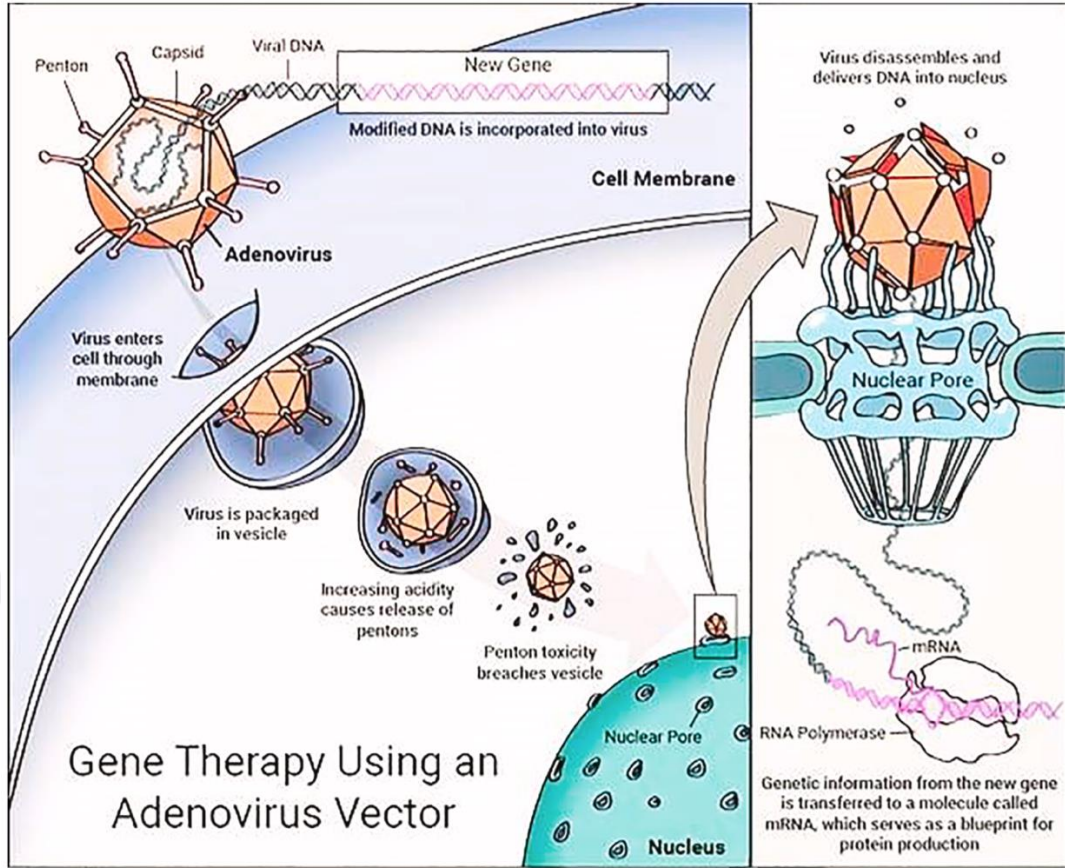
Şekil 1.7. Farklı tiplerde adenoviral vektörlerin hazırlanması (Singh ve ark., 2018).

Adenovirüs genomu iyi karakterize edilmiştir, genetik olarak stabildir ve konakçının genomuyla bütünleşmez, hücre çekirdeğinde epizomal DNA olarak kalır (Athanasopoulos ve ark., 2017). Ek olarak, adenoviral vektörler viral replikasyonu kontrol etmek için modifiye edilmiştir, büyük bir klonlama kapasitesine sahiptir, hem bölünen hem de hareketsiz hücreleri iletebilir, yüksek *in vivo* transdüksiyon verimliliğine sahiptir ve kolay üretilebilirler (Lee ve ark., 2017 ve Gao ve ark., 2019). Adenovirüsler bu özellikleri nedeniyle terapötik gelişime giren ilk DNA virüsleridir (Tessarallo ve ark., 2021). Farklı tiplerde geliştirilen bu adenoviral vektörler, *in vitro* ve *in vivo* olarak aşı çalışmaları, onkolitik ajanlar veya gen transfer vektörleri gibi çok çeşitli bilimsel olarak mekanizma aydınlatma ve tedavi amaçlı terapötik gelişimler için yaygın olarak kullanılmaktadır. Konakçıya adenovirüs verildiğinde ortaya çıkan hücre dışı, hücre içi ve membran bağlı reseptörleri içeren karmaşık bir bağışıklık yanıtı vardır. Verilen bağışıklık yanıtı adenovirüsün veriliş tipine, içerdiği DNA genomuna ve virionun enfeksiyondan önce karşılaştığı hücre dışı ortama kadar birçok değişkene bağlıdır. Bu değişkenler de adenoviral tabanlı tedavinin etkinliğini artırabilir veya sınırlayabilir. Özellikle doğuştan gelen bağışıklık sistemi, kendisine yabancı olan transgenlerin hedefe verilmesi ile güçlü bir şekilde tetiklenecektir ve makrofajlar tarafından büyük miktarlarda enflamatuvar sitokin salınımı başlayacaktır (Muruve ve ark., 1999). Öte yandan, adenoviral vektörler, viral proteinlerin genetik manipülasyonu, psödopleme ve polimerler veya biyolojik membranlarla konjugasyon dahil olmak üzere biyolojik yapılarının modifikasyonu için stratejilere uygundur. Bu tür modifikasyonlar, hedef hücreye daha fazla özgüllük ve sistemik uygulamada daha iyi güvenlik sağlar; bu nedenle, antiviral konak tepkilerinin azaltılması, kanser immünoterapisinde adenoviral vektörlerin kullanımını destekleyecektir (Tessarallo ve ark., 2021). Sonuç olarak Adenovirüslerin güvenilirlikleri, geniş hücre tropizmi ve güçlü bir bağışıklık tepkisini uyarma yetenekleri gibi birçok özelliği, gen terapisinde ve onkolitik kanser tedavisinde viral vektör platformu, gen dağıtım aracı olarak kullanılmasını desteklemektedir. (Coughlan ve ark., 2020 ve Ricobaraza ve ark., 2020). Birçok avantaja sahip olan adenoviral vektör tabanlı tedavileri kanser gen tedavisinde daha etkin kullanabilmek adına adenoviral vektör vücuda girdiğinde ona karşı oluşabilecek doğuştan gelen

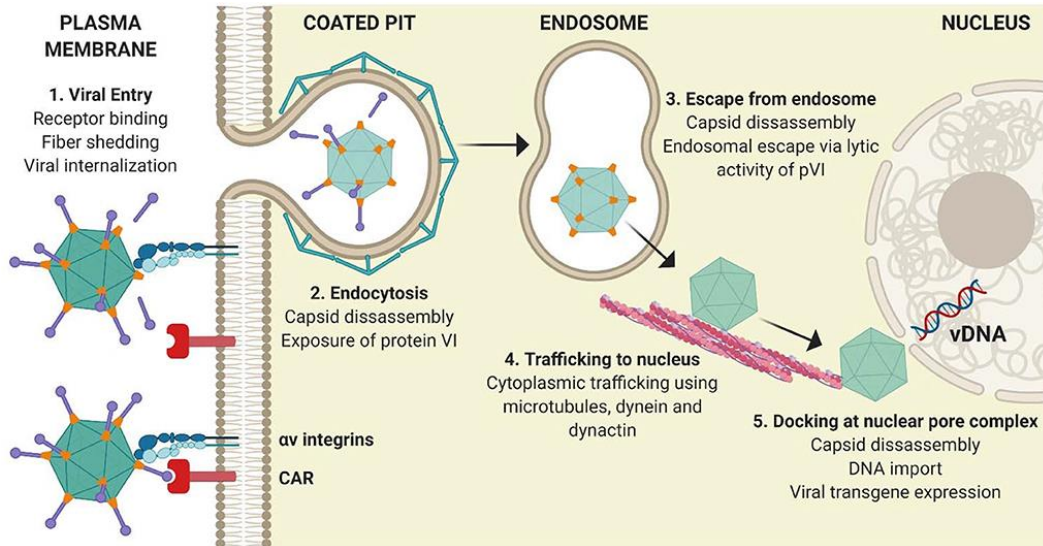
immün sisteminin ve hücrelerinin cevabını anlama gayretinin sürmesi gerekmektedir (Zachary ve ark., 2008 ve McConnell ve Imperiale, 2004).

1.3.2.4. Gen Tedavide Kullanılan Adenoviral Vektörlerin Hücre İçerisine Girmesi

Virüs ile hücre etkileşimine baktığımızda, bilgi hem virüsten hücreye hem de hücreden virüse doğru aktarılır (Greber ve ark., 1993). Böylece enfeksiyon, hücre ve virüsün gidişatını ayarlar (Greber ve ark., 1993). Örneğin virüsün hücre reseptörüne bağlanması ile hücreye girişi başlar ve sinyal yolları aktifleşerek hücre bütünlüğünü bozarlar. Bu da hücre büyümesini, konakçı immün sistemi hücrelerini veya membran onarım bileşenlerinin aktivasyonunu tetikleyebilir (Greber ve ark., 1994). Hücreden virüse giden sinyal ile de virüsün kararlılık durumunu ve virüsün yapısında oluşturabileceği değişiklikleri kontrol edebilir (Johnson ve ark., 2010). Bu süreçte birçok sinyal alıcı, bağlayıcı ve süreci kolaylaştırıcı molekül rol oynar (Lasswitz ve ark., 2018). Tip 5 adenovirüsten üretilen vektörlerin klasik yolla hücrelere girişinde fiber topuz (knob) domainin Cocksackie ve Adenovirüs reseptörüne (CAR) bağlanması aracılık eder. Bu güçlü bağlanmadan sonra, adenoviral vektöre ait penton yapısı ile hücre yüzeyindeki integrinler ($\alpha\beta3$ ve $\alpha\beta5$) arasındaki etkileşim sayesinde viral vektörün hücreye girişi kolaylaşır (Lord ve ark., 2016 ve Wickham ve ark., 1993). Viral vektör, membrandan nükleusa doğru ilerledikçe kapsidi kademeli olarak kapsid yapısı bozulmaya başlar (Greber ve ark., 1993). Viral vektörün, endosom vesikülünden çıkışı ile vektör mikrotübül ağı üzerinde bulunan nükleer gözenek kompleksine taşınır (Stewart ve ark., 1993 ve Wodrich ve ark., 2010). Vektörün bu tübüle yerleşimi ile hücresel protein etkileşimleri artar ve kapsid yapısının çözülmesiyle ortaya çıkan transgeni de içeren viral DNA, bir sonraki gen ekspresyonu için nükleusa doğru geçer (Coughlan ve ark., 2010).



Şekil 1.8. Adenoviral vektörün hücreye girmesi. (Alnasser, 2020).



Şekil 1.9. Hücreye giren adenoviral vektörün genetik materyalinin nükleusa girişi (Coughlan,2020).

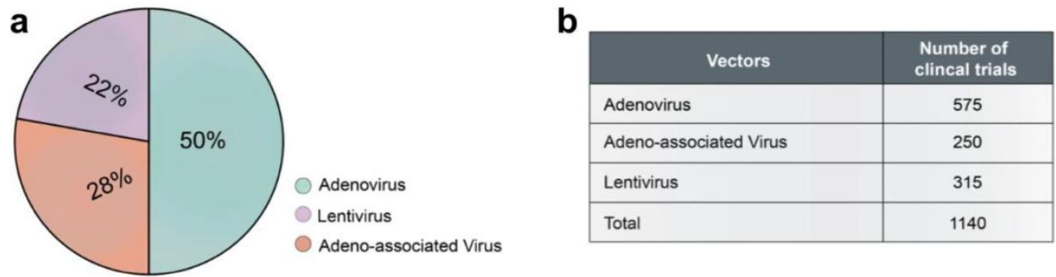
1.4. Adenoviral Vektörlerin Hedef Dışı Etkileri

Günümüzde artık ticari olarak satışı onaylanmış birkaç viral vektör bazlı gen tedavi ilaçları bulunmakla birlikte kanser gen terapisinde kullanılabilecek çok sayıda viral vektör çalışmaları, klinik öncesi deneyler ve klinik denemelerin farklı aşamalarında (Shirley ve ark., 2020). Terapötik transgeni taşıma kapasiteleri ve çok çeşitli memeli hücre tiplerini verimli/etkin şekilde enfekte etme yeteneklerinin olması üzerine virüslerin replikatif ve patojenik yeteneklerinin ortadan kaldırılması, onları gen terapisinde kullanıma ideal hale getirir (Nayak ve ark., 2010). Bununla birlikte, tedavide kullanılan vektör ve taşıdığı terapötik transgenin ürünlerine karşı konakçıda doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık tepkileri oluşması gen tedavilerinde viral vektör ile gen taşınması önünde önemli engeller oluşturarak kullanımını sınırlandırmaktadır (Shirley ve ark., 2020). Bu durum da kanser gen terapisinde viral vektör kullanımı etkinliği ve güvenilirliği üzerine bazı endişeler doğurmaktadır; hedef doku, transgenin hedefe taşınması, ekspresyonu ve konakçının vereceğini immün yanıtlar. Bu sorunları aşmak için de viral vektörler geliştirilmektedir. Şu ana kadar lentivirüsler, adenovirüs ve adeno-ilişkili virüsler üzerinde çalışmalar yapılarak gen terapi tedavisini daha etkin ve daha güvenilir hale getirilmeye çalışılmaktadır. Zhang'e göre (1999), transgenin etkin bir şekilde taşınması için vektörlerin belli başlı bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir (Çizelge 1.1.).

Çizelge 1.1. Transgenin etkin bir şekilde taşınması için vektörlerin sahip olması gereken bazı özellikler

Transgenin Etkin Bir Şekilde Taşınması İçin Vektörlerin Sahip Olması Gereken Bazı Özellikler
Yüksek gen transfer verimliliği
Büyük boyutta gen taşıma kapasitesi
Taşınan transgenin seleksiyonu
Sitotoksitite kontrolü
İmmünojenisite regülasyonu
Kolay üretim ve manipülasyon
Ucuz üretim
Güvenli ve kullanışlı uygulama
Klinisyen ve hastalar tarafından kabul edilebilirlik

Bu özellikleri baz aldığımızda adenoviral vektörlerin diğer vektörlere göre daha etkin bir potansiyel gen dağıtım sistemi adayı olduğu düşünülmektedir. Adenoviral vektörlerin en büyük avantajlarından biri, çok çeşitli hücre tipleri için diğer viral vektör sistemleri arasında en verimli gen transferini sağlamalarıdır. Özellikle genleri hem çoğalan hem de çoğalmayan hücelere aktarabilirler (Breyer ve ark., 2006). Ayrıca, yaşam döngüsü konakçı hücre genomuna entegrasyon gerektirmediğinden, Adenoviral vektörler tarafından verilen yabancı genler epizomal olarak eksprese edilir ve in vivo olarak uygulandığında düşük genotoksisiteye sahiptir (Zhang, 1999 ve Liebert, 2004). Ek olarak, adenoviral vektörler çok yüksek verime sahiptir, yüksek titrelerde kolayca ($> 10^{12}$ pfu/ml) elde edilebilirler. Klinik çalışmalara baktığımızda viral vektör tabanlı gen terapilerin %50'sinde birçok avantajlı özelliğe sahip olan adenovirüs kullanıldığı gözlenmektedir (Bulcha ve ark., 2021).



a. Kullanımdaki adenovirüs, adeno-ilişkili virüs veya lentivirüs vektörlerinin yüzdesini gösteren pasta grafiği. b. Farklı viral vektörleri kullanan mevcut klinik araştırma sayısının tablosu. (Dünya Çapında Gene Terapi Denemeleri üzerine Wiley veritabanı).

Şekil 1.10. Klinik araştırmalarda vektör kullanımı.

Scibetta ve ark. (2005), E1 ve E2 bölgesi çıkarılmış tip-5 adenovirüs (Ad5-GFP) ile insan meme epitel hücresi olan HB2 hücre hattını enfekte ederek enflamatuar ve immün yanıt yollarının aktivasyonunda rol oynayan IL-8, IL-6, ve TNF-a gen ekspresyon profillerine bakıldığında vektör enfekte edilmemiş hücelere göre yukarı regüle edildiği gözlemlenmiştir. Amin ve ark. (1995), beta galaktosidaz enzim geni içeren bu tip replikasyon eksikliği olan adenoviral vektörleri kullanmış ve kontrol olarak kullandığı enfekte edilmemiş insan A549 hücre hattında da IL-8 artışı gözlenmiş ve enfekte edilmiş hücrelerde önemli bir IL-8 artışı görmüşlerdir. Yine IL-8 seviyesine bakılan başka bir çalışma da HeLa hücre hattına Beta-glukuronidaz içeren adenoviral

vektör ve LacZ genini ifade eden kontrol adenoviral vektör verilmiş (AdLacZ) verilmiştir. HeLa hücre hattını AdLacZ ile enfekte ettikten 19 saat sonra IL-8 üretiminin arttığını ELIZA ile göstermiş ve adenoviral vektör enfeksiyonu sonrası inflamasyonda yer alabileceğini söylemişlerdir (Bruder ve Kovesdi, 1997). Bir başka çalışmada da ortamda sitokin varlığı ve yokluğu etkisini karşılaştırmak için insan primer endotel hücrelerine Beta galaktosidaz enzim geni içeren adenoviral vektör vererek ortamda sitokinlerin varlığının promotör etkisi üzerinde etkili olabildiği gösterilmiştir. Sonuç olarak, IL-10'un endotel hücrelerde promotör aktivitesini aşağı regüle ederken, tümör nekroz faktörü (TNF-a) ve interlökin 1 Beta (IL-1B) promotör aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir (Ritter ve ark., 2000). 1996 yılında Noah ve ark., insan akciğer hücrelerini kültürlemiş ve vahşi tip Adenovirüs 5(wtAd5) ve reporter gen olan LacZ geni içeren adenovirüs tip 5 (Ad.CMV.LacZ) 9'e maruz bırakmıştır. 24, 48 ve 96 saat Ad.CMV.LacZ vektörüne maruz kalan hücrelerde sitopatik etki görülmez iken wtAd5 vektörüne maruz bırakılan hücrelerde 72.saatten sonra sitopatik etkiler (yuvarlak ve bağımsız/kültür tabanından kalkmış hücreler) görülmüştür. Bu çalışmada, 24 ve 48.saatte toplanan hücrelerde IL-6 ve IL-8 salınımı tespit edilememiş fakat aynı kültürleri tümör nekroz faktörü-alfa stimülasyonundan 24 ve 48.saatten sonra hem IL-6 hem de IL-8 salınımı belirgin bir artış göstermiştir.

