T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARE IL-18 VEYA CD40L GENLERİNİ TAŞIYAN REKOMBİNANT *SALMONELLA TYPHİMURİUM AROB* SUŞLARININ OLUŞTURULMASI VE GEN TEDAVİSİ VEKTÖRÜ OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Didem AYDIN

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2006

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARE IL-18 VEYA CD40L GENLERİNİ TAŞIYAN REKOMBİNANT *SALMONELLA TYPHİMURİUM AROB* SUŞLARININ OLUŞTURULMASI VE GEN TEDAVİSİ VEKTÖRÜ OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Didem AYDIN

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Dicle GÜÇ
ORTAK TEZ DANIŞMANI
Yard. Doç. Dr. Ayşen GÜNEL ÖZCAN

ANKARA
2006

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü' ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Emin Kansu Hacettepe Üniversitesi	
Danışman:	Prof. Dr. Dicle Güç Hacettepe Üniversitesi	
Üye:	Prof. Dr. Tezer Kutluk Hacettepe Üniversitesi	
Üye:	Doç. Dr. A. Lale Doğan Hacettepe Üniversitesi	
Yardımcı Danışman:	Yard. Doç. Dr. Ayşen Günel Özcan Kırıkkale Üniversitesi	

ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği' nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan S. Orer
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım sırasında benden hiçbir konuda desteğini esirgemeyen ve bilimsel anlamda bana rehber olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Dicle Güç' e ve tez izleme komitesinde görev alan, desteği ve yol göstericiliği ile bilimsel gelişimime büyük katkıda bulunan Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Emin Kansu' ya teşekkür ederim. Tez çalışmalarım süresince verdiği bilimsel destek ve yardımcı tez danışmanlığından dolayı, ayrıca Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuarı' ndan faydalanmamı ve *Salmonella typhimurium aroB* mutant suşu ve XL1-Blue *E.Coli* suşunun teminini sağladığı için Sayın Yard. Doç. Dr. Ayşen Günel Özcan' a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarıma yaptığı bilimsel katkılar ve *in vivo* deneylerimin ön çalışmaları için Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Hayvan Deneyleri Laboratuarı' nı kullanma imkanını verdiği için Sayın Prof. Dr. M. Oğuz Güç' e ve oradaki çalışmalarımdaki yardımlarından dolayı Farmakoloji Anabilim Dalı personeline teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın bir bölümünü gerçekleştirmem için University of Cambridge, Centre for Veterinary Science Laboratuarları' nda bana çalışma imkanı sağlayan Sayın Prof. Dr. Duncan J. Maskell ve Dr. Pietro Mastroeni' ye, organ diseksiyonları sırasındaki teknik yardımlarından dolayı Sayın Dr. Nathalie Menager' a, pcDNA3 vektörünü ve LB5010 *Salmonella* suşunu sağlayan Sayın Dr. Andrew J. Grant' a, HEK293 hücre hattını sağlayan Sayın Dr. Clare Bryant ve Catherine Walsh' a teşekkür ederim.

Tez izleme komitesinde yer alan Sayın Prof. Dr. Ayşegül Üner' e ve istatistik analizinde yardımcı olan Yard. Doç. Dr. Mutlu Hayran' a teşekkür ederim.

Otomatik DNA dizi analizini Ankara Üniversitesi, Hepatoloji Enstitüsü Laboratuarları' nda yapmama imkan tanıyan Sayın Prof. Dr. A. Mithat Bozdayı' ya ve DNA dizi analizi sırasındaki teknik yardımlarından ötürü Sayın Uzm. Bio. Ahmet Reşat Türkyılmaz ve Uzm. Bio. Handan Kayhan' a teşekkür ederim.

NIH/3T3 hücre hattını sağlayan Beatson Institute for Cancer Research' den Sayın Dr. Kevin Ryan' a ve bana ulaştıran Sayın Doç. Dr. A. Lale Doğan' a teşekkür ederim. Fare anti-CD3 monoklonal antikoru, Lympholyte M ve Falcon Cell Strainer hediye eden Yard. Doç. Dr. Ümit Bağrıaçık' a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında bana destek olan Temel Onkoloji Anabilim Dalı akademik, teknik ve idari personeline teşekkür ederim.

Tez çalışmamı destekleyen TÜBİTAK SBAG ve BAYG' ın değerli üyelerine ve tez basım aşamasında destek olan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi' nin değerli üyelerine teşekkür ederim.

Son olarak, sevgi, saygı ve anlayışlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili ailem ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

ÖZET

Aydın, D. Fare IL-18 veya CD40L genlerini taşıyan rekombinant *Salmonella typhimurium aroB* suşlarının oluşturulması ve gen tedavisi vektörü olarak değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2006. Zayıflatılmış *Salmonella typhimurium (ST)* suşları DNA aşılama ve gen tedavisi çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, kanser immüngen tedavisinde kullanılmak üzere fare IL-18 ve CD40L genlerini kodlayan rekombinant *STaroB* suşları oluşturuldu ve *STaroB* suşu gen tedavisi vektörü olarak ilk kez değerlendirildi. IL-18 geni lipopolisakkaridle uyarılmış fare aderan periferik kan mononükleer hücrelerinden *Reverse* Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile çoğaltıldı. Biyoaktif IL-18 proteini elde etmek amacıyla, *overlap extension* metodu ile İnterferonβ sinyal ve olgun IL-18 dizilerinden oluşan hibrid IL-18 molekülü oluşturuldu. Fare IL-18 ve CD40L genleri pTargeT memeli ekspresyon vektörüne sırasıyla T-A klonlama ve restriksiyon klonlama yöntemleriyle klonlandı. IL-18 ve CD40L genlerini taşıyan pcDNA3 memeli ekspresyon vektörleri restriksiyon klonlama ile oluşturuldu. Plazmidler *STaroB* suşuna elektroporasyon ile aktarıldı. pTargeT vektörlerinin *in vitro* stabilitesi çok düşük bulunurken pcDNA3 vektörleri çok stabil bulundu. pTargeT ve pcDNA3 vektörleri, sırasıyla NIH/3T3 fare fibroblastlarına ve HEK293 hücrelerine (insan embriyonik böbrek epitelyal hücre hattı) katyonik lipozom ve polimer kullanılarak transfekte edildi. pTargeT vektörlerinden IL-18 ve CD40L ekspresyonları sırasıyla ELISA ve immünfloresan boyama ile gösterildi. HEK293 hücrelerinde, pcDNA3 vektörlerinden IL-18 ve CD40L mRNA ekspresyonlarının RT-PZR ile belirlenmesinin ardından, pcDNA3 vektörlerini taşıyan rekombinant *STaroB* suşları inbred Balb/*c* farelere intravenöz yolla verildi. Tüm plazmid vektörlerin *in vivo* stabilitesi % 1' in altındaydı ve farelerin karaciğer ve dalaklarında IL-18 ve CD40L mRNA ekspresyonu tespit edilemedi. Tedavi edici bir heterolog geni kodlayan pTargeT veya pcDNA3 plazmidlerini taşıyan *STaroB* suşunun bir hastalık modelinde etkilerini araştırmak için plazmid vektörlerin daha kararlı hale getirilmesi gereklidir.

Anahtar Kelimeler: *Salmonella typhimurium aroB* mutantı, gen tedavisi, IL-18, CD40L, plazmid stabilitesi ve ekspresyonu.

Destekleyen Kurumlar: TÜBİTAK SBAG (proje numarası: SBAG-2493), TÜBİTAK BAYG NATO-A2 Yurt Dışı Araştırma Burs Ödülü ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (proje numarası: 06.T05.102.004).

ABSTRACT

Aydın, D. Construction of recombinant *Salmonella typhimurium aroB* strains carrying murine IL-18 or CD40L genes and evaluation as gene therapy vectors. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Tumor Biology and Immunology, Ankara, 2006. Attenuated strains of *Salmonella typhimurium* (*ST*) have being widely used in DNA vaccination and gene therapy studies. In this study, recombinant *STaroB* strains encoding murine IL-18 or CD40L genes were constructed in order to be used for cancer immunogenetherapy and *STaroB* strain was evaluated as a gene therapy vector for the first time. IL-18 gene was amplified by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) from lipopolysaccharide-induced murine adherent peripheral blood mononuclear cells. A hybrid IL-18 molecule consisting of Interferonβ signal and mature IL-18 sequences was constructed by overlap extension method in order to obtain bioactive form of the protein. Murine IL-18 or CD40L genes were cloned into pTargeT mammalian expression vector by T-A cloning and restriction cloning, respectively. pcDNA3 mammalian expression vectors carrying IL-18 or CD40L genes were constructed by restriction cloning. The plasmids were transformed into *STaroB* strain by electroporation. *In vitro* stability of pTargeT vectors was found very low, whereas pcDNA3 vectors were found highly stable. pTargeT and pcDNA3 vectors were transfected into NIH/3T3 murine fibroblasts and HEK293 cells (human embryonal kidney epithelial cell line) by using cationic liposome and polymer, respectively. IL-18 and CD40L expressions from pTargeT vectors were demonstrated by ELISA and immunoflourescence staining, respectively. After detecting the mRNA expressions of IL-18 and CD40L from pcDNA3 vectors in HEK293 cells by RT-PCR, recombinant *STaroB* strains carrying pcDNA3 vectors were administered into inbred Balb/*c* mice intravenously. *In vivo* stability of all plasmid vectors was below 1% and mRNA expressions of IL-18 and CD40L could not be detected in the livers and spleens of mice. It is necessary to obtain more stable plasmid vectors in order to investigate the effects of *STaroB* strain carrying pTargeT or pcDNA3 encoding a therapeutic heterologous gene in a disease model.

Key Words: *Salmonella typhimurium aroB* mutant, gene therapy, IL-18, CD40L, plasmid stability and expression.

Supported by TÜBİTAK SBAG (project number: SBAG-2493), TÜBİTAK BAYG NATO-A2 Research Fellowship Award and Hacettepe University Department of Scientific Research (project number: 06.T05.102.004).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xxi
TABLOLAR DİZİNİ	xxv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Gen Tedavisinde Temel Prensipler	4
2.1.1. Gen Tedavisi Yaklaşımları	5
2.1.2. Gen Transferi Yöntemleri	7
2.2. Bakteriyel Gen Tedavisi	16
2.3. Gen Tedavisi Vektörü Olarak *Salmonella*	20
2.3.1. Salmonellozis Patogenezi	22
2.3.2. Zayıflatılmış *Salmonella* Aşı Suşları	28
2.3.3. *Salmonella*-Aracılı DNA Aşılama ve Gen Tedavisi Çalışmaları	32
2.4. IL-18 Molekülü	40
2.4.1. IL-18 Molekülü, Geni, Düzenlenmesi ve Sinyal İletimi	41
2.4.2. IL-18' in Anti-tümör Etkileri ve Kanser Gen Tedavisindeki Yeri	43
2.5. CD40L (CD154) Molekülü	45
2.5.1. CD40L Molekülü, Geni, Düzenlenmesi ve Sinyal İletimi	45
2.5.2. CD40L' ın Antitümör Etkileri ve Kanser Gen Tedavisindeki Yeri	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM	53
3.1. Gereçler	53
3.1.1. Hayvanlar	53
3.1.2. Bakteriler	53
3.1.3. Memeli Ekspresyon Vektörleri	54

3.1.4. Hücre Hatları 54
3.1.5. Kimyasal Ajanlar, Reaktifler ve Çeşitli Sarf Malzemeleri 54
3.1.6. Tamponlar ve Çözeltiler 57
3.1.7. Bakteri Kültüründe Kullanılan Medya 59
3.1.8. Hücre Kültüründe Kullanılan Medya 60
3.1.9. Kitler 61
3.1.10. Monoklonal Antikorlar 61
3.1.11. Enzimler 62
3.1.12. Primerler 62
3.1.13. DNA *Ladders* 63
3.1.14. Agaroz Jel Elektroforezi 63
3.1.15. Laboratuar Cihazları 63
3.2. Yöntemler 65
3.2.1. Hibrid IL-18 DNA' sının Elde Edilmesi 65
3.2.1.1. Mononükleer Hücre Eldesi ve LPS ile Uyarılması 65
3.2.1.2. Total RNA İzolasyonu 66
3.2.1.3. PZR Amplifikasyonu İçin İlk Zincir cDNA Sentezi 66
3.2.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 67
3.2.1.5. *Overlap Extension* Yöntemi 68
3.2.2. Hibrid IL-18 DNA' sının pTargeT Vektörüne T-A Klonlama Yöntemiyle Klonlanması 70
3.2.2.1. *Low Melting Point* (LMP) Agaroz Jelden DNA İzolasyonu ve Fenol/Kloroform Ekstraksiyonu ile DNA Saflaştırması 72
3.2.2.2. Ligasyon 73
3.2.2.3. JM109 Kompetan Hücre Hazırlanması 74
3.2.2.4. Isı Şoku Transformasyonu 75
3.2.2.5. Koloni Seçimi ve Plazmid DNA İzolasyonu 75
3.2.2.6. Restriksiyon Enzim Analizi 77
3.2.3. CD40L DNA' sının pTargeT Vektörüne Restriksiyon Klonlama Yöntemiyle Klonlanması 77
3.2.3.1. Restriksiyon Enzim Analizi ile CD40L DNA' sını Taşıyan pTargeT Vektöründe *İnsert* DNA Yönünün Belirlenmesi 77

3.2.3.2. pTargeT Vektör ve *İnsert* CD40L DNA' larının Elde Edilmesi 78
3.2.3.3. Ligasyon 79
3.2.3.4. XL1-Blue Kompetan Hücre Hazırlanması 80
3.2.3.5. Isı Şoku Transformasyonu 81
3.2.3.6. Koloni Seçimi ve Plazmid DNA İzolasyonu 81
3.2.3.7. Restriksiyon Enzim Analizi 81
3.2.4. pTargeT/18 ve pTargeT/40L Vektörlerinin DNA Dizi Analizi 82
3.2.4.1. DNA Dizi Analizi PZR 82
3.2.4.2. Sodyum Asetat-Etanol Çöktürmesi ile DNA' ların Temizlenmesi 83
3.2.4.3. Otomatik DNA Dizi Analizi 83
3.2.5. pTargeT/18 ve pTargeT/40L Vektörlerinin NIH/3T3 Hücrelerine Katyonik Lipozom Aracılı Transfeksiyonu ve *İn Vitro* Ekspresyonun Gösterilmesi 83
3.2.5.1. NIH/3T3 Hücrelerinin *İn Vitro* Kültürü 84
3.2.5.2. NIH/3T3 Hücrelerinin Dondurularak Saklanması ve Çözülmesi 84
3.2.5.3. pTargeT/18 ve pTargeT/40L Plazmidlerinin TransFast Transfeksiyon Reaktifi ile NIH/3T3 Hücrelerine Transfeksiyonu 85
3.2.5.4. pTargeT/18 Transfeksiyonu Yapılan NIH/3T3 Hücrelerinde IL-18 mRNA Ekspresyonunun RT-PZR ile ve Molekülün Fonksiyonelliğinin ELISA ile Gösterilmesi 87
3.2.5.5. pTargeT/40L Transfeksiyonu Yapılan NIH/3T3 Hücrelerinde CD40L Ekspresyonunun İmmünfloresan Boyama ile Gösterilmesi 90
3.2.6. CD40L ve Hibrid IL-18 DNA' larının pcDNA3 Vektörüne Subklonlanması 90
3.2.6.1. pTargeT/18 ve pTargeT/40L DNA' larının Kimyasal Kompetan DH5α Hücrelerine Isı Şoku Transformasyonu 92
3.2.6.2. Koloni Seçimi ve Plazmid DNA İzolasyonu 92
3.2.6.3. pcDNA3 Vektör ve IL-18 ve CD40L *İnsert* DNA' larının Eldesi 93
3.2.6.4. Ligasyon 94
3.2.6.5. Isı Şoku Transformasyonu 95
3.2.6.6. Koloni Seçimi ve Plazmid DNA İzolasyonu 96

3.2.6.7. Restriksiyon Enzim Analizi 96
3.2.7. pcDNA3/18 ve pcDNA3/40L Vektörlerinin HEK293 Hücrelerine Katyonik Polimer Aracılı Transfeksiyonu ve *İn Vitro* Ekspresyonun Gösterilmesi 97
3.2.7.1. HEK293 Hücrelerinin *İn Vitro* Kültürü 97
3.2.7.2. pcDNA3/18 ve pcDNA3/40L Plazmidlerinin PolyFect Transfeksiyon Reaktifi ile HEK293 Hücrelerine Geçici Transfeksiyonu 98
3.2.7.3. pcDNA3/18 ve pcDNA3/40L Transfekte Edilmiş HEK293 Hücrelerinde IL-18 ve CD40L Ekspresyonunun RT-PZR ile Gösterilmesi 99
3.2.8. IL-18 veya CD40L Kodlayan pTargeT ve pcDNA3 Vektörlerinin LB5010 ve *STaroB Salmonella* Suşlarına Elektroporasyon ile Aktarılması 102
3.2.8.1. *Salmonella* Suşlarının Kültürü ve Çoğaltılması 102
3.2.8.2. Elektrokompetan Hücre Hazırlanması 103
3.2.8.3. Elektroporasyon 103
3.2.8.4. Plazmid DNA İzolasyonu ve Restriksiyon Enzim Analizi 104
3.2.9. Koloni Oluşturan Birim (*colony forming unit*-cfu) Sayılarının Belirlenmesi 104
3.2.10. *İn Vitro* Plazmid Stabilitesi 105
3.2.11. Rekombinant Salmonella' nın *İn Vivo* Uygulaması ve Değerlendirilmesi 105
3.2.11.1. *İn Vivo* Uygulama Öncesi Bakterilerin cfu Sayılarının Hesaplanması 105
3.2.11.2. Bakterilerin İntravenöz Uygulanması 106
3.2.11.3. Karaciğer ve Dalakta Bakteri Kolonizasyonları 106
3.2.11.4. *İn Vivo* Plazmid Stabilitesi 107
3.2.11.5. *İn Vivo* Ekspresyonun RT-PZR ile Değerlendirilmesi 107
3.2.12. Spektrofotometrik Değerlendirme 110
3.2.13. Agaroz Jel Elektroforezi 110
3.2.14. İstatistiksel Analiz 111

4. BULGULAR 112
4.1. Hibrid IL-18 DNA' sının Elde Edilmesi 112
4.1.1. IFNβ Sinyal Dizisinin Primer Dimer ve Artıklarından Ayrılması 113
4.2. Hibrid IL-18 DNA' sının pTargeT Vektörüne T-A Klonlama Yöntemiyle Klonlanması 114
4.3. CD40L DNA' sının pTargeT Vektörüne Restriksiyon Klonlama Yöntemiyle Klonlanması 115
4.4. pTargeT/18 ve pTargeT/40L Vektörlerinin DNA Dizi Analizi 117
4.5. pTargeT/18 ve pTargeT/40L Vektörlerinin NIH/3T3 Hücrelerine Katyonik Lipozom Aracılı Transfeksiyonu ve *İn Vitro* Ekspresyonun Gösterilmesi 124
4.5.1. pTargeT/18 Transfeksiyonu Yapılan NIH/3T3 Hücrelerinde RT-PZR ile IL-18 Ekspresyonunun Gösterilmesi 124
4.5.2. pTargeT/18 Transfeksiyonu Yapılan NIH/3T3 Hücrelerinde IL-18 Molekülünün Fonksiyonelliğinin ELISA ile Gösterilmesi 125
4.5.3. pTargeT/40L Transfeksiyonu Yapılan NIH/3T3 Hücrelerinde CD40L Ekspresyonunun İmmünfloresan Boyama ile Gösterilmesi 128
4.6. CD40L ve Hibrid IL-18 DNA' larının pcDNA3 Vektörüne Subklonlanması 130
4.7. pcDNA3/18 ve pcDNA3/40L Vektörlerinin HEK293 Hücrelerine Katyonik Polimer Aracılı Transfeksiyonu ve *İn Vitro* Ekspresyonun Gösterilmesi 135
4.8. IL-18 veya CD40L Kodlayan pTargeT Vektörlerinin *STaroB Salmonella* Suşuna Elektroporasyon ile Aktarılması 139
4.9. IL-18 veya CD40L Kodlayan pcDNA3 Vektörlerinin LB5010 ve *STaroB Salmonella* Suşlarına Elektroporasyon ile Aktarılması 140
4.10. *İn Vitro* Plazmid Stabilitesi 141
4.11. *İn Vivo* Uygulama Öncesi Bakterilerin cfu Sayılarının Hesaplanması 144
4.12. Rekombinant Bakterilerin İntravenöz Uygulanması 145
4.13. *İn Vivo* Kolonizasyon ve Plazmid Stabilitesi 146
4.14. *İn Vivo* Ekspresyonun RT-PZR ile Değerlendirilmesi 150

5. TARTIŞMA 165
SONUÇLAR VE ÖNERİLER 172
KAYNAKLAR 176
EKLER
EK 1. Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Kararı
EK 2. Bildiri Özetleri
EK 3. BMC (BioMed Central) Molecular Biology Journal' da Yayınlanmak Üzere Başvurusu Yapılmış Değerlendirme Aşamasındaki Tam Araştırma Makalesinin Özeti

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
aa	amino asit
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AML	Akut Miyeloid Lösemi
AMP	Adenozin monofosfat
Amp^r	Ampisilin dirençliliği
AP-1	Activating Protein-1, Aktivatör Protein-1
Asn	Asparajin
Asp	Aspartik asit
ATP	Adenozin trifosfat
BGH	Bovine Growth Hormone, Sığır Büyüme Hormonu
Bkz.	Bakınız
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMC	BioMed Central
bp	base pair, baz çifti
BSA	Bovine Serum Albumin, Sığır Serum Albumini
β-gal	β-galaktozidaz
Ca^{+2}	İki değerlikli kalsiyum iyonu
$CaCl_2$	Kalsiyum klorür
$CaCl_2.2H_2O$	Kalsiyum klorür dihidrat
cAMP	cyclicAMP, siklikAMP
CD	Cluster of Differentiation
CD	Cytosine Deaminase, Sitozin Deaminaz
CD40L	CD40 Ligand (CD154)
cDNA	complementaryDNA, komplementerDNA
CEBP-β	CCAAT Enhancer Binding Protein-β, CCAAT Enhancer Bağlayıcı Protein-β
cFLIP	cellular FLICE-inhibitory protein, hücresel FLICE-inhibitör protein
cfu	colony forming unit, koloni oluşturan birim
CH_3COONa	Sodyum asetat

CIP	Calf Intestinal Phosphatase, Buzağı İntestinal Fosfataz
Cl^-	Klor iyonu
cm	santimetre
CMV	Sitomegalovirüs
CO_2	Karbondioksit
CTP	Sitidin trifosfat
dATP	deoksiadenozin trifosfat
dCTP	deoksisitidin trifosfat
ddH_2O	doubledistilled H_2O, çift distile su
DEPC	Dietil pirokarbonat
dGTP	deoksiguanozin trifosfat
DHB	Dihidroksibenzoik asit
diğ.	diğerleri
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksid
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
dNTP	deoksinükleozid trifosfat
DOPE	L-dioleoyil fosfatidiletanolamin
DTT	Dithiothreitol, Ditiyotreitol
dTTP	deoksitimidin trifosfat
E.Coli	*Escherichia Coli*
EDTA	Etilen diamintetraasetik asit
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase, Hücre dışı sinyalle-düzenlenen kinaz
FADD	Fas Associated protein with Death Domain, Ölüm bölgesi taşıyan Fas ilişkili protein
FasL	Fas Ligand (CD95L)
FITC	Floresan İzotiyosiyanat
FLICE	FADD-like ICE, FADD-benzeri ICE
FLK-1	Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü-2

Foxp3	Forkhead box P3
Fra-1	Fos-related antigen-1, Fos-ilişkili antijen-1
g	Acceleration due to gravity, Yerçekim ivmesi (9.80665 m/s²)
g	gram
G	Guanin
G-418	Neomisin analoğu antibiyotik
GADD45β	Growth Arrest and DNA Damage 45β
gapdh	gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz
GAS	Gamma-Activated Sequence, Gama-Aktive Dizi
GAT	Gen Arttırma Tedavisi
Gln	Glutamin
Glu	Glutamik asit
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor, Granülosit/Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
GTP	Guanozin trifosfat
GTPaz	Guanozin trifosfataz
H_2O	Su
HBSag	Hepatit B virüsü yüzey antijeni
hCEA	human Carcinoembryonic Antigen, insan Karsinoembriyonik Antijeni
HCl	Hidroklorik asit
HIV	Human Immunodeficiency Virus, İnsan immün yetmezlik virüsü
HSV	Herpes Simpleks Virüs
HSV-TK	Herpes Simpleks Virüs-Timidin Kinaz
http	hypertext transfer protocol
ICE	IL-1β Converting Enzyme, IL-1β Dönüştürücü Enzim, Kaspaz-1
ICOS	Inducible costimulator, Uyarılabilir kostimülatör
IFN	İnterferon

Ig	İmmünglobulin
IGIF	IFNγ-Inducing Factor, IFNγ-Uyarıcı Faktör
IL	İnterlökin
IL-18BP	IL-18 Bağlayıcı Protein
IL-18R	IL-18 Reseptörü
IL-1R	IL-1 Reseptörü
IPTG	Izopropil-β-D-tiyogalaktopiranazid
IRAK	IL-1R-*associated kinase*, IL-1R-ilişkili kinaz
IRF-E	IFN Regulatory Factor 1 response Element, IFN Düzenleyici Faktör-1 cevap Elemanı
Ity^{R}	*Immunity to typhimurium*^{R}, ^{R} dirençli
Ity^{S}	*Immunity to typhimurium*^{S}, ^{S} duyarlı
i.v.	intravenöz
iNOS	uyarılabilir Nitrik Oksit Sentaz, inducible Nitric Oxide Synthase
kb	kilobase pair, kilobaz çifti
KCl	Potasyum klorür
kDa	kiloDalton
KLL	Kronik Lenfositik Lösemi
kV	kiloVolt
l	litre
L.monocytogenes	*Listeria monocytogenes*
LB	Luria Broth
LFA-3	Lymphocyte Function Associated Antigen-3, Lenfosit Fonksiyon İlişkili Antijen-3
LLO	Listeriyolizin-O
LMP	Low Melting Point
log	logaritma
LPS	Lipopolisakkarid
M	Molar

mAb	monoklonal antikor
MAPK	mitogen-activated protein kinase, mitojen-aktive protein kinaz
mg	miligram
Mg^{+2}	İki değerlikli magnezyum iyonu
$MgCl_2.6H_2O$	Magnezyum klorür heksahidrat
$MgSO_4$	Magnezyum sülfat
$MgSO_4.7H_2O$	Magnezyum sülfat heptahidrat
MHC	Major Histocompatibility Complex
µF	mikroFarad
µl	mikrolitre
ml	mililitre
MLV	Murine Leukemia Virus, Fare Lösemi Virüsü
mM	milimolar
$MnCl_2.4H_2O$	Mangan klorür tetrahidrat
mRNA	mesajcıRNA
ms	milisaniye
MSR	Macrophage Scavenger Receptor
MyD88	Myeloid Differentiation88, Miyeloid Diferansiyasyon 88
NaCl	Sodyum klorür
NADH	İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid, Nicotinamide Adenine Dinucleotide, reduced
NADPH	İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, reduced
$NaHCO_3$	Sodyum bikarbonat
NaOH	Sodyum hidroksit
NATO	North Atlantic Treaty Organization, Kuzey Atlantik İttifakı
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells, Aktiflenmiş T-hücrelerinin Nükleer Faktörü
NFκB	Nükleer Faktör-κB

ng	nanogram
NK	Natural Killer, Doğal Öldürücü
no	numara
Nramp1	Natural-resistance-associated macrophage protein1, Doğal-dirençlilik-ilişkili makrofaj protein1
OD	Optik Dansite
ODN	OligoDeoksiNükleotid
Ω	Ohm
ORF	Open Reading Frame, açık okunma kalıbı
ori	replikasyon başlangıcı
örn.	örneğin
P. Acnes	*Propionibacterium acnes*
PABA	Paraaminobenzoik asit
ψ	Paketleme dizisi
PBS	Phosphate Buffered Saline, Fosfatla Tamponlanmış Tuz
pg	pikogram
pH	potential of Hydrogen
Phe	Fenil alanin
PI3K	Fosfoinositid-3 Kinaz
Pro	Prolin
PMN	Polimorfonükleer
pro-IL-18	öncül IL-18 molekülü
PtdIns(3)P	Fosfatidilinositol-3-fosfat
PtdIns(3,4,5)P_3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat
PtdIns(3,5)P_2	Fosfatidilinositol-3,5-bifosfat
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Polymerase Chain Reaction (PCR)
RANKL	Receptor Activator of NFκB Ligand, NFκB Ligand' ın Reseptör Aktivatörü
rDNaz	rekombinant DNaz
RDO	RNA-DNA Oligonükleotid

RES	Retiküloendotelyal sistem
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSV	Rous Sarkom Virüsü
RT	Reverse Transkripsiyon
RT-PZR	Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S.enterica	*Salmonella enterica*
S.flexneri	*Shigella flexneri*
S.typhi	*Salmonella typhi*
S.Typhimurium	*Salmonella typhimurium*
SCV	*Salmonella*-containing vacuole, *Salmonella*-içeren vaküol
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SIGIRR	Single Immunoglobulin IL-1R-Related molecule, Tek immünglobulin IL1R-ilişkili molekül
SIV	Simian immunodeficiency virus, Simian immün yetmezlik virüsü
SPI	Salmonella Pathogenicity Island, Salmonella Patojenisite Adası
ST	*Salmonella typhimurium*
STaroB	*Salmonella typhimurium aroB* mutant suşu
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription, Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktivatörü
STL	Sitotoksik T lenfosit
SV40	Simian Virüs 40
T	Timin
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TAPET-CD	Tumor Amplified Protein Expression Therapy-Cytosine Deaminase
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCR	T Cell Receptor, T-hücre reseptörü

TE	Tris-HCl/EDTA
TFO	Triple-helix-forming oligonucleotide, üçlü heliks oluşturan oligonükleotid
Th1	Tip 1 yardımcı T-hücre
Th2	Tip 2 yardımcı T-hücre
Thr	Treonin
TIR	Toll-like reseptör-IL-1R
TK	Timidin Kinaz
TLR	Toll-like reseptör
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TRAF	TNF receptor-associated factor, TNF reseptör-ilişkili faktör
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand, TNF-İlişkili Apoptozis Uyarıcı Ligand
Trp	Triptofan
TRP2	Tyrosinase-Related Protein2, Tirozinaz-ilişkili protein2
TTP	Timidin trifosfat
TTSS	Type Three Secretion System, Tip üç sekresyon sistemi
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
TÜBİTAK BAYG	TÜBİTAK Bilim Adamı Yetiştirme Grubu
TÜBİTAK SBAG	TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu
Tyr	Tirozin
www	world wide web
X-Gal	5-bromo-4-kloro-3 indolil-β-D-galaktozid
X-SCID	X-linked Severe Combined Immune Deficiency, X' e bağlı Ağır Kombine İmmün Yetmezlik

ŞEKİLLER

Sayfa

2.1. Dünyada klinik gen tedavisi çalışmalarının hastalıklara göre dağılımı, 2006 4
2.2. Hedef hücrenin transdüksiyonu 10
2.3. Viral vektör yapımındaki genel strateji 11
2.4. Ökaryötik ekspresyon plazmidlerinin invazif bakteriden memeli hücresine transferi 19
2.5. TTSS-1 takımının yapısı 22
2.6. TTSS-1 ve TTSS-2 efektör proteinlerinin konak hücre ile etkileşimleri 23
2.7. Sistemik *Salmonella* enfeksiyonlarına karşı konak direcinin seviyeleri 28
2.8. Pre-korismat yolağında görev alan enzim ve metabolitler 31
3.1. Hibrid IL-18 DNA' sının *overlap extension* yöntemiyle elde edilmesi 69
3.2. pTargeT vektör haritası ve dizi referans noktaları 71
3.3. pTargeT vektörüne T-A klonlama stratejisi 72
3.4. pcDNA3 vektör haritası ve dizi referans noktaları 91
4.1. Hibrid IL-18 (564 bp), olgun IL-18 (493 bp) ve IFNβ sinyal (91 bp) PZR ürünlerinin %2' lik agaroz jel elektroforezi 112
4.2. Farklı primer ve dNTP konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilen IFNβ sinyal dizisi (91 bp) PZR ürünlerinin %2' lik agaroz jel elektroforezi 113
4.3. Hibrid IL-18 DNA' sının pTargeT vektörüne klonlanmasının ardından elde edilen beyaz kolonilerden birinden (3 no' lu koloni) izole edilen plazmid DNA' nın *Eco*RI restriksiyon enzim analizi 114
4.4. CD40L DNA' sı taşıyan pTargeT vektörünün restriksiyon enzim analizi 115
4.5. CD40L *insert* DNA' sının pTargeT vektörüne restriksiyon klonlanması sonucu elde edilen kolonilerden plazmid DNA izolasyonunu takiben *Bgl*II/*Sal*I restriksiyon enzim analizi 116
4.6. pTarget/18 DNA' sının *forward* primer ile otomatik dizi analizi 118

4.7. pTarget/18 DNA' sının *reverse* primer ile otomatik dizi analizi 119
4.8. pTarget/40L DNA' sının *forward* primer ile otomatik dizi analizi 120
4.9. pTarget/40L DNA' sının *reverse* primer ile otomatik dizi analizi 121
4.10. Hibrid IL-18 *insert* DNA' sının nükleotid dizisinin BLAST analizi sonrasında nükleotid-nükleotid hizalanması 122
4.11. CD40L *insert* DNA' sına ait nükleotid dizisinin BLAST analizi sonrasında nükleotid-nükleotid hizalanması 123
4.12. pTargeT/18 transfekte edilmiş hücrelerden RT-PZR sonrası %1' lik agaroz jel elektroforezi 124
4.13. Standartların düzeltilmiş optik dansite değerleri ile konsantrasyonları arasındaki lineer ilişki 126
4.14. pTargeT/18 transfekte edilmiş veya edilmemiş NIH/3T3' lere ait kültür süpernatanı ile anti-CD3 mAb ile uyarılmış fare dalak lenfositlerinin kültürü sonucu 12, 18, 24, 48 ve 72. saatlerde lenfositlerin kültür süpernatanlarındaki IFNγ düzeyleri 127
4.15. pTargeT/40L aktarılmış NIH/3T3 hücrelerinde CD40L ekspresyonunun immünfloresan boyama ile gösterilmesi 129
4.16. IL-18 *insert* DNA' sının pcDNA3 vektörüne restriksiyon klonlanması sonucu elde edilen kolonilerden plazmid DNA izolasyonunu takiben restriksiyon enzim analizi 131
4.17. CD40L *insert* DNA' sının pcDNA3 vektörüne restriksiyon klonlanması sonucu elde edilen kolonilerden plazmid DNA izolasyonunu takiben *Hind*III/*Xba*I restriksiyon enzim analizi 132
4.18. CD40L *insert* DNA' sının pcDNA3 vektörüne restriksiyon klonlanması sonucu elde edilen kolonilerden plazmid DNA izolasyonunu takiben *Sma*I restriksiyon enzim analizi 133
4.19. pcDNA3/sadece vektör taşıyan bir koloni, pcDNA3/18 taşıyan 4 no' lu koloni ile pcDNA3/40L taşıyan 7 no' lu koloninin *Eco*RI, *Sma*I ve *Hind*III/*Xba*I restriksiyon enzim analizi 134
4.20. pcDNA3/18 aktarılmış HEK293 hücrelerinde IL-18 mRNA ekspresyonunun RT-PZR ile gösterilmesi 136

4.21. pcDNA3/40L aktarılmış HEK293 hücrelerinde CD40L mRNA ekspresyonunun RT-PZR ile gösterilmesi 137

4.22. pcDNA3/18, pcDNA3/40L ve pcDNA3/sadece vektör aktarılmış HEK293 hücrelerinde *gapdh* mRNA ekspresyonunun RT-PZR ile gösterilmesi 138

4.23. *STaroB*' ye pTargeT/18 ve pTargeT/40L plazmidlerinin elektroporasyonla aktarılmasının ardından elde edilen kolonilerin restriksiyon enzim analizi 139

4.24. LB5010' a pcDNA3/sadece vektör, pcDNA3/18 ve pcDNA3/40L plazmidlerinin elektroporasyonla aktarılmasının ardından elde edilen kolonilerin *Hind*III/*Xba*I restriksiyon enzim analizi 140

4.25. *STaroB*' ye pcDNA3/sadece vektör, pcDNA3/18 ve pcDNA3/40L plazmidlerinin elektroporasyonla aktarılmasının ardından elde edilen kolonilerin *Hind*III/*Xba*I restriksiyon enzim analizi 141

4.26. pcDNA3 plazmidlerini taşıyan *STaroB* rekombinant suşlarının *in vitro* stabiliteleri 143

4.27. *STaroB*/sadece vektör rekombinant bakterisinin gece boyu kültürünün steril PBS çözeltisi içerisinde 10^{-1}' den 10^{-10}' a kadar yapılan dilüsyonlarının OD_{600} değerleri ile cfu miktarları arasındaki ilişki 144

4.28. *İn vivo* uygulanan *STaroB*-pcDNA3-sadece vektör, *STaroB*-pcDNA3/18, *STaroB*-pcDNA3/40L suşlarının gece boyu kültürlerinin plazmid stabiliteleri 146

4.29. Rekombinant *STaroB* suşları enjekte edilen inbred Balb/*c* farelerin karaciğer ve dalaklarındaki bakteri kolonizasyonları 148

4.30. Rekombinant *STaroB* suşları enjekte edilen inbred Balb/*c* farelerin karaciğer ve dalaklarındaki bakterilere ait *in vivo* plazmid stabilite yüzdeleri 149

4.31. *STaroB*-pcDNA3/18 uygulanan gruptan bir farenin (A) karaciğer ve dalağında RT-PZR ile plazmidden IL-18 mRNA ekspresyonunun araştırılması 151

4.32. *STaroB*-pcDNA3/40L uygulanan gruptan bir farenin (A) karaciğer ve dalağında RT-PZR ile plazmidden CD40L mRNA ekspresyonunun araştırılması 152

4.33. *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanan gruptan iki farenin (C ve D) karaciğer ve dalaklarında RT-PZR ile plazmidden IL-18 mRNA ekspresyonunun araştırılması 153

4.34. *STaroB*-pcDNA3/18+*STaro*B-pcDNA3/40L uygulanan gruptan iki farenin (C ve D) karaciğer ve dalaklarında RT-PZR ile plazmidden CD40L mRNA ekspresyonunun araştırılması 155

4.35. *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanan gruptaki tüm farelerin (A, B, C, D, E) karaciğer ve dalaklarında RT-PZR ile *gapdh* mRNA ekspresyonunun araştırılması 157

4.36. *STaroB*-pcDNA3/18 uygulanan gruptaki tüm farelerin (A, B, C, D, E) karaciğer ve dalaklarında RT-PZR ile *gapdh* mRNA ekspresyonunun araştırılması 159

4.37. *STaroB*-pcDNA3/40L uygulanan gruptaki tüm farelerin (A, B, C, D, E) karaciğer ve dalaklarında RT-PZR ile *gapdh* mRNA ekspresyonunun araştırılması 161

4.38. *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanan gruptaki tüm farelerin (A, B, C, D, E) karaciğer ve dalaklarında RT-PZR ile *gapdh* mRNA ekspresyonunun araştırılması 163

TABLOLAR

Sayfa

2.1. Gen transferinde kullanılan başlıca viral vektörler 12

2.2. Canlı zayıflatılmış *Salmonella* aşılarının üretiminde hedeflenen genler 29

3.1. IL-18 olgun ve IFN-β sinyal dizisinin çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri 67

3.2. IL-18 ve IFN-β sinyal dizisinin çoğaltılmasında kullanılan PZR koşulları 68

3.3. pTargeT-IL-18 ligasyon reaksiyonunda kullanılan reaktan ve miktarları 74

3.4. pTargeT-CD40L ligasyon reaksiyonunda kullanılan reaktan ve miktarları 80

3.5. DNA dizi analizi PZR' nda kullanılan reaktanlar ve PZR koşulları 82

3.6. DNA dizi analizinde kullanılan primerler 82

3.7. pTargeT vektörlerinin TransFast reaktifi ile NIH/3T3 hücrelerine transfeksiyonunda kullanılan reaktif ve DNA miktarları 86

3.8. pcDNA3 vektörüyle ligasyon reaksiyonunda kullanılan reaktan ve miktarları 95

3.9. pcDNA3 vektörlerinin restriksiyon enzim analizi sonucunda beklenen DNA büyüklükleri 96

3.10. IL-18 veya CD40L kodlayan pcDNA3 vektörlerinden IL-18 ve CD40L ekspresyonunun ve hücrelerde RNA ekspresyonunun pozitif kontrolü olarak *gapdh* ekspresyonunun RT-PZR ile belirlenmesinde kullanılan primer dizileri 102

4.1. CD40L-pTargeT restriksiyon klonlama sonucu X-Gal/IPTG/ ampisilinli LB-agar petrilerindeki beyaz koloni sayıları 117

4.2. pTargeT/18 transfekte edilmiş veya edilmemiş NIH/3T3' lere ait kültür süpernatanı ile anti-CD3 mAb ile uyarılmış fare dalak lenfositlerinin kültürü sonucu lenfositlerin kültür süpernatanlarındaki IFNγ düzeyleri 127

4.3. *STaroB*-pTargeT/18 ve *STaroB*-pTargeT/40L rekombinant suşlarının gece boyu kültürlerinin ekimi sonucu elde edilen koloni sayıları 142
4.4. pcDNA3 plazmidlerini taşıyan *STaroB* rekombinant suşlarının gece boyu kültürlerinin cfu sayıları 143
4.5. *İn vivo* uygulanan rekombinant bakteri miktarları 146
4.6. Rekombinant *STaroB* suşları enjekte edilen inbred Balb/*c* farelerin organlarındaki bakteri kolonizasyonları ve *in vivo* stabiliteleri 147

1. GİRİŞ

Tümör hücrelerine karşı immün yanıtta tip 1 yardımcı T-hücre (Th1), sitotoksik T lenfosit (STL), doğal öldürücü (*Natural Killer*-NK) hücre ve B-hücre antikor cevabı önemli rol oynar. Tümör hücreleri ise immün sistem tarafından tanınmamak ve immün sistemden kaçmak için çok çeşitli mekanizmalar geliştirirler. Tümör hücre yüzeyinde sınıf I MHC molekül ekspresyonunun azalması STL' ler tarafından tanınmalarını zorlaştırır. B-hücre, STL ve NK hücre aktivasyonuna yol açan yardımcı T-hücre cevabının oluşabilmesi için ise tümör antijenlerinin sınıf II MHC molekülleri üzerinde, kostimülatör uyarısı eşliğinde T-hücrelerine sunulması gerekmektedir. Çoğu tümörde sınıf II MHC ekspresyonu olmadığı için tümör antijenlerinin antijen sunucu hücreler tarafından T-hücrelerine çapraz sunumu gereklidir. Antijen sunucu hücreler tarafından yeterli derecede sunum yapılamazsa tümör hücrelerine özgül STL, B-hücre cevabı ve NK hücre aktivasyonu gerçekleşmez. Yapılan araştırmalar sitokin veya kostimülatör molekülleri kodlayan genlerin aktarıldığı tümör hücrelerinin ve antijen sunucu hücrelerin immünmodülatör etki oluşturulabildiğini göstermektedir.

İnterlökin-18 (IL-18), IL-12' ye benzer şekilde Th1 cevabını arttırarak tümör immünitesinde etkin rol oynayan bir sitokindir. CD40L molekülü de özellikle aktif T-hücrelerinin yüzeyinde eksprese olur ve B hücre yüzeyindeki CD40 molekülüne bağlanarak B-hücrelerinde proliferasyon, diferansiyasyon ve immünglobulin sınıf dönüşümüne yol açar. Ayrıca, CD40L antijen sunucu hücrelerin aktivasyonu için de gereklidir. Bu aktivasyon, sitokin sekresyonunda, CD80 (B7-1) ve CD86 (B7-2) gibi kostimülatör moleküllerin ekspresyonunda artışa ve dolayısıyla yardımcı T-hücre aktivasyonuna neden olur. Sonuçta STL ve NK hücrelerinin de aktiflenmesiyle etkin bir immün cevap gelişir. Çeşitli deneysel hematopoietik tümörlerde ve karsinomlarda CD40L bağlanması sonucu apoptozis ve immün cevapta artış gösterilmiş, CD40L ile başarılı immün tedavi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Sitokin veya kostimülatör moleküllerle immün tedavi amacıyla yapılan gen tedavisi çalışmaları, kanser tedavisi konusunda umut verici aşamalar

kaydetmektedir. Gen tedavisi yapılırken uygun gen taşıyıcısının seçilmesi en önemli basamaktır. Son yıllarda viral vektörlerin yan etkilerinden kaynaklanan çekinceler nedeniyle başka gen tedavisi vektörleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bakteriyel vektörler, zayıflatılmış suşlarının geliştirilmiş olması, ucuzlukları, kullanım ve hazırlama kolaylıkları, yan etki ortaya çıkması durumunda antibiyotiklerle gerekli tedavinin halihazırda uygulanabilir olması nedeniyle cazip görünmektedir. Bu amaçla en çok çalışılan bakteriyel vektörler mutant *Salmonella* suşlarıdır. *Salmonella* bakterisinin doğal hedefinin monosit-makrofaj sistemi olması, bunun yanında tümör dokusunda diğer dokulara göre daha fazla kolonize olması, tümörlere karşı sitokin ve/veya kostimülatör gen tedavisi için ideal vektörler olarak değerlendirilmelerine yol açmaktadır. Ayrıca kendisi de kostimülatör etkisi görerek immün cevapları tetiklemektedir. Ancak *Salmonella* aracılı gen tedavisinde karşılaşılan en büyük sorunlar plazmid stabilitesinin sağlanması ve *in vivo* yeterli ekspresyon elde edilmesindeki zorluklardır. Bu nedenle herhangi bir hastalık modelinde çalışma yapılmadan önce, geliştirilen bakteriyel vektörün plazmid stabilitesinin ve ekspresyon yeteneğinin değerlendirilmesi gereklidir.