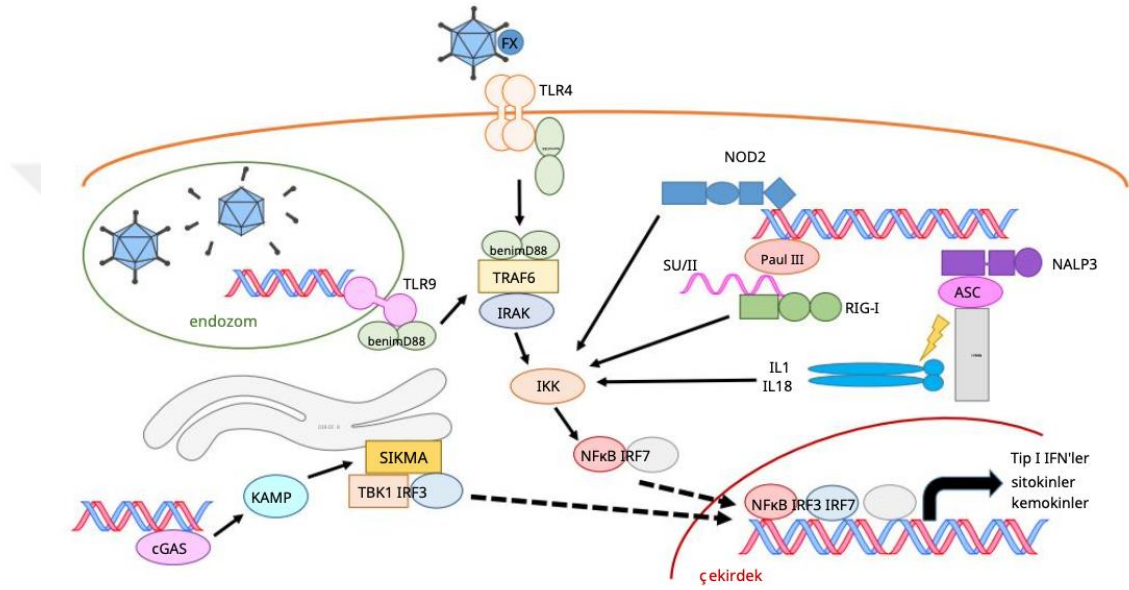
Sonuç olarak adenoviral vektörlerin güvenlikleri, geniş hücre tropizmi ve güçlü bir bağışıklık tepkisini uyarma yetenekleri gibi birçok özelliği, gen terapisinde bir gen dağıtım aracı olarak kullanılan bir viral vektör platformu olarak kullanılmasını desteklemektedir. (Coughlan ve ark., 2020 ve Ricobaraza ve ark., 2020). Çeşitli viral vektör kullanılan birçok immünojen tedavi stratejisi uygulanmıştır ve hayvan modelleri ve hastalarda yapılan çalışmalar, viral vektörlerin genleri kanser hücrelerine taşımak ve anti-tümör immün tepkilerini indüklemek için terapötik potansiyelini göstermiştir (Collins ve ark., 2008).

1.5. İnflamasyonda Etkin Rol Oynayan Faktörler

1.5.1. İnflamasyon ve İmmun Yanıt

İnflamasyon hücreye bir zarar geldiğinde vücudun vermiş olduğu immün bir cevaptır (Song ve ark., 2019). İnflamasyonun pek çok nedeni vardır: Kanser, bağışıklık sistemi bozuklukları, zararlı kimyasallara maruz kalma, fiziksel yaralanmalar, enfeksiyon patojenleri ve depresyon gibi psikolojik rahatsızlıklar (Roe, 2020). Kanser hastalarının yarısından fazlasında görülen inflamasyon kanser hastalığının kendisi ile ilişkilidir. Hatta bazı kanser hastalarında klinik kronik inflamatuvar bir tablo görünmese bile kanser dokularında inflamatuvar hücre infiltrasyonu gerçekleşebilir (Scand, 2020). Enflamatuvar yanıtın devamlılığı, kanser başlangıcı, ilerlemesi, malign transformasyonu ve metastazını destekler (Song ve ark.,2019). İnflamasyon hakkında yorum yapabilmek için enzimler, proteinler ve TNF-alfa, IL-1, IL-6, IL-8 gibi sitokinler biyobelirteç olarak görülmektedir (Prasad ve ark., 2016). TNF-alfa, IL-1Beta, IL-6 gibi sitokinlerin varlığı enflamasyon ile doğru orantılıdır, inflamasyonun gidişatı ile ifade ve salınım miktarları da artmaktadır (Punt ve ark.,2019). Adenoviral vektör aşılara yanıt olarak salınan sitokinlerin profiline ilişkin veriler sınırlıdır. Farelerle yapılan bir çalışmada, kas içi aşılamadan 3 saat sonrasında IFN-alfa ve CXCL10, aşılama bölgesinde bulunan lenf düğümlerinde saptanırken kas dokusunda saptanamamıştır. Kanda da yalnızca aşılamadan 24 saat sonra IFN-y, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 ve IL-15 gözlenmiştir (Collignon ve ark., 2020).Adenoviral vektör aracılı tedavilerde,etkinliğin verimliliği için damar yolu ile kanser veya genetik rahatsızlığı olan hastalara enjekte edilmektedir. Replikasyon yeteneği olmayacak biçimde tasarlanan terapötik viral vektörler vücuda girdiğinde bağışıklık sistemi patojen ilişkili moleküler şekiller (PAMP) sebebiyle vektörleri gerçek viral patojen olarak algılar ve böylece vücut virüs varlığına karşı doğal bağışıklık mekanizmasını aktifleştirerek kemokin ve sitokin üretimini tetikler. Aşılama yöntemi ile verildiğinde 24 saat içinde serumda sitokinler ortaya çıkar. Bir çalışmada aşılamadan 1 saat sonrasında IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF-alfa inflamatuvarı başlatıcı sitokinlerin varlığı saptandığı görülmüştür (Paolo ve ark., 2009). 24

sonrasında ise bu yanıtı tetikleyici sitokinlerin neredeyse hiçbirinin kanda bulunmaya devam etmediği, temel seviyelere indiği tespit edilmiştir (Machiels ve ark., 2019; Atencio ve ark., 2006). Reid ve ark. (2002) göre, 24 saatlik olan inflamasyon başlatıcı sitokin miktarı artışını ortamda bulunan vektör dozuna bağlı olduğunu düşünmektedir. Viral vektör tedavi yönteminin güvenilirliğini arttırıcı yönde çalışmalar devam etmektedir (Atasheva ve ark., 2020).



Şekil 1.11. Virüs-hücre etkileşimi sonucu inflamasyon başlangıcı. (Shaw ve ark., 2019.)

1.5.2. İnterlökin-1Beta (IL-1B)

Tümör mikro çevresinde (TME) bulunan monosit, makrofaj ve dendritik hücreleri gibi immün sistem hücreleri, fibroblastlar ve kanser hücreleri gibi çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen proinflamatuvar bir sitokindir (Mercogliano ve ark., 2021). IL-1B öncülü olan Pro-IL-1B aktif hale gelmesi için enflamasyonla aktive edilmiş çeşitli proteazlar ile bölünmesi gerekir ve bölündükten sonra aktif hale gelen IL-1B reseptörü olan IL-1R1'e bağlanarak aşağı sinyal akışı gerçekleşir (Pyrillou ve ark., 2020). IL-1B, enfeksiyonlara karşı konak savunmasında yer aldığı gibi doku homeostazında ve onarımında da önemli bir rol oynar (Mooij ve ark., 2017). Kanserde

yüksek seviyelerde ifade edilen IL-1B immün hücrelerine etki ederek immün yanıtta, sürekli Nükleer Faktör kappa Beta (NF-kB) aktivasyonunu (Haabeth ve ark., 2015) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) aktivitesini (Chung ve ark., 2009) yönlendirerek tümör gelişimini destekleyen süreçler olan anjiyogenez (Song ve ark., 2003), metastaz ve göç süreçlerinde, kanser hücrelerinin çoğalmasında etkin role sahip olan bir interlökindir (Mercogliano ve ark., 2021).

1.5.3. İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6, aktive olan fagosit hücreler, fibroblastlar, endotel hücreler ve bazı T hücreleri tarafından üretilir (Mak ve ark., 2014). IL-6, enflamatuar reaksiyonlar gibi çeşitli hücre fonksiyonlarını modüle edebilen ve JAK / STAT3 ve PI3K / AKT sinyal yollarının aktivasyonunda görevli olan bir sitokindir (Schafer, 2007). Tümör gelişimini destekler ve anjiyogenez, metastatik göçün düzenlenmesinde rol oynar (Akira ve ark., 1993; Chen ve ark., 2010 ve Santer ve ark., 2010). Chen ve ark. (2013), *in vitro* model olan CE81T hücrelerinde IL-6 ifadesini susturarak tümör büyümesini önemli ölçüde baskılamıştır ve *in vivo* hayvan modelleri deneyleri yaparak aynı sonucu almışlardır. Adenovirüse karşı immün yanıtta IL-6'nın spesifik bir rol oynadığı görülmektedir; *in vivo* çalışmalarda, AdV-5 intranazal inokülasyonundan sonra IL-1 ve TNF-alfa gibi diğer proinflamatuar sitokinlerden daha önce ve yüksek konsantrasyonda gözlenmiştir (Coussens ve ark., 2002). IL-6 *knock-out* farelerle yapılan çalışma ile, naif CD4+ T hücrelerinin efektör IL-4 üretebilen Th2 hücrelerine polarizasyonundaki önemi aydınlatılmıştır (Rincon ve ark., 1997). Yine vahşi tip ve IL-6 *knock-out* farelerle yapılan başka bir çalışmada, E1/E3 bölgesi silinerek tasarlanmış adenovirüs enjekte edilerek IL-6'nın akut faz protein üretiminin IL-6 *knock-out* farelerde belirgin miktarda azaldığı gözlenmiştir. Vahşi tip farelere nazaran IL-6 üretimi yapamayan farelerin serumlarında IL-1Beta ve TNF-alfa seviyelerinde artış gözlemleyip bunu olası bir telafi edici mekanizma olarak yorumlamışlardır (Benihoud ve ark., 2000).

1.5.4. İnterlökin-8 (IL-8)

IL-8 (CXCL8), monositler, endotel hücreleri ve çeşitli epitel hücreleri tarafından üretilir (Ha ve ark., 2017). IL-8 başlangıçta birincil görevi CXCR1/2' ye etki eden bir polimorfonükleer enflamatuar lökosit infiltratının çekilmesi olan bir kemokin olarak tanımlanmışken son zamanlarda, tümörlerin malign özelliğini destekleyici farklı pro-tümöral fonksiyonlar uygulayan bu kemokini ürettiği gözlenmiştir (Alfaro ve ark., 2017). IL-8'in pleiotropik fonksiyonları arasında immün sistem yanıtı düzenleme (örneğin nötrofil infiltrasyonu), anjiyogenezi artırma, metastaza teşvik etme, tümör hücresi büyümesi ve sağ kalımı uyarımı yer alır (Fousek ve ark., 2020; Yuan ve ark., 2005). Kanser hastalarında IL-8'in esas olarak tümör hücreleri tarafından üretilmesi serumdaki konsantrasyonunun tümör yükü ile korele olduğu gösterilmiş ve bu nedenle, IL-8 serum konsantrasyonlarının, immünoterapiye yanıtı erken tespit etmek için farmakodinamik bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir (Alfaro ve ark., 2017). İnsan polarize mukozal epitel hücreleri ile periferik kan monosit türevli makrofajların kullanıldığı bir in vitro çalışmada, adenovirüs enfeksiyonu sonucu IL-8 üretimin aktive edildiği gözlenmiştir. Makrofajların lokal olarak IL-8 üretimi ,epitel hücrelerinin adenovirüs bağlamalı lif protein aracılığıyla artırarak doğrudan virüs enfeksiyonuna duyarlı hale getirildiği düşünülmektedir (Lutschg ve ark., 2011).

1.5.5. İnterlökin-10 (IL-10)

İmmünoşüpresif ve anti-inflamatuar fonksiyonlara sahip olan IL-10, immün düzenleyici bir sitokindir ve sitokin inhibitör faktörü olarak anılmaktadır (Singh ve ark., 2019). Aktif makrofajlar, monositler, doğal öldürücü hücreler, eozinofil, mast hücreleri ve T lenfositleri dahil olmak üzere immün hücreler tarafından üretilir (Sheikhpour ve ark., 2018 ve Mak ve ark., 2013). İmmünoşüpresyon yeteneğiyle IL-6 ekspresyonunu da destekleyerek tümör hücresi proliferasyonunu sağlayıp apoptozunu engeller ve metastaza geçişine teşvik eder. Bir diğer immünoşüpresyon yoluyla gerçekleştirdiği yeteneği TNF, IL-1, IL-12 ve kemokin ekspresyonuna aracılık etmektir. Ayrıca, IL-10, NF-kB translokasyonunu da inhibe edebilme özelliğine

sahiptir (Sheikhpour ve ark., 2018). Yani IL-10, tümör gelişimine destek olan düzenleyicileri baskılar. Bunun sonucunda da tümör büyümesi ve metastaz kolaylaşır. Özellikle tümör ilişkili makrofajlar IL-10 üreterek tümör içi immünoşüpresyona katkıda bulunur ve böylece kanser büyümesi için uygun mikro ortam sağlar (Narmeen ve ark., 2018).

1.5.6. Tümör Nekroz Faktör-Alfa (TNF-a)

TNF-a, makrofaj veya monositler tarafından üretilen, enflamatuvar yanıtta, anti-apoptoz düzenlemede, tümör hücrelerinin otokrin büyümesinde ve Th1/Th2 dengesinde immünoşüregülatör sitokindir (Rothman ve ark., 2006). İnflamasyon başlangıcını destekleyen en önemli sitokin yanıtına TNF-alfa neden olur, TNF-alfa'ya karşı antikor kullanımında, erken evredeki inflamasyonun belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir (Ginsberg, 1996). Hematopoetik hücrelerin sağ kalımı, çoğalması, aktivasyonu, adezyonu ve ekstrasvazyonunda yer alır, sitokin üretimini destekler (Mak ve ark.,2013). TNF-a, hücrel transformasyon, promotasyon, yaşamını sürdürme, invazyon, anjiyogenez ve metastaz gibi tüm tümörgenez süreçlerinde önemli rol oynar (Sethi ve ark.,2008 ve Ashktorab ve ark., 2018). Warsingih ve ark. (2020) yaptıkları kolorektal kanser ile çalışma sonucunda, plazmadaki TNF-a düzeyi ile kanserin evresindeki ilerleme seviyesi arasında anlamlı ilişki gözlemlemişlerdir. Kanser evresi arttıkça plazmada tespit edilen TNF-a miktarı da artmaktadır. TNF-eksikliği olan farelerle yapılan bir çalışmada, kloramfenikol asetil içeren tip 5 adenovirüs verildiğinde lökosit infiltrasyonunda belirgin bir azalma gözlemlemişlerdir ve sonuç olarak TNF-eksikliği olan farelerde virüs enfeksiyonuna karşı yeterli hümmoral bağışıklık tepkisi gösterememiş ve inflamatuvar hücreleri bölgeye yeterli miktarda alınamamıştır (Elkon ve ark., 1997).

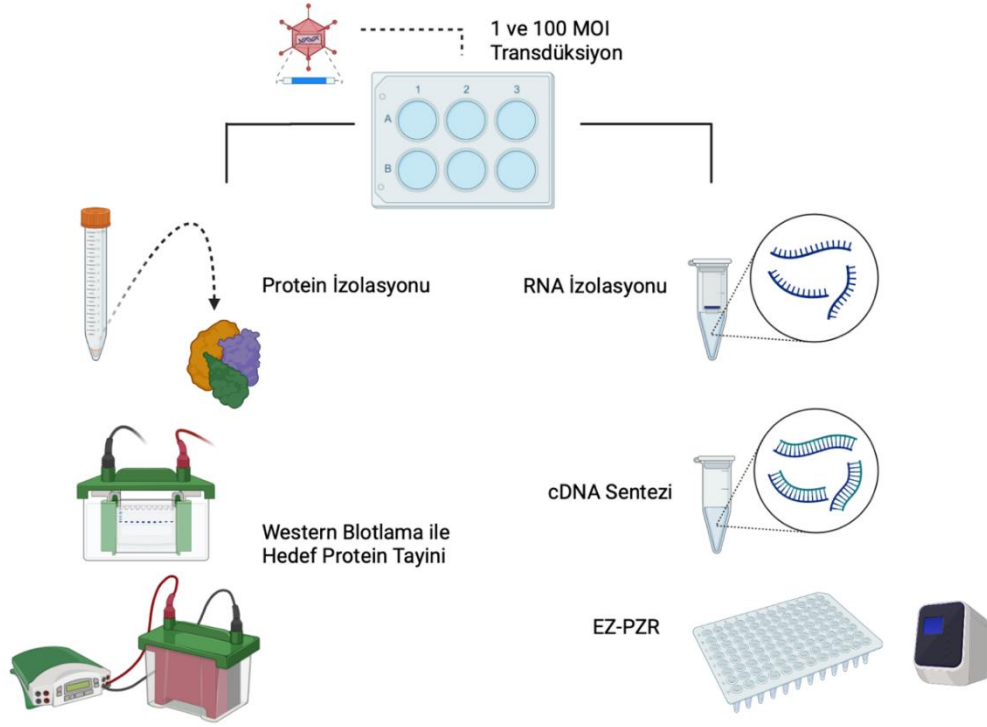
1.5.7. Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta (TGF-B)

TGF-B, hücre büyümesini ve ölümü, farklılaşmayı, bağışıklık tepkisini, anjiyogenezi ve enflamasyonu düzenleyen biyolojik sinyal yolağını üretmek için plazma zarı üzerindeki protein kinaz reseptörlerine etki eden sitokinler üst ailesine aittir (Fabregat ve ark., 2014). Sinyal yolağında gelişen bir bozulma ile mitojenik büyüme faktörlerinin üretimine aracılık ederek tümör oluşumu ve ilerlemesine önemli katkıda bulunur (Fabregat ve ark., 2014). Ayrıca, düzenleyici T hücrelerinin (Treg) farklılaşmamasını sağlayarak ve aktive edilmiş dendritik hücrelerin, makrofajların, T ve B hücrelerinin, doğal öldürücü hücrelerin (NK) efektör özelliği baskılayarak tümör mikro çevresinde (TME) bağışıklık sisteminin işlevini engeller ve tolerojenik bir ortam oluşturarak tümör hücresinin immün sistemden kaçışına yardımcı olur bu yüzden de immünoterapi tedavilerinde anti-tümör cevapları olumsuz yönde etkiler (Mak ve ark., 2013; Battle ve ark., 2019 ve Angiona ve ark., 2021).

Tümör mikro çevresinin TGF-B'dan zengin olması olması çeşitli hücrelere farklı etkilere sebep olabilir: (i) Düzenleyici T hücrelerini uyararak efektör T hücrelerinin immün homeostazı sürdürme işlevini baskılar ve böylece sağlıklı dokularda efektör T hücreleri düşük miktarlarda bulunur (Battle ve Massague, 2019). (ii) Dendritik hücrelerinin farklılaşmasını olgunlaşmamış miyeloid hücre fenotipine yönlendirerek tolerojenik hale getirir ve dendritik hücrelerin fonksiyonlarının bozulmasına sebep olur (Papaspriidonos ve ark., 2015). (iii) Makrofajların enflamatuvar işlevlerini inhibe ederek bağışıklık sisteminden kaçmasına katkıda bulunabilir (Porta et al., 2009). (iv) Tümörle ilişkili nötrofiller (TAN), tümörle ilişkili makrofajlarda olduğu gibi, anti-tümörijenik veya pro-tümörijenik olarak programlanmayı benimser (Fridlender ve ark., 2009) TME'de TGF-B miktarının fazla olması tümör teşvik edici etkiye sebep olur (Kitamura ve ark., 2007). (v) Doğal öldürücü hücrelerin farklı düzeylerdeki etkinliklerini inhibe edici yönde etkiler. NK hücrelerini sitotoksik etkisi olan innat lenfoid hücre tip 1 (ILC1) 'e dönüşümünü tetikler (Gao ve ark., 2017; Cortezve ark., 2017).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Tez çalışmamıza ait olan deney planının özeti şematik olarak aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Deney planının şematik gösterimi.