Tüm bu bilgiler ışığında, bu çalışmada, hem memeli dokusunda eksprese olan IL-18 ve CD40L moleküllerinin hem de bakterinin etkisiyle anti-tümör immün cevapları uyarmak ve kanser immüngen tedavisinde kullanılmak üzere, fare IL-18 ve CD40L genlerini taşıyan metabolik zayıflatılmış *Salmonella typhimurium aroB* (*STaroB)* gen tedavisi vektörlerinin oluşturulması ve etkinliklerinin *in vivo* değerlendirilmesi amaçlandı. *Salmonella*, doğal hedefinin monosit-makrofaj sistemi olması ve tümör dokularını yüksek oranda kolonize etmesi nedeniyle vektör olarak seçildi. Doğal-tip C5 *ST* suşunun *aroB* geninde insersiyonel mutasyon oluşturularak elde edilmiş oksotrofik bir mutant olan zayıflatılmış *STaroB* suşu (1) gen tedavisi vektörü olarak ilk kez bu çalışmada değerlendirildi. IL-18 molekülü öncül bir polipeptid olarak sentezlenir ve post-translasyonel modifikasyon sonucu biyolojik olarak aktif olan olgun formuna dönüşür. IL-18’ in salınabilme yeteneğini arttırmak amacıyla olgun IL-18 cDNA dizisinin başına İnterferonβ

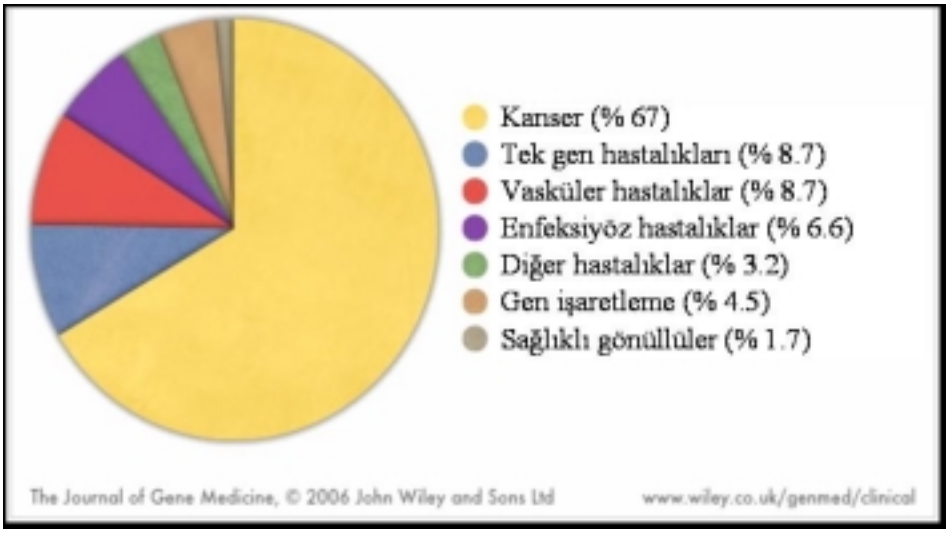
(IFNβ) sinyal dizisi eklenerek hibrid IL-18 molekülü oluşturuldu. Hibrid IL-18 ve CD40L DNA' ları iki ayrı ökaryötik ekspresyon plazmidine (pTargeT, Promega ve pcDNA3, Invitrogen) ayrı ayrı klonlandı. Oluşturulan plazmidler katyonik lipozom ve polimer kullanılarak memeli hücrelerine *in vitro* aktarıldı ve plazmidlerin IL-18 ve CD40L ekspresyonları RNA ve protein düzeyinde değerlendirildi. Ardından rekombinant plazmidler *STaroB* mutant suşuna elektroporasyonla aktarılarak gen tedavisi vektörleri oluşturuldu. Plazmidlerin rekombinant bakteriler içerisinde *in vitro* stabiliteleri değerlendirildikten sonra, IL-18 ve CD40L kodlayan pcDNA3 plazmidlerini taşıyan *STaroB* suşları inbred Balb/*c* farelere uygulanarak *in vivo* plazmid stabilitesi ve plazmid ekspresyonu araştırıldı. Bilindiği kadarıyla, pTargeT (Promega) ökaryötik ekspresyon plazmidinin kullanıldığı bir *Salmonella* gen tedavisi çalışması yoktur. Yakın zamanda yapılan bir *Salmonella* gen tedavisi çalışmasında ise pcDNA3 (Invitrogen) plazmidlerinin *Salmonella* bakterisi içinde *in vitro* stabilitesi % 80 olarak belirlenmiş ve *in vivo* immün cevap oluşturabildiği gösterilmiştir (2).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gen Tedavisinde Temel Prensipler

Bir genetik eksikliği düzeltmek veya yeni bir fonksiyon kazandırmak amacıyla fonksiyonel genetik materyalin bir kişiye aktarılmasına gen tedavisi denilmektedir (3). Verilen genetik materyal bir gen, gen segmenti veya oligonükleotid olabilir (4). Konvansiyonel tıbbi tedavinin çok özelleşmiş bir uzantısı olan gen tedavisi, hastalıkları tedavi etmek için ilaçlar yerine nükleik asitlerin uygulanması prensibine dayanır (3).

Günümüzde gen tedavisi klinik uygulamaları başlıca kanser, tek gen hastalıkları, enfeksiyöz hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar üzerine yoğunlaşmıştır (Şekil 2.1), (5). İnsan Genom Projesi insan genomunda yaklaşık 30.000 gen olduğunu ortaya koymuştur. Zaman içerisinde tüm genlerin tanımlanması ve hastalık patogenezleriyle ilişkilerinin kurulmasıyla gen tedavisi stratejilerine dayalı farmasötikler ve diğer tıbbi tedavilerin gelişimi de hızlanacaktır (3). İnsanlarda klinik etkinliğin elde edilmesiyle aseptik teknikler, anestezi, antibiyotikler, aşılar ile doku ve organ nakli gibi modern tıbbın dönüm noktaları arasında gen tedavisi de yerini alacaktır (3).



Şekil 2.1. Dünyada klinik gen tedavisi çalışmalarının hastalıklara göre dağılımı, 2006. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide [online], John Wiley and Sons Ltd, http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/ sayfasından değiştirilerek alınmıştır (5).

2.1.1. Gen Tedavisi Yaklaşımları

Bir hastalık için gen tedavisi stratejisi geliştirmede ilk ve en önemli basamak hastalıkla ilişkili genin ve temel düzenleyici bölgelerin tanımlanması ve izole edilmesidir. Daha sonraki basamaklar, yeterli genetik materyalin oluşturulması ve hastanın hücrelerine aktarılmasıdır (6). Tüm bu işlemler sırasında Hipokrat' ın öğretisi "*Primum non nocere*" yani "Öncelikle zarar verme" ilkesi her zaman akılda tutulmalıdır.

Günümüzde insan gen tedavisi, somatik hücrelerin modifikasyonuna dayalı olan somatik gen tedavisi üzerine yoğunlaşmıştır. İnsan eşey hücrelerine yönelik gen tedavisi (*germline* gen tedavisi) araştırmaları ise henüz başlangıç aşamasındadır. Somatik hücrelerin genetik olarak modifikasyonu sadece tedavi edilen hastayı etkilerken, *germline* gen tedavisinin gelecek kuşakları etkileme potansiyeli mevcuttur (7). Bu etik problem *germline* gen tedavisinin önündeki en büyük engel olup uygulanabilirliği gelecek kuşakların bu konudaki kararına bağlı olacaktır.

Somatik hücreleri genetik olarak değiştirme amacıyla iki yaklaşım söz konusudur. İlk yaklaşım hastanın vücudundan hücrelerin alınması, hücrelerin genetik olarak değiştirilmesi ve sonrasında hastaya geri verilmesi olup *ex vivo* gen tedavisi olarak adlandırılmaktadır. İkinci yaklaşım ise hücreler hastanın vücudunda doğal yerleşim yerlerinde iken genetik materyal aktarımının gerçekleştirilmesidir ve *in vivo* gen tedavisi adını almaktadır (7). *Ex vivo* veya *in vivo*, tüm gen tedavilerinin amacı tedavi edici genetik materyali hedef hücrelere başarılı bir şekilde aktarmaktır (gen transferi) (7).

Hastalığın patogenezine bağlı olarak geliştirilen farklı gen tedavisi stratejileri iki ana başlık altında incelenebilir (4).

1. Klasik gen tedavisi stratejileri: Uygun hedef hücrelere belirli genlerin aktarılması ve optimal ekspresyonun sağlanması esasına dayalıdır.

a) Gen Arttırma Tedavisi (GAT): Bir genin fonksiyon kaybı sonucu gelişen hastalıklarda, normal genin ilave bir kopyası verilerek eksik olan gen ürününün miktarı normal fenotipi sağlayacak düzeylere yükseltilir. GAT, verilecek genin hafif ekspresyon düzeylerinde bile fenotipte yeterli düzelme yaratacak otozomal resesif hastalıklarda uygulama alanı bulmaktadır.

b) Hasta hücrelerin doğrudan öldürülmesi: Bu yaklaşım kanser gen tedavilerinde sıklıkla uygulanmaktadır. Hedef hücrelere yönlendirilen genler, ekspresyonları sonucunda hücre ölümüne yol açmaktadırlar. Hasta hücrelerine ölümcül bir toksin geni (intihar geni) aktarılması veya hastaya bir ilaç verilmesini takiben toksik ürüne dönüşebilen bir ürün kodlayan ön-ilaç geninin aktarılması ile hasta hücrelerin doğrudan öldürülmesi söz konusudur. Ayrıca seçici litik virüsler (onkolitik virüsler) de kullanılmaktadır.

c) Hasta hücrelerin dolaylı öldürülmesi: Özellikle kanser gen tedavisi stratejileri arasında önemli yer bulan bu yaklaşımda, hasta hücreleri ortadan kaldırmak amacıyla immün sistem hücrelerinin uyarılması amaçlanmaktadır. Bir antijen geninin hasta hücrelere verilmesi veya bir sitokin geninin immün sistem hücrelerine veya hasta hücrelere verilmesi sonucu immün cevabın arttırılması mümkündür.

2. Klasik olmayan gen tedavisi stratejileri: Patogenezle ilişkili genlerin ekspresyonunu engellemek veya bir genetik hatayı tamir etmek ve böylece normal gen ekspresyonunu sağlamak esasına dayalıdır.

Dominant negatif etkiye yol açan kalıtsal mutasyonlarda gen arttırma tedavisi uygulamasının yeri yoktur. Bunun yerine mutasyonun düzeltilmesi gerekmektedir (4). Ayrıca fonksiyon kaybı mutasyonları sonucu gelişen hastalıklarda da; gen tamiri yapılması durumunda, tamir edilen genin hücreye dışarıdan verilen ilave bir kopya olmaması ve endojen genle aynı yerde yerleşmesi, ayrıca ekspresyon ve düzenlenme şeklinin de endojen gen ile aynı olması gen arttırma tedavisine göre büyük üstünlüklerdir (8).

Hatalı kromozomal allelin homolog rekombinasyon sonucu çift zincirli DNA ile yer değiştirmesi gen tamiri amacıyla ilk kullanılan yaklaşımdır. Ancak memeli hücrelerinde çok düşük homolog rekombinasyon oranı (yaklaşık 10^{-5}) ve aktarılan DNA' nın yüksek oranlarda non-homolog, rastgele entegrasyonu nedeniyle bu yaklaşım pratik kullanım alanı bulamamıştır. Ancak homolog rekombinasyon mekanizmaları ve kısıtlılıklarının yoğun bir şekilde çalışılması DNA tamirinin temel biyokimyasına ışık tutmuştur. Böylece küçük sentetik oligonükleotidler kullanılarak hedeflenmiş gen tamiri yaklaşımları ortaya çıkmıştır (9).

Oligonükleotidler nükleik asit dizilerini RNA veya DNA seviyesinde düzenleyebilirler. Son yıllarda RNA düzeyinde gen fonksiyonunu düzenlemede iki ana yaklaşım ön plana çıkmıştır. Birincisi RNA moleküllerini etkili bir şekilde yıkan ve kırpılma yapan tedavi edici RNA enzimleri (tedavi edici ribozimler)' dir. Tedavi edici ribozimlerin hedeflenen mutasyonları değiştirme kapasiteleri gösterilmiştir ve miyotonik distrofi, orak hücreli anemi ve over kanserinde hücre kültür sistemlerinde uygulamaları mevcuttur. Ribozimlerin uygun katlanması ve dizi içerikleri aktiviteleri açısından büyük önem taşımaktadır. İkinci yaklaşım ise kırpılma yolaklarını değiştirmek için *antisense* oligonükleotidlerin kullanılmasıdır. *Antisense* oligonükleotidler; *sense* RNA transkriptindeki yanlış kırpılma bölgelerini kapatarak kırpılma işlemini doğru kırpılma dizisine yönlendirirler (8).

DNA seviyesinde ise mutasyonları tamir etmek için üçlü heliks oluşturan oligonükleotidler (*triple-helix-forming oligonucleotides*, TFO), kimerik RNA-DNA oligonükleotidler (RDO) ve kısa değiştirilmiş tek zincirli oligodeoksinükleotidler (ODN) kullanılmaktadır. Hücre ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar tüm bu stratejilerin; mutasyonları DNA seviyesinde, DNA tamir mekanizmalarının yardımıyla onardığını göstermektedir (8, 9).

Patogenezle ilişkili genlerin ekspresyonunu DNA veya RNA seviyesinde engellemek amacıyla da *antisense* oligonükleotidler kullanılmaktadır. *Antisense* prensibi; DNA ve RNA bölgelerinin *antisense* oligonükleotidler tarafından özgül olarak tanınması ve *sense* ile komplementer *antisense* oligonükleotid zincirinin seçici bağlanması sonucu translasyonun engellenmesi mekanizmasına dayanmaktadır (10, 11). İstenmeyen gen ürünlerinin engellenmesine yönelik bir diğer yaklaşım da; hedef RNA ile komplementer diziler içeren ve katalitik bileşenleri ile hedef RNA' yı yıkan ribozimlerin kullanılmasıdır (4).

2.1.2. Gen Transferi Yöntemleri

Gen tedavisinin başarılı olabilmesi için uygun miktarda tedavi edici genin toksik bir etki oluşturmadan hedef hücrelere aktarılması gerekmektedir (12). DNA genetik bilginin fiziksel taşıyıcısıdır; gen ise kalıtımın temel birimidir

ve protein kodlayan bir DNA parçasıdır. Modern moleküler biyoloji; genleri veya gen parçalarını tanıma, çoğaltma ve DNA zincirlerini kesen ve bağlayan enzimler kullanan genetik rekombinasyon teknikleri ile genlerde değişiklikler yapmayı da mümkün kılmıştır. Ancak DNA hücre membranından kendi başına geçemez. Hedef hücrelere genetik materyali aktarmak (gen transfeksiyonu) için çok çeşitli fizikokimyasal ve biyolojik yöntem geliştirilmiştir. Gen tedavisi ile güvenilir klinik etki elde edilmesinin önündeki en büyük engel, güvenli ve etkili transfer sistemlerinin geliştirilmesidir (3).

Transfer sistemlerinde verilecek DNA parçalarının büyüklüğü sınırlıdır. Bu nedenle klasik gen tedavisi yöntemleri için yapay minigenler kullanılmaktadır. Bu minigenler, kodlanan DNA dizisinin tümünü içeren cDNA dizisi ve yüksek düzeyde ekspresyonu sağlayacak olan uygun düzenleyici DNA dizilerini (örn. güçlü bir viral promotor) içerir (4).

Kullanılan transfer sisteminin özellikleri doğrultusunda, gen transferini takiben, eksojen verilen genler kromozom dışı genetik elemanlar (epizom) olarak kalabilirler veya kromozomlara yerleşebilirler. Kromozoma yerleşen eksojen gen, hücre bölünmesini takiben tüm alt nesillerde bulunacak ve böylece uzun dönem, stabil ekspresyon sağlanacaktır. Bu nedenle genetik bir hastalık için kök hücre gen tedavisi yapılırken kromozomal entegrasyon büyük avantajdır. Ancak kromozomal entegrasyon rastgele gerçekleşmektedir. Aktarılan gen heterokromatik bir bölgeye yerleşebilir ve eksprese olmayabilir veya hücre yaşamı için önemli bir gen bölgesine yerleşir, önemli genin inaktivasyonuna ve sonuçta hücre ölümüne yol açabilir. Bu olaylar entegrasyonun gerçekleştiği tek hücre için önem taşımaktadır. En çok korkulan ise insersiyonel mutagenez sonucu kanser oluşmasıdır. Entegrasyon sonucu bir onkogen aktivasyonu veya bir tümör baskılayıcı geni veya apoptozisi uyaran bir gen inaktivasyonu gelişmesi durumunda kanser oluşması gündeme gelmektedir (4).

Transfer edilen gen kromozom dışı yerleşir ve hücreler aktif olarak bölünürse; eksojen gen alt nesil hücrelerine eşit olarak dağılmayacak ve uzun dönem ekspresyon sağlanamayacaktır. Bu nedenle gen tedavisinin tekrarlanması gerekecektir. Ancak uzun dönem, kararlı ekspresyon

gerektirmeyen durumlarda bu bir dezavantaj olmamaktadır. Örneğin kanser hücrelerinin öldürülmesine yönelik bir kanser gen tedavisi stratejisinde genin kanser hücresine transferi ve ekspresyonu sonucunda hücrenin ölümü gerçekleşecek ve tedavi edici gene artık ihtiyaç kalmayacaktır (4).

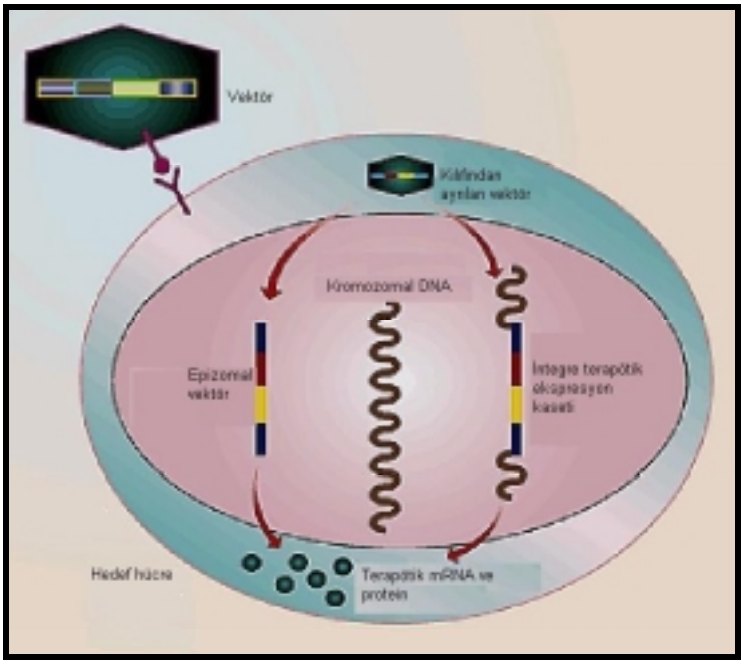
Transfeksiyon etkinliği, uygun gen transfer yönteminin seçilmesinde önemli bir kriterdir. Genetik bozukluklar gibi hastalıkların tedavisinde hücrelerin bir bölümünden uzun dönem ekspresyon yeterlidir. Ancak kanser hücrelerinin büyümesini engellemek amacıyla yapılan bir tümör baskılayıcı gen tedavisinde kanser hücrelerinin çok büyük bir bölümüne ulaşılması gereklidir ve yüksek transfeksiyon etkinliği şarttır. Gen transfer sistemi tasarlanırken dikkat edilmesi gereken bir diğer nokta da gen ekspresyonunun düzenlenmesidir. Bazı hastalıkların tedavisinde düzenlenebilir gen ekspresyonu gereklidir. Örneğin diabet hastalığında eksojen insülinin glukoz konsantrasyonundaki hızlı değişikliklerle çok sıkı bir şekilde kontrolü gerekmektedir. Bu durumda metabolik olaylara cevap veren uygun post-translasyonel işlemler gerekmektedir (12). Çeşitli anemilerde ise tetrasiklin gibi oral alınan ilaçların özgül transaktivatör üzerine düzenleyici etkisi sonucu özgül promotorun aktivasyonu ve baskılanması ile eritropoietin geninin ekspresyonunun sağlanması çalışmaları yapılmaktadır (12, 13).

Gen transferinde seçilecek yöntem, tedavinin uygulanacağı dokunun tabiatı, hastalığın patogenezi ve tedavinin *in vivo* veya *ex vivo* uygulanmasına göre değişir. Hiçbir gen transfer sistemi ideal değildir. Her birinin avantaj ve dezavantajları vardır (4). Gen transfer etkinliğinin yüksek olması, istenen hücre veya dokuda ekspresyonun sağlanması, ekspresyon süresinin istenildiği kadar olması ve toksisite, immünojenisite ve kromozomal entegrasyon gibi konularda güvenilir olması bir vektörde aranan en önemli özelliklerdir.

Gen transfer yöntemlerini viral, non-viral ve hibrid vektörler olmak üzere üç ana kategoride inceleyebiliriz.