2.1. Deneyde Kullanılan Kimyasallar ve Cihaz-Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

- DMEM (Gibco,41966-029)
- RPMI-1640 (Sartorius, 01-100-1A)
- FBS (BI, 2137767)
- Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B (Sartorius,03-033-1B)

- Tripsin/EDTA solüsyonu (Capricorn,TRY-3B)
- DMSO (Merck, 1.02931.1000)
- Dulbecco's Fosfat Tamponlama solüsyonu (DPBS)
- MTT (Serva,20395)
- RNA izolasyon kiti (WIZBIO,W72060-100)
- Komplementer DNA sentez kiti (ABT,C03-01-05)
- EZ-PZR karışımı (Enzo, ENZ-NUC103)
- Protein İzolasyon kiti (Sigma,MCL1)
- Bradford boya reaktifi (Biorad, 500-0205)
- BSA (Amresco, 0332-25G)
- Tris (Serva, 37190.02)
- SDS (Merck,817034.2500)
- Bromofenol mavisi (Amresco,0449-25G)
- Gliserol (Amresco, 0854-1L)
- Glisin (Merck, 1.04201.0100)
- Merkaptotanol (Amresco,0482-100ML)
- %40 Akrilamid/Bis Solüsyonu, 29:1 (Biorad,161-0146)
- Amonyum persülfat (0486-100G)
- Süt tozu (Merck, 70166-500G)
- TEMED (amresco, 0761-25ML)
- Sodyum Klorit (BioShop,SOD001.1)
- Tween 20 (Amresco,0777-1L)
- Comassie brilliant blue (0472-10G)
- Metanol (Merck, 1.06007.2500)

- Asetik asit(Merck, 1.00056.2500)
- 0.2 µm PVDF membran (Biorad, 162-0177)
- Membran görüntüleme kiti (Biorad, 170-5061)

2.1.2. Kullanılan Cihaz ve Gereçler

- CO₂ inkübatörü (Panasonic, MCO-18AC-PE)
- Ters mikroskop (Nicon, eclipse Ti2)
- BCL1 Laminar hava akışlı kabin (Telstar)
- BCL2 Laminar hava akışlı kabin (Kojair)
- Santrifüj cihazı (Hermle, Z326K)
- -80°C dondurucu (New Brunswick Scientific, U410)
- Hassas tartı (Mettler Toledo, AB265-S)
- Manyetik karıştırıcı (Stuart, CB162)
- Çalkalayıcı
- Hücre kültürüne uygun flasklar
- Hücre kültürüne uygun plaklar
- Petri kapları
- Tek kullanımlık pipetler
- Tek kullanımlık pipet uçları
- EZ-PZR'e uygun 96 kuyucuklu plaklar
- Diğer deneyler için uygun olan 96 kuyucuklu plaklar
- Santrifüj tüpleri
- 15 ve 50 mL steril tüpler
- Otomatik pipetler

- Şarjlı pipet cihazı
- PZR sıcaklık döngü cihazı
- Eş zamanlı PZR sıcaklık döngü cihazı
- Western blotlama sistemi cihazları

2.2. Hücreler, Adenoviral Vektörler

Çalışmamızda SARS-COV-2'ye karşı CoVacHG rekombinant adenoviral vektör (Ad-Spike) (Sonugür ve ark., 2022; clinicaltrials.gov: NCT05526183) ve kanser gen terapisinde etkinliği gösterilmiş olan terapötik sitozin deaminaz (CD) geni ve granülosit makrofaj-koloni stimülatör faktör (GM-CSF) geni taşıyan rekombinant adenoviral vektör (Ad-CD-GMCSF) Ankara Üniversitesi (Kanser/Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Tıp Fakültesi) Prof.Dr. Hakan Akbulut tarafından sağlanmıştır (Hakan Akbulut ve ark., 2019).

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan MCF-7 (insan meme kanseri hücre hattı) ve HUVEC (insan göbek kordonu veni endotel hücresi) laboratuvarından temin edilmiştir. Bir diğer hücre hattı HeLa (insan serviks kanseri hücre hattı) Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Biyomimetik Mikrosistemler Laboratuvarı lideri Prof. Dr. Özlem Yeşil Çeliktaş'ın hediyesidir.

2.3. Tip 5 Adenoviral Vektörlerin (AdV-5) Sitotoksik Etkilerinin Tayini

Çalışmamızda öncelikle kullandığımız adenoviral vektörlerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri araştırıldı. Bu amaçla mikrotitrasyon yöntemlerin içinde en yaygın olan tetrazoliumun canlılığın bir işareti olan renkli formazonlara indirgemesi yöntemine dayalı MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür) tahlili uygulandı. MCF-7, HeLa ve HUVEC hücrelerinde rekombinant adenoviral vektör optimum transfer etkinliğini tanımlayabilmek için her kuyucuğu 5 x

10³ hücre kaplayacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü plağına ekim yapıldı. 24 saat sonra hücelere hücre başına viral partikül olarak farklı oranlarda (enfeksiyon çokluğu, MOI=1,10,100,1000 ve 10000) CoVacHG veya Ad-CD-GMCSF vektörleri ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 72 saat sonra kuyucuklara MTT solüsyonu eklenerek 2 saat inkübe edildi. Sonrasında solüsyon aspire edilerek kristallerin DMSO ile çözünmesi sağlandıktan sonra 570-630 nm’de mikropilaka okuyucu cihazdan (MultiskanGo, Thermo) absorbanslar ölçüldü. Alınan absorbans değerleri ile grafik oluşturularak virüs uygulanmayan kuyucukların absorbans değerleri referans alınarak aşı dozuna bağlı hücrelerin canlılık oranlarını hesaplandı.

2.4. Adenoviral Vektörlerin Gen İfadelerine Etkisinin Test Edilmesi

Bir önceki deneyde test edilen MOI değerlerinden 1 ve 100 MOI ile vektörlerin gen ifadeleri üzerindeki etkileri araştırıldı. 6 kuyucuklu hücre kültürü plağına 5 x 10⁴ hücre/kuyucuk yoğunlukta olacak şekilde MCF-7, HeLa ve HUVEC hücreleri ekildi. 24 saat sonra hücreler duplike olacak şekilde 1 ve 100 MOI Ad-Spike ve Ad-CD-GMCSF vektörleri ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 24, 48 ve 72. saat sonra hücreler tripsinize edilerek toplandı. Hücre pelleti PBS ile yıkandıktan sonra hücreler -80°C’ye kaldırıldı.

2.5. Tümör Hücrelerinde Sitokin Genlerinin İfade Tayini / Ekspresyonlarının Belirlenmesi

2.5.1. RNA İzolasyonu

-80°C’de saklanan hücre pelletlerinden WizPrep Total RNA Mini Kit (Cell) ticari kitin (WIZBIO, W72060) prosedürüne uygun olarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. Kısaca, hücre pelletleri önce RNaz inhibitörü içeren lizis tamponu ile lizis edildi. Parçalanmış hücrelerden ortaya çıkan RNA silika membran içeren kolona bağlanması kitteki solüsyonla ile sağlandıktan sonra diğer bileşenlerin ayrımı için

gerekli olan yıkama basamakları uygulandı. İzole edilen RNA, kit içeriğinde bulunan, 50 µL nükleaz içermeyen su içerisinde elde edildi. Spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific, NanoDrop One) ile hücre pelletlerinden izole edilmiş olan total RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı ölçüldü. RNA saflıkları, $2.1 \geq \lambda_{260}/\lambda_{280} \geq 1.8$ arası olan örnekler çalışmaya alındı.

2.5.2 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

RNA izolasyonundan sonra tüm örneklerden 500 ng RNA ile ticari kitin (A.B.T. cDNA Synthesis Kit with RNase Inh., C03-01) içerdiği random hexamer primerler, oligo-dT ve reverse transkriptaz enzimi kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezi yapıldı. Kitin sağladığı RNaz inhibitörü ile RNA örneklerini bozulmaya karşı korunurken random hexamer ve oligo-dT primerler sayesinde RNA örneklerinden komplementer DNA elde edilmesi için PZR cihazında (Biorad C1000 Thermal Cycler, ABD) protokole uygun koşullarda senteze bırakıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen cDNA, Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (EZ-PZR) için kalıp DNA olarak kullanıldı.

Çizelge 2.1. Komplementer DNA sentezi reaksiyonu koşulları.

	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
1.Basamak	25°C	10 dakika	1
2.Basamak	37°C	120 dakika	1
3.Basamak	85°C	5 dakika	1

2.5.3. Primer Tasarımı

Enflamatuvarıda görev aldığı düşünülen hedef sitokin genleri İnterlökin (IL) -1Beta, IL-6, IL-8, IL-10, Tümör Nekroz Faktörü-Alfa (TNF-alfa) ve Transforme edici Büyüme Faktörü-Beta (TGF-beta) genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi ve referans geni Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) kontrol olarak EZ-PZR

deneyinde kullanılması amacıyla ileri (forward) ve geri (reverse) primer tasarımları yapıldı. Tasarlama Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) sitesi kullanılarak referans gen dizisi elde edilmiş olup Primer3web (version 4.1.0) (<https://primer3.ut.ee/>) sitesinden primerleri tasarlamak için yararlanıldı. Tasarlanan primerlerin çalışılacak gen dizileri ile uyumluluklarından emin olmak için Primer Blast web sitesinden (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) kontrol edildi.

Çizelge 2.2. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için tasarlanmış primerler.

Primer Adı	İleri Primer (5'→3')	Geri Primer (5'→3')
IL-1B	CGATCACTGAACTGCACGC	GCTCCATATCCTGTCCCTGG
IL-6	AATGAGGAGACTTGCCCTGGT	GCAGGAACTGGATCAGGACT
IL-8	CTCTGTGTGAAGGTGCAGTT	CCAGACAGAGCTCTCTTCCA
IL-10	GGCGCTGTCATCGATTTCTT	ATAGAGTCGCCACCCTGATG
TGF-beta	ACGTGGAGCTGTACCAGAAA	GCAGTGTGTTATCCCTGCTG
TNF-alfa	AGGACACCATGAGCACTGAA	CCGATCACTCCAAAGTGCAG
GAPDH	AGTCAACGGATTTGGTCGT	ATGAAGGGGTCATTGATGG

2.5.4. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Tasarlanan primerlerin optimizasyonu sonucunda, elde edilen cDNA örnekleri 96 kuyucuklu plakaya çalışılacak her bir gene (GAPDH, IL-1Beta, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-alfa, TGF-Beta) özgü tasarlanan ileri ve geri primer çifti, AMPIGENE qPCR Green Mix Lo-ROX ‘ortak karışım’ (Enzo, ENZ-NUC103) ve RNaz-DNaz içermeyen su eklenerek son hacim 20 µL’ye tamamlandı. Çizelge 2.3.te gösterilen reaksiyon koşullarında amplifikasyon yapıldıktan sonra qPCR cihazında (Biorad C1000 Thermal Cycler CFX96 RealTime System, ABD) mRNA düzeyinde gen ifade analizleri yapıldı. EZ-PZR reaksiyonu sonunda elde edilen Cq değerleri ile kantitatif analizi 2 delta delta metodu ile yapıldı. Elde edilen erime sıcaklığı grafikleri ile reaksiyon saflığı/dimerleşme olup olmadığı saptandı.

Çizelge 2.3. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.

	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Polimeraz Aktivasyonu	95°C	2 dakika	1
Denatürasyon	95°C	5 saniye	40
Uzama	60°C	30 saniye	

2.5.5. EZ-PZR Ürünlerinin Agaroz Elektroforezi ile Kontrolü

EZ-PZR ile amplifiye edilen ürünler %2'lik agaroz jelde yürütülerek bir önceki işlem basamağı olan EZ-PZR işleminin kontrolü yapıldı. 100 bp DNA ladder (Bioron, 304105) ve 6X konsantrasyon yükleme boyası (BioLabs, B7024S) kullanılarak örnekler %2'lik agaroz jelde yürütüldü ve jel görüntüleme cihazında (Bio-Rad Gel Doc XR, ABD) görüntülendi.

2.6. Western Blotlama Yöntemi ile Hedef Proteinlerin Tayini

Adenoviral vektör ile enfekte olmuş ve olmamış hücrelerde ekspre edilen sitokinlerin akıbetini belirlemek için, Western Blotlama yöntemi uygulanarak inflamasyonda rol alan hedef genlerin proteinlerine ait bant yoğunlukları analiz edildi. Adenoviral vektör enfeksiyonundan 72.saatte toplanıp -80°C'ye kaldırılan hücre pelletlerinde IL-1B, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-a ve TGF-B proteinleri ve referans olarak HBA (insan beta aktin) proteini tespiti için proteinlere özgü antikorlar kullanılmıştır.

2.6.1. Protein Miktar Tayini

Hücre pelletleri lizis solüsyonu (Sigma, Memeli Hücre Lizis Kiti MCL1) ile lizasyona uğratarak içerdikleri protein miktarı Bradford yöntemi ile tayin edildi. 2mg ile 0,125 mg konsantrasyon aralığında standartlar bovine serum albümin (BSA) ile oluşturuldu. 5 µL olacak şekilde blank/kontrol standart ve örnekler sırasıyla 3 tekrarlı

olacak şekilde 96 kuyucuklu plağa koyuldu. Üzerlerine 250 µL Bradford boya reaktifi (Biorad,500-0205) eklenerek 5 dakika çalkalayıcıda, hücrede bulunan proteinlere bağlanması için karanlıkta inkübe edildi. 595 nm’de mikroparka okuyucu cihazdan (MultiskanGo, Thermo) absorbans değerleri alındı. Standartların verdiği absorbans değerleri ile oluşturulan Standart Eğri Grafiği oluşturularak örneklerdeki toplam protein miktarları hesaplandı. Western blotlama deneyinde örneklerden aynı miktarda protein kullanımı için hücre lizislerinden jelle yüklenmesi gereken miktarlar hesaplandı.

2.6.2. Western Blotlama ile Protein Tayini

Hücre pelletleri lizasyona uğratıldıktan sonra izole edilen 15 ng hesaplanmış protein örnekleri, 4µL Protein Standart marker (NEB,P7719) ile 10% SDS-poliakrilamid jelde ayrıştırılmak üzere yüklendi ve deneyin transfer aşamasında proteinler 0.2 µm polivinilidinden diflorür membrana (Biorad,162-0177) aktarıldı. Daha sonra proteinlerin aktarıldığı membran, %5 süt tozu (Sigma,70166-500G) içeren bloklama tamponu ile 2 saat çalkalayıcıda muamele edildikten sonra primer antikor olan tavşanda üretilen insan IL-1B antikor (Elabsicence, USA), insan IL-6, antikor (Elabsicence, USA), insan IL-8 antikor (Abcam, UK) , insan IL-10 antikor (FineTest, China), insan TNF-a antikor (Elabsicence, USA), insan TGF-B antikor (Abcam, UK) ve insan HBA antikor (Thermo Fisher Scientific,Amerika) ile gece boyu +4°C dolabında çalkalayıcıyla inkübasyona bırakıldı.Deneyin 2.günü, bantların saptanması için geliştirilmiş olan kemilüminesans substratı (Jackson Immunoresearch, 111-035-003) sekonder antikor olarak kullanılarak primer antikorlara bağlanması için 2 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Yıkama basamakları sonrasında membran, karanlık alanda 1 dakika boyunca membran görüntüleme kiti (Biorad, 170-5061) ile bantların görüntülenmesi sağlandı. Membran görüntüleri, jel görüntüleme cihazı (Bio-Rad Gel Doc XR, ABD) ile alındı. Bant yoğunlukları Image Lab programı kullanılarak analiz edildi.

2.7. İstatiksel Analiz

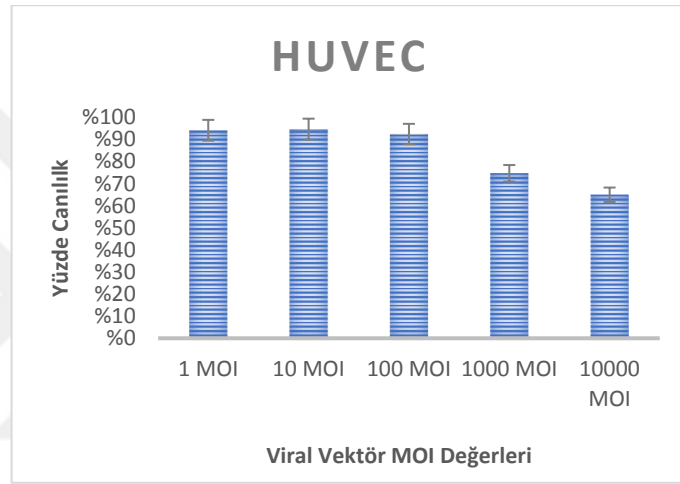
EZ-PZR deneyleri sonucu elde edilen kantitatif verilere SPSS 20.0 versiyonu kullanılarak ‘t-test’ ve ‘ANOVA’ testi uygulanıp bulguların istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığına bakılmıştır. p değerleri <0,05 olan sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.



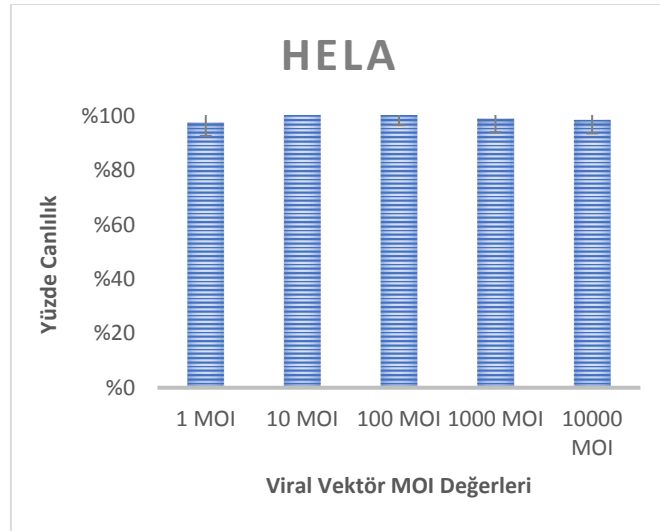
3. BULGULAR

3.1. MTT Tayini Hücre Canlılığının Tespit Edilmesi

Yapılan MTT deneyi absorbans değerleri ile hücrelerin canlılık oranı hesaplandı. HUVEC hücrelerinde MOI değerinin artması ile canlılık oranında düşüş görülse de HeLa hücrelerinde canlılık oranını etkilemedi.



Şekil 3.1. HUVEC MOI değerlerine göre canlılık yüzdeleri.



Şekil 3.2. HeLa MOI değerlerine göre canlılık yüzdeleri.

3.2. Hücrelerden İzole Edilen RNA'ların Konsantrasyon ve Saflikları

Negatif kontrol olarak enfekte edilmemiş ve 1, 100 MOI viral vektör coVachG ve Ad-CD-GMCSF ile enfekte edilmiş HUVEC, HeLa ve MCF-7 hücre hatlarına ait RNA konsantrasyon ve saflikları 3.1. ve 3.2. çizelgelerinde verilmiştir.

Çizelge 3.1. Farklı konsantrasyonlarda CoVachG ile enfekte edilmiş ve kontrol hücre örneklerinin RNA izolasyon konsantrasyon ve saflik değerleri.

24.saat	Konsantrasyon($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Saflik
HUVEC		
Kontrol	27.7	1.94
1 MOI	42.5	1.80
100 MOI	58.4	1.81
HELA		
Kontrol	55.6	1.82
1 MOI	40.8	1.84
100 MOI	11.6	1.81
MCF7		
Kontrol	98.7	1.83
1 MOI	59.0	1.96
100 MOI	54.6	1.94
48.saat	Konsantrasyon($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Saflik
HUVEC		
Kontrol	44.6	1.80
1 MOI	26.8	1.87
100 MOI	25.1	1.89
HELA		
Kontrol	146.3	2.06
1 MOI	165.0	2.07
100 MOI	190.9	2.08
MCF7		
Kontrol	87.5	1.80
1 MOI	76.0	1.80
100 MOI	73.9	1.82
72.saat	Konsantrasyon($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Saflik
HUVEC		
Kontrol	69.0	1.80
1 MOI	64.8	1.86
100 MOI	61.6	1.88
HELA		
Kontrol	104.5	2.03
1 MOI	111.6	1.99
100 MOI	96.7	1.80
MCF7		
Kontrol	77.9	1.90
1 MOI	66.8	1.88
100 MOI	120.5	1.79

Çizelge 3.2. Farklı konsantrasyonlarda Ad-CD-GMCSF ile enfekte edilmiş ve kontrol hücre örneklerinin RNA izolasyon konsantrasyon ve saflık değerleri.