1. Viral Vektörler: Viral vektörler, kendi viral genomlarının yerinde tedavi edici gen kaseti bulunan değiştirilmiş genoma sahip viral partiküllerdir. Rekombinant vektörün, hedef hücre içine fonksiyonel genetik bilgiyi aktarması

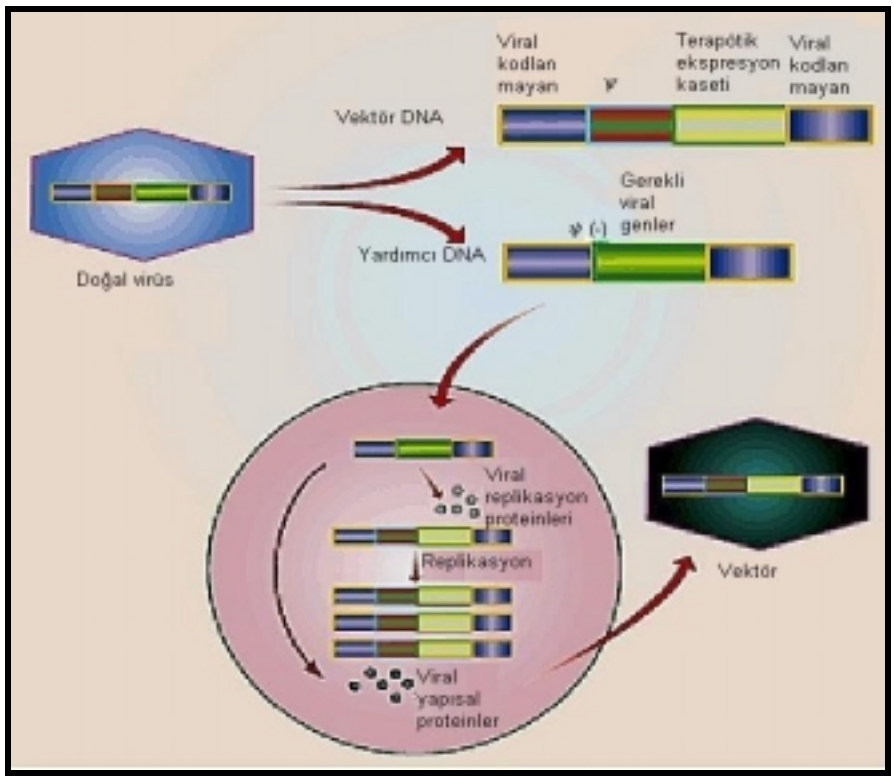
ile sonuçlanan, ancak replikasyonla sonuçlanmayan enfeksiyonuna transdüksiyon denilmektedir (Şekil 2.2), (12).



Şekil 2.2. Hedef hücrenin transdüksiyonu. Tedavi edici gen dizisini içeren vektör partikülü genellikle reseptör aracılı olarak hücreye bağlanır ve hücreye girer. Vektör genomu, çift zincirli DNA oluşumu ile sonuçlanan karmaşık işlemler sonrası vektörün tipine bağlı olarak epizomal yerleşebilir veya konak genomuna yerleşebilir. Ardından tedavi edici genin ekspresyonu gerçekleşir. Kay ve diğ. (12)' nden değiştirilerek alınmıştır.

Virüs genomu, genler ve *cis*-etkili gen düzenleyici dizilerden oluşmaktadır. Vektör oluşturulurken; virüsün kodlanan genleri ve *cis*-etkili gen düzenleyici dizileri ayrı nükleik asit molekülleri şeklinde düzenlenirler. Bu şekilde üretken viral partiküller oluşturmak üzere rekombinasyonların engellenmesi amaçlanmaktadır. Virüsün kodlanan dizileri *trans* etkilidir, böylece viral genler heterolog plazmidler olarak eksprese edilebilir ve hatta stabilitelerini sağlamak ve tekrar hareket etmelerini kısıtlamak amacıyla üretici hücrelerin kromatinlerine yerleştirilebilirler. Ardından tedavi edici gen ve ona bağlı olan viral *cis*-etkili diziler aynı hücreye konulabilir ve böylece hedef hücrelere yeni genetik bilgiyi özgül olarak kazandıracak olan ve replikasyon

yeteneği olmayan partiküllerin yapılması sağlanmış olur (Şekil 2.3). Üretim aşamasında viral genler ile *cis*-etkili dizilerin ayrılmasının sağlanması vektör sisteminin etkinliği ve güvenilirliğini belirleyen önemli bir faktördür (12).



Şekil 2.3. Viral vektör yapımındaki genel strateji. Yardımcı plazmid DNA; yardımcı virüs olarak salınabilen veya paketleme hücresinin kromozomal DNA' sına stabil olarak yerleştirilmiş olan heterolog plazmid DNA yapısında yer alan ve viral replikasyon için gerekli genleri içerir. Yardımcı DNA' nın paketleme dizisi (Ψ) yoktur ve böylece kendisi veya RNA' sı viral partikül içine paketlenemez. Vektör DNA' sı paketleme dizisi de dahil olmak üzere kodlanmayan viral *cis*-etkili elemanlar ile tedavi edici ekspresyon kasetini içerir. Vektör DNA' sının replikasyonu için gerekli viral proteinler yapılır ve vektör genomunun (vektörün tipine bağlı olarak RNA veya DNA) pek çok kopyası üretilir. Viral yapısal proteinler Ψ (+) olan vektörü tanır, ancak Ψ (-) olan yardımcı nükleik asidi tanımaz ve sonuçta sadece vektör genomu bir partikül içine paketlenir. Kay ve diğ. (12)' nden değiştirilerek alınmıştır.

Hedef doku veya hücreye özgül transgen ekspresyonunun sağlanması gen tedavisinin etkinliği ve yan etkileri açısından büyük önem taşımaktadır. Transgenin hedeflenen dokudan ekspresyonunu sağlayabilmek için dokuya özgül promotorların kullanılması veya rekombinant viral partiküllerinin yüzey tanıma elemanlarının değiştirilerek (*pseudotyping*) hücre tanıma özelliklerinin değiştirilmesi günümüzde kullanılan yöntemlerdir (12).

En sık kullanılan viral vektörler ve özellikleri Tablo 2.1' de özetlenmiştir (14).

Tablo 2.1. Gen transferinde kullanılan başlıca viral vektörler. Lundstrom (14)' dan değiştirilerek alınmıştır.

Vektör	Paketleme kapasitesi	Konak hücre çeşitliliği	Özellikleri
Adeno asosiye virüs (AAV)	Düşük, <4 kb	Geniş, bölünen ve bölünmeyen hücreler	Ekspresyonun başlaması yavaş, genom entegrasyonu (+/-), uzun dönem ekspresyon, verimsiz geniş ölçekli virüs üretimi
Adenovirüs	Orta, <7.5 kb	Geniş, nöronlara düşük transdüksiyon	Geçici ekspresyon, yüksek immünojenisite
Herpes Simpleks Virüs (HSV)	Yüksek, >30 kb	Geniş, nöronlar, kök hücreler, kas hücreleri	Latent enfeksiyon, uzun dönem ekspresyon, düşük toksisite (mutantları)
Lentivirüs	Orta, 8 kb	Geniş, bölünen ve bölünmeyen hücreler	Genom entegrasyonu, uzun dönem ekspresyon, güvenlik problemleri, verimsiz üretim
Retrovirüs	Orta, 8 kb	Kısıtlı, sadece bölünen hücreler	Genom entegrasyonu, uzun dönem ekspresyon

Viral gen transfer vektörleri ile en sık karşılaşılan problemler yabancı madde infüzyonu sonucu gelişen akut toksisite, transdükte hücrelere karşı hücresel immün cevap, tedavi edici gen ürününe karşı hümoral immün cevap ve kromozoma yerleşen vektörlerin insersiyonel mutagenez olasılığıdır (12).

Viral vektörler kullanılarak yapılan gen tedavisi klinik çalışmalarında iki vektörle yaşanan deneyimler güvenlik konularında çok daha dikkatli olunması ve vektör tasarlanması aşamalarındaki temel araştırmaların üzerine daha çok yoğunlaşılması gerekliliğini ortaya koymuştur. Doğal adenovirüs enfeksiyonunu takiben ağır bir hastalık riskinin nadir olması ve viral genomun konak kromozomlarına nadiren yerleşmesi adenoviral aracılı gen tedavisinin göreceli olarak güvenli bir yöntem olarak kabul edilmesine yol açmıştır. Ancak

1999 yılında kısmi ornitin transkarbomilaz eksikliği nedeniyle adenoviral vektör gen tedavisi uygulanan 18 yaşında bir erkek hasta, vektörün yol açtığı enfeksiyon sonucunda ölmüştür. Rekombinant adenoviral vektörler özellikle duyarlı kişilerde doğal formlarından daha farklı bir davranış sergileyebilmektedir. Bu çıkarım aslında diğer tüm virüs temelli vektör sistemleri için de dikkate alınmalıdır (7). Kısa bir süre önce ise X' e bağlı ağır kombine immün yetmezlik hastalığı (*X-linked Severe Combined Immune Deficiency*, X-SCID) nedeniyle retroviral vektörle gen tedavisi yapılan üç çocukta lösemi geliştiği bildirilmiştir (15). İki hastada retroviral vektörün *lmo2* onkogenine yerleştiği gösterilmiştir (16). Kullanılan retroviral vektörün neden aynı geni hedeflediği bilinmemekle birlikte, bu olay CD34(+) kök hücrelerine retroviral entegrasyon sonucu lökomojeneze katılabilen gen sayısının aslında düşük olduğunu gösterebilir (17). Wu ve diğ., Fare Lösemi Virüsü (*Murine Leukemia Virus*, MLV) vektörünün, insan hücrelerinde, tercihen aktif genlerin transkripsiyon başlangıç bölgelerinin iki ucundan birinin bir kaç kilo baz çifti içerisine yerleştiğini göstermişlerdir (18).

2. Non-viral vektörler: Viral vektör sistemlerinin paketleme hücre hatlarına ihtiyaç duymaları, güvenilirlik, toksisite, immün cevap oluşturma problemleri, hücre hedeflemedeki sorunları, dolaşımdan hızlı bir şekilde temizlenmeleri, kromozomal entegrasyona yol açan türleri ve rekombinasyon sonucu replikasyon yeteneğine sahip virüs oluşturma riskleri non-viral vektör sistemlerinin geliştirilmesi konusunda itici güç olmuştur (19).

Non-viral taşıyıcıların viral vektörlere üstünlükleri şöyle özetlenebilir:

1. Hazırlanmaları kolaydır,
2. Daha büyük DNA transferine olanak tanırlar,
3. Genel olarak *in vivo* daha güvenlidirler,
4. Özgül immün cevap oluşturmazlar, bu nedenle tekrarlayan defalar verilebilirler.

Ancak özellikle *in vivo* kullanıldıklarında; DNA' yı transfer etmede ve gen ekspresyonunu başlatmada etkileri daha zayıftır. Bu nedenle klinik çalışma aşamasına ulaşmış az sayıda non-viral vektör vardır. Non-viral vektör sistemleri sadece plazmid temelli ekspresyon kaseti (çıplak DNA) veya bir

sentetik amfipatik DNA-kompleksleyici ajanla hazırlanmış çıplak DNA' dan oluşurlar (19).

Fiziksel yöntemler: Fiziksel yöntemler kullanılarak çıplak DNA, endozom ve lizozomların enzimatik degradasyonuna maruz kalmadan doğrudan sitoplazmaya verilir (19).

1. Çıplak DNA' nın doğrudan enjeksiyonu: Gen tedavisinde günümüzde kullanılan en basit non-viral sistem lokal olarak dokulara veya sistemik dolaşıma çıplak plazmid DNA' nın enjeksiyonudur. Ancak sistemik dolaşımda, çıplak DNA nükleazlar tarafından hızla yıkılır ve mononükleer-fagosit sistemi tarafından temizlenir. Buna ek olarak dokuya doğrudan enjekte edilen DNA, hızla lenfatiklere drene olur ve hücre dışı boşluktaki endonükleazlar 30 dakika içinde DNA' yı yıkarlar. Ancak, farelerde yüksek hacimli enjeksiyonun iç organlara etkili gen transferini uyarabildiği gösterilmiştir. Muhtemelen hidrodinamik ve hidrostatik basınç DNA' nın hücrelere verilmesinde en büyük itici güçtür. Sitokin geni eksprese eden çıplak plazmid DNA' nın basit intramusküler enjeksiyonu kanser gen tedavisi çalışmalarında kullanılan bir yöntemdir (19).

2. Elektroporasyon: Elektrik alanı yaratarak hücre membranında geçici porlar oluşturulması ve çevrede bulunan DNA moleküllerinin bu porlardan sitoplazmaya geçmesi prensibine dayanır. *İn vitro* olarak çok iyi geliştirilmiş bir tekniktir, miyopati gen tedavisi ve aşılama amaçlı *in vivo* uygulamaları da çalışılmaktadır (19).

3. Partikül Bombardımanı: Altın partikülleri üzerine kaplanmış çıplak DNA, gen tabancası kullanılarak hedef doku veya hücrelere gönderilmektedir. Bu teknikle DNA doğrudan hücre nükleusuna gitmektedir. Deri, karaciğer ve kas hücrelerinin başarılı bir şekilde transfekte edildiği bildirilmiştir. Gen tabancasının *in vivo* uygulamaları gen ürününün kısa dönem ve düşük düzeyde ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır, ancak genetik aşılama için uygun bir teknik olabilir (19).

Kimyasal yöntemler: Eksojen genlerin somatik hücrelere verilmesinde kullanılan en eski kimyasal yöntemler arasında kalsiyum fosfat presipitasyonu

ve dietilaminodekstran yer almaktadır. Ancak bu sistemler artık *in vivo* gen transferinde kullanılmamaktadır (19).

Lipozomlar, biyolojik membran yapısını taklit eden sentetik lipid çift tabakadan oluşan küresel veziküllerdir. Transfer edilecek DNA lipozomla *in vitro* paketlenir ve DNA' yı uygun bir hedef dokuya doğrudan aktarmak üzere *in vivo* kullanılır. Lipid kaplama, DNA' nın *in vivo* yıkılmamasını, hücrelere bağlanmasını ve endositozla hücre içine alınmasını sağlar (4). Katyonik lipozomlar üstünde en çok çalışılan non-viral vektörlerdir. Katyonik lipozomların (katyonik lipopleksler) pozitif yükü negatif yüklü DNA' nın bağlanmasını sağlar. Hazırlanmaları kolay ve ucuzdur, transfer edebildikleri DNA' nın büyüklüğü sınırsızdır. Ancak gen transfer etkinlikleri düşüktür, *in vitro* etkin transfeksiyon ajanları olmalarına rağmen sistemik uygulamada verimli değillerdir (19).

Katyonik lipidler gibi katyonik polimerler de negatif yüklü DNA ile elektrostatik kompleksler (polipleksler) oluşturabilirler. Bunların arasında poli-L-Lizin' den türetilenler ve polietilenimin, poliamidoamin ve polimetakrilat dendrimerleri sayılabilir (19).

Başarılı bir transfeksiyon için plazmidin nükleusa taşınması gereklidir. Polipleks ve lipopleksler endositozla hücre içine alınır, endozomdan kaçış sonrası nükleusa taşınırlar. Endozomdan kaçışlarına yardımcı olmak için non-viral vektörlere füzyonu sağlayıcı lipidler veya peptidler yerleştirilebilir (19). Gen transferinin hedeflenmesi amacıyla hücre hedefleyici ligandlar kullanılarak katyonik gen taşıyıcıları değiştirilebilirler. Bu ligandlar arasında insülin, galaktoz, hepatositler için sialinsiz glukoproteinler, T-hücreler için anti-CD3 ve anti-CD5 antikorları, bazı kanser hücreleri için transferrin sayılabilir (19).

3. Hibrid vektörler: Hibrid vektörler; katyonik temelli vektör sistemleri (non-viral) ile virüsler veya viral peptidlerin bir araya geldiği transfer sistemleridir. Sentetik vektörlerin etkinliği, yapay nükleik asit taşıyıcılarına virüsleri taklit eden fonksiyonel elemanlar eklenerek arttırılabilir. Örneğin, adenovirüs hekzon proteini, polietilenimin-plazmid DNA vektörlerinin nükleusa taşınmasını ve transgen ekspresyonunu arttırır. Retrovirüslerin lipid yapısına

benzer yapay viral zarflar, plazmid DNA' nın kaplanmasında kullanılabilir. Adenovirüs penton proteini; lipopleks veya poliplekslerin endozomdan kaçışını arttırabilmek amacıyla füzyonu sağlayıcı ajanlar olarak kullanılabilir (19).

2.2. Bakteriyel Gen Tedavisi

Ökaryötik ekspresyon plazmidlerinin bakteriden ökaryötik konak hücrelerine doğrudan transferi 1980 yılında Schaffner tarafından gösterilmiştir (20). Rekombinant plazmid DNA taşıyan *Escherichia coli (E.Coli)* hücrelerinin memeli hücrelerini enfekte edebildiği ve gen transferinin DNaz I uygulamasına dirençli olduğu, buna bağlı olarak da serbest DNA aracılı olmadığı gösterilmiştir. Gen transferinin çok yüksek ihtimalle bakterinin tümünün hücre içine alınması ile gerçekleştiği düşünülmüştür. Bakterinin kalsiyum fosfat presipitasyonu şeklinde eklenmesi veya polietilen glikol varlığında protoplastlar ile memeli hücrelerinin füzyonu ile transfer sıklığının arttığı da aynı çalışmada gösterilmiştir. Gram-negatif ve gram-pozitif bakteriler arasında (21, 22) ve bakteriden mayalara plazmid transferi (23) daha önce gösterilmiştir. Bitkilere bakteri aracılı gen transferi de rekombinant bitkilerin üretiminde standart yöntem olarak çok iyi bilinmekte ve kullanılmaktadır (24). Son yıllarda, bakterilerden memeli hücrelerine başarılı gen transferi çalışmalarının gösterilmesi bakterilerin bir gen tedavisi vektörü olarak kullanılmalarının önünü açmıştır (25, 26). Bakteriyel vektörler, kolay hazırlanma ve saklanmaları, ayrıca taşıyabildikleri ve aktarabildikleri DNA miktarının fazlalığı nedeniyle memeli hücrelerine gen transferinde avantaj sağlamaktadırlar.

Bakteri aracılı gen transferi, taşıyıcı bakterinin hedef hücreleri invazyonu, fagositik vaküolden kaçışı ve metabolik bir zayıflatılma (oksotrofi) veya antibiyotikle tedavisi sonucu lizisi prensibine dayanır. Ardından plazmidler serbestleşmekte ve konak hücrenin nükleusuna taşınmaktadır. Böylece ökaryötik ekspresyon plazmidi tarafından kodlanan proteinin ekspresyonu sağlanmaktadır. *Salmonella typhimurium (S.typhimurium)* bu açıdan diğer bakterilerden farklı bir özelliğe sahiptir. Bakteri fagositik vezikül içinde kalmaktadır ve plazmid DNA, veziküler membrandan geçerek

serbestleşmektedir. İnvazif bakteriyel DNA vektörleri, kalıtsal virülans mekanizmaları ve/veya metabolik tercihleri nedeniyle özgül hücre veya dokuları hedefleyebilmektedirler. Örneğin, *S.typhimurium* farede oral alınmasının ardından özgül olarak intestinal mukozadaki makrofaj ve dendritik hücreleri enfekte etmektedir (27, 28).

Bakteri aracılı ekspresyon vektörlerinin uygulama alanları genetik aşılama, gen tedavisi ve tedavi edici proteinlerin üretilmesi şeklinde üçe ayrılarak incelenebilir (26). Plazmidlerin intramusküler, intradermal veya oral uygulanması yoluyla yapılan genetik aşılama, antijen modifikasyonu ve immünmodülasyon imkanını da sağlayarak memeli konakta antijen ekspresyonuna yol açmaktadır. Fakat genetik aşılamada en büyük problem düşük etkinliktir. Bakterilerin taşıyıcı olarak kullanılması ile DNA aşılarının mukozal uygulamaları, çıplak DNA aşılamasından daha etkin sonuçlar elde edilmesini sağlarken, adjuvan etki ve immün sistemin uyarıcı hücrelerinin hedeflenmesi de ek faydalar sağlamaktadır.

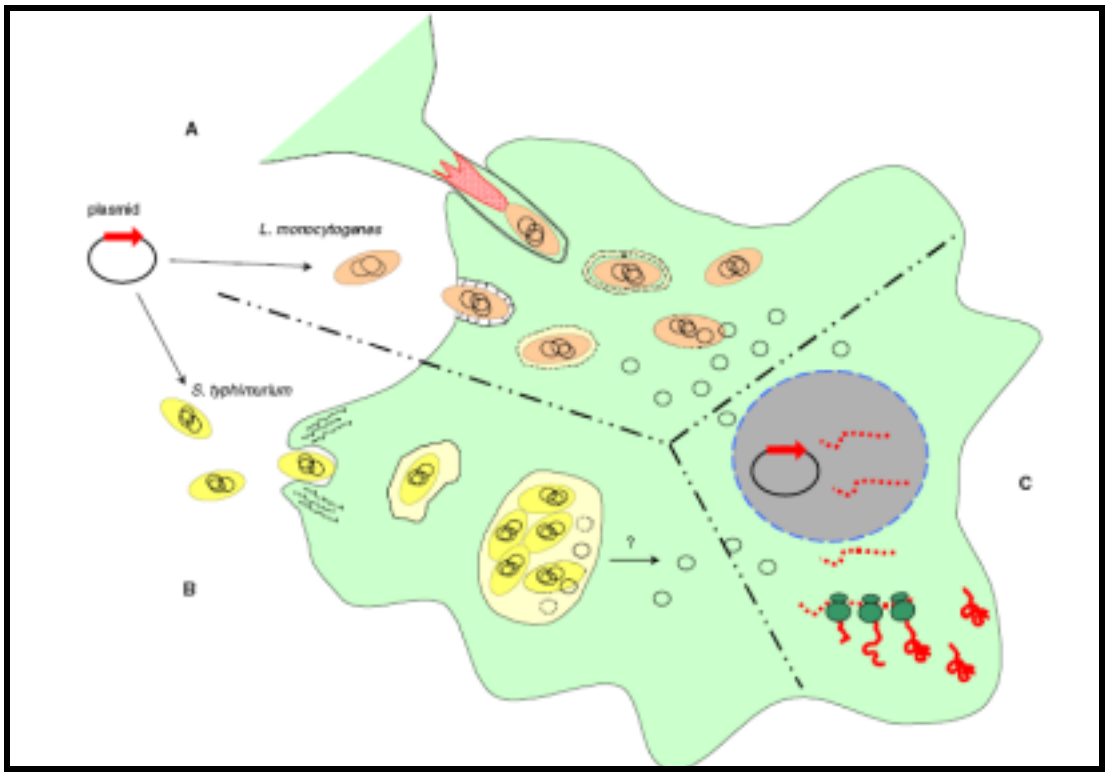
Gen tedavisi çalışmalarında ise *in vivo* olarak hedef hücrelerde transgen ekspresyonunu sağlayan, bunun yanında istenmeyen etkilere ve vektöre özgü immün cevaplara yol açmayan etkin vektörlere ihtiyaç vardır. Bakteri aracılı gen transferi, sıklıkla kullanılan ve replikasyon yeteneği olmayan vektörler yerine kullanılabilecek iyi bir seçenektir. Doku yönelimi ve hücreden hücreye yayılma özellikleri sayesinde replikasyon yeteneği olmayan vektörlerin ulaşamadığı doku tabakalarına bakteriler aracılığı ile gen transferi yapmak mümkündür. Bakteriyel plazmidlerin geniş kodlama kapasiteleri büyük genomik parçaların transferini sağlarken, uygun rekombinant bakteriyel taşıyıcılar ile homolog rekombinasyon da mümkün olabilmektedir. Dolayısıyla tek gen hastalıklarının tedavisi amacıyla, bakterilerin etkili transfer araçları olarak geliştirilmeleri hedeflenmektedir.

Diğer bir potansiyel uygulama alanı olarak da tedavi edici proteinlerin üretilmesi söylenebilir. Özellikle *Salmonella* bakterisinin tümör hedefleyici bir ajan olarak (29) gösterilmesinin ardından immün sistemi tetikleyici görevler üstlenen proteinlerin ekspresyonlarının sağlanması kanser immün tedavisinde yeni bir umut doğurmuştur. Bununla birlikte otoimmün kaynaklı hastalıklarda

immün cevapları düzenleme amacıyla bakteri aracılı immünmodülatör transgen aktarımı çalışmaları da yapılmaktadır (30).

Konak hücreler içerisinde bakterinin ölümünün ardından gerçekleşen, invazif hücre içi bakteriler aracılığı ile plazmid DNA transferi çalışmaları ilk olarak *Shigella flexneri (S.flexneri)* (31, 32), invazif *E.Coli* (32) ve *S.typhimurium* (33) suşları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enfeksiyöz hastalıklar, tümörler ve gen eksikliklerine müdahale amacıyla, plazmid DNA transferinde başarılı olarak kullanılan bakteriyel taşıyıcı suşları gün geçtikçe çoğalmaktadır. Günümüzde *Salmonella enterica* türleri, *S.flexneri*, *E.Coli* ve *Listeria monocytogenes (L.monocytogenes)* bakterilerinden köken alan çok sayıda zayıflatılmış suş kullanılmaktadır. Zayıflatılma, ökaryotik hücrede bulunmayan, bakteri için esansiyel olan ve dışarıdan tamamlanamayan amino asitlerin veya hücre duvarı bileşenlerinin metabolizmasında kusurlu olan mutantların oluşturulması ile sağlanmaktadır (31-33). Bakteriyel vektörlerin, canlı ve replikasyon yeteneğine sahip bakterilerin oluşması riskine karşılık, uygulanan zayıflatılma ve beraberinde sıklıkla kullanılan antibiyotiklere hassasiyetleri gen aktarılmasında önemli bir kontrol noktasını oluşturmaktadır.

Bakteriyel vektörün hücre içi yaşam biçimine ve konak hücre tipine bağlı olarak plazmid DNA' nın konak hücre nükleusuna taşınması ve sonuçta protein ekspresyonuna yol açan olaylar farklılık göstermektedir (Şekil 2.4), (25).



Şekil 2.4. Ökaryötik ekspresyon plazmidlerinin invazif bakteriden memeli hücresine transferi. A. Sitozolde replike olan bakteriler: *L. monocytogenes* gibi bakteriler konak hücreyi invazyonun ardından vaküol lizisine yol açarak sitozole geçerler. Sitozolde oksotrofi, otolizin ekspresyonu veya antibiyotik muamelesi sonucu ölürler ve lizisleri sonucu ekspresyon plazmidleri serbestleşir. Serbestleşen plazmidlerin bir kısmı nükleusa gider. B. Fagozom yerleşimli hücre içi bakteriler: *S.typhimurium* hücre içine girişini ve fagozomal vaküol oluşumunu aktif olarak uyarır. Metabolik zayıflatılma sonucu bakteri, fagozom içerisinde ölür ve ekspresyon plazmidleri serbestleşir. Bilinmeyen bir mekanizmayla bu plazmidler veziküler membranı geçer ve nükleusa ulaşır. C. Plazmid tarafından kodlanan proteinlerin ekspresyonu, nükleusa ulaşan plazmid kopya sayısı ve kullanılan ökaryötik ekspresyon sistemine bağlıdır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda güçlü yapısal ökaryötik promotorlar kullanılmıştır. Loessner ve Weiss (25)' dan değiştirilerek alınmıştır.

Makrofajlar ve dendritik hücreler gibi profesyonel antijen sunucu hücreler hedeflendiğinde bakterinin hücre içine alınması fagositozla gerçekleşmektedir. Ancak fagositoz yapmayan hücreler için farklı mekanizmalar mevcuttur (34). Sitozolde replike olan *Listeria* ve *Shigella* bakterileri, sitozoldeki lizislerinin ardından DNA transferini gerçekleştirmektedir. İlk invazyonları sırasında, *L.monocytogenes* yüzeyindeki internalin proteininin, memeli hücre yüzeyindeki reseptörü E-kaderin ile temasının ardından, bakterinin hücre içine fermuar benzeri alımı gerçekleşmektedir (35, 36). Geç dönemde hücre içinde replike olan bakteri aktin-temelli harekete bağlı olarak protrüzyonlar ve invajinasyonlar aracılığıyla komşu hücrelere yayılır. *Listeria'* nın etkin bir şekilde plazmidi transfer edebilmesi için fagozomdan kaçışı şarttır (37). Bu nedenle *Listeria'* nın hücre içine girmesini takiben *L.monocytogenes* hemolizini olan listeriyolizin-O (LLO) salıverilir ve LLO tarafından fagositik vaküolün lizisi gerçekleşir (38). *Salmonella* ve invazif *E.Coli* suşları ise fagositik vaküol içerisinde kalırlar ve sitozole doğrudan geçemezler. *Salmonella*, hücre içerisine alınmasını sağlamak amacıyla, hücre içi sinyal yolaklarını ve aktin hücre-iskeletini harekete geçiren invazif proteinlerini hücre içine salıveren sekresyon sistemlerine sahiptir (39). Aktinden zengin membran katlanması sonucu pinositoz ile hücre içine alınan bakteri vaküol içerisinden kaçamaz ve zayıflatılma nedeniyle ölür, ve plazmid DNA bu şekilde vaküol içinde serbestleşmiş olur. Günümüz bilgilerine göre plazmid DNA' nın sitozole ve konak hücre nükleusuna nasıl ulaştığına dair mekanizmalar bilinmemektedir ve litik bakteriden salınan DNA' nın fagozom içerisinde nükleaz degradasyonuna uğramasının DNA transfer etkinliğini düşürebileceği düşünülmektedir (25).

2.3. Gen Tedavisi Vektörü Olarak *Salmonella*

Salmonellae, *Enterobacteriaceae* ailesine ait Gram-negatif, fakültatif anaerob, hareketli, laktoz fermente etmeyen basillerdir. *Salmonella*, insanları ve hayvanları genellikle oro-fekal yolla enfekte eder. Mikroorganizmalar lağım sularında, denizde ve nehirlerde sıklıkla bulunabilir ve çok çeşitli türde yiyeceği kontamine edebilir. *Salmonella*, inek, tavuk, hindi, koyun, domuz,

köpek, kedi, at, eşek, fok, kertenkele ve yılan gibi pek çok hayvan türünden izole edilmiştir (40). Bazı *Salmonella* türleri bir veya bir kaç hayvan türüne özgü iken diğerlerinin konak çeşitliliği daha fazladır (40, 41).

İnsanda yol açtıkları hastalıklar açısından bakıldığında, *Salmonella* serotipleri üç gruba ayrılabilir; tifo, bakteriyemi ve enterite yol açan serotipler. Hayvan modelleri, tifo ve enterit gelişiminde önemli rol oynayan *Salmonella* serotiplerinin virülans mekanizmalarını çalışmak için sıklıkla kullanılmaktadır. İnsanlarda, hasta ve gönüllülerin semptomları primat modellerinde gözlenen hastalık belirtilerine çok benzemektedir, ancak yüksek maliyetleri ve az bulunmalarından dolayı bu modellerin yaygın kullanımı yoktur. Bu nedenle çalışmalar virülans mekanizmalarının en başarılı şekilde açıklanabildiği fare ve buzağılar üzerine yoğunlaşmıştır. Tifo, *Salmonella enterica (S.enterica) typhi*, *paratyphi A*, *paratyphi B* ve *paratyphi C* serotipleri tarafından insanlarda oluşturulan sistemik bir enfeksiyondur. Bakteriyemi, insanda en az rastlanan klinik sendromdur, *S.enterica choleraesuis* ve *S.enterica Dublin* serotipleri tarafından oluşturulur. 2500' den fazla *Salmonella* serotipi ise enterite yol açmaktadır, ancak *S.enterica typhimurium* ve *enteritidis* en sık karşılaşılanlarıdır (42).

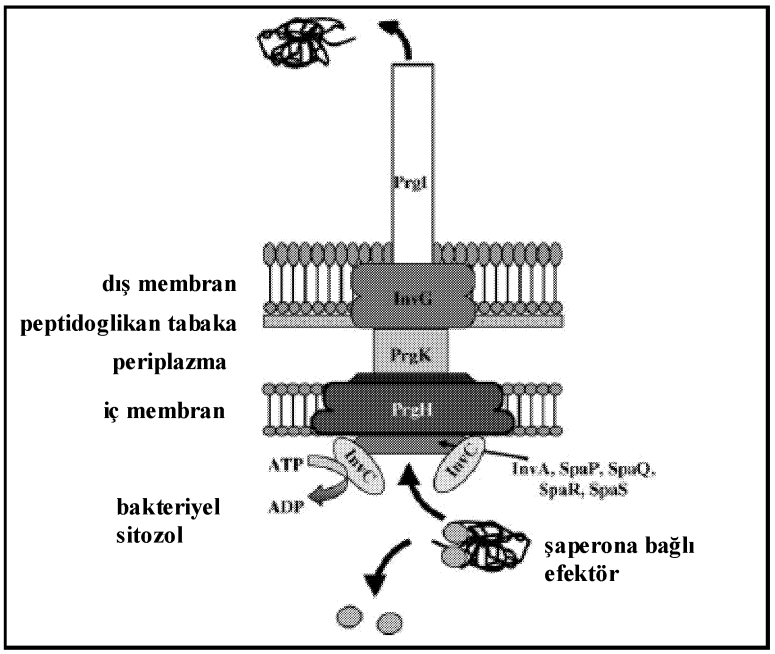
Salmonella serotipleri ile konak organizma arasındaki karşılıklı etkileşimler, hem *Salmonella* serotipi hem de konağa ait genetik faktörler tarafından belirlenmektedir. *S.typhi* insanlarda sistemik bir hastalık olan tifoya yol açarken, *S.typhimurium'* un diyareye yol açan lokalize gastroenterit ve lenfadenite sebep olması, iki serotip arasındaki genetik farklılıktan kaynaklanmaktadır. Farelerde ise *S.typhimurium* enfeksiyonu sistemik tifo benzeri bir hastalıkla sonuçlanmaktadır. İnbred fare suşlarının duyarlılığı da genetik alt yapılarına bağlı olarak değişmektedir (43).

1892 yılında, *S. typhimurium*, Loeffler tarafından fare tifo etkeni olarak *Bacillus typhimurium* adıyla tanımlanmıştır. İlk çalışmalar, *typhimurium* serotipi ile enfekte farelerin dokularındaki bakteri dağılımının tifo hastalarınınkiyle benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmalar sonucunda farelerde tanımlanan bu model, insan tifo çalışmaları için hayvan modeli olarak kullanılmaya başlanmıştır (42).

2.3.1. Salmonellozis Patogenezi

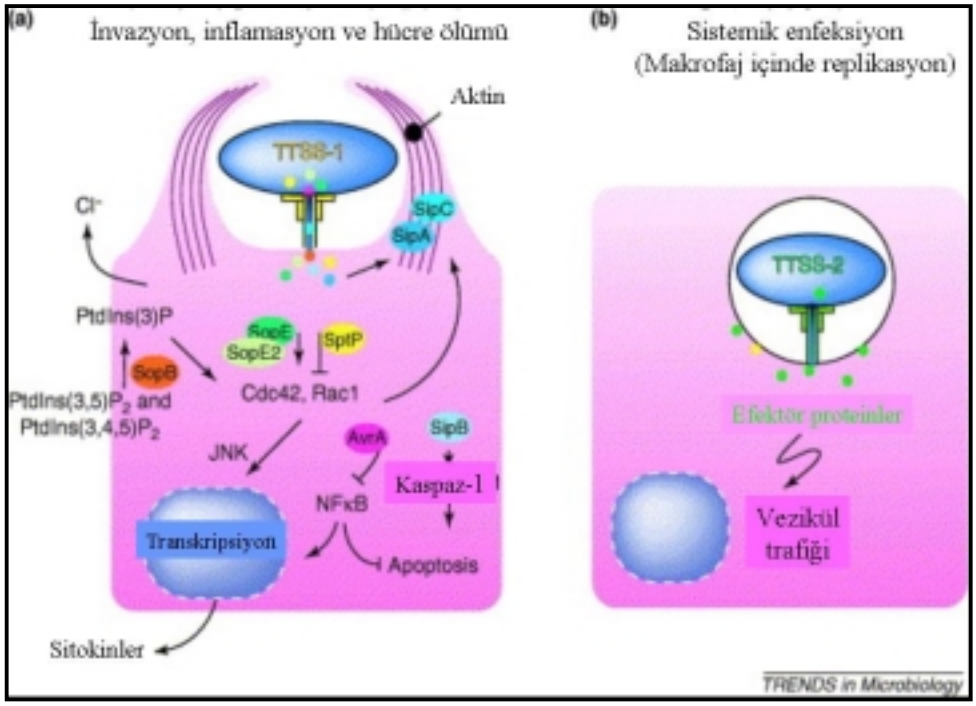
Salmonella insanları ve hayvanları oral yolla enfekte eder. Sindirimi takiben, intestinal lenfoid dokuya bir yönelim gösterir, distal ileum ve çekuma ulaşarak mukozayı istila eder, submukozada ve Peyer plaklarında replike olur (44). *S.typhimurium* farelerde Peyer plaklarının folikül-ilişkili epitelindeki M-hücrelerini istila eder (45) ve komşu enterositlere girmez. Ancak M-hücrelerinin invazyonu ve tahrip edilmelerinin ardından enterositlerin invazyonu ve tahrip edilmeleri gerçekleşmektedir (46).

Tüm *Salmonella enterica* suşlarının patogenezinde önemli rol oynayan iki tane tip üç sekresyon sistemi (*Type Three Secretion System*, TTSS) bulunmaktadır (47). Bu sistemler, bakteriyel proteinlerin ökaryötik konak hücrelerine koordineli bir şekilde enjeksiyonunu sağlar. Yaklaşık 25 proteinden oluşan bir sekresyon takımı, düzenleyici proteinler, efektör proteinler, ve efektör proteinleri koruyan ve TTTS takımına yönlendiren şaperonlardan oluşmaktadırlar (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. TTSS-1 takımının yapısı. Bakteriyel hücre duvarının iç ve dış membranı boyunca uzanan 25 tane takım proteininin birleşmesinden oluşan iğne kompleksinin moleküler yapısı gösterilmektedir. Ehrbar ve Hardt (47)' dan değiştirilerek alınmıştır.

Salmonella Patojenisite Adası-1 (*Salmonella Pathogenicity Island-1, SPI-1*) ve *SPI-2* bölgeleri tip üç sekresyon sistemlerini kodlarlar. *SPI-1* invazyon genlerini içerirken, *SPI-2* genleri hücre içi patogenez için gereklidir ve sistemik *S.enterica* enfeksiyonlarında çok önemli bir role sahiptir (Şekil 2.6), (48).



Şekil 2.6. TTSS-1 ve TTSS-2 efektör proteinlerinin konak hücre ile etkileşimleri. (a) TTSS-1 efektör proteinleri aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, iyon akımlarında değişiklikler, pro-inflamatuar sitokinlerin ve pro-apoptotik yolakların uyarılması gibi çeşitli sinyal yolaklarını tetiklemektedir. AvrA, SipA, SipB, SipC, SopB, SopE, SopE2 ve SptP moleküllerinin fonksiyonları gösterilmiştir. Konak hücrede bilinen hedef moleküller, Rho GTPazları olan Cdc42 ve Rac1, F-aktin, kaspaz-1 ve fosfatidilinositidlerdir. (b) TTSS-2 efektör proteinleri konak hücre vezikül trafiğini, *Salmonella*-içeren vaküolün korunması ve geç endozomal-lizozomal bölümle füzyonun engellenmesi yönünde uyarır. Cl^-, klor iyonu; NFκB, nükleer faktör-κB; PtdIns(3)P, fosfatidilinositol-3-fosfat; PtdIns(3,5)P_2, fosfatidilinositol-3,5-bifosfat; PtdIns(3,4,5)P_3, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat. Hapfelmeier ve Hardt (49)' dan değiştirilerek alınmıştır.

Peyer plaklarında epitelyal hücrelerin ve M-hücrelerinin invazyonu *SPI-1* genleri tarafından kodlanan TTSS-1 tarafından sağlanmaktadır (50). Ayrıca *SPI-1* tarafından kodlanan sipB proteini Peyer plaklarında makrofaj apoptozisine yol açarak *Salmonella'* nın öldürülmekten kaçmasını sağlamaktadır (51). Bajaj ve diğ. (52) *S.typhimurium SPI-1* bölgesinde kodlanan invazyon genlerinin oksijen konsantrasyonu, osmolarite, pH ve pek çok virülans geninin düzenlenmesinden sorumlu olan *PhoPQ* tarafından koordineli bir şekilde düzenlendiklerini göstermişlerdir. Buna göre invazifliği ve invazif gen ekspresyonunu düzenleyen koşullar, düşük oksijen, yüksek osmolarite, hafif alkali pH ve aktif bakteriyel protein sentezidir. Bu fizyolojik koşullar, *Salmonella*' nın enfeksiyonu başlattığı yer olan distal ileumdaki koşullardır (52). Yine Bajaj ve diğ. (52) invazyon genlerinin sadece tüm çevresel ve düzenleyici koşullar optimum olduğunda eksprese olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgular, *Salmonella*' nın intestinal epitele girip geçmesinin ardından fagositoz yapmayan hiçbir hücreye girmemesiyle uyumluluk göstermektedir (52). Nnalue ve diğ. (53) de intravenöz uygulamayı takiben, hepatositlerde ve karaciğer endotelyal hücreleri gibi fagositoz yapmayan hücrelerde, bu hücrelerle temas halinde olmasına rağmen, *S.typhimurium'* un bulunmadığını tespit etmişlerdir. Buna göre *SPI-1* genleri intestinal ortam koşullarına benzer şartlarda eksprese olur ve daha sonra hücre içi yerleşimli *Salmonella* tarafından baskılanır.

TTSS-1 sitozole pek çok efektör protein enjekte ederek, hücre iskeletinde değişikliklere yol açar ve makropinositozla bakterinin hücre içine alınmasını sağlar (54). Membran kıvrımları, efektör proteinlerin (SipC ve SipA) konak hücre iskeletinin bileşenleri ile doğrudan ilişkisi veya efektör proteinlerin (SopE, SopE2 ve SopB) konak hücre sinyal yolaklarına müdahale etmeleri sonucu aktin-iskeletinin yeniden düzenlenmesinin dolaylı yoldan uyarılması sonucu oluşmaktadır. İkinci mekanizma, TTSS-1 Efektörleri SopE ve SopE2' nin doğrudan, SopB' nin ise dolaylı yoldan Cdc42 ve Rac aktivasyonuna yol açmasını içermektedir (Bkz. Şekil 2.6), (55).

Epitelyal hücreye girişin ardından, *S.typhimurium* membran-bağlı bir vaküol içerisinde yerleşir. Yeni çevresine uyum sağlamak amacıyla

S.typhimurium gen ekspresyon şeklini değiştirir. *SPI-2* tarafından kodlanan *TTSS-2* genlerinin ekspresyonunda artış olur (55).

Salmonella, M-hücrelerinin içinden geçerek Peyer plaklarının lenf foliküllerine ulaşır, burada fagositoz yapan hücreler tarafından fagositozla alınır ve mezenterik lenf nodlarına, karaciğer ve dalağa taşınır (56). Bu organlarda, makrofaj içerisinde özel bir membran bölümü olan *Salmonella*-içeren vaküol (*Salmonella-containing vacuole,* SCV) içinde yaşayabilir ve replike olabilir. İntestinal invazyonun ardından bakterilerin bir bölümü kana geçer ve kompleman opsonizasyonu ile dolaşımdan hızla temizlenirler (57). Geriye kalanlar, retiküloendotelyal sistemde (RES), hücre içine yerleşirler. *S.typhimurium*, intestinal lümenden kan dolaşımına ve RES' e, *SPI-1*' den bağımsız bir yol kullanarak da geçebilmektedir. Bu yolak, CD-18 eksprese eden fagositlerce (makrofajlar veya dendritik hücreler) bakterinin sistemik bölgelere taşınmasını içermektedir (58). Dendritik hücreler, epitel hücreleri arasındaki sıkı-bağlantıları açar, epitel dışına dendritlerini uzatır ve bakteriyi doğrudan içlerine alırlar. Ayrıca dendritik hücreler sıkı-bağlantı proteinleri eksprese ettikleri için bu sırada epitelyal bariyerin bütünlüğü korunur (59).