24.saat	Konsantrasyon($\mu\text{g/mL}$)	Saflık
HUVEC		
Kontrol	416.9	2.12
1 MOI	342.7	2.11
100 MOI	289.7	2.13
HELA		
Kontrol	285.6	2.10
1 MOI	248.0	2.08
100 MOI	269.3	2.08
MCF7		
Kontrol	132.5	2.10
1 MOI	227.1	2.09
100 MOI	113.6	2.06
48.saat	Konsantrasyon($\mu\text{g/mL}$)	Saflık
HUVEC		
Kontrol	160.7	2.11
1 MOI	161.7	2.08
100 MOI	99.2	2.09
HELA		
Kontrol	426.3	2.12
1 MOI	317.5	2.08
100 MOI	300.7	2.07
MCF7		
Kontrol	119.7	2.09
1 MOI	95.4	2.07
100 MOI	165.4	2.10
72.saat	Konsantrasyon($\mu\text{g/mL}$)	Saflık
HUVEC		
Kontrol	619.8	2.10
1 MOI	592.0	2.12
100 MOI	524.1	2.11
HELA		
Kontrol	308.1	2.13
1 MOI	294.4	2.13
100 MOI	465.1	2.14
MCF7		
Kontrol	68.9	2.07
1 MOI	85.0	2.10
100 MOI	31.5	2.02

3.3. CoVacHG ve Ad-CD-GMCSF Viral Vektörlerin Tümör Hücre Hatlarındaki İnflamasyonda Etkin Rol Alan Genlerin İfadesi Üzerindeki Etkileri

Viral vektörlerle enfekte edilmiş hücrelerdeki İnterlökin (IL) -1Beta, IL-6, IL-8, IL-10, Tümör Nekroz Faktörü-Alfa (TNF-alfa) ve Transforme edici Büyüme Faktörü-Beta (TGF-beta) viral vektörlerle enfeksiyondan sonraki 24, 48 ve 72. saat hücrelerinde genlerinin ifade değişimleri EZ-PZR yöntemi ile mRNA düzeyinde belirlenmiştir. Gen ifade düzeylerinin belirlenmesinde referans gen olarak Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) kullanılmış ve kantitatif analizler 2^{-delta delta} metodu ile yapılmıştır. Gen ifade değişimleri şekil 3.3 – 3.14 'te verilmiştir.

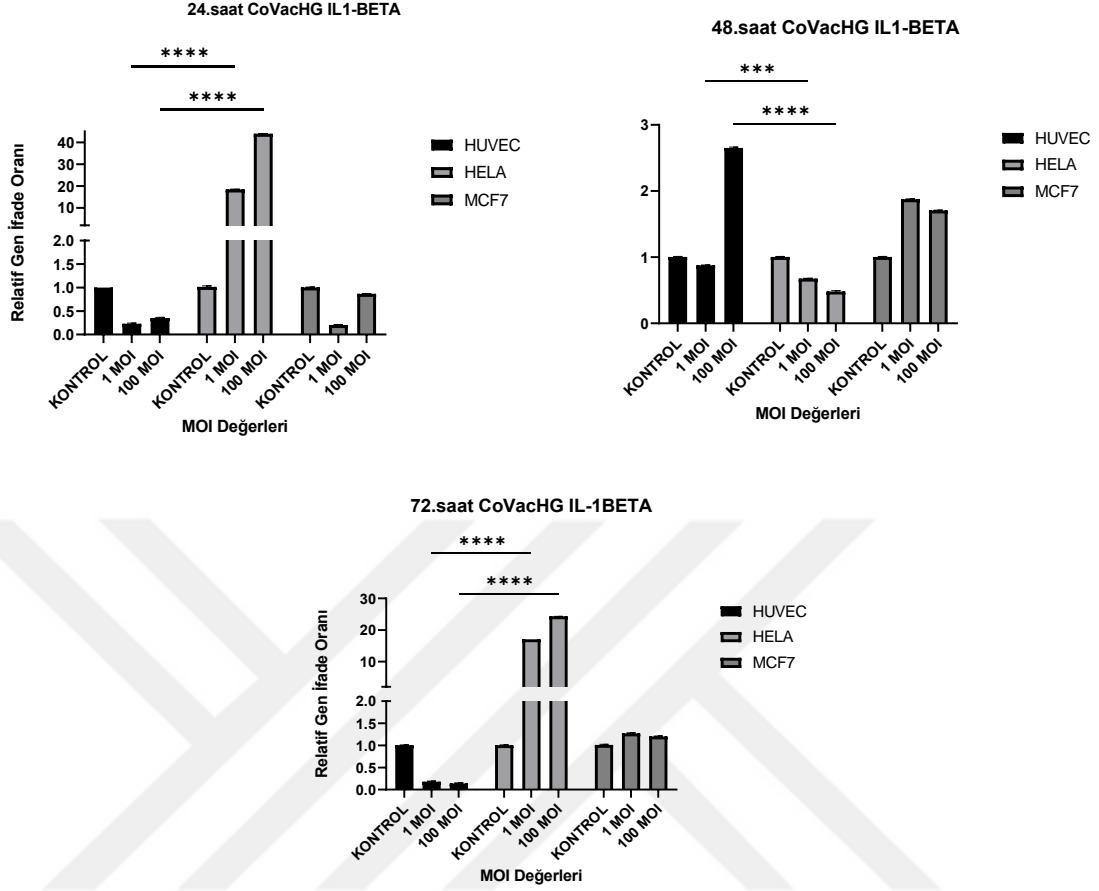
3.3.1. CoVacHG ile Enfekte Edilmiş Hücrelerdeki Hedef Genlerin İfade Değişimleri

3.3.1.1. IL-1Beta mRNA Düzeyinde Gen İfadesi

HUVEC hücrelerinde IL-1Beta hücre başına 100 CoVacHG (Ad-Spike) viral vektör verilen 48. saat inkübasyonu hariç diğer tüm saat ve koşullarda ekspresyonda azalış gösterdi (Şekil 3.3.).

CoVacHG viral vektör uygulaması ile HeLa hücrelerinde IL-1Beta için 48. saat koşullarında azalırken 24 ve 72 saat inkübe edilen hücrelerde sitokin gen ekspresyonlarında artışı gözlemlendi (Şekil 3.3.).

MCF7 hücrelerindeki gen ekspresyon ifade değişimlerine baktığımızda ise Ad-Spike viral vektörü uygulandığında IL-1Beta geni 24. saatte ekspresyonu azalırken 48 ve 72. saatte arttı (Şekil 3.3.).



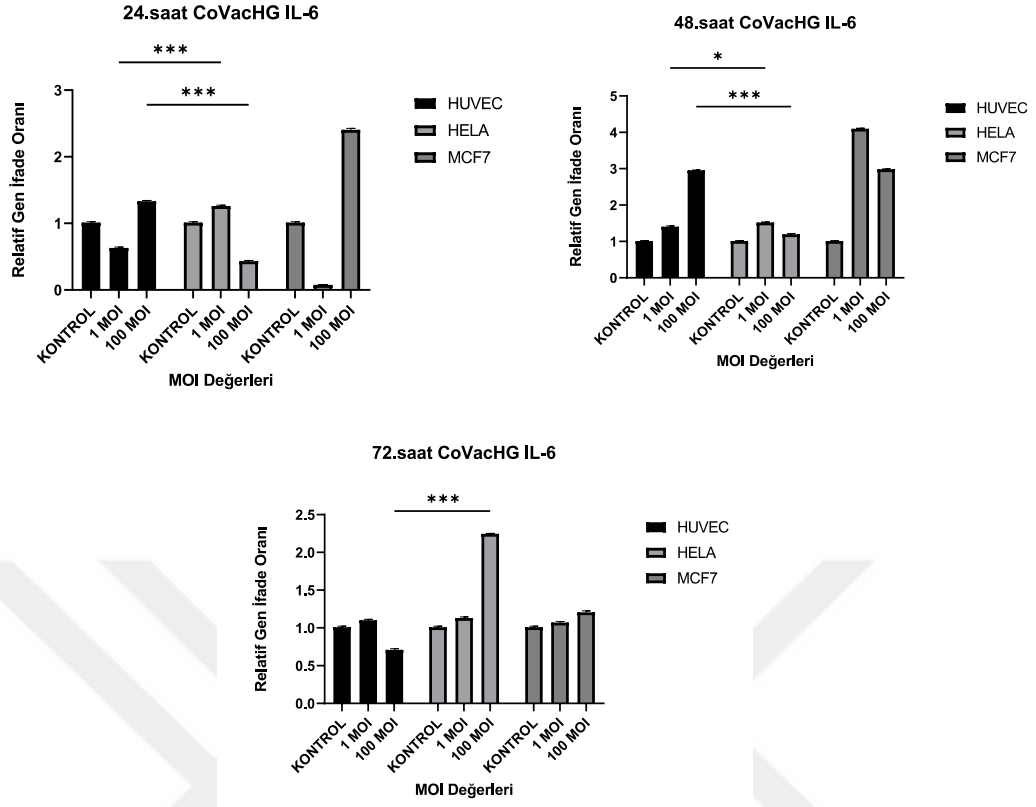
Şekil 3.3. CoVacHG ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki IL-1Beta gen ifade değişimleri.

3.3.1.2. IL-6 mRNA Düzeyinde Gen İfadesi

HUVEC hücrelerinde IL-6 gen ifadesinde 24.saat 1 MOI ve 72.saat 100 MOI'de azalırken diğerlerinde artış gözlemlendi (Şekil 3.4.).

HeLa hücrelerinde ise IL-6 geninde, 24.saat 100 MOI koşulu hariç diğer tüm koşul ve saatlerde gen ifadesinde artış görüldü (Şekil 3.4.).

MCF7 hücrelerine baktığımızda IL-6 geni ise yalnızca 1 MOI verilen 24 saat inkübe edilen hücrelerde azalırken diğer tüm koşul ve saatlerde arttı (Şekil 3.4.).

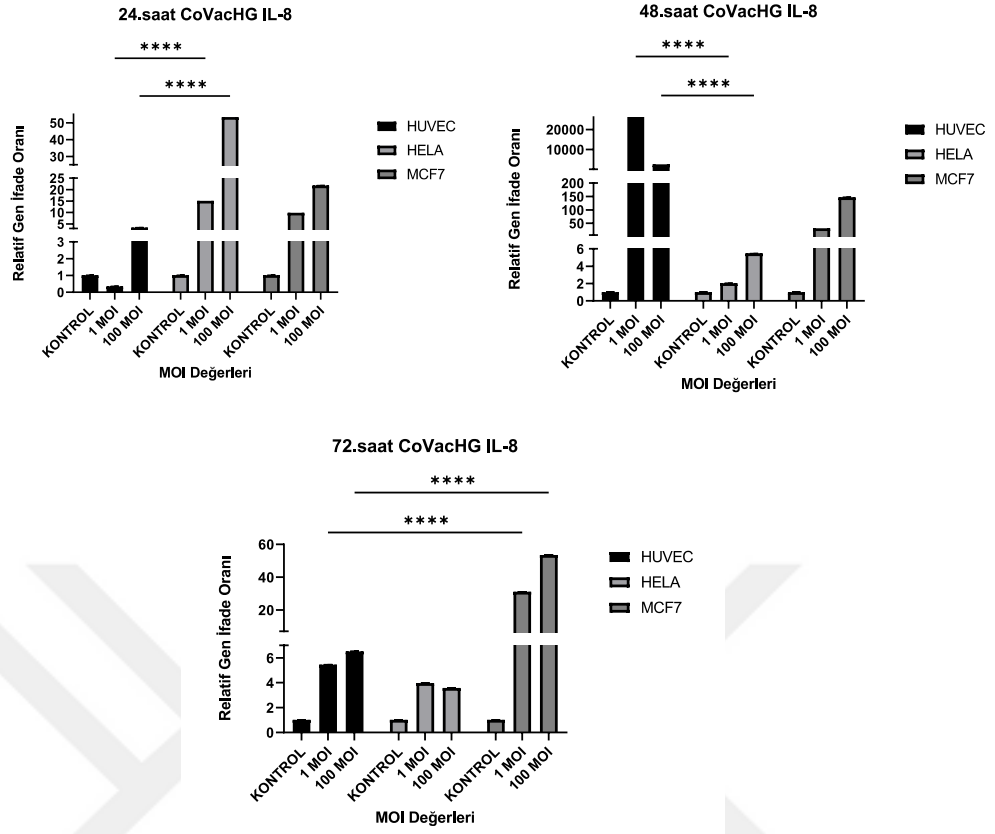


Şekil 3.4. CoVacHG ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki IL-6 gen ifade değişimleri.

3.3.1.3. IL-8 mRNA Düzeyinde Gen İfadesi

HUVEC hücrelerinde IL-8 sadece 24.saat 1 MOI koşulunda azalış gösterirken diğer tüm koşullarda artış göstermiş hatta 48 saat inkübasyon hücrelerinde çok belirgin olarak arttı (Şekil 3.5.).

HeLa ve MCF7 hücrelerinde IL-8 gen ifadesi genel olarak tüm uygulamalarda arttı (Şekil 3.5.).



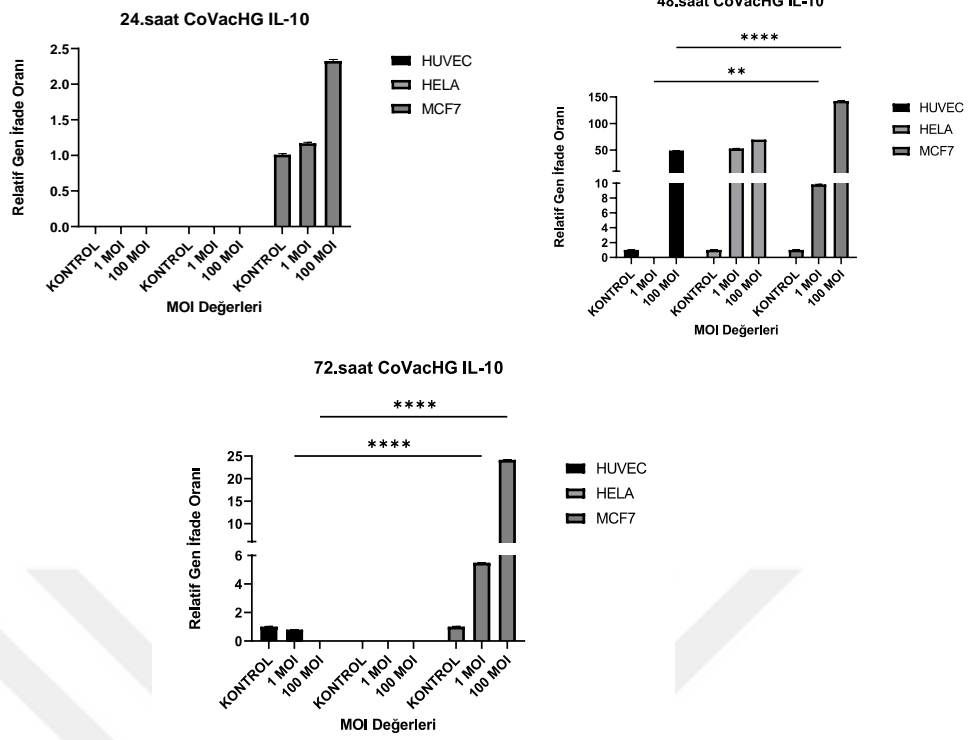
Şekil 3.5. CoVacHG ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki IL-8 gen ifade değişimleri.

3.3.1.4. IL-10 mRNA Düzeyinde Gen İfadesi

HUVEC hücrelerinde IL-10 gen ifadesi 48.saat 100 MOI de artarken 72.saat 1 MOI kontrol grubuna göre viral vektör uygulanan hücrelerde ekspresyonu azaldı (Şekil 3.6.).

HeLa hücrelerinde kontrol gruplarında IL-10 gen ifadesi izlenmezken viral vektör uygulanan hücrelerde az da olsa gen ifadesi saptanmıştır (Şekil 3.6.).

MCF7 hücrelerinde de IL-10 geni ifadesi de aynı şekilde her durum ve saatte kontrolüne göre artış gözlemlendi. Özellikle 100 MOI verilen hücrelerin 48 ve 72 saat inkübasyonunda belirgin artış görüldü (Şekil 3.6.).



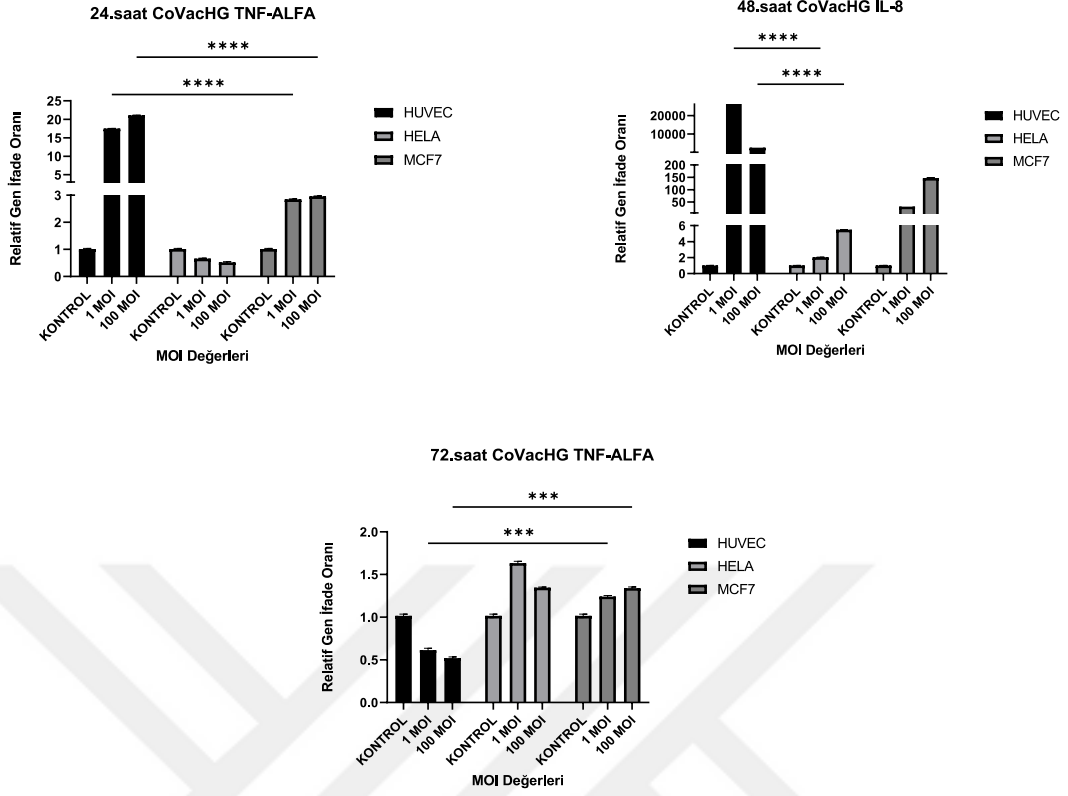
Şekil 3.6. CoVacHG ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki IL-10 gen ifade değişimleri.

3.3.1.5. TNF-Alfa mRNA Düzeyinde Gen İfadesi

HUVEC TNF-alfa 24 saat inkübe edilen hücrelerde belirgin bir artış gözlemlendi ve bu artış 48.saatte de vardı.72.saatten sonra ise ekspresyonda azalma görüldü(Şekil 3.7.).

HeLa hücrelerinde TNF-alfa geni ise 24.saatte azalmışken 48. ve 72. saatlerde s belirgin şekilde artış gösterdi (Şekil 3.7.).

MCF7 hücrelerinde de 1 MOI viral vektör verilen hücrelerde kontrole göre bir miktar TNF-alfa gen ekspresyonu azalırken diğer koşullarda kontrole göre gen ifadesinde artış görüldü (Şekil 3.7.).



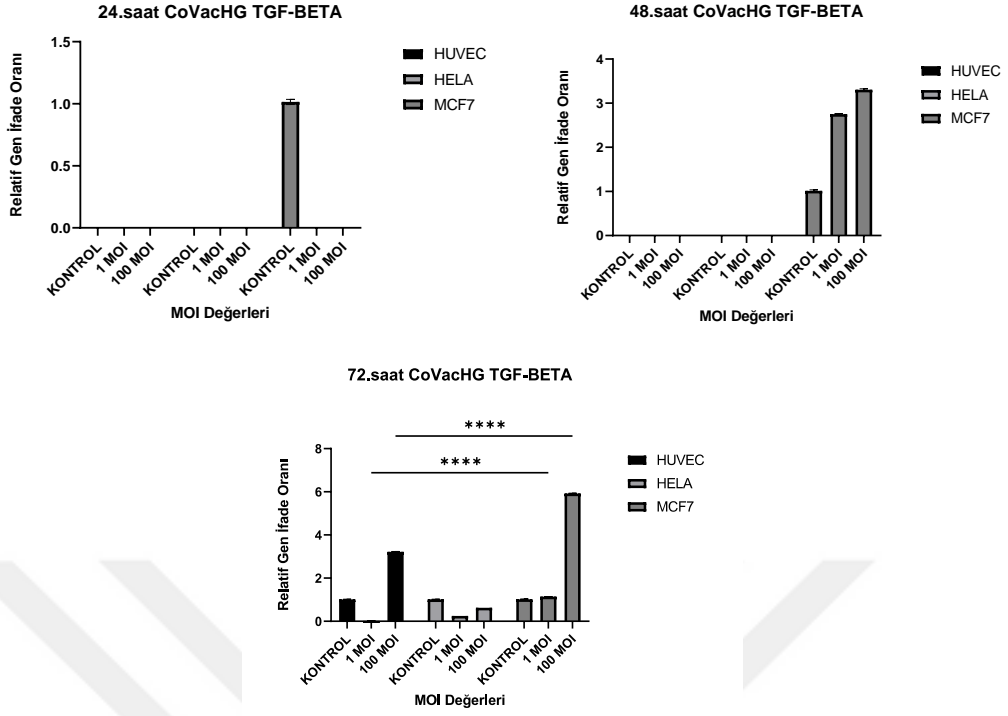
Şekil 3.7. CoVachG ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki TNF-alfa gen ifade değişimleri.

3.3.1.6. TGF-Beta mRNA Düzeyinde Gen İfadesi

HUVEC hücrelerinde TGF-Beta'nın ekspresyonuna baktığımızda ise 1 MOI viral vektör verilen hücrelerde kayda değer olmayan bir miktar azalış ve 100 MOI viral vektör verilen hücrelerde gen ekspresyonunda artış gözlemlendi (Şekil 3.8.).

HeLa hücrelerinde TGF-Beta 24 ve 48 inkübe edilen hücrelerin kontrollerinde ekspre edilmedi, virüs uygulanan hücrelerde ise geç ifade edildi (Şekil 3.8.).

MCF7 TGF-Beta geni 24 saat inkübe edilen hücrelerin kontrolünde ifadesi gözlemlenmedi, vektör uygulanmış hücrelerde de geç ekspresyonu görüldü. 48 ve 72.saatlerde kontrole göre gen ifade artışı izlendi (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. CoVacHG ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki TGF-Beta gen ifade değişimleri.

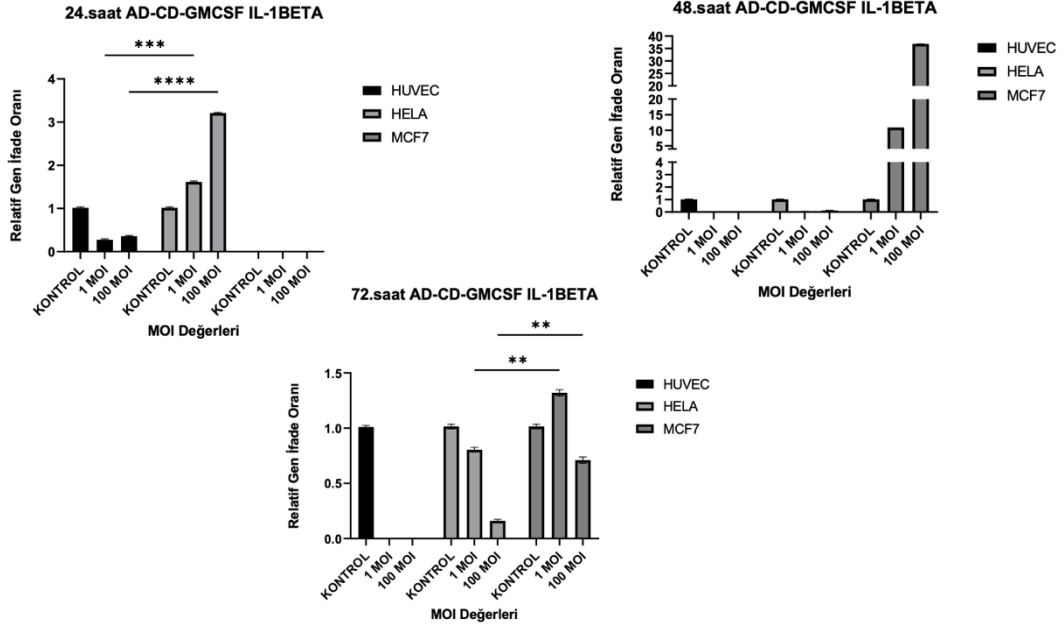
3.3.2. Ad-D-GMCSF ile Enfekte Edilmiş Hücrelerdeki Hedef Genlerin İfade Değişimleri

3.3.2.1. IL-1Beta mRNA Düzeyinde Gen İfadesi

HUVEC hücrelerine Ad-CD-GMCSF viral vektörü verildiğinde 24 saat inkübe edilen hücrelerde kontrole göre IL-1Beta gen ekspresyonu azaldı (Şekil 3.9.). 48 ve 72.saatte kontrol hücrelerinde IL-1Beta gen ekspresyonu gözlenmez iken virüs verilen hücrelerde yüksek ct değerlerinde (1 MOI'de 39, 100 MOI'de 33) ekspresyon gözlemlendi (Şekil 3.9.).

HeLa hücrelerinde IL1-Beta geni ifadesi 24.saatte artarken 48 ve 72.saat inkübasyonlarında azalış gözlemlendi (Şekil 3.9.).

MCF7 hücrelerinde ise, IL1-Beta geninin 24.saat kontrolünde ekspresyonuyla karşılaşılmadı, virüs verilen hücrelerde de geç ekspresyonu gözlemlendi. 48 ve 72 saat inkübe edilen hücrelerde ise gen ekspresyonunda artış saptandı (Şekil 3.9.).



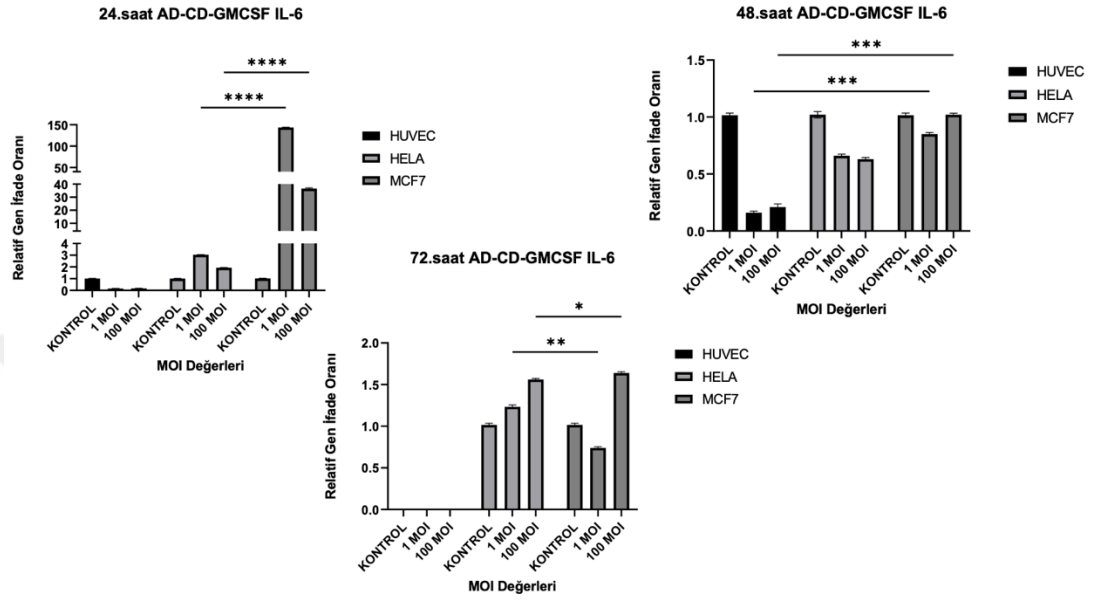
Şekil 3.9. AD-CD-GMCSF ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki IL-1Beta gen ifade değişimleri.

3.2.2.2. IL-6 mRNA Düzeyinde Gen İfadesi

IL-6 gen ekspresyonunda HUVEC hücrelerinde 72.saate kadar olan inkübasyonlarda azalış gözlemlendi, 72.saat inkübasyonunda ise kontrolde ekspresyon izlenmezken virüs verilen hücrelerde ise geç ekspresyon izlendi (Ct değerleri 1 MOI'de 34, 100 MOI'de 31).

HeLa hücrelerinde IL-6 geni için 48.saatte ifadesinde azalış, 24 ve 72 saat inkübasyonlarında ise artış gözlemlendi (Şekil 3.10.).

MCF7 hücrelerinde ise IL-6 geni 24.saat hücrelerinde kontrole göre artarken 48 ve 72.saat hücrelerinde 1 MOI vektör verilen hücrelerde azalma, 100 MOI verilen hücrelerde ise artış izlendi (Şekil 3.10.).



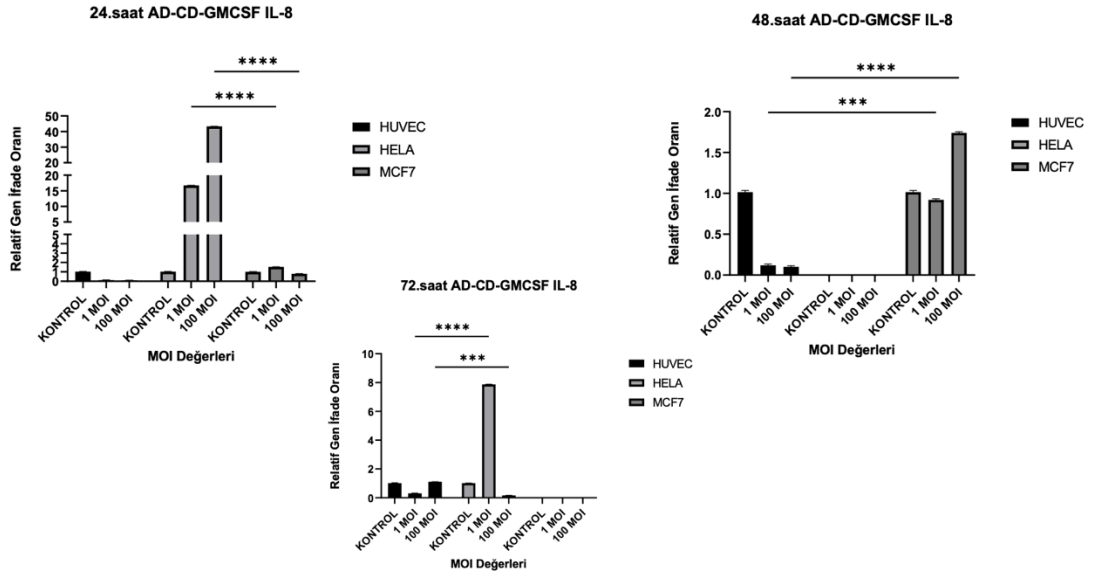
Şekil 3.10. AD-CD-GMCSF ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki IL-6 gen ifade değişimleri.

3.2.2.3. IL-8 mRNA Düzeyinde Gen İfadesi

HUVEC hücrelerinde 72.saat 100 MOI koşulu hariç hepsinde IL-8 gen ekspresyonunda azalma izlendi (Şekil 3.11.).

Buna karşılık HeLa hücrelerinde IL-8 gen ekspresyonunda kontrollere göre artış gözlemlendi (Şekil 3.11.).

MCF7 hücrelerinde ise kontrol grubunda IL-8 ekspresyonu gözlenmezken, virüs verilen hücrelerde IL8 geninin geç de olsa eksprese edildiği gözlemlendi.



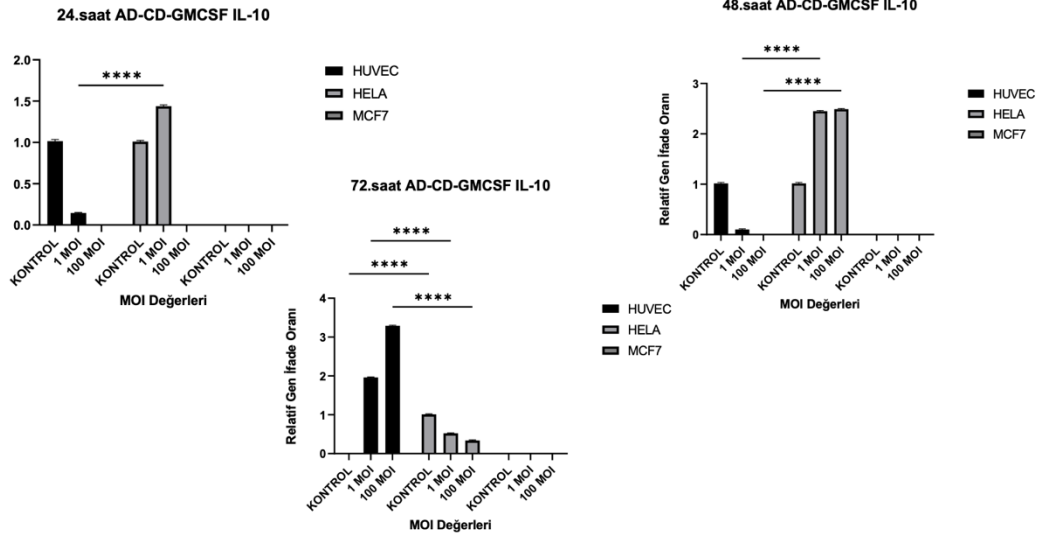
Şekil 3.11. AD-CD-GMCSF ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki IL-8 gen ifade değişimleri.

3.2.2.4. IL-10 mRNA Düzeyinde Gen İfadesi

HUVEC hücrelerinde 24 ve 48.saat inkübasyonlarında 1 MOI verilen hücrelerde IL-10 gen ekspresyonu azalırken 100 MOI viral vektör verilen hücrelerde gen ekspresyonu gözlenmedi. 72.saatte ise diğerlerinin aksine gen ekspresyonunda artış gözlemlendi (Şekil 3.12.).

HeLa hücrelerinde ise IL-10 geni 24.saatte kontrol grubunda ekspre edilmezken virüs uygulanan hücrelerde geç ekspre edildi. Buna karşılık 48.saat hücrelerinde ekspresyonu artarken 72.saat hücrelerinde ise ekspresyonunda azalma meydana geldi (Şekil 3.12.).

MCF7 hücrelerinde IL-10 geni kontrol gruplarında ve 24. ve 48. Saat inkübasyonlarında ekspre edilmezken sadece virüs verilen hücrelerde 72. Saatte gen ekspresyon izlendi (Şekil 3.12.).



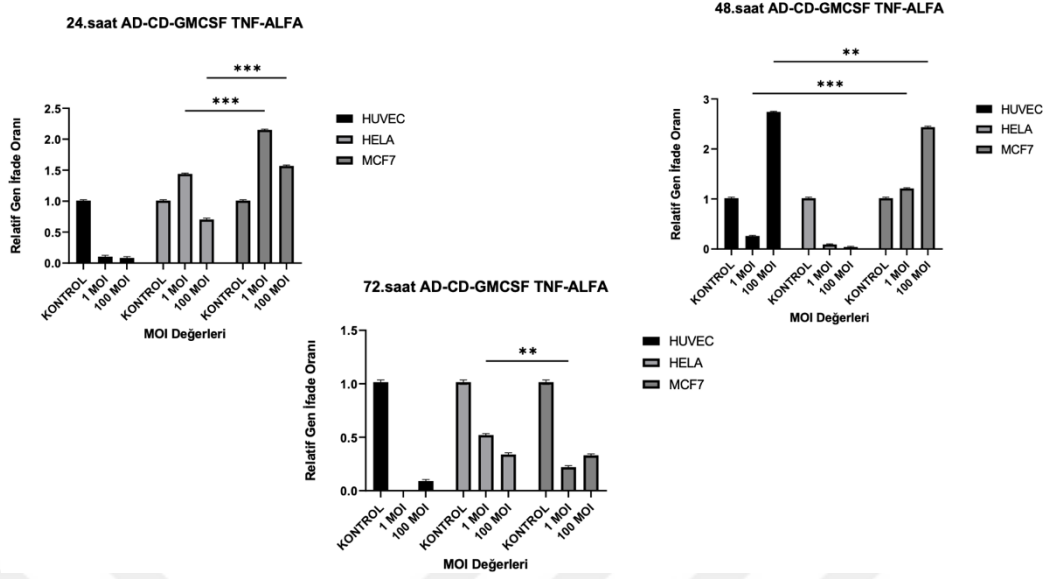
Şekil 3.12. AD-CD-GMCSF ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki IL-10 gen ifade değişimleri.

3.2.2.5. TNF-Alfa mRNA Düzeyinde Gen İfadesi

HUVEC hücrelerinde, 24. ve 48. Saat 1 MOI viral vektör verilen ve 72. Saat 100 MOI viral vektör verilen hücrelerde gen ifadesi kontrole göre azalırken 48.saat 100 MOI verilenlerde artmıştır (Şekil 3.13.).

HeLa hücrelerinde TNF-alfa yalnızca 1 MOI verilen 24 saat inkübe edilen hücrelerde gen ifadesini arttırırken, diğer tüm koşullarda gen ifadesinde azalış gözlemlendi (Şekil 3.13.).

MCF7 hücrelerinde ise TNF-alfa ekspresyonunda 24 ve 48.saatlerde kontrole göre artarken, 72.saate azalışı gözlemlendi (Şekil 3.13.).



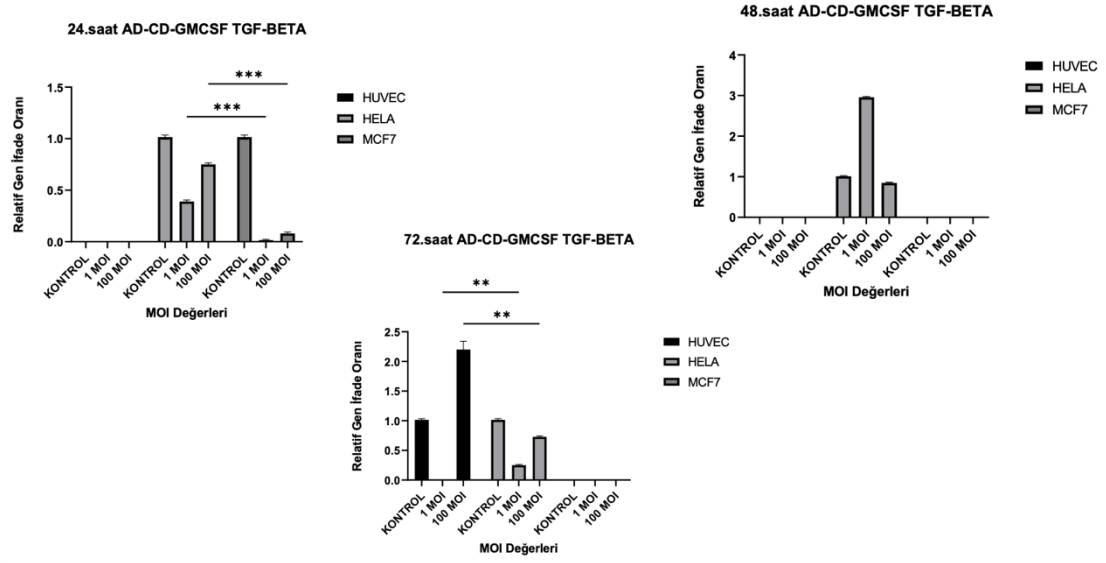
Şekil 3.13. AD-CD-GMCSF ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki TNF-alfa gen ifade değişimleri.