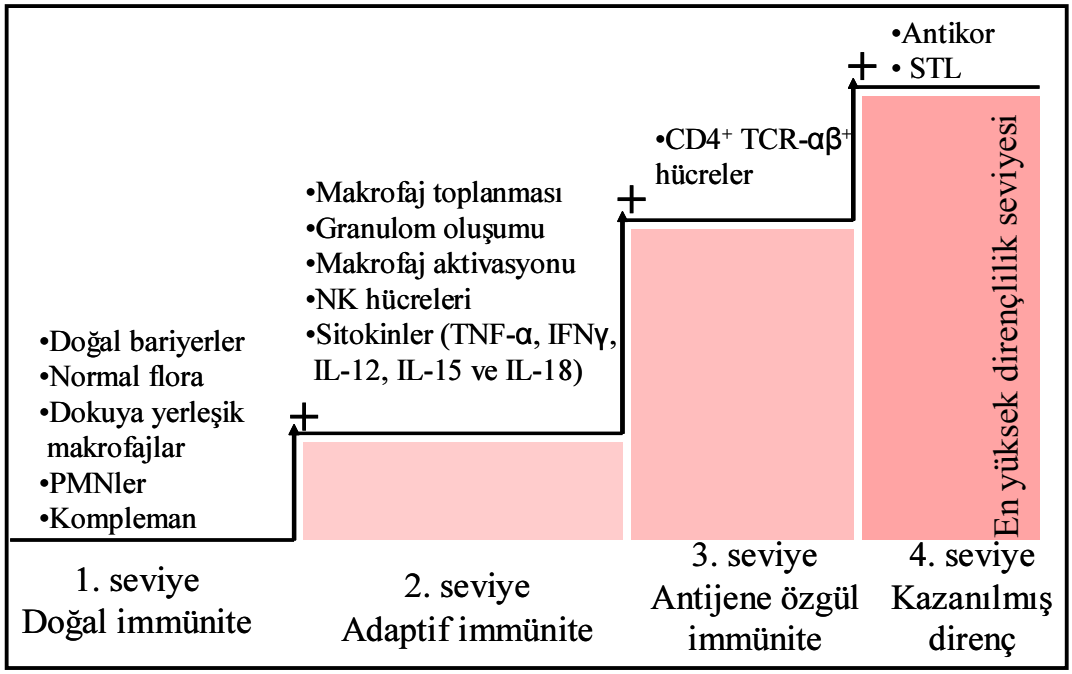
Salmonella RES içerisinde, makrofajlar, polimorfonükleer (PMN) hücreler ve dendritik hücrelerle ilişkidedir (27, 60). Dalakta, bakterilerin çoğunluğu kırmızı pulpa makrofajları ($F4/80^{+}$ ve *Macrophage Scavenger Receptor-A*^{low}, MSR-$A^{düşük}$) ve marjinal zon makrofajları (MSR-A^{+}) içerisinde bulunur (61). Çok yüksek enfeksiyon dozları aşıldığında, $B220^{+}$ B-hücreleriyle ilişkide olanlar da gösterilmiştir (60). Enfeksiyonun erken evrelerinde, karaciğerde Kupffer hücrelerine yerleşmiş bulunmaktadır. Hastalığın ileri evrelerinde ise, bakteri patolojik lezyonlarda görülmektedir ve bakterinin makrofajlar ve PMN hücreler içerisinde bulunduğu, hepatositler içerisinde ise bakteriye rastlanmadığı gösterilmiştir (27). *S.typhimurium*' un hepatositler içerisinde gösterildiği daha önceki çalışmalarda yüksek dozlar kullanılması ve nötrofil deplesyonuna yol açan veya enfeksiyon odağında nötrofil toplanmasını engelleyen antikorların kullanılması, *Salmonella* proliferasyonunun primer sahasının hepatositler olmadığını desteklemektedir (27). *Salmonella*' nın bir bölümünün, en azından geçici olarak, hücre dışı

boşlukta bulunduğu da söylenebilir. Ökaryötik hücrelere girmeyen bir antibiyotik olan gentamisin uygulaması, *Salmonella* ile enfekte farelerde, RES' de bakteri yükünü azaltmaktadır (62). Buna ek olarak, subletal ve ölümcül enfeksiyonlar sırasında, kandan *Salmonella* kültürü yapılabilir ve dokularda çok yüksek bakteriyel sayılara ulaşıldığında hücre dışı boşlukta da bakteri görülebilir (63). Makrofajlardaki fagozomlar, endozomlarla füzyon sonucu, iyonize edici ve hidrolitik enzim aktivitesindeki artış ile birlikte vaküolün ilerleyici asidifikasyonu şeklinde bir olgunlaşmaya uğrarlar (64). *S.typhimurium* TTSS-2' yi kullanarak SCV olgunlaşmasını kendi lehine yönlendirmektedir (48). İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat, (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, reduced*, NADPH) oksidaz-bağımlı solunum patlaması ve uyarılabilir nitrik oksit sentaz (*inducible Nitric Oxide Synthase*, iNOS), makrofajların anti-*Salmonella* fonksiyonundan kısmen sorumludur (65, 66). *Salmonella*, NADPH oksidazın fagozoma yerleşimini engelleyerek öldürülmekten kaçmaktadır ve bunu *SPI-2* bölgesindeki genler aracılığıyla başarmaktadır (67). Benzer şekilde *SPI-2*' nin, makrofaj içerisinde iNOS ve nitrotirozin ile *Salmonella'* nın birlikte bulunmasını engellediği gösterilmiştir (68). Reaktif oksijen aracıları da insanlarda *Salmonella* direncinde önemli rol oynamaktadır. Örneğin, NADPH oksidaz eksikliği sonucu gelişen Kronik Granülomatöz Hastalık' ta Salmonellozis de dahil olmak üzere tekrarlayan mikrobiyal enfeksiyonlara duyarlılık söz konusudur (69).

İnbred fare suşları, *S.typhimurium* ile enfeksiyona doğal dirençlilik/duyarlılık açısından farklılık gösterirler. Genel olarak, inbred suşlar, hedef organlardaki bakteriyel replikasyon ve sağkalım süreleri değerlendirildiğinde enfeksiyona aşırı duyarlı (C57BL/6J, C3H/HeJ, BALB/cJ), orta seviye (A/J, CBA/N) veya aşırı dirençli (129S6/SvEvTac) olmak üzere sınıflandırılabilirler (43). Farelerde *S.typhimurium* enfeksiyonuna karşı genetik dirençlilik, pek çok lokusun ekspresyonu sonucu gelişmekte ise de makrofajların fagolizozomal membranında bulunan iki değerlikli katyon taşıyıcısı Doğal-dirençlilik-ilişkili makrofaj protein1 (*Natural-resistance-associated macrophage protein*1, Nramp1)' in en önemli rolü oynadığı

bilinmektedir. Sağlam Nramp1 proteinine sahip fareler *S.typhimurium* enfeksiyonuna genetik olarak dirençlidirler (*Immunity to typhimurium*^{R}, *Ity*^{R}), Nramp1 proteinini kodlayan genin nokta mutasyonu ile inaktivasyonu ise farelerin 6-10 gün içerisinde enfeksiyon nedeniyle ölmelerine yol açmaktadır (*Ity*^{S}). *Ity*^{R} farede, *S.typhimurium* esas olarak mezenterik lenf nodlarında bulunur, karaciğer, dalak ve çekumda daha kısa bir süre bulunur (70). Yüksek anti-*Salmonella* IgG titrelerine rağmen, *S.typhimurium*, *Ity*^{R} farelerin mezenterik lenf nodlarındaki makrofajlarda 1 yıldan fazla kalabilmektedir. Nötralizan anti-IFNγ antikor uygulaması sonucu kronik taşıyıcı durum akut hastalığa dönüşmektedir (70). Nramp1' in, makrofaj içerisinde bulunan bakterilerin iki değerlikli katyonlara ulaşmasını engelleyerek besinsel bir immünite sağladığı düşünülmektedir. Fe^{++} ve Mn^{++} gibi iki değerlikli katyonların aktif alımı *S.typhimurium'* un tam virülansı ve hücre içinde yaşaması için gereklidir (71).

Erken doğal immün cevabın ardından, bakterinin dokularda büyümesini baskılayan karmaşık bir konak cevabı gelişmektedir. Bu cevap T veya B-hücrelerine ihtiyaç duymaz ve enfekte dokularda makrofaj infiltrasyonu ve makrofajdan zengin granülomların oluşumuyla eş zamanlı gelişir. Tümör Nekroz Faktörü-α (TNF-α), IFNγ, IL-12, IL-15 ve IL-18 sitokinlerinin ortak çalışması, *Salmonella'* ya karşı immün cevabın adaptif döneminde gereklidir. Dokulardan bakterinin temizlenmesi aşamasında ise, $CD4^{+}$ TCR-$\alpha\beta^{+}$ T-hücrelerinin CD28-bağımlı aktivasyonu ile gerçekleşen antijene özgül immün cevap gelişimi rol oynamaktadır. Antikor ve sitotoksik T lenfosit (STL) cevaplarının gelişmesi ise konağın bakteriye karşı kazanılmış direnç elde etmesinde rol oynamaktadır (Şekil 2.7), (40, 41, 72).



Şekil 2.7. Sistemik *Salmonella* enfeksiyonlarına karşı konak direncinin seviyeleri. *Salmonella* ile ilk enfeksiyon sırasında konak direncinin seviyelerindeki artış (1-3. seviyeler) görülmektedir. Dördüncü seviye, etkin, canlı zayıflatılmış *Salmonella* aşıları ile immünize hayvanlarda görülen en yüksek dirençlilik seviyesini göstermektedir. Mastroeni (40)' den değiştirilerek alınmıştır.

2.3.2. Zayıflatılmış *Salmonella* Aşı Suşları

Çok çeşitli zayıflatılmış *Salmonella* suşu kendilerine karşı veya eksprese ettikleri heterolog antijene karşı hem mukozal hem de sistemik immüniteyi uyarmak amacıyla canlı aşı olarak kullanılmaktadırlar. Son yıllarda geliştirilen *Salmonella* aşı suşları metabolik fonksiyonları veya virülans faktörleri ile ilgili genlerinde geri dönüşümsüz mutasyon taşıyan suşlardır (Tablo 2.2). Üzerinde en çok çalışılmış olan metabolik-zayıflatılmış suşlar; 1. aromatik amino asit biosentezinde eksiklik olan (örn. *aroA*, veya *aroC* ve *aroD*), 2. pürin biosentezinde eksiklik olan (*purA*, *purE*), 3. adenilat siklaz yapımında eksiklik olan (*cya*) ve 4. siklik AMP (cAMP) reseptör proteini yapımında eksiklik olan (*crp*) mutantlardır. En yoğun çalışılan virülans-

zayıflatılmış aşı suşları ise; 1. *phoP/phoQ* iki-komponentli düzenleyici sistemde veya 2. *SPI-2* lokuslarında mutasyon taşıyan suşlardır (73).

Tablo 2.2. Canlı zayıflatılmış *Salmonella* aşılarının üretiminde hedeflenen genler. Mastroeni ve diğ. (41)' nden değiştirilerek alınmıştır.

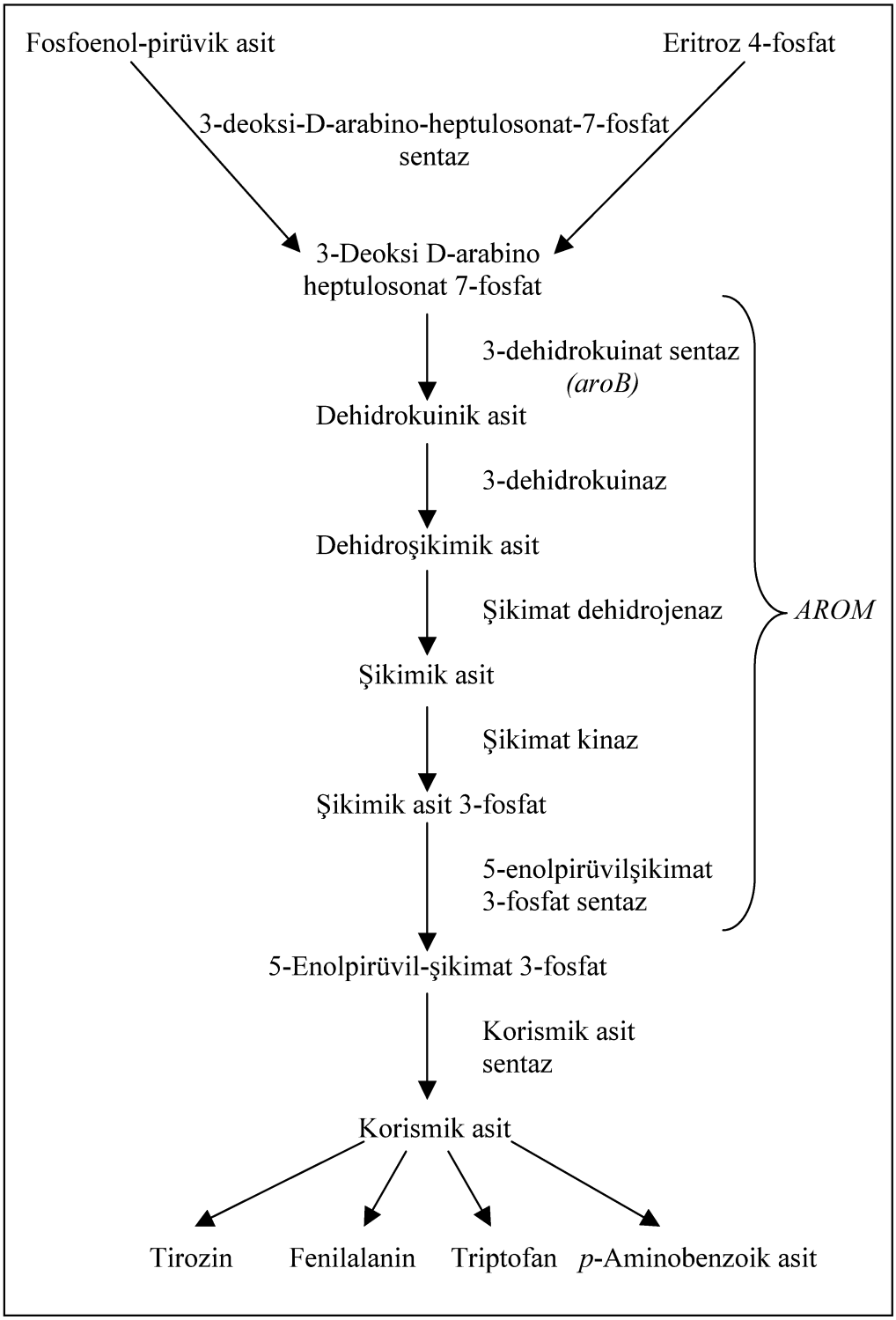
Mutasyona uğratılan gen	Gen fonksiyonu
galE	UDP-galaktozun UDP-glukoza çevrilmesi
aro	PABA, DHB ve aromatik aminoasitlerin biyosentezi
pur	Adenin biyosentezi
htrA	Isı stresi ve oksidatif stresten korunma
cya/crp	cAMP biyosentezi ve AMP reseptör ekspresyonu
ompR	Dış membran proteinlerinin ve Vi ekspresyonunun düzenlenmesi
ompC, ompF	Dış membran proteinleri C veya F' nin biyosentezi
phoP/phoQ	Pek çok virülans geninin düzenlenmesi
waaN	Lipid A' nın ikincil açilasyonu
recA, recBC	DNA rekombinasyonu ve tamiri
guaBA	Guanin nükleotidlerinin biyosentezi
nuoG	NADH dehidrojenaz-1 ekspresyonu
surA	Peptidilprolil-*cis, trans*-izomeraz biyosentezi
dam	DNA adenin metilaz ekspresyonu

Bakteri, fungus ve bitkilerde, aromatik amino asitler ve aromatik halka yapısını taşıyan diğer bileşiklerin sentezi pre-korismat veya şikimat yolağı üzerinden gerçekleştirilir (Şekil 2.8). Şikimat yolağı, triptofan (Trp), tirozin (Tyr) ve fenil alanin (Phe) aromatik amino asitleri ile paraaminobenzoik asit (PABA, folat ve nükleotidler için öncül moleküldür) ve dihidroksibenzoik asitin (DHB, enteroçelinin öncül molekülüdür) ortak öncül molekülü olan korismat molekülünün sentezi aşamalarını kapsamaktadır. Bu yolak, hayvan türlerinde bulunmaması nedeniyle, özgül kemoterapötikler için potansiyel bir hedef oluşturmaktadır. Çeşitli noktalarda dallanarak metal şelatörleri, vitamin E ve K, folik asit, ubikinon ve plastokinon yapımına da yol açmaktadır.

Funguslarda, iki ile altıncı basamakları katalizleyen enzimler tek bir polipeptid oluşturacak şekilde birleşmiş halde bulunmaktadır ve bu beş fonksiyonlu tek enzim AROM olarak adlandırılmaktadır. Bakterilerde ise şikimat yolağının pre-korismat bölümünü katalizleyen enzimler tek fonksiyonludur ve genom boyunca dağınık halde bulunan genler tarafından kodlanırlar (74).

İlk olarak *aroA*, ardından *aroC* ve *aroD* genlerinde de oksotrofik mutasyon oluşturularak zayıflatılmış suşlar elde edilmiştir (75-78). Oksotrofik mutantlar, memeli dokularında bulunmayan metabolitlere ihtiyaç duyan ve bu nedenle *in vivo* büyüme ve replikasyon yetenekleri bozulmuş suşlardır. Aromatik amino asit metabolizmasında görev alan enzim genlerinde mutasyon oluşturularak oksotrofik hale getirilmiş olan *Salmonella* suşları DNA aşılama ve gen tedavisi çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (41).

Pre-korismat yolağının ikinci basamağı, *aroB* geni tarafından kodlanan dehidrokuinat sentaz enzimi tarafından katalizlenir. *S.typhimurium aroB* geni, 1997 yılında klonlanmış, dizi analizi yapılmış ve kanamisin dirençlilik kasetinin gen bölgesine yerleştirilmesi sonucu insersiyonel inaktivasyon ile mutant hale getirilmiştir. Mutant bakteri aromatik bileşikler açısından oksotrofiktir ve diğer *S.typhimurium aro* mutantları gibi *in vivo* zayıflatılmış etki göstermektedir (1). *S.typhimurium aroB* mutant suşunun vektör olarak kullanıldığı bir DNA aşılama veya gen tedavisi çalışması literatürde bulunmamaktadır.



Şekil 2.8. Pre-korismat yolağında görev alan enzim ve metabolitler. Hawkins ve diğ. (74)' nden değiştirilerek alınmıştır.

2.3.3. *Salmonella*-Aracılı DNA Aşılama ve Gen Tedavisi Çalışmaları

Gen transferinin ilk kısıtlayıcı basamağı, memeli hücresine genetik materyalin alınmasıdır. Bakteriyel vektörler söz konusu olduğunda, gen transferi, bakterinin tamamının hedef hücreler içerisine alınmasıyla mümkün olmaktadır. *Salmonella*, makrofaj ve dendritik hücreler gibi profesyonel fagositoz yapan hücrelere fagositozla alınmaktadır, fagositoz yapmayan hücrelerde ise invazyon proteinlerinin ökaryötik hücre içerisine salıverilmesi sonucu hücre içi sinyal mekanizmalarının tetiklenmesi ve ardından hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, membran kıvrımlaşması ve pinositoz ile alımı söz konusudur (34). Bakteri hücre içerisinde fagozomal vaküol içerisinde bulunmaktadır ve plazmidin nükleusa ulaşabilmesi için vaküoler bölümden çıkması şarttır. *S.typhimurium* aracılı DNA aktarımında, plazmid DNA' nın sitozole kaçış mekanizmaları henüz aydınlatılamamıştır (25). Goussard ve diğ. (79), memeli hücrelerinde tespit edilen ökaryötik gen ekspresyonunun bir kısmının, bakteride en-erken sitomegalovirüs (CMV) promotoru veya Rous sarkom virüsü (RSV) promotorunun aktivasyonuna bağlı olabileceğini göstermişlerdir. Bu durumda DNA transferinden çok protein transferi söz konusudur. Bu nedenle bakteri aracılı gen transferi çalışmalarında, ökaryötik promotorların bakteride aktiflenebileceği düşünülerek değerlendirmeler dikkatli yapılmalıdır (79).

Patojenlere Karşı Zayıflatılmış *Salmonella* Aracılı Önleyici Genetik Aşılama

Aşılama çalışmalarında, ticari olarak temin edilebilen ökaryötik ekspresyon plazmidleri kullanılmaktadır. Bu plazmidler, çoğunlukla, bakteri içerisinde plazmidlerin yüksek kopya sayılarına ulaşmasına yol açan *pUC* replikasyon başlangıcı *(ori)* temel alınarak geliştirilmiştir. Kültürde plazmidi seçmek ve stabilize etmek amacıyla da genellikle bir ampisilin dirençlilik belirteci de taşırlar (80).

Ökaryötik ekspresyon plazmidinin zayıflatılmış *S.typhimurium* kullanılarak memeli hücrelerine *in vivo* aktarıldığı ilk çalışma, Darji ve diğ. (33) tarafından 1997 yılında gerçekleştirilmiştir. Rekombinant *S.typhimurium aroA*

suşunun tek bir oral uygulamasından sonra *L. Monocytogenes*' e ait LLO ve ActA virülans faktörleri ve *E.Coli'* ye ait β-galaktozidaz' a (β-gal) karşı sitotoksik ve yardımcı T-hücre (başlıca Th1) cevabı ile özgül antikorlar elde edilmiştir. Prokaryötik bir promotor tarafından bakteride heterolog protein olarak eksprese edilen antijen ile karşılaştırıldığında, ökaryötik ekspresyon plazmidi ile aşılamanın çok daha üstün olduğu gösterilmiştir. Ayrıca T-hücre hafıza cevabının da ökaryötik ekspresyon plazmidi taşıyan rekombinant *Salmonella* ile geliştiği, *Salmonella* tarafından eksprese edilen antijenle gelişmediği tespit edilmiştir (81). LLO kodlayan ekspresyon plazmidi taşıyan *Salmonella* ile immünizasyon, *L.monocytogenes'* in ölümcül uygulamasına karşı koruyucu cevap oluşturmuştur. Bu bulgular *Salmonella* enfeksiyonuna çok duyarlı Balb/*c* farelerinde elde edilmiştir. Daha dirençli farelerde (C57BL/6 ve DBA2) ve *outbred* farelerde (NIH Swiss) yapılan immünizasyon sonucunda, tek bir uygulama sonrasında sitotoksik ve yardımcı T-hücre cevabı tespit edilmiş, ancak özgül antikor cevabı gelişmemiştir (81). Antikor cevabı rekombinant *Salmonella*' nın ancak çeşitli defalar uygulanması sonucu elde edilmiştir (25). İki farklı mukozal yolu karşılaştırmak amacıyla, rekombinant *Salmonella,* oral veya nazal olarak uygulanmış ve sistemik T-hücre cevaplarının iki yolla da uyarıldığı, ancak oral uygulamanın daha etkin olduğu gösterilmiştir (81). *Salmonella*-aracılı DNA aşılaması ile aktarılan bir diğer bakteriyel antijen *Chlamydia trachomatis'* in dış membran proteinidir (82). Aşı oral uygulanmıştır, buna rağmen farelerin akciğerlerinde kısmi korunma cevapları elde edilmiştir.

Bakteriyel DNA vektörlerinin tek başına veya heterolog *prime-boost* protokolleri ile uygulandığı mukozal aşılama stratejileri, eşlik eden parenteral aşı uygulaması ile, yeni ve etkili insan immün yetmezlik virüsü (*Human Immunodeficiency Virus*, HIV) aşılarının geliştirilmesine yol açmaktadır (83). HIV env proteinini kodlayan ökaryötik ekspresyon plazmidi taşıyan rekombinant *S.typhimurium'* un oral uygulamasının ardından hem mukozal hem de sistemik lenfoid dokularda anlamlı bir CD8+ T-hücre cevabı geliştiği görülmüştür (84). Çıplak DNA' nın intramusküler enjeksiyonu ise sadece sistemik CD8+ T-hücrelerini uyarmaktadır. Bu bulgu, mukozal dokuda antiviral

hücresel cevabın oluşmasında *Salmonella* DNA vektörünün önemini vurgulamaktadır. Vecino ve diğ. (85) HIV gp120 veya Simian immün yetmezlik virüsü (*Simian Immunodeficiency Virus*, SIV)-nef proteinlerini kodlayan zayıflatılmış *Shigella*, *S.typhimurium* veya *S.typhi'* yi intranazal uygulamaları sonrası karşılaştırmışlardır. Antijene özgül CD8+ T-hücre cevaplarını uyarmaları açısından karşılaştırıldıklarında, *Shigella* suşunun daha etkin olduğunu göstermişlerdir. *Shigella* ve intramusküler DNA aşılaması benzer hücresel cevapları uyarmışlardır. İntramusküler DNA aşılaması serumda güçlü bir özgül IgG cevabına neden olurken, *Shigella* vektörü daha üstün bir mukozal gp120-özgül IgA cevabını uyarmaktadır.

Woo ve diğ. (86) 2001 yılında, oral *Salmonella* DNA aşısının Hepatit B virüsü yüzey antijenine (HBsAg) karşı STL cevabını, intramusküler çıplak DNA uygulamasıyla karşılaştırılabilir ölçüde uyardığını göstermişlerdir. Aynı DNA aşısının etkinliği, karaciğer ve böbreklerinde yapısal olarak HbsAg' ini eksprese eden transjenik farelerde değerlendirildiğinde, tek doz rekombinant *Salmonella'* nın hepatositlerde HBsAg ekspresyonunu baskıladığı, çıplak DNA ve protein aşısı ile ise bu etkinin görülmediği tespit edilmiştir (87). Transgen ekspresyonunu baskılayıcı etki, karaciğerde sitotoksik aktiviteyi gösteren geçici bir hepatik inflamasyona eşlik etmektedir. STL' lerin, Th1 T-hücrelerinin ve IgG2 alt sınıfına ait antikorların uyarılması, viral proteine karşı immün toleransın kırıldığını göstermektedir.

Benzer şekilde, Herpes Simplex Virüs-2 (HSV-2) glukoprotein D kodlayan oral *Salmonella*-aracılı DNA aşılaması dalak, ileal lenf nodları ve Peyer plaklarındaki T-hücreleri tarafından özgül IFNγ yapımını uyarmaktadır ve ölümcül bir intravajinal virüs uygulamasına karşı, vajina mukoza dokusunda IFNγ yapımı ile birlikte korunma sağlamaktadır (88). Aynı modelde, *Salmonella* tarafından taşınan ve IL-10 kodlayan ökaryötik ekspresyon plazmidi, antijen kodlayan *Salmonella* ile birlikte uygulandığında, oral aşının koruma etkinliğinin azaldığı da gösterilmiştir (89).

Tümör Aşılama ve Tedavisinde *S.typhimurium*

Tümör modellerinde oral *Salmonella* aracılı DNA aşılaması ile çok başarılı sonuçlar elde edilmektedir. β-gal' in tümör antijeni olarak kullanıldığı bir agresif fibrosarkom ve bir renal karsinom modelinde, ökaryötik LacZ ekspresyon plazmidi taşıyan *Salmonella*' nın oral uygulaması ile koruyucu immünite kısmen uyarılmıştır (90, 91). Renal karsinom modelinde, intramusküler çıplak DNA enjeksiyonu ile karşılaştırıldığında, oral *Salmonella* aşısı ile tümöre karşı koruyuculuk daha üstün bulunmuştur (91). İnsan melanom antijeni hgp100 ile transjenik B16 fare melanom hücre hattı ile oluşturulan melanom modelinde, hgp100' e karşı önleyici oral DNA aşılamasının koruyucu etkisi gösterilmiştir (92). Farelerin %70' inde tümör aşısının koruyuculuğu gösterilmiştir. Dalakta antijene özgül T-hücreleri gösterilmiş ve *Salmonella* DNA aşısının intragastrik uygulamasından üç gün sonra mezenterik lenf nodlarında antijen eksprese eden dendritik-benzeri hücreler tespit edilmiştir.

Normal dokular tarafından da eksprese edilen otolog tümör antijenleri ile de aşılama çalışmaları yapılmıştır. 2001 yılında Weth ve diğ. (93) aşının etkinliğini arttırmak için fare gp100 molekülünü değişmez *(invariant)* zincir ile birleştirerek, antijenin MHC Sınıf II sunum yolağındaki bölümlere yönlenmesini sağlamayı hedeflemişlerdir. Ayrıca tümör çevresine cilt altı IL-2 uygulaması da yapılmıştır. Birleşik tedavi, farelerin yaşam süresini uzatmış ve aşılamanın başlangıcı ile tümörün oluşturulması eş zamanlı olduğunda etkisinin en fazla olduğu tespit edilmiştir. gp100' ün *self*-antijen olduğu düşünüldüğünde, *Salmonella*-aracılı DNA aşılamasının immünolojik toleransı yenebildiği görülmektedir. Değişmez zincirle sarı floresan bir proteinin birleştirildiği rekombinant *Salmonella* uygulaması sonrası, Peyer plaklarında ve peritonda yüksek sayıda protein eksprese eden hücre bulunmuştur ve bu hücrelerin makrofaj ve dendritik hücrelerden oluştuğu gösterilmiştir (93).

Salmonella-temelli oral DNA aşısı tarafından tetiklenen anti-tümör cevapları desteklemek ve arttırmak amacıyla immünmodülatör veya tümör-tedavi edici moleküllerin tedaviye dahil edildiği çalışmalar da büyük ölçüde başarılı olmuştur. Xiang ve diğ. (94) tarafından fare melanom modelinde

otolog tümör antijenleri gp100 veya Tirozinaz-ilişkili protein2 (*Tyrosinase-Related Protein2*, TRP2) epitopları ile ubikuitin birleştirilmiş ve füzyon yapıyı taşıyan *Salmonella* DNA aşısı, farelerde B16 melanomunun büyümesini geriletmiştir. Aynı yaklaşım nöroblastom modelinde de denenmiş ve tümör-ilişkili *self*-antijen tirozin hidroksilaz epitoplarını kodlayan minigenler ubikuitin ile birleştirilerek *Salmonella*-aracılı DNA aşısı olarak uygulanmıştır (95). Bu çalışma sonucunda, ilk kez tirozin hidroksilaza karşı immün toleransın yenilmesi söz konusu olmuştur. Yine nöroblastom modelinde, tirozin hidroksilaz geninin viral kaynaklı bir post-transkripsiyonel düzenleyici elemanla birlikte kodlandığı *Salmonella*-aracılı DNA aşılamasında, tümöre hedeflenmiş IL-2 uygulaması da yapılarak metastazlara karşı tam koruyuculuk elde edilmiştir (96). IL-2' nin tümöre hedeflenmesi, IL-2' nin tümör hücrelerinde bulunan GD2 gangliozidini tanıyan bir antikorla birleştirilmesi sonucu elde edilmiştir. İnsan karsinoembriyonik antijeni (*human Carcinoembryonic Antigen*, hCEA) transjenik farelerde yapılan bir çalışmada da hCEA deneysel *self*-antijen olarak kullanılmıştır (97). Antijen sunucu hücrelerin aktivasyonunu ve olgunlaşmasını destekleyen CD40L molekülü ile hCEA antijeninin trimerizasyonu sonucu elde edilen molekül *Salmonella*-aracılı DNA aşılaması ile transjenik hCEA-farelere verilmiştir. Tümör hedefli IL-2 enjeksiyonu ile kombinasyon sonrası, farelerde CEA eksprese eden kolon adenokarsinomuna karşı tam korunma sağlanmıştır. Sadece *Salmonella* veya sadece IL-2 tedavileri ise yalnız kısmi korunma sağlamıştır. B16 melanom modelinde ise gp100 ve TRP2 epitoplarının ubikuitin ile birleştirildiği stratejiye, hedeflenmiş IL-2' nin adjuvan olarak eklenmesiyle sekiz farenin altısında tam red görülürken, ikisinde cilt altı tümör büyümesinde baskılanma tespit edilmiştir (98).

Agresif bir fare meme karsinomunda yapılan bir çalışmada ise karsinom hücrelerinde aşırı eksprese olan transkripsiyon faktörü Fos-ilişkili antijen-1 (Fos-*related antigen*-1, Fra-1)' e karşı *Salmonella*-aracılı DNA aşılaması uygulanmıştır (99). Ubikuitinle birleştirilmiş antijen ile pro-inflamatuar bir sitokin olan IL-18' i eksprese eden ökaryötik ekspresyon plazmidlerinin birlikte verilmesi sonucu T-hücreleri, NK hücreleri ve dendritik

hücrelerde aktivasyon ve sonucunda tümöre karşı koruyucu immün cevap elde edilmiştir. IL-18 tümör anjiyogenezini belirgin olarak azaltmıştır (99). Aynı grup tarafından, immünize olmuş farelerden sinjenik SCID farelere adoptif T-hücre transferi sonrasında, tümörün tekrarlamasına karşı, tümöre özgül sitotoksisitenin ve uzun dönemli T-hücre hafızasının geliştiği de gösterilmiştir (100).

Niethammer ve diğ. (101) vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü-2 (FLK-1) kodlayan oral *Salmonella*-aracılı DNA aşısı ile özgün bir yaklaşım sergilemişlerdir. FLK-1, tümör damar yatağında çoğalmış endotelyal hücrelerde artmış ekspresyonu görülen bir moleküldür. Oral *Salmonella* aşısı ile FLK-1 antijenine karşı periferik immün tolerans kırılmış ve tümör yatağındaki endotelyal hücrelere karşı güçlü hücresel immün cevap gelişmiştir, bunun sonucunda da anjiyogenez baskılanması sağlanmıştır. Dolayısıyla, immünize farede tümöre karşı koruyuculuk elde edilmiş, ve kendiliğinden oluşan ve deneysel pulmoner metastazlarda gerileme görülmüştür. Bu yaklaşım, tümör hücrelerinin genetik olarak ne kadar kararsız olduğu düşünülürse, umut verici bir aşılama stratejisidir.

CD44v2 transjenik bir sıçan lenfoma modelinde CD44' ün kırpılma varyantı olan CD44v2' ye karşı *Salmonella*-aracılı DNA aşılaması sonucunda ise tümör büyümesi hızlanmış ve timusta metastazlar tespit edilmiştir (102). CD44v2, özellikle fötal gelişme sırasında eksprese edilen ve timusa lenfosit yerleşiminde etkili olabileceği düşünülen bir *self*-antijendir. Oral rekombinant *Salmonella* uygulamasının ardından CD44v2-özgül STL ve yardımcı T-hücre cevabı tespit edilmiş ve periton miyeloid hücrelerinde antijen ekspresyonu gösterilmiştir. CD44v2' ye karşı tolerans gelişmesi bu ters etkiyi açıklamak üzere öne sürülmüştür, ancak tolerans gelişmesini açıklayacak mekanizmalar belli değildir.

Tümörler genetik olarak çok kararsızdırlar ve antijene özgül tümör aşıları bu nedenle etkinlik konusunda kısıtlanmaktadır. Ancak çoklu antijenleri immünmodülatör moleküller ile birlikte kodlayan, çok fonksiyonlu bakteriyel DNA aşıları umut vericidir.

Tümör Hedefleyici Olarak *Salmonella*

Salmonella fakültatif anaerobik bir bakteri olması nedeniyle, hipoksik bir merkeze sahip olan büyük tümörleri ve oksijenize küçük metastatik tümörleri kolonize etme yeteneğine sahiptir. 1997 yılında Pawelek ve diğ. (29) tarafından hiperinvazif, oksotrof *Salmonella* suşları, melanom taşıyan farelere verildiğinde bakterilerin tümör dokularını tercih ettiği ve bakterinin tümör:karaciğer kolonizasyon oranlarına bakıldığında 250:1 ve 9000:1 arasında değiştiği gösterilmiştir. Aynı zamanda tümörde gerileme ve hayvanların yaşam süresinde iki kat kadar artış tespit edilmiştir. Herpes Simpleks Virüs-Timidin Kinaz (HSV-TK) eksprese eden *Salmonella* uygulamasını takiben de tümörde gansiklovir-aracılı, doz-bağımlı baskılanma ve sadece bakteri uygulamasına göre artmış yaşam süreleri tespit edilmiştir. İmmün yetmezlikli farelerde intravenöz uygulama tekrarlandığında, anti-tümör etkinin T ve B-hücre bağımlı olmadığı gösterilmiştir. Hastalarda lipopolisakkarid (LPS)' le uyarılan septik şok olasılığını azaltabilmek amacıyla, lipid-A-modifiye (*msbB*) *Salmonella* oksotrofları geliştirilmiştir (103). Bu mutantlar ile TNF-α uyarılmasının azaldığı, beraberinde ise tümör hedeflenmesinin ve tedavi edici etkinin kaybolmadığı gösterilmiştir. Bir başka çalışmada ise, *msbB* ve *purI* lokuslarında delesyonları olan VNP20009 *S.typhimurium* suşunun, intravenöz verilmesini takiben melanom taşıyan farelerde tümör büyümesini ve metastazları engellediği gösterilmiştir (104). VNP20009, genetik olarak kararlı, zayıflatılmış virülansa sahip (*purI* geninde delesyon), septik şok potansiyelinde düşüklük (*msbB* geninde delesyon) ve antibiyotik duyarlılığı olan çok emniyetli bir *S.typhimurium* mutant suşudur (105). VNP20009, Faz I klinik çalışmasında 24 tane metastatik melanom ve bir metastatik renal karsinom hastasına intravenöz olarak uygulanmıştır (106). Maksimum tolere edilen doz $3x10^8$ cfu/m^2 olarak görülmüştür, 10^9 cfu/m^2 alan hastalarda doz-kısıtlayıcı toksisite gözlenmiştir ve semptomlar trombositopeni, anemi, persistan bakteriyemi, hiperbilirubinemi, diyare, bulantı ve kusma olarak tespit edilmiştir. VNP20009 pro-inflamatuar sitokinleri dozla ilişkili olarak arttırmıştır. Üç hastada tümör kolonizasyonu görülmüş, ancak belirgin bir tümör gerilemesi tespit edilmemiştir. Diğer bir klinik çalışma,

E.Coli sitozin deaminaz *(cytosine deaminase,* CD*)* genini eksprese eden zayıflatılmış *S.typhimurium* TAPET-CD *(Tumor Amplified Protein Expression Therapy-Cytosine Deaminase*) suşunun üç dirençli kanser hastasına tümör içi enjeksiyonu ve ardından oral 5-florositozin uygulamasıdır (107). Tedavi ile ilişkili bir yan etki görülmemiştir. İki hastada tümörde bakteriyel kolonizasyon ve sitozin deaminaz ekspresyonu sonucu 5-fluorositozinden 5-fluorourasile dönüşüm gösterilmiştir. *S.typhimurium* ile gerçekleştirilmiş olan bu klinik çalışmalar, daha düşük toksisite ve daha iyi tümör kolonizasyon özelliklerine sahip suşların geliştirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Gen Tedavisi ve İmmünmodülasyon Çalışmaları

Salmonella' nın ökaryötik ekspresyon plazmidlerini memeli hücrelerine *in vitro* ve *in vivo* aktarabilme özelliği, aşılama dışındaki uygulamaların da önünü açmıştır. Makrofajlar, *Salmonella* enfeksiyonu sırasında bakterinin doğal hedefleridir ve bu nedenle monosit-makrofaj sistemine ait genetik hastalıklarda *Salmonella'* nın gen tedavisi vektörü olarak kullanılması akla yatkındır (108). Kalıtsal hemokromatoz hastalarından elde edilen makrofajlardaki gen hasarı, hemokromatoz geni *Hfe* içeren ökaryötik ekspresyon plazmidinin zayıflatılmış *Salmonella* aracılığı ile *in vitro* aktarılması yoluyla düzeltilmiştir (109). *Salmonella* aracılı gen tedavisi *in vivo* olarak da gösterilmiştir. IFNγ' dan yoksun fareler, *aroA* zayıflatılmış *S.typhimurium* uygulaması sonucu ölürler. Ancak Paglia ve diğ. (110) IFNγ kodlayan ökaryötik ekspresyon plazmidi taşıyan *aroA* zayıflatılmış *Salmonella'* nın oral uygulaması sonrasında genetik eksikliğin tamamlandığını ve farelerin bakteriye karşı doğal dirençliliğinin tekrar sağlandığını göstermişlerdir.

Çözünür insan CD40L kodlayan ökaryötik ekspresyon plazmidi taşıyan rekombinant *Salmonella*' nın oral uygulaması ile farelerde eş zamanlı oluşturulan B-hücreli lenfomaya karşı koruyuculuk gösterilmiştir (111). Rekombinant *Salmonella*' nın, tümör uygulamasından bir hafta sonra verildiğinde etkinliğin kısmen devam ettiği, 2-3 hafta sonra verildiğinde ise tümör büyümesini halen geriletebildiği görülmüştür. Bir başka çalışmada ise cilt altı uygulanan iki fare tümör modelinde, oral *Salmonella*-aracılı insan veya

fare IL-12 ve granülosit/makrofaj koloni uyarıcı faktör (*Granulocyte/ Macrophage Colony Stimulating Factor,* GM-CSF) kodlayan ökaryötik ekspresyon plazmidlerinin aktarılması, fare serumlarında sitokin konsantrasyonlarının ve periferik kanda STL oranının belirgin olarak artmasına ve yaşam oranlarının yükselmesine neden olmuştur (112). Rosenkranz ve diğ. (113) ise cilt altı melanom hücreleri verilerek melanom oluşturulmuş farelere, 1 hafta sonra IL-4 veya IL-18 kodlayan ökaryötik plazmid taşıyan zayıflatılmış *S.typhimurium'* u oral uygulamışlar ve iki sitokinle de farelerin ortalama yaşam sürelerinin arttığını tespit etmişlerdir. Zayıflatılmış *Salmonella* suşunun tümörde biriktiğini ve çoğaldığını, ancak tümörde bulunan bakteri sayısının, Pawelek ve diğ. (29)' nin sonuçlarından farklı olarak, karaciğer ve dalaktakinden farklı olmadığını göstermişlerdir.

Makrofajların ve dendritik hücrelerin *Salmonella* bakterisinin doğal hedefleri olması, bu hücrelerin etkin anti-tümör immün cevaplarının gelişimindeki kilit rolleri, ve ayrıca *Salmonella*' nın kendi anti-tümör etkisi, kanser immüngen tedavisinde *Salmonella*' yı umut verici bir vektör haline getirmektedir.

2.4. IL-18 Molekülü

IL-18, ilk olarak, *Propionibacterium acnes (P. acnes*) ve LPS uygulanmış farelerin serum ve karaciğerlerinden saflaştırılmış güçlü bir IFNγ uyarıcı faktördür (114). Bu özelliğinden dolayı başlangıçta IFNγ-uyarıcı faktör (IFNγ-*Inducing Factor*, IGIF) olarak adlandırılmıştır. Klonlanmış fare ve insan IL-18 cDNA' ları sırasıyla 192 ve 193 aminoasitten oluşan proteinleri kodlamaktadır (115, 116). İnsan IL-18 molekülünün amino asit dizisi fare dizisiyle %65 homoloji göstermektedir (116). IL-18, IL-1β gibi öncül bir protein olarak sentezlenir, 24 kDa ağırlığındadır ve IL-1β Dönüştürücü Enzim (*IL-1β Converting Enzyme***,** ICE, Kaspaz-1) tarafından parçalanmasının ardından aktif haline dönüştüğü gösterilmiştir (115, 117, 118). IL-18 molekülünün β-yaprak tabaka yapısı IL-1' e çok benzemektedir (119), ancak çevredeki sitokin ortamına bağlı olarak, yardımcı T-hücre cevabını Th1 veya Th2 yönüne uyarabilme kapasitesine sahip yegane sitokindir (120).

2.4.1. IL-18 Molekülü, Geni, Düzenlenmesi ve Sinyal İletimi

IL-18 epitelyal hücreler, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi çok çeşitli hücreler tarafından sentezlenir. Fare IL-18 geni, kromozom 9' da yer alır, yedi eksondan oluşur. Ekson 2' nin yukarısındaki promotor aktivitesi yapısaldır, ancak ekson 1' inki LPS ile aktiflenir (121, 122). İnsan IL-18 geni ise kromozom 11' de bulunur, altı ekson ve beş introndan oluşur. Promotor bölgenin genomik karakterizasyonu ve analizi, molekülün yapısal ekspresyonu için promotor bölgenin en az 92 bp' nin gerekli olduğunu göstermiştir ve DNA protein-bağlanma deneyleri aktif Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktivatörü-5 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*-5, STAT-5)' in özgül olarak bağlandığını ortaya çıkarmıştır. IFN konsensus dizi-bağlayıcı protein, PU.1, NFκB ve Aktivatör Protein-1 (AP-1) de IL-18 promotorunun aktivasyonu için kritik faktörler olarak tanımlanmışlardır (123-125). Toll-like reseptör-IL-1R (TIR) üzerinden gelişen tüm sinyal yolaklarının gen ekspresyonunu, NFκB ve AP-1 aktivasyonu ile değiştirdiği bilinse de, Wald ve diğ. (126) IL-1 reseptörü (IL-1R) ailesinden tek immünglobulin IL1R-ilişkili molekülün (*single immunoglobulin IL-1R-related molecule*, SIGIRR), IL-18 ve IL-1 ile uyarılan immün cevapları negatif olarak düzenlediğini göstermişlerdir. Bir başka çalışmada ise Bcl6 molekülünün, IL-18 promotorunun kontrolü altındaki lusiferaz geninin ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (127). Mononükleer hücreler tarafından yapısal olarak eksprese edilen ve IFNγ ile de uyarılan, IL-18' in dolaşımda bulunan inhibitörü IL-18 bağlayıcı proteinin (IL-18BP) promotor aktivitesi de değerlendirilmiş ve en az altı tane düzenleyici eleman içerdiği gösterilmiştir (128). Bunların içerisinde bir tane Gama-Aktive Dizi (*Gamma-Activated Sequence,* GAS), bir tane IFN Düzenleyici Faktör-1 cevap Elemanı (*IFN Regulatory Factor-1 response Element*, IRF-E) ve iki tane CCAAT *Enhancer* Bağlayıcı Protein-β (CCAAT *Enhancer Binding Protein-β*, CEBP-β) bölgelerinin bazal promotor aktivitesi için gerekli olduğu gösterilmiştir.