3.2.2.6. TGF-Beta mRNA Düzeyinde Gen İfadesi

HUVEC TGF-Beta ise yalnızca 24saat 100 MOI koşulunda geç ekspre olurken (Cq: 34) 72 saat inkübe edilen 100 MOI viral vektör verilen hücrelerde ekspresyon artışı gözlemlendi (Şekil 3.14.).

HeLa hücrelerinde ise 24 saat inkübe edilen tüm gruplarda TGF-Beta eksprese edilirken 72 saat inkübe edilen hücrelerde ekspresyon gözlenmedi. 48 saat 100 MOI viral vektör verilen hücrelerde 48. Saatte TGF-beta ekspresyonu azalırken 1 MOI viral vektör verilenlerde artış gözlemlendi (Şekil 3.14.).

MCF7 hücrelerinde ise TGF-Beta geninde 24.saatte kontrole göre ekspresyonunda azalma gözlemlendi ve 48.saat 100 MOI koşulundaki hücrelerde ise geç ekspresyon izlendi. Buna karşılık diğer gruplarda hiç ekspresyon izlenmedi (Şekil 3.14.).



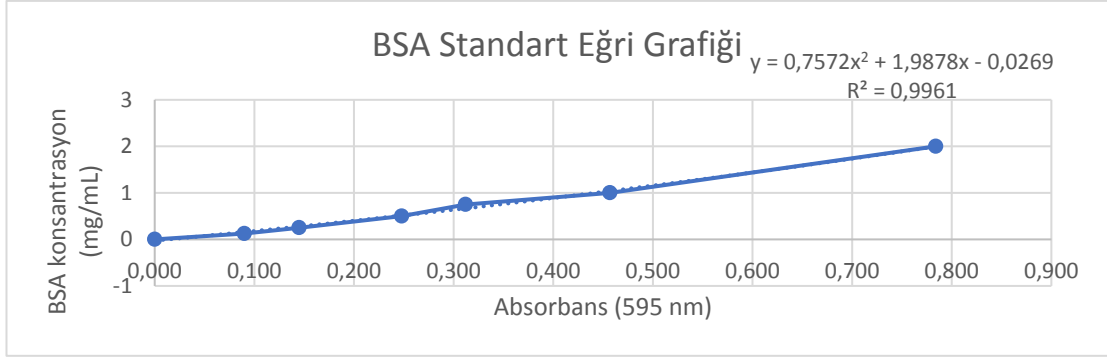
Şekil 3.14. AD-CD-GMCSF ile 24-48-72 saat inkübasyon sonucu hücrelerdeki TGF-Beta gen ifade değişimleri.

3.4. CoVacHG ve Ad-CD-GMCSF Viral Vektörlerin İnflamasyonda Etkin Rol Alan Proteinlerin İfade Düzeyine Etkileri

Konrol, 1 ve 100 MOI viral vektör uygulanmış hücreleri transdüksiyondan 72 saat sonra toplanıp -30° C'de saklanan hücre pelletleri lizise uğratıldıktan sonra Bradford yöntemi ile protein düzeyleri belirlenmiş olup standart eğri grafiği çizilerek hesaplandı ve her örnekten 15 μ g protein ile Western Blotlama deneyi gerçekleştirildi. Hedef proteinlere ait bant yoğunlukları Image Lab programı ile hesaplandı.

3.4.1. Bradford ile Protein Miktar Tayini

0,125 - 2 mg/mL konsantrasyon aralığında BSA standartları hazırlandı. Kullanılan standartların karşılık geldiği absorbans değerleri ile grafik çizdirildi ve eğrinin formülü hesaplandı (Şekil 3.15.). Örneklerin içerdiği protein miktarları absorbans değerlerine göre hesaplandı. Formülde OD değerleri x yerine konularak konsantrasyonlar elde edildi.



Şekil 3.15. BSA Standart Eğri Grafiği.

Çizelge 3.3. Hücrelerin içerdiği protein miktarlarının ölçümleri.

HUVEC	Uygulanan Vektör	mg/mL
Kontrol		4,60
1 MOI	Ad-Spike	4,53
100 MOI	Ad-Spike	2,67
Kontrol		20,43
1 MOI	Ad-CD-GMCSF	15,10
100 MOI	Ad-CD-GMCSF	8,30
HELA	Uygulanan Vektör	mg/mL
Kontrol		5,84
1 MOI	Ad-Spike	6,65
100 MOI	Ad-Spike	8,76
Kontrol		8,64
1 MOI	Ad-CD-GMCSF	8,46
100 MOI	Ad-CD-GMCSF	6,17
MCF-7	Uygulanan Vektör	mg/mL
Kontrol		3,13
1 MOI	Ad-Spike	2,01
100 MOI	Ad-Spike	1,88
Kontrol		16,52
1 MOI	Ad-CD-GMCSF	6,21
100 MOI	Ad-CD-GMCSF	10,21

3.4.2. CoVacHG ve Ad-CD-GMCSF Uygulanmış Hücrelerdeki Hedef Proteinlerin İfadeleri

İmage Lab yazılımı üzerinden membranlarda görüntülenen bantlar tek tek seçildi ve analiz tablosundan bant yoğunluğu ortalaması değerleri alınarak her değer referans protein olarak HBA bantlarındaki aynı koşuldaki bant yoğunluğu ortalaması değeri ile normalize edildi. Daha sonra da 1 MOI ve 100 MOI viral vektör uygulanan hücelere

ait normalize edilmiş değerler, kontrollere ait olan ortalama bant yoğunluğu nu gösteren değere bölünerek ifade değişim miktarları hesaplandı.

3.4.2.1. CoVacHG Uygulanmış Hücrelerdeki Hedef Proteinlerin İfadeleri

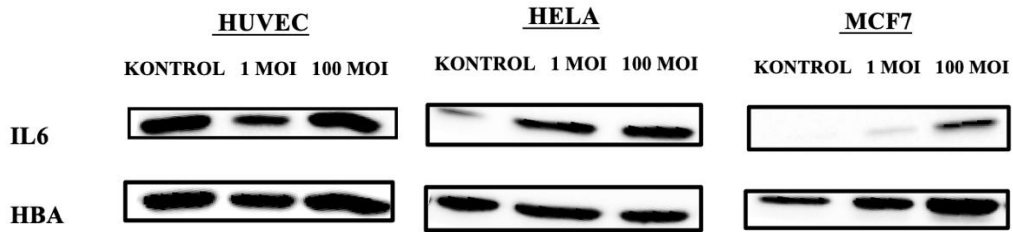
3.4.2.1.1. IL-1Beta Protein Düzeyi

HUVEC, HeLa ve MCF7 hücreleri ile yapılan deneylerde kontrol ve vektör uygulanan hücrelerde IL-1Beta proteini saptanamadı.

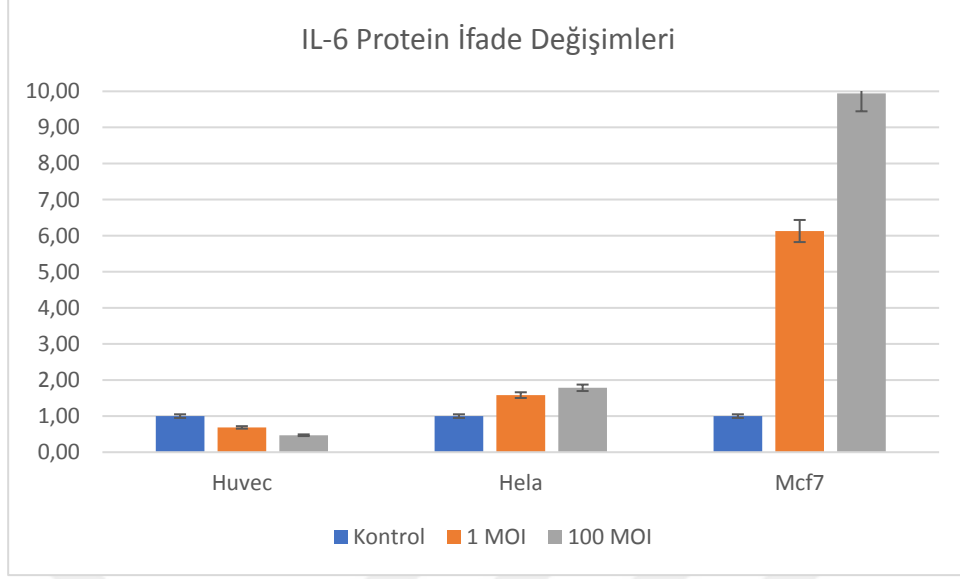
3.4.2.1.2. IL-6 Protein Düzeyi

IL-6 protein ifade düzeyleri Şekil 3.10. de ve kontrol grubuna göre değişimleri Şekil 3.11. da gösterilmiştir.

HUVEC hücrelerinde vektör uygulaması ile 1 ve 100 MOI de IL-6 protein ifadesinde azalma izlenirken HELA ve MCF7 hücrelerinde artış izlenmiştir (Şekil 3.16. ve Şekil 3.17.)



Şekil 3.16. CoVacHG uygulanmış hücrelerdeki IL6 proteinine ait bant görüntüleri.



Şekil 3.17. CoVacHG uygulanmış hücrelerdeki IL-6 protein ifade değişimleri.

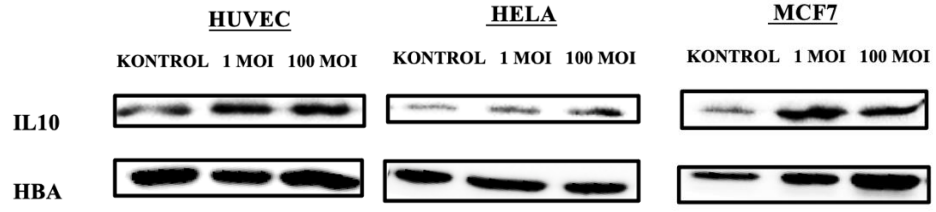
3.4.2.1.3. IL-8 Protein Düzeyi

HUVEC, HeLa ve MCF7 hücreleri ile yapılan deneylerde kontrol ve vektör uygulanan hücrelerde IL-8 proteini saptanamadı.

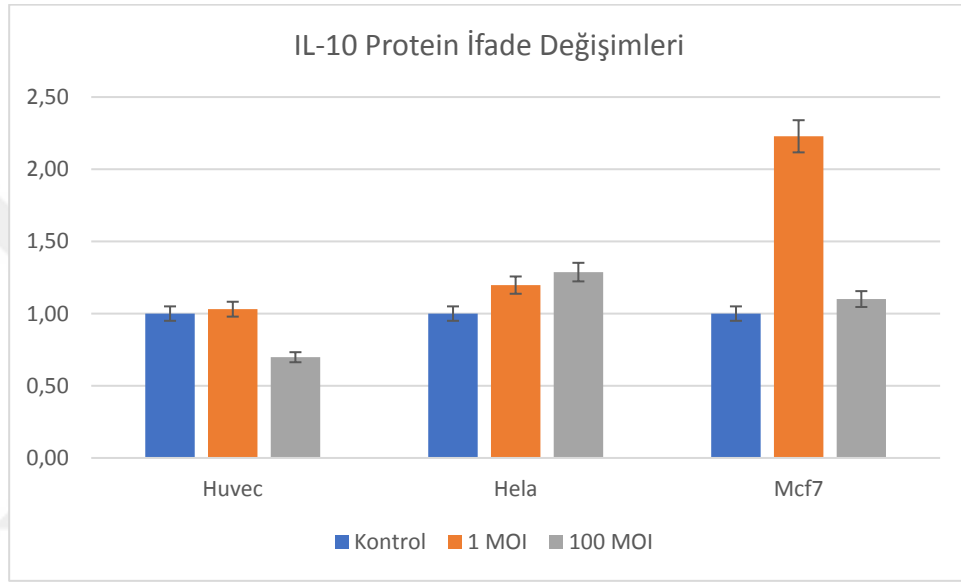
3.4.2.1.4. IL-10 Protein Düzeyi

IL-10 protein ifade düzeyleri Şekil 3.10. da ve kontrol grubuna göre değişimleri Şekil 3.11.de gösterilmiştir.

HUVEC hücrelerinde 1 MOI vektör uygulaması ile IL-10 protein ifadesinde bir değişiklik olmazken 100 MOI uygulamasında bir azalma izlenmiştir (Şekil 3.18.). HELA hücrelerinde ise vektör uygulaması ile IL-10 protein düzeyinde hafif bir artış izlenirken MCF7 hücrelerinde sadece 1 MOI vektör uygulamasında bir artış izlenmiştir (Şekil 3.19.).



Şekil 3.18. CoVacHG uygulanmış hücrelerdeki IL-10 proteinine ait bant görüntüleri.

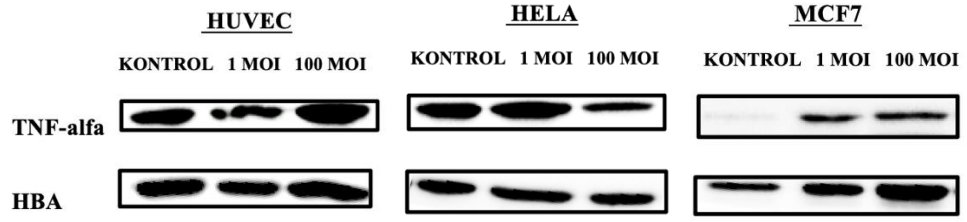


Şekil 3.19. CoVacHG uygulanmış hücrelerdeki IL-10 protein ifade değişimleri.

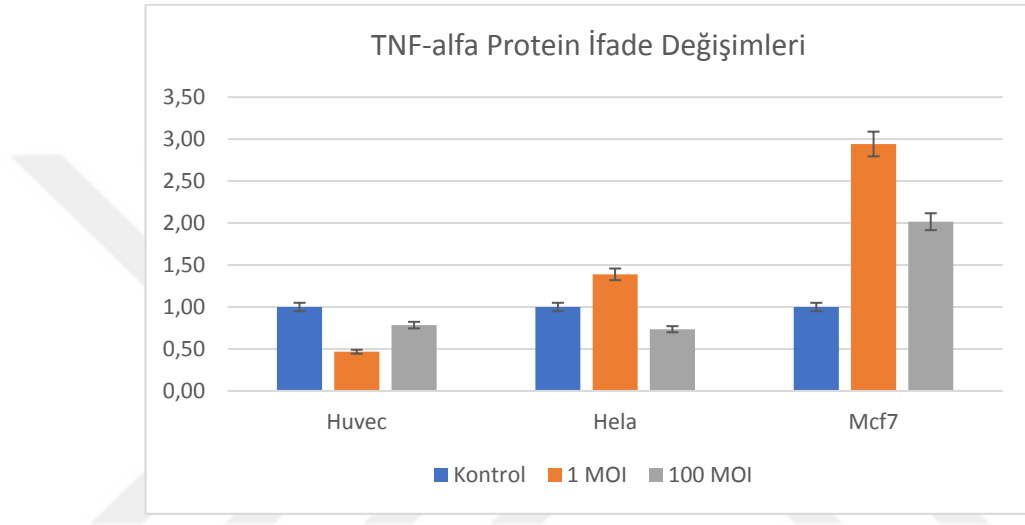
3.4.2.1.5. TNF-Alfa Protein Düzeyi

TNF-alfa protein ifade düzeyleri Şekil 3.14.de ve kontrol grubuna göre değişimleri Şekil 3.20’de gösterilmiştir.

HUVEC hücrelerinde vektör uygulaması ile TNF-alfa protein ifadesinde bir azalma izlenmiştir (Şekil 3.20.). HELA hücrelerinde ise 1 MOI vektör uygulaması ile protein ifadesinde artış buna karşılık 100 MOI vektör uygulandığında bir azalma izlenmiştir (Şekil 3.20.). MCF7 hücrelerinde ise vektör uygulaması ile TNF-alfa düzeylerinde bir artış izlenmiştir (Şekil 3.21.).



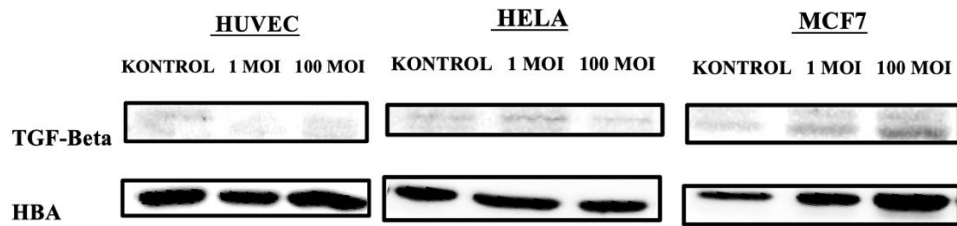
Şekil 3.20. CoVacHG uygulanmış hücrelerdeki TNF-alfa proteinine ait bant görüntüleri.



Şekil 3.21. CoVacHG uygulanmış hücrelerdeki TNF-alfa protein ifade değişimleri.

3.4.2.1.6. TGF-beta Protein Düzeyi

Proteinin latent yani henüz aktif olmayan formundaki 44 kDa boyutunda görüntüsü elde edildi (Şekil 3.22.).



Şekil 3.22. CoVacHG uygulanmış hücrelerdeki TNF-alfa proteinine ait bant görüntüleri.

3.4.2.2. AdCD-GMCSF uygulanmış hücrelerdeki Hedef Proteinlerin Düzeyleri

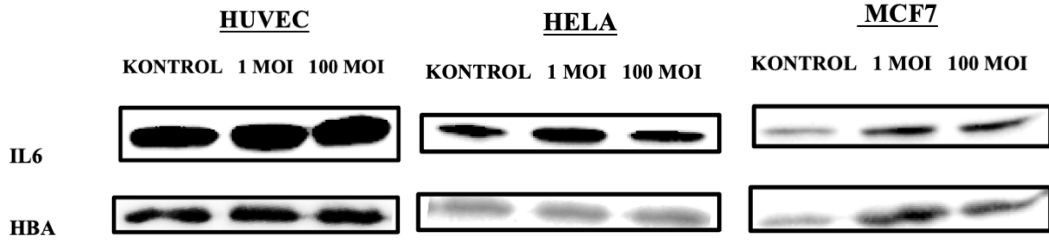
3.4.2.2.1. IL-1Beta Protein Düzeyi

HUVEC, HeLa ve MCF7 hücreleri ile yapılan deneylerde kontrol ve vektör uygulanan hücrelerde IL-1Beta proteini saptanamadı.

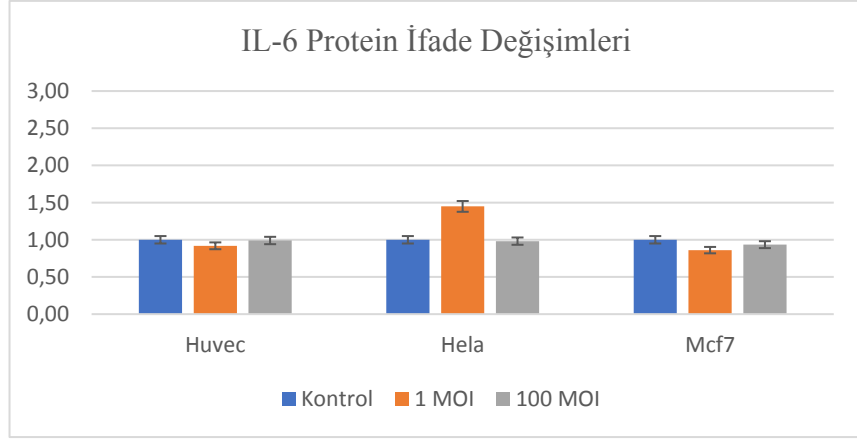
3.4.2.2.2. IL-6 Protein Düzeyi

IL-6 protein ifade düzeyleri Şekil 3.17. ve kontrol grubuna göre değişimleri Şekil 3.23.de gösterilmiştir.

HUVEC ve MCF7 hücrelerinde vektör uygulaması ile IL-6 protein ifadesinde bir değişiklik izlenmez HeLa hücrelerinde sadece 1 MOI vektör uygulamasında bir artış izlenmiştir (Şekil 3.23. ve Şekil 3.24.) .



Şekil 3.23. Ad-CD-GMCSF uygulanmış hücrelerdeki IL-6 proteinine ait bant görüntüleri.



Şekil 3.24. Ad-CD-GMCSF uygulanmış hücrelerdeki IL-6 protein ifade değişimleri.

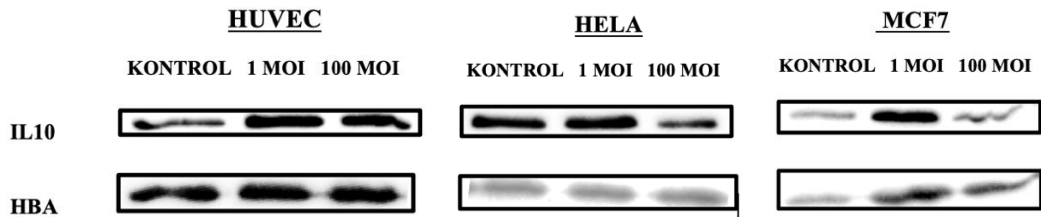
3.4.2.2.3. IL-8 Protein Düzeyi

HUVEC, HeLa ve MCF7 hücreleri ile yapılan deneylerde kontrol ve vektör uygulanan hücrelerde IL-8 proteinini saptanamadı.

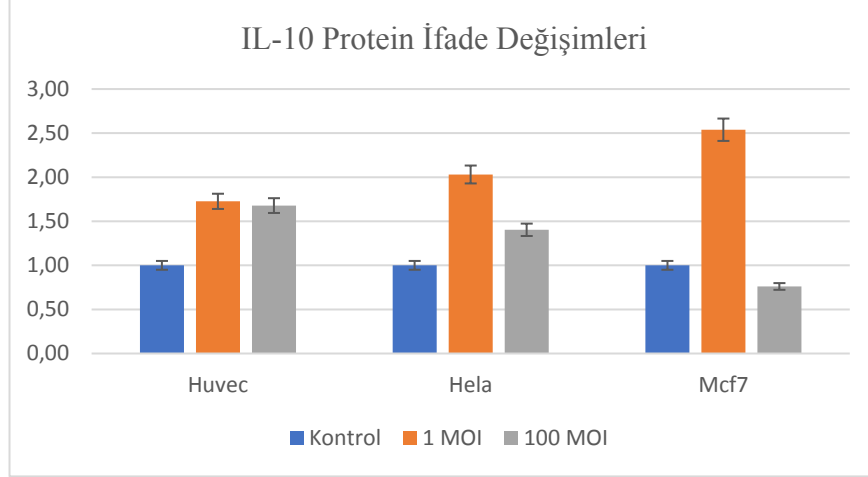
3.4.2.2.4. IL-10 Protein Düzeyi

IL-10 protein ifade düzeyleri Şekil 3.16. ve kontrol grubuna göre değişimleri Şekil 3.17.de gösterilmiştir.

HUVEC ve HeLa hücrelerinde vektör uygulaması ile IL-10 protein ifadesinde bir artış izlenirken MCF7 hücrelerinde 1 MOI de protein ifadesinde artış buna karşılık 100 MOI vektör uygulamasında ise bir azalma izlenmiştir (Şekil 3.25. ve Şekil 3.26.).



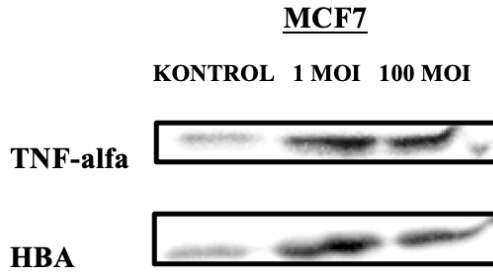
Şekil 3.25. Ad-CD-GMCSF uygulanmış hücrelerdeki IL-10 proteinine ait bant görüntüleri.



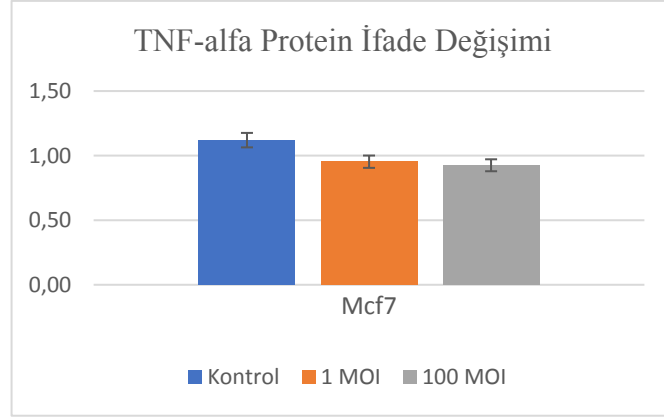
Şekil 3.26. Ad-CD-GMCSF uygulanmış hücrelerdeki IL-10 protein ifade değişimleri.

3.4.2.2.5. TNF-Alfa Protein Düzeyi

HUVEC ve HeLa hücreleri ile yapılan deneylerde kontrol ve vektör uygulanan hücrelerde TNF-alfa proteini saptanamadı. Yalnızca MCF7 hücrelerinde TNF-alfa proteini saptanabildi. MCF7 hücrelerindeki TNF-alfa protein ifade düzeyleri Şekil 3.27.de ve kontrol grubuna göre değişimleri Şekil 3.28.de gösterilmiştir. MCF7 hücrelerinde vektör uygulaması ile TNF-alfa düzeylerinde belirgin bir değişiklik izlenmedi (Şekil 3.27. ve Şekil 3.28.).



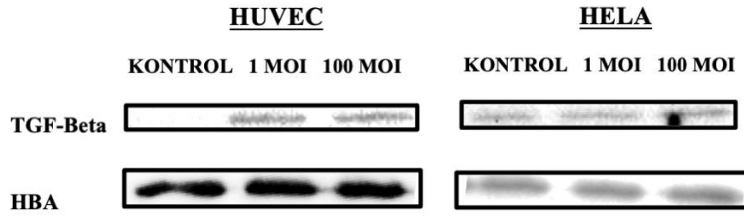
Şekil 3.27. Ad-CD-GMCSF uygulanmış hücrelerdeki TNF-alfa proteinine ait bant görüntüleri.



Şekil 3.28. Ad-CD-GMCSF uygulanmış hücrelerdeki TNF-alfa protein ifade değişimleri.

3.4.2.2.6. TGF-beta Protein Düzeyi

Proteinin latent yani henüz aktif olmayan formundaki 44 kDa boyutunda görüntüsü elde edildi (Şekil 3.29.). MCF7 hücrelerinde bant görülmedi.



Şekil 3.29. Ad-CD-GMCSF uygulanmış hücrelerdeki TNF-alfa proteinine ait bant görüntüleri.

4. TARTIŞMA

2000li yılların başlarında adenoviral vektörler revaçta iken geliştirilen tedavi vektörlerin klinik uygulamalarda yer bulamaması nedeniyle ilgi azalmış ancak 2019 yılında Covid-19/SARS-Cov-2 (şiddetli akut solunum sendromu) hastalığının da hayatımıza girmesi ile adenoviral vektörler tekrar popülerite kazanmıştır. Oxford üniversitesi tarafından geliştirilen ve replike olmayan bir adenoviral vektöre yerleştirilen spike geninden oluşan COVID-19 aşısı yüz milyonlarca kişiye uygulanmıştır (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT0504782). Adenoviral vektörlerin kanser tedavisi için geliştirilme süreci yaklaşık 30 yıldan daha uzun bir geçmişe dayanmakla birlikte ilk adenoviral gen tedavisi ajanı yakın bir zamanda mesane kanseri için FDA tarafından onaylanmıştır (fda.gov.tr; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02773849). Hayvan modelleri ve sonraki klinik çalışmalar, viral vektörlerin genleri kanser hücrelerine taşımak ve anti-tümör immün tepkileri indüklemek için terapötik potansiyeli gösterilmiştir (Coughlan ve ark., 2020 ve Ricobaraza ve ark., 2020). Bunun yanı sıra çok sayıda gen tedvisi ajanı kanserli hastalarda denenmektedir (Brouwer ve ark., 2007; Kuman ve ark., 2016; Lowenstein ve ark., 2019; Zhu ve ark., 2018).

Diğer tedavi türlerinin çıktığında gelişen güvenlik endişeleri, henüz yeni yeni yaygınlaşan bu tedavi tipinde de ortaya çıkmıştır. Özellikle COVID-19 için kullanılan aşı vektörü ile ortaya çıkan kan pıhtılaşması yan etkisi ciddi endişeler doğurmuş ve bu aşının uygulanmasının bazı ülkeler tarafından durdurulmasına yol açmıştır. Tedavide kullanılan vektörlerin vücutta gerçekleştirebileceği hedef dışı etkiler ve sonuçlarını araştıran yayınlar artmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız her iki viral vektör tipimiz de replikasyon defektiftir. Replikasyon yeteneği olmayan vektörlerin vücutta hedef dışı etkilerine bakıldığında endişe uyandıracak düzeyde olmadığına dair araştırmalar bulunmaktadır. Örneğin, Noah ve ark. (1996), yaptığı çalışmada insan endotel hücrelerine replikasyondan yoksun adenoviral vektör vererek ortamdaki IL6 ve IL-8 salınımı araştırılmış ve 24 ve 48.saatte toplanan hücrelerde salınımı tespit etmemişlerdir. Bir başka çalışmada da E1 ve E2 bölgesi çıkarılmış yine tip-5 adenovirüs ile insan meme epitel hücresi olan HB2 hücre hattı enfekte edilerek

enflamatuar ve immün yanıt yollarında aktivasyonunda rol oynayan IL-8, IL-6 ve TNF-alfa gen ekspresyon profillerine bakılmış ve enfekte edilmemiş hücelere göre bir artış gözlenmiştir (Scibetta ve ark., 2005).

Tez çalışmamızda taşıdıkları terapötik genleri dışında birbirinin aynı olan 2 farklı tip 5 replikasyon defektör adenoviral vektörün (Ad-Spike ve Ad-CD-GMCSF) inflamatuvar sitokin ifadesi üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçladık. Tasarımı Prof.Dr.Hakan Akbulut'a ait olan bu viral vektörlerin etkileri endotel hücre hattı olan HUVEC'in yanı sıra 2 ayrı tümör hücresinde (HeLa ve MCF7) test edilmiştir.

IL1-Beta'nın mRNA düzeyinde genellikle kontrole göre viral vektör verilen hücrelerde azaldığı protein düzeyinde de ortamda olmadığı görüldü. IL-6, mRNA düzeyinde CoVacHG ve Ad-CD-GMCSF vektörü verilen hücreler arasında farklılıklar saptandı.Bunun nedeni adenoviral vektörün hücreye girişinden ziyade vektörün taşıdığı terapötik genin etkisiyle oluşan farklılık olabileceği düşünülmektedir.IL8 de yine iki vektörümüz için farklı sonuçlar veren bir sitokindir. IL-8 sitokinine baktığımızda iki yönlü olduğu görülmektedir, bir yandan lökositleri ortama çekerken diğer yandan da tümörlerin malignant özelliklerini destekleyici fonksiyonları olduğu gözlenmektedir (Alfaro ve ark., 2017). IL-8 farklı hücre tiplerinde üretilse de kanser hastalarında özellikle tümör hücreleri tarafından üretildiği düşünülmektedir (Alfaro ve ark., 2017). IL-8 adına deney sonuçlarımıza baktığımızda protein düzeyinde hiç karşımıza çıkmazken gen ekspresyonları karşımıza çıkmaktadır. Sağlıklı hücre hattında 48.saatte ge ifadesi görülürken tümör hücre hattında 24.saatten itibaren çıkması tümör hücrelerinin de IL-8 üretimine katılabileceğini bize de düşündürmektedir. IL-10 sitokini, CoVacHG vektörü tümör hücre hatlarında 48.saatten sonra belirgin ifade artışı gösterdi. Ancak AD-CD-GMCSF ile enfekte edilmiş hücrelerde ifade edilmemesine karşın her iki vektörün de kullanıldığı gruplarda bant görüntüleri elde edildi. TNF-alfa protein salımı açısından malignansi hücre ve dokularda salgılandığı ve mRNA düzeyinde de stabil olmayan gen ekspresyonları ile karşılaştığı bilinmektedir (Szlosarek ve ark., 2006). Çalışmamızda, kontrol hücelere göre genellikle TNF-alfa ekspresyonunda artış gözlemlendi. Hatta çok fazla ifade edildiği durumlar vardı. İki viral vektörün uygulandığı

gruplar arasında zıt yönlü farklılıklar da gözlemlendi. TGF-Beta faktörü hem mRNA düzeyinde hem de protein seviyesinde ifade varlığı gözlemlenemedi.

Bu sonuçlara baktığımızda; gen ekspresyonlarında oluşan farklılıkları TME’de bulunan çeşitli faktörlerin gerçekleştirebileceği, bu tümör çevresinde olan faktörlerin de viral vektör etkisi dışında kanser gelişiminde rol alan sinyal yollarını aktive etmek üzere genlerin ekspresyonlarında değişiklik yapabileceği yönünde yorum yapılabilmektedir. IL-1Beta’nın TME’de bulunan birçok immün sistem hücreleri, farklı hücre tipleri tarafından salgılanan proinflamatuvar sitokin olduğu (Mercogliano ve ark., 2021) ve MAPK aktivasyonu destekleyerek de tümör gelişiminde de rol aldığı bilinmektedir (Chung ve ark., 2009) IL-1Beta bilindiği üzere anjiyogenez, metastaz gibi tümörü destekleyici rollerde yer almaktadır (Mercogliano ve ark., 2021). IL-8 de aynı şekilde tümörü teşvik edici özelliklere sahiptir (Fousek ve ark., 2020; Yuan ve ark., 2005). IL-10 için de bakacak olursak sitokinlerin üretimi inhibe ederek kanser büyümesine uygun ortamı oluşturmaktadır (Singh ve ark., 2019). TGF-Beta geninin aktive olması ile de tümör hücresinin immün sistemden kaçış yollarının kolaylaşacağı bilinmektedir (Mak ve ark., 2013). TNF-alfa, inflamasyonu başlatıcı en etkin sitokin olarak görülmektedir (Ginsberg, 1996). Hematopoetik hücrelerin sağ kalımı, çoğalması, aktivasyonu, adezyonu ve ekstrasilyonunda yer alır, sitokin üretimini destekler (Mak ve ark.,2013). IL-6’nın virüslere karşı geliştirilen immün yanıtta önemli rol oynadığı ve bir çalışmada inflamasyon destekleyici sitokinlerden daha önce gözlemlendiğini yukarıda belirtmiştik (Coussens ve ark., 2002).IL-6 olmayan ortamda telafi edici olarak öngörülen IL-1Beta ve TNF-alfa varlığı daha önceki deneylerde yorumlanmıştır (Benihoud ve ark., 2000). 72 saat inkübe edilen HeLa hücrelerinde IL-6 ifadesi ve TNF-alfa da yalnızca 24 saat inkübe edilen hücreler ile 100 MOI viral vektör verilen 72.saat hücrelerde gözlemlenmiştir. MCF7 hücrelerinde ise IL-6 ve IL-8 belirgin olmayan bir artış ve 100 MOI verilen 24 ve 48.saat hücrelerinde TNF-alfa ifadesi gözlemlenmiştir. Protein bazındaki sonuçlarımız IL-6 ve TNF-alfa adına kurulan bu ilişkiyi destekler niteliktedir. HUVEC ve HeLa hücrelerinde, MCF7 hücrelerine göre virüs enfeksiyonu ile IL-6 geni daha fazla artarken TNF-alfa proteini yalnızca MCF7 hücrelerinde saptanmıştır. Aktif olmayan formuyla TGF-Beta görülen HUVEC ve HeLa hücreleri aksine MCF7 hücrelerinde

görülmezken TNF-alfa bantları yalnızca MCF7 hücrelerinde görülmüştür. TNF-alfa'nın TGF-Beta aracılı gen veya sinyal iletim yollarını inhibe edebileceği (Kahari ve ark., 1992; Verrecchia ve ark., 2000), TGF-Beta için de TNF-alfa reseptörlerini aşağı regüle ederek TNF-alfa üretimini inhibe edebileceği yönünde yorumlar bulunmaktadır (Liu ve ark., 2022). Ortamda bulunan aktif TGF-Beta tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışına yardım ederek tümör oluşumu destekler, tedavilerde de tümöre karşı geliştirilmiş yanıtı olumsuz etkiler (Kitamura ve ark., 2007).



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışmasında yapılan EZ-PZR ve Western deneyleri sonuçlarına baktığımızda; CoVacHG aşısı vektörünün normal hücrelerde IL-1Beta, IL-6, IL-10 ve TGF-Beta'yı baskılamaktadır. Adenoviral vektörlerin özellikle immünsüpresif sitokinleri baskılaması lokal yan etkilerinin daha az olması ve enjeksiyon bölgesinde olası immün baskılanmayı azaltma potansiyeli olması bu vektörlerin aşısı olarak kullanılabilirliğini desteklemektedir. Aşıdan beklentimiz; konakçıya verilmesi ile ortamda başlayan inflamasyon sayesinde bağışıklık sistemine ait hücreler bu ortama gelerek adenoviral vektörü tanıması ve konakçının doğal bağışıklık sistemini aktive etmesi yanı sıra viral vektörün içerdiği terapötik gene ait üretilen proteinin tanıtılmak için antijen sunan hücrelere sunulup antijene özgü antikor üretilmesidir. Ad-CD-GM-CSF tedavi vektöründe de benzer etki görülmesi, bu etkilerin taşıdıkları genlerden ziyade adenoviral vektörün kendisinden kaynaklandığını düşündürmektedir.

Tümör hücre hatlarımıza baktığımızda ise aşısı ve tedavi vektörü verilmeyen kontrollerine göre inflamasyon başlangıcını destekleyen faktörlerde artış gözlenirken inflamasyonu inhibe eden faktör olan TGF-Beta için gen ekspresyonu ve protein salınımı gözlenmemiştir. İnflamasyonu inhibe edici özelliği olan IL10 ve TGF-Beta'yı baskılaması adenoviral vektörlerin kanser tedavisinde iyi bir seçim olabileceğini düşündürmektedir. İnflamasyonu başlatıcı faktörlerin ortamda olması immün sistemine ait hücrelerin o ortama gelmesi için bir sinyaldir. Ortama gelen bu hücreler kanser hücreleri ile savaşılmaktadır. Kanser hastalarındaki en büyük problem immün sistem zayıflığı sonucu tümör hücresiyle baş edememesidir. Bizim de amacımız immün sistemini uyarmak ve tedaviyi daha etkin kılmaktır. Hücre kültürü bazında bulunan sonuçların daha iyi değerlendirilmesi için *in vivo* olarak modellenmeli ve TME ortamında olan farklı hücre tipleriyle birlikte değerlendirilerek viral vektörün kanser tedavideki etkinliği araştırılmalıdır.

ÖZET

Replikasyon Defektif Tip 5 Adenoviral Vektörlerin Tümör Hücrelerinde Sitokin Gen Ekspresyonuna Etkileri

Gen tedavisi son 30 yıldır başta kanser olmak üzere birçok hastalıkta denenmiş ve son yıllarda birkaç tane ürün rutin kullanıma girmiştir. Gen tedavisinde özellikle viral vektörler sıklıkla kullanılmaktadır. Covid-19 pandemisi sürecinde adenoviral vektör tabanlı aşılar rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle aşılar da replikasyon defektif adenoviral vektörler kullanılmaktadır. Adenoviral vektörlerin enfeksiyon etkenine ait antijenler ya da kanser tedavisinde kullanılan terapötik genlerin etkileri yanı sıra vektörlerin kendilerinden kaynaklanan birtakım etkiler de söz konusu olmaktadır. Özellikle rekombinant vektörlerin immün cevaplar üzerindeki etkisi ve ayrıca inflamasyon üzerindeki etkileri çok iyi bilinmemektedir. Bu çalışma ile hücrelere AdV-5 verildiğinde immün sisteminin baskılanması ve inflamasyon gelişimine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada HUVEC (insan göbek kordonu veni endotel hücresi), HeLa (insan serviks kanseri hücre hattı) ve MCF7 (insan meme kanseri hücre hattı) hücre hatlarının replikasyon defektif AdV-5 ile enfeksiyonu sonrası immün sistemi baskılayıcı etkisi ve inflamatuvar destekleyici olan IL-1B, IL-6, IL-8, IL- 10, TNF-alfa ve TGF-Beta mRNA düzeyinde gen ekspresyonlarına ve protein ifade düzeylerine bakılarak ifade değişimleri değerlendirilmiştir.

Replikasyon defektif tip 5 adenoviral aşı ve tedavi vektörlerine karşı *in vitro* ortamda oluşan immün yanıtta görüyoruz ki inflamasyon başlatıcı genleri benzer şekilde mRNA ve protein düzeyinde ifade değişimi göstermiştir. İmmünsüpresif olan IL10 ve TGF-Beta'nın baskılanması ise bu vektörlerin aşı olarak kullanılabilirliğini desteklemekte ve adenoviral vektörlerin kanser tedavisinde iyi bir seçim olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Tip 5 adenoviral vektör, CoVacHG, Ad-CD-GMCSF, kanser gen terapi, inflamasyon, immünsüpresyon

SUMMARY

Effects of Cytokine Gene Expression of Replicative Defective Type 5 Adenoviral Vectors on Tumor Cells

Gene therapy has been tried in many diseases, especially cancer, for the last 30 years, and several products have been routinely used in recent years. In gene therapy, especially viral vectors are often used. During the Covid-19 pandemic process, adenoviral vector-based vaccines have been routinely introduced. In particular, the vaccines use replication defective adenoviral vectors. In addition to the effects of antigens or therapeutic genes used in cancer treatment of Adenoviral vectors, there are also some effects from the vectors themselves. In particular, the effects of recombinant vectors on immune responses and inflammation are not well known. This study aimed to investigate the effect of the replication-defective adenoviral vector administration on the secretion of immunosuppressive and inflammatory cytokines in normal and tumor cells.

We transduced the HUVEC (human umbilical cord and endothelial cell), HeLa (human cervical cancer cell line), and MCF7 (human breast cancer cell line) cell lines by defective AdV-5 vectors. Then we assayed the mRNA and protein expression of immune suppressive and inflammatory cytokines, including IL-1B, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-alpha, and TGF-beta by qPCR and western blotting.

In the immune response to replicative defective type 5 viral adenoviral vaccine and treatment vectors, in vitro conditions, we see that pro-inflammation genes have similarly demonstrated a change in expression at mRNA and protein levels. Furthermore, the suppression of immunosuppressive IL-10 and TGF-Beta supports the usability of those vectors as vaccines and suggests that adenoviral vectors may be a good choice in cancer treatment.

Keywords: Type 5 adenoviral vectors, CoVacHG, Ad-CD-GMCSF, cancer gene therapy, inflammation, immunosuppression

KAYNAKLAR

- AHMAD N, AMMAR A, STORR SJ, GREEN AR, RAKHA E, ELLIS IO, MARTIN SG (2018). IL-6 and IL-10 are associated with good prognosis in early stage invasive breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunotherapy*, **7**(4):537-549.
- AKBULUT H, COLERI A, SAHIN G, TANG Y, ICLI F (2019). A Bicistronic Adenoviral Vector Carrying Cytosine Deaminase and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Increases the Therapeutic Efficacy of Cancer Gene Therapy. *Human Gene Therapy*, **30**(8): 999–1007.
- AKIRA S, TAGA T, KISHIMOTO T (1993). Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol*, **54**:1-78.
- ALFARO C, SANMAMED MF, RODRÍGUEZ-RUIZ, ME, TEJEIRA Á, OÑAT C, GONZÁLEZ Á, PONZ M, SCHALPER PÉREZ-GRACIA JL, MELERO I (2017). Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up. *Cancer Treatment Reviews*, **60**: 4–31.
- ANGIONI R, SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ R, VIOLA A, MOLON B (2021). TGF- β in cancer: Metabolic driver of the tolerogenic crosstalk in the tumor microenvironment. *In Cancers* (Vol. **13**, Issue 3, pp. 1–21).
- ASHKTORAB H, SOLEIMANI A, NICHOLS A, SODHI K, LAIYEMO AO, NUNLEE-BLAND G, NOURAIIE SM, BRIM H (2018). Adiponectin, Leptin, IGF-1, and Tumor Necrosis Factor Alpha As Potential Serum Biomarkers for Non-Invasive Diagnosis of Colorectal Adenoma in African Americans. *Frontiers in Endocrinology*, 9(MAR), **12**.
- ATASHEVA S, EMERSON CC, YAO J, YOUNG C, STEWART PL, SHAYAKHMETOV DM (2020). Systemic Cancer Therapy with Engineered Adenovirus that Evades Innate Immunity. *Science Translational Medicine*, **12**(571).
- ATENCIO IA, GRACE M, BORDENS R, FRITZ M, HOROWITZ JA, HUTCHINS B, INDELICATO S, JACOBS S, KOLZ K, MANEVAL D, MUSCO ML, SHINODA J, VENOOK A, WEN S, WARREN R (2006). Biological activities of a recombinant adenovirus p53 (SCH 58500) administered by hepatic arterial infusion in a Phase 1 colorectal cancer trial. *Cancer Gene Therapy*, **13**(2): 169–181.
- BATLLE E, MASSAGUÉ J (2019). Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *In Immunity* (Vol. **50**, Issue 4, pp. 924–940).
- BENIHOUD K, SALONE B, ESSELIN S, OPOLON P, POLI V, Di GIOVINE M, PERRICAUDET M, SAGGIO I (2000). The role of IL-6 in the inflammatory and humoral response to adenoviral vectors. *J Gene Med.*, **2**(3): 194-203.
- CORTEZ VS, ULLAND TK, CERVANTES-BARRAGAN L, BANDO JK, ROBINETTE M L, WANG Q, WHITE AJ, GILFILLAN S, CELLA M, COLONNA M (2017). SMAD4 impedes the conversion of NK cells into ILC1-like cells by curtailing non-canonical TGF- β signaling. *Nature Immunology* 2017 18:9, **18**(9): 995–1003.

- COUSSENS LM, WERB Z (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, **420**: 860-7.
- DHINGRA A, HAGE E, GANZENMUELLER T, BÖTTCHER S, HOFMANN J, HAMPRECHT K, OBERMEIER P, RATH B, HAUSMANN F, DOBNER T, Heim A. *Molecular evolution of Human Adenovirus (HAdV) species C OPEN*.
- DÍ PAOLO NC, MIAO EA, IWAKURA Y, MURALI-KRISHNA K, ADEREM A, FLAVELL RA, PAPAYANNOPOULOU T, SHAYAKHMETOV DM (2009). Virus Binding to a Plasma Membrane Receptor Triggers Interleukin-1 α -Mediated Proinflammatory Macrophage Response In Vivo. *Immunity*, **31**(1): 110–121.
- ELKON KB, LIU C, GALL JG, TREVEJO J, MARINO MW, ABRAHAMSEN KA, SONG X, ZHOU JL, OLD LJ, CRYSTAL RG, FALCK-PEDERSEN E (1997). Tumor necrosis factor plays a central role in immune-mediated clearance of adenoviral vectors. *Immunology*, **94**: 9814–9819.
- ENGELHARDT JF, LITZKY L, WILSON JM (1994). Prolonged transgene expression in cotton rat lung with recombinant adenoviruses defective in E2a. *Human Gene Therapy*, **5**(10):1217-29.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (2022). Advanced therapy medicinal product
Erişim Adresi: [<https://www.ema.europa.eu/en/glossary/advanced-therapy-medicinal-product>]. Erişim Tarihi: 23/12/2022.
- FABREGAT I, FERNANDO J, MAINEZ J, SANCHO P (2014). TGF-beta signaling in cancer treatment. *Curr Pharm Des*, **20**(17):2934-47.
- FISCHER A, HACEIN-BEY-ABINA S, CAVAZZANA-CALVO M. (2011). Gene therapy for primary adaptive immune deficiencies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **127**(6):1356–1359.
- FISHER KJ, CHOI H, BURDA J, CHEN SJ, WILSON JM (1996). Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology*, **217**(1):11-22.
- FERRING PHARMACEUTICALS A/S (2022). Erişim Adresi: [<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/adstiladrin>]. Erişim Tarihi: 16/12/2022.
- GAO Y, SOUZA-FONSECA-GUIMARAES F, BALD T, NG SS, YOUNG A, NGIOW S F, RAUTELA J, STRAUBE J, WADDELL N, BLAKE SJ, YAN J, BARTHOLIN L, LEE JS, VIVIER E, TAKEDA K, MESSAOUDENE M, ZITVOGEL L, TENG MWL, BELZ, GT, SMYTH MJ (2017). Tumor immunoevasion by the conversion of effector NK cells into type 1 innate lymphoid cells. *Nature Immunology* 2017 18:9, **18**(9): 1004–1015.
- GINSBERG HS (1996). The ups and downs of adenovirus vectors. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, **73**(1): 53.
- GOSWAMI R, SUBRAMANIAN G, SILAYEVA L, NEWKIRK I, DOCTOR D, CHAWLA K, CHATTOPADHYA S, CHANDRA D, CHILUKURI N, BETAPUDI V (2019). Gene Therapy Leaves a Vicious Cycle. *Frontiers in Oncology*, **9**: 297.
- GRAHAM FL, SMILEY J, RUSSELL WC, NAIRN R (1997). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virology*, **36**(1):59-74.

- HA H, DEBNATH B, NEAMATI N (2017). Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. *Theranostics*, **7**:1543-1588.
- HAN SO, MAHATORI, SUNG YK, KIM SW (2000). Development of Biomaterials for Gene Therapy. *Molecular Therapy*, **2**(4): 302–317.
- HARDY S, KITAMURA M, HARRIS-STANSIL T, DAI Y, PHIPPS ML (1997). Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J Virol*, **71**(3):1842-9.
- HARTMAN ZC, APPLIEDORN DM, AMALFITANO A (2008). Adenovirus vector induced innate immune responses: Impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. In *Virus Research* (Vol. **132**, Issues 1–2, pp. 1–14).
- KÄHÄRÄ VM, CHEN YQ, BASHIR MM, ROSENBLOOM J, UITTO J (1992). Tumor necrosis factor-alpha down-regulates human elastin gene expression. Evidence for the role of AP-1 in the suppression of promoter activity. *J Biol Chem.*, **267**(36):26134-41.
- KITAMURA T, KOMETANI K, HASHIDA H, MATSUNAGA A, MIYOSHI H, HOSOGI H, AOKI M, OSHIMA M, HATTORI M, TAKABAYASHI A, MINATO N, TAKETO M (2007). SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1+ myeloid cells that promote invasion. *Nature Genetics*, **39**(4): 467–475.
- KOCHANNEK S, CLEMENS PR, MITANI K, CHEN HH, CHAN S, CASKEY CT (1996). A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(12): 5731.
- LEE CS, BISHOP ES, ZHANG R, YU X, FARINA EM, YAN S, ZHAO C, ZENG Z, SHU Y, WU X, LEI J, LI Y, ZHANG W, YANG C, WU K, WU Y, HO S, ATHIVIRAHAM A, LEE MJ, HE TC (2017). Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. In *Genes and Diseases* (Vol. **4**, Issue 2, pp. 43–63).
- LIU ZW, ZHANG YM, ZHANG LY, ZHOU T, LI YY, ZHOU GC, MIAO ZM, SHANG M, HE JP, DING N, LIU YQ (2022). Duality of Interactions Between TGF- β and TNF- α During Tumor Formation. *Front Immunol.*, **12**:810286.
- LUSKY M, CHRIST M, RITTNER K, DIETERLE A, DREYER D, MOUROT B, SCHULTZ H, STOECKEL F, PAVIRANI A, MEHTALI M (1998). In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol*, **72**(3):2022-32.
- LÜTSCHG V, BOUCKE K, HEMMÍ S, GREBER UF (2011). Chemotactic antiviral cytokines promote infectious apical entry of human adenovirus into polarized epithelial cells. *Nature Communications*, **2**(1).
- MACHIELS JP, SALAZAR R, ROTTEY S, DURAN I, DIRIX L, GEBOES K, WILKINSON-BLANC C, POVER G, ALVIS S, CHAMPION B, FISHER K, MCELWAIN-JOHN H, BEADLE J, CALVO E (2019). A phase 1 dose escalation study of the oncolytic adenovirus enadenotucirev, administered intravenously to patients

- with epithelial solid tumors (EVOLVE). *Journal for Immunotherapy of Cancer*, **7**(1).
- MAK TW, SAUNDERS ME, JETT BD (2014). Primer to The Immune Response: Second Edition. *Primer to The Immune Response: Second Edition*, **1**:674.
- MCGRORY WJ, BAUTISTA DS, GRAHAM FL (1988). A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology*, **163**(2):614-7.
- MERCOGLIANO MF, BRUNIS MAURO F, ELIZALDE PV, SCHILLACI R (2021). Harnessing tumor necrosis factor alpha to achieve effective cancer immunotherapy. In *Cancers* (Vol. **13**, Issue 3, pp. 1–33).
- NAYEROSSADAT N, MAEDEH T, ALI PA (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced Biomedical Research*, **1**(1): 27.
- OXFORD/ASTRAZENECA COVID-19 VACCINE EFFECTIVENESS in ENGLAND (2021). Erişim Adresi: [ClinicalTrials.gov Identifier: NCT0504782]. Erişim Tarihi:15/12/2022.
- PAPASPYRIDONOS M, MATEI I, HUAN Y., DO ROSARIO ANDRE M, BRAZIER-MITOUART , WAITE JC, CHAN AS, KALTER J, RAMOS I, WU Q, WILLIAMS C, WOLCHOK JD, CHAPMAN PB, PEINADO H, ANANDASABAPATHY N, OCEAN AJ, KAPLAN RN, GREENFIELD JP, BROMBERG J, LYDEN D (2015). Id1 suppresses anti-tumour immune responses and promotes tumour progression by impairing myeloid cell maturation. *Nature Communications*, **6**.
- PHASE I CLINICAL TRIAL WITH NEW SARS-COV-2 COVACHGMIX TYPE 5 ADENOVIRAL VECTOR VACCINE. Erişim Adresi: [ClinicalTrials.gov Identifier: NCT05526183]. Erişim Tarihi:15/12/2022.
- PRASAD S, TYAGI AK, AGGARWAL, BB (2016). Detection of inflammatory biomarkers in saliva and urine: Potential in diagnosis, prevention, and treatment for chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, **241**(8): 783–799.
- PYRILLOU K, BURZYNSKI LC, CLARKE MC (2020). Alternative Pathways of IL-1 Activation, and Its Role in Health and Disease. In *Frontiers in Immunology* (Vol. **11**). Frontiers Media S.A.
- REID T, GALANIS E, ABBRUZZESE J, SZE D, ANDREWS J, ROMEL HATFIELD M, RUBIN J, KIRN D (2001). Intra-arterial administration of a replication-selective adenovirus (dl1520) in patients with colorectal carcinoma metastatic to the liver: a phase I trial. *Gene Therapy*, **8**: 1618–1626.
- RINCÓN M, ANGUITA J, NAKAMURA T, FIKRIG E, FLAVELL RA (1997). Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med*, **185**(3):461-9.
- ROTHMAN N, SKIBOLA CF, WANG SS, MORGAN G, LAN Q, SMITH MT, SPINELLI JJ, WILLETT E, DE SANJOSE S, COCCO P, BERNDT SI, BRENNAN P, BROOKS-WILSON A, WACHOLDER S, BECKER N, HARTGE P, ZHENG T, ROMAN E, HOLLY EA, BOFFETTA P, ARMSTRONG B, COZEN W, LINET M, BOSCH FX, ENNAS MG, HOLFORD TR, GALLAGHER RP, ROLLINSON S, BRACCI PM,

- CERHAN JR, WHITBY D, MOORE PS, LEADERER B, LAI A, SPINK C, DAVIS S, BOSCH R, SCARPA A, ZHANG Y, SEVERSON RK, YEAGER M, CHANOCK S, NIETERS A (2006). Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium. *Lancet Oncol*, **7**(1):27-38.
- SANTER FR, MALINOWSKA K, CULIG Z, CAVARRETTA IT (2010). Interleukin-6 trans-signalling differentially regulates proliferation, migration, adhesion and maspin expression in human prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer*, **17**(1):241-53.
- SCHAFFER Z T, BRUGGE J S (2007). IL-6 involvement in epithelial cancers. *The Journal of Clinical Investigation*, **117**(12): 3660.
- SETHI G, SUNG B, AGGARWAL BB (2008). TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci*, **13**:5094-107.
- SHAW AR, SUZUKI M (2019). Immunology of Adenoviral Vectors in Cancer Therapy. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, **15**: 418.
- SHEIKHPOUR E, NOORBAKHS P, FOROUGHI E, FARAHNAK S, NASIRI R, NEAMATZADEH H (2018). A Survey on the Role of Interleukin-10 in Breast Cancer: A Narrative. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, **7**(1): 30.
- SHENDLER R N, BJORKDAHL O, SEGAL S, DINARELLO FIMA C A, CAGNANO E, BENHARROCH D, SONG Y X, VORONOV E, DVORKIN T (2003). Tumorigenicity Patterns and Invasiveness on β and IL-1 α Differential Effects of IL-1. *J Immunol References*, **171**: 6448–6456.
- SINGH S, KUMAR R, AGRAWAL B (2019). Adenoviral Vector-Based Vaccines and Gene Therapies: Current Status and Future Prospects. In *Adenoviruses. IntechOpen*.
- SHIRLEY JL, DE JONG YP, TERHORST C, HERZOG RW (2020). Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors. *Mol Ther.*, **28**(3):709-722.
- SONUGÜR FG, BABAHAN C, ABDİ ABGARMİ S, AKBULUT H (2022). Incubation Temperature and Period During Denarase Treatment and Microfiltration Affect the Yield of Recombinant Adenoviral Vectors During Downstream Processing. *Mol Biotechnol*, Nov **30**:1–11.
- SZETO CC, LAI FM, CHOW KM, KWAN BC, KWONG VW, LEUNG CB, LI PK (2015). Long-term outcome of biopsy-proven minimal change nephropathy in Chinese adults. *Am J Kidney Dis*, **65**(5):710-8.
- UCHINO J, CURIEL DT, UGAI H (2014). Species D human adenovirus type 9 exhibits better virus-spread ability for antitumor efficacy among alternative serotypes. *PLoS One*, **9**(2):e87342.
- VERRECCHIA F, PESSAH M, ATFI A, MAUVIEL A (2000). Tumor necrosis factor-alpha inhibits transforming growth factor-beta /Smad signaling in human dermal fibroblasts via AP-1 activation. *J Biol Chem.*, **275**(39):30226-31.
- WAN PK, RYAN AJ, SEYMOUR LW (2021). Beyond cancer cells: Targeting the tumor microenvironment with gene therapy and armed oncolytic virus. *Mol Ther*, **29**(5):1668-1682.

WANG Q, FINER M H (1996). Second-generation adenovirus vectors. *Nature Medicine*, **2**(6): 714–716.

WARSINGGIH, LIMANU F, LABEDA I, LUSIKOOY R E, MAPPINCARA, FARUK M (2021). The relationship of tumor necrosis factor alpha levels in plasma toward the stage and differentiation degree in colorectal cancer. *Medicina Clinica Practica*, **4**.

WIRTH T, PARKER N, YLÄHERTTUALA S (2013). History of gene therapy. *Gene*, **525**(2): 162–169.

WOLD WS, DORONIN K, TOTH K, KUPPUSWAMY M, LICHTENSTEIN DL, TOLLEFSON AE (1999). Immune responses to adenoviruses: viral evasion mechanisms and their implications for the clinic. *Curr Opin Immunol*, **11**(4):380-6.

WOLD WS, TOLLEFSON AE, HERMISTON TW (1995). E3 transcription unit of adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol*, **199**: 237-74.