IL-18' in biyolojik etkiye sahip olabilmesi için post-translasyonal modifikasyona uğraması gereklidir. 24 kDa ağırlığındaki inaktif öncül proteini sinyal peptidinden yoksundur (pro-IL-18). Kaspaz-1, pro-IL-18 molekülünü

Asp^{35}-Asn^{36} bölgesinden keserek 18.3 kDa ağırlığında biyolojik olarak aktif IL-18 molekülünün oluşmasını sağlar (117, 118). Proteinaz-3 enziminin insan oral epitelyal hücrelerinde pro-IL-18' den biyolojik olarak aktif IL-18 oluşumunu katalizlediği bilinmektedir (129). Başka bir çalışmada da kaspaz-3 ile pro-IL-18 veya olgun IL-18 proteinlerinden biyolojik olarak inaktif ürünlerin oluştuğu gösterilmiştir (130). Katepsin B' nin de pro-IL-18' in olgun hale gelmesinde rolü olduğu bildirilmiştir (131), ancak kaspaz-1 dışında diğer peptidazlarla IL-18 işlenmesinin biyolojik önemi henüz bilinmemektedir.

IL-18 reseptörü (IL-18R), IL-18' in hücre dışı bağlanmasından sorumlu olan bir α zinciri ve sinyal iletiminden sorumlu bir β zincirinden oluşan heterodimer bir yapıdadır (132, 133). IL-18R makrofajlar, lenfositler, nötrofiller, NK hücreleri, endotelyal, epitelyal ve düz kas hücreleri gibi hücrelerde eksprese edilir (120, 134, 135).

IL-18R, toll-like reseptörleri ile ortak hücre içi efektör yolakları kullanır (136). IL-18' in IL-18Rα zincirine bağlanmasını takiben, IL-18Rβ, miyeloid diferansiyasyon 88 (*Myeloid Differentiation* 88, MyD88), IL-1R-ilişkili kinaz (IL-1R-*associated kinase*, IRAK) ve TNF reseptör-ilişkili faktör 6 (TNF *receptor-associated factor* 6, TRAF6) gibi IL-1R ailesi üyeleri tarafından paylaşılan sinyal yolaklarını uyarır (137, 138). NFκB ve mitojen-aktive protein kinazların (*Mitogen-Activated Protein Kinase*, MAPK) da IL-18 sinyalinde yer aldıkları gösterilmiştir (139, 140). IL-18' in pleitropik etkileri düşünüldüğünde, uyarılmasının şekline bağlı olarak farklı hücre gruplarında IL-18' in farklı sinyal moleküllerini aktiflediği düşünülmektedir. Örneğin Th1 hücrelerinde, IL-18' in *Growth Arrest and DNA Damage* 45β (GADD45β) molekülünün ekspresyonunu uyararak seçici olarak IL-18' le uyarılan fakat T-hücre reseptörü aracılı olmayan IFNγ üretimine yol açtığı gösterilmiştir (141). IL-18' in, IL-12 ile de ortak sinyal yolakları olduğu bilinmektedir. Tyk-2 STAT-4 sinyal yolağının IL-12 aracılı IFNγ ekspresyonunda kilit rol oynadığı ve IL-18 molekülünün sinerjistik etki yarattığı bilinmektedir (142). Ayrıca, IL-12 tarafından uyarılan STAT-4' ün, IL-18 ile uyarılan AP-1' in IFNγ promotoruna bağlanmasını ve aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (143). IL-12' nin

fonksiyonel IL-18R ekspresyonunu arttırdığı ve bu mekanizmada IFNγ ve STAT-4 ekspresyonunun vazgeçilmez rol aldığı da tespit edilmiştir (144).

2.4.2. IL-18' in Anti-tümör Etkileri ve Kanser Gen Tedavisindeki Yeri

IL-18, T ve NK hücre olgunlaşmasına yol açar, bu hücrelerden IFNγ yapımını uyarır ve sitotoksisitelerini arttırır. Bu etkileri nedeniyle IL-12 ile sinerji gösterir. Özellikle IL-12 ile birlikte kullanıldığı zaman hücre aracılı immüniteyi uyarmaktadır (120, 145). Bunun yanında, paradoksik olarak IL-4 ve IL-2 varlığında IgE ekspresyonuna ve Th2 diferansiyasyonuna yol açmaktadır (120). IL-18' in Th2 yönelimini uyarabilme yeteneğinin CD4+ T hücreleri, IL-4 ve STAT-6 bağımlı olduğu gösterilmiştir (146).

Rekombinant IL-12 proteininin (147-150) ve IL-12 salıvermek üzere genetik olarak değiştirilmiş fibroblastların veya tümör hücrelerinin (151, 152) uygulandığı fare çalışmalarında IL-12' nin anti-tümör etkileri gösterilmiştir. IL-18 ile IL-12 arasındaki immünolojik benzerlik, IL-18' in de anti-tümör immüniteyi uyarma amacıyla kullanılabileceğini düşündürmüştür. Micallef ve diğ. (153) fare Meth A sarkom modelinde rekombinant IL-18' in anti-tümör etkilerini göstermişler ve anti-tümör immün cevabının NK hücreleri ve sitotoksik CD4+ T hücrelerinin oluşmasına bağlı olduğunu bildirmişlerdir. IL-18' in anti-tümör etki mekanizmasının IL-12' den farklılık gösterdiği Hashimoto ve diğ. (154) tarafından yapılan bir çalışmada bildirilmiştir. Bu çalışmada, fare melanom modelinde rekombinant IL-18 ve IL-12 uygulamalarının *in vivo* tümör büyümesini eşit oranda engelledikleri gösterilmiştir. Ancak IL-18' in anti-tümör etkisini Fas Ligand (FasL)-aracılı tümör-öldürücü aktiviteyi arttırarak, IL-12' nin ise tamamen perforin-aracılı sitotoksisiteyi arttırarak gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca IL-18' in anti-anjiyojenik etkisinin olduğu da bilinmektedir. Cao ve diğ. (155) tarafından IL-18' in, fibroblast büyüme faktörü ile uyarılan kapiller endotel hücre proliferasyonunu engellediği gösterilmiştir. Ayrıca eksojen IL-18, korneada fibroblast büyüme faktörü tarafından uyarılan yeni damarlanma oluşumunu da baskılamaktadır. Yine aynı çalışmada *in vivo* IL-18 uygulamasının fibrosarkom büyümesini engellediği ve tümör damarlanmasında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir.

IL-18 ile gen tedavisi çalışmalarında da etkin anti-tümör cevaplar gösterilmiştir. Olgun IL-18 eksprese etmek üzere tasarlanmış retroviral vektörle transfekte nöroblastom hücre hattı, sinjenik fareye uygulandığında tümör reddi gözlenmiş, IL-18 içermeyen parental tümör hücreleri ise yüksek oranda tümör oluşturucu etkiye sahip bulunmuştur. Ayrıca, CD4+ ve/veya CD8+ T-hücreden yoksun farelere IL-18 eksprese eden tümör hücreleri uygulandığında tümör oluşturdukları görülmüştür, bu bulgu da IL-18' in anti-tümör etkisinin T-hücre bağımlı olduğunu göstermiştir (156). IL-18 ve IL-12 eksprese etmek üzere değiştirilmiş fare meme karsinom hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada ise, ikili uygulamanın tümör gerilemesini sağlamada daha etkili olduğu gösterilmiştir (157). Antikor nötralizasyon çalışmaları, iki molekülün anti-tümör etkisinin de IFNγ üzerinden gerçekleştiğini göstermiştir. Ancak tümör uygulamasının ardından yaşayan farelerin sadece yarısında tümöre karşı koruyucu immünitenin olması, korunmanın anti-tümör immün yanıt haricinde başka bir mekanizma üzerinden de olabileceğine işaret etmektedir. Aynı çalışmada IL-12 ve IL-18 eksprese eden tümör hücrelerinin anjiyogenez inhibisyonuna yol açtığı ve ikili uygulamanın daha güçlü bir sistemik anti-anjiyojenik etki gösterdiği bildirilmiştir.

Hara ve diğ. (158) IL-18 eksprese eden renal karsinom hücrelerini sinjenik farelere verdiklerinde tümörün tamamen reddedildiğini ve uzak bölgeye parental renal karsinom hücre enjeksiyonu sonrasında da aşı etkisinin geliştiğini bildirmişlerdir. Fare melanom modelinde yapılan bir diğer çalışmada ise, IL-18 cDNA transfekte edilmiş melanom hücrelerinin sinjenik farelere enjeksiyonunun tümör büyümesini gerilettiği ve anti-tümör etkinliğin başlıca anti-anjiyojenik etkiye bağlı olarak geliştiği gösterilmiştir (159). IL-18 tarafından uyarılan IFNγ' nın bu etkiye, anti-anjiyojenik kemokinleri, IFN ile uyarılabilir protein-10 ve IFNγ ile uyarılan monokini arttırarak, anjiyojenik faktör olan anjiyogenini ise azaltarak yol açtığı bildirilmiştir. Fare melanom modelinde yapılan bir diğer çalışmada ise IL-18 ve B7.1 eksprese eden plazmid enjeksiyonunun eşlik eden lokal radyoterapi ile tümör büyümesini etkili bir şekilde engellediği gösterilmiştir (160).

2.5. CD40L (CD154) Molekülü

CD40 Ligandı (CD40L) ve reseptörü CD40, T ve B-hücreleri arasındaki etkileşimin anahtar molekülleridir. CD40, TNF reseptör süper ailesine ait bir tip I membran glukoproteinidir. Mesane karsinom hücrelerinde ve B-hücrelerinde 1985 yılında tanımlanmış (161) ve 1989 yılında klonlanmıştır (162). 1992 yılında CD40 molekülünün ligandı olan, bir tip II transmembran proteini ve TNF süper ailesine ait CD40L' ın izolasyonu ve klonlanması (163, 164) sonrası, CD40-CD40L etkileşiminin doğal ve adaptif immünitenin düzenlenmesinde kilit rol oynadığı gösterilmiştir.

2.5.1. CD40L Molekülü, Geni, Düzenlenmesi ve Sinyal İletimi

CD40L, aktif CD4+ T-hücreleri, bazofiller ve mast hücreleri yüzeyinde eksprese olur. CD40L 'ın B-hücre yüzeyinde bulunan CD40 reseptörüne bağlanması ile B-hücrelerinde proliferasyon, diferansiyasyon ve immünglobülin sınıf dönüşümü gerçekleşir (165). CD40L, dendritik hücreler ve makrofajlar gibi antijen sunucu hücrelerin aktivasyonu için de gereklidir. Bu aktivasyon, sitokin salınımında, CD80 (B7-1) ve CD86 (B7-2) gibi kostimülatör moleküllerin ekspresyonunda artışa ve ardından T-hücre yüzeyindeki CD28' e bağlanmaya neden olur (166). Böylece, antijene özgül T-hücrelerinin, STL ve NK hücrelerinin çoğalması ve aktivasyonu gerçekleşir (167). CD40 molekülü sadece lenfoid hücrelerde değil, aynı zamanda nöronal, epitelyal ve endotelyal hücrelerde ve fibroblastlarda gösterilmiştir (168-170).

CD40-CD40L yolağının bozulması insanlarda X' e bağlı hiper IgM sendromu olarak karşımıza çıkmaktadır. CD40L genindeki mutasyonların sonucu ortaya çıkan bu sendrom antijenlere karşı timus-bağımlı cevaplarda azalma, germinal merkez oluşumunun bozulması, tekrarlayan enfeksiyonlar ve karsinom ve lenfoma oluşumunda artış ile tanımlanan ağır bir immün yetmezliktir (171, 172).

Fare CD40L cDNA' sı, 22 amino asit (aa) sitoplazmik, 24 aa transmembran ve 214 aa hücre dışı bölgeler olmak üzere 260 aa' lik bir polipeptidi kodlar (173). İnsan CD40L cDNA' sı ise 22 amino asit (aa) sitoplazmik, 24 aa transmembran ve 215 aa hücre dışı bölgeler olmak üzere

261 aa' lik bir polipeptidi kodlar (173). CD40L molekülü 32-33 kDa ağırlığındadır, insan ve fare CD40L molekülleri %78 homoloji gösterir (164, 173). CD40L geni X kromozomunda yer alır. İnsan CD40L geni 12-13 kb büyüklüğünde kromozomal DNA bölgesini kapsar, beş ekson ve dört introndan oluşmaktadır (174). İlk ekson hücre içi, transmembran ve hücre dışı bölgenin küçük bir bölümünü kodlarken, II-V. eksonlar hücre dışı bölgenin geri kalan kısmını kodlarlar. Genomik dizinin 5' bölgesinde yaklaşık 2000 bp büyüklüğünde promotor bölgesi yer alır (173). Fare CD40L geni de 5 eksondan oluşmaktadır (175, 176).

CD40L hücre yüzeyinde homotrimer olarak bulunur. Tip II transmembran protein olarak üretilse de, hücre yüzeyinde heteromultimerik yapılar halinde de eksprese edilebilir (177). 33 kDa büyüklüğündeki molekül haricinde 31 ve 18 kDa ağırlığında iki formu daha vardır (178, 179). Daha kısa olan bu moleküller çözünür moleküllerdir, trimer oluşturabilirler, CD40' a bağlanırlar ve biyolojik sinyalleri iletebilirler. CD40L böylece gerçek bir sitokin gibi hareket etmektedir. Bu moleküllerin, aktiflenmiş T-hücresinin sitoplazmasındaki mikrozomal veya lizozomal bölümlerde ve hatta yüzeyinde kısmi proteolitik degradasyon ve tekrar kullanıma sokulma sonucu oluştuğu öne sürülmektedir (180, 181).

CD40L ekspresyonu çok sıkı bir denetim altında gerçekleşir. T-hücre reseptörünün bağlanması, aktiflenmiş T-hücrelerinin yüzeyinde CD40L ekspresyonunun uyarılmasına yol açar. Ayrıca kostimülatör ve sitokin sinyalleri de CD40L ekspresyonunda artışa sebep olur. T-hücrenin uyarılmasından 1-2 saat sonra CD40L mRNA ekspresyonu en yüksek seviyeye ulaşır ve 4-6 saat içerisinde hücre yüzeyinde CD40L proteini eksprese edilir. 16 saat sonunda ise hücre yüzeyinden tamamen kaybolur (182). Geçici olarak gerçekleşen CD40L ekspresyonu antijenle aktiflenmiş T-hücresine, etkileşimde olduğu B-hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücrelere yardımcı sinyaller gönderebilmesi için kısa bir zaman tanımış olur. CD28, Lenfosit Fonksiyon İlişkili Antijen-3 (*Lymphocyte Function Associated Antigen-3,* LFA-3) ve uyarılabilir kostimülatör (*Inducible costimulator*, ICOS) gibi hücre yüzey aksesuar moleküllerinin CD40L ekspresyonunu arttırdığı

gösterilmiştir (183-185). IL-2, IL-12 ve IL-15' in CD40L ekspresyonunu arttırdığı, IL-4 ve IL-10' un ise azalttığı bilinmektedir (186-188).

CD40L gen transkripsiyonuna yol açan başlıca ikincil mesajcı, serbest iyonize sitoplazmik kalsiyumdur (Ca^{+2}). Ca^{+2} bağımlı bir fosfataz olan kalsinörinin aktiflenmiş T-hücrelerinin nükleer faktörü (*Nuclear Factor of Activated T cells*, NFAT) olarak bilinen transkripsiyon faktörünü defosforile etmesi, NFAT aktivasyonuna ve nükleusa gitmesine yol açar. Aktif NFAT, AP-1 ile birlikte CD40L' ın transkripsiyonel düzenlenmesinde kilit rol oynar. Kalsinörin yolağının etkili bir inhibitörü olan siklosporinin normal T-hücrelerinde CD40L ekspresyonunu ortadan kaldırdığı gösterilerek bu yolaklar aydınlatılmıştır (182).

CD40L ekspresyonu post-transkripsiyonel seviyede de düzenlenmektedir. Anti-CD3 monoklonal antikorla uyarılan CD40L mRNA stabilitesinin T-hücre reseptörünün ligasyon süresi uzadıkça arttığı gösterilmiştir (189). İyonomisin ile uyarılan CD40L mRNA stabilitesi bir forbol esteri veya bir cAMP uyarıcı ajan ile artmaktadır. T-hücre reseptörü bağlanmasını takiben CD28 bağlanması ve IL-12' nin etkisiyle CD40L mRNA' sının yarı ömrünün arttığı bildirilmiştir. Sitokinlerle uyarım çalışmalarında da p38 ve jun N-terminal kinaz gibi stresle aktiflenen mitojen-aktive protein kinazlar CD40L mRNA stabilitesini arttırmaktadır (190, 191).

Post-tranlasyonel düzeydeki düzenlenmesinde ise hücre yüzeyindeki CD40L' ın endositozu veya metalloproteinaz aracılı enzimatik parçalanması sonucu çözünür CD40L oluşması rol oynamaktadır (192).

CD40L' ın reseptörü CD40 molekülünün sitoplazmik kuyruğunun intrinsik kinaz aktivitesi yoktur. CD40L' ın bağlanması sonrasında, sinyal TRAF ailesinin adaptör proteinlerinin çağrılması ile iletilir. CD40' ın sitoplazmik kuyruğundaki iki bölge TRAF ile etkileşim ve sinyal aktivasyonu açısından önemlidir. Membrana yakın yerleşimli ve Gln^{234} ve Glu^{235} amino asitlerini içeren bölge TRAF6 bağlanmasından, $Pro^{250}XGln^{252}XThr^{254}$ motifi ise TRAF2 ve TRAF3, dolaylı olarak da TRAF5 bağlanmasından sorumludur (193). TRAF adaptör moleküllerinin çağrılmaları ve trimerizasyonu c-Jun N-terminal kinaz, hücre dışı sinyalle-düzenlenen kinaz (*Extracellular Signal-*

Regulated Kinase, ERK) ve p38 MAPK sinyal yolaklarının, NFκB ve STAT transkripsiyon faktörlerinin ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) kaskadının aktivasyonunu tetikler (193-196).

2.5.2. CD40L' ın Antitümör Etkileri ve Kanser Gen Tedavisindeki Yeri

CD40 molekülü sadece hematopoietik hücrelerde değil, çok çeşitli normal ve hastalıklı hücrede tespit edilmiştir. CD40, endotelyal hücreler, nöronal hücreler, fibroblastlar, düz kas hücreleri ve timik epitelyal hücrelerde eksprese edilir (168, 170, 197). Aynı zamanda insan çok katlı yassı epitelinin bazal proliferatif tabakasında, normal over ve meme epitel dokularında da düşük düzeylerde bulunmuştur (169, 198).

Normal dokulardaki yaygın ekspresyonunun yanında çeşitli tümörlerde de CD40 ekspresyonu gösterilmiştir. Hodgkin hastalığında ve non-Hodgkin lenfomada, kronik lenfositik lösemide (KLL), multipl miyelomda, akut miyeloid lösemide (AML) CD40 ekspresyonu vardır (199-202). Melanom ve yumuşak doku sarkomlarında da CD40 ekspresyonunun varlığı bilinmektedir (203-205). Nazofarinks, mesane, serviks ve over karsinomlarında da yüksek seviyelerde ekspresyonu gösterilmiştir (206-209). Karsinomlarda ve lenfomalarda bu kadar yaygın CD40 ekspresyonu bu reseptörün kanser patogenezinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Örneğin, non-Hodgkin lenfoma, Burkitt lenfoma ve KLL hücreleri tarafından düşük miktarda CD40L ekspresyonu otonom proliferasyonun devamlılığını sağlamakta ve anti-apoptotik etki göstermektedir (210-212). Aynı çalışmalarda, CD40L nötralize edici antikorlar kullanıldığında, CD40 aktivasyonun engellenmesi sonucu, B-hücre malign gelişiminin *in vitro* baskılandığı ve hücre ölümünün uyarıldığı görülmüştür.

Burkitt lenfoma, primer yüksek-*grade* B-hücre lenfoma ve multipl miyelom hücrelerinin CD40L ile muamelesi, proliferasyonlarını hem *in vitro* koşullarda hem de fare modellerinde belirgin şekilde azaltmıştır (200, 213). Bu durum CD40 bağlanmasının normal B-hücrelerindeki ve KLL, *hairy cell* lösemi ve foliküler lenfoma gibi düşük-*grade* B-hücre malignansilerindeki proliferatif etkisiyle (214) çelişmektedir, aslında CD40' ın uyarılmasının diferansiyasyon basamağına bağımlı bir cevap oluşturduğunu göstermektedir.

CD40 bağlanmasının düzeyinin de *in vitro* lenfoma büyümesini etkilediği gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda eksojen CD40L uygulaması Burkitt lenfoma hücrelerinin proliferasyonunu baskılarken, düşük düzeyde bağlanma yaşam sürelerini arttırmaktadır (211). CD40' ın apoptozisi düzenleme yeteneğindeki farklılıklar da lösemi ve lenfomalarda gösterilmiştir. Bu malignansilerin pek çoğunda ve normal germinal merkez B-hücrelerinde CD40 bağlanması, Bcl-2, A20, Bcl-xL, Bfl1 ve hücresel FLICE (FADD-benzeri ICE)-inhibitör protein (*cellular* FLICE-*inhibitory protein*, cFLIP) gibi yaşamsal proteinlerin ekspresyonunu uyarmakta ve serum açlığı, anti-Fas, TNF-İlişkili Apoptozis Uyarıcı Ligand (TNF-*Related Apoptosis Inducing Ligand*, TRAIL) veya genotoksik ajanlarla uyarılan apoptozisi engellemektedir (215, 216). Bunun yanında, CD40 bağlanması, non-Hodgkin lenfoma ve KLL hücrelerini anti-Fas ile uyarılan apoptozise karşı duyarlı hale getirmektedir (217, 218). Bu etkinin Fas molekülünün CD40 aracılı artışı ve cFLIP molekülünün azalması ile oluştuğu gösterilmiştir.

Karsinom modellerinde yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Mesane ve over tümör hücrelerinin CD40L ile muamelesi, büyümede gerilemeye ve seramid, anti-Fas monoklonal antikor ve sisplatin ile uyarılan apoptozise karşı duyarlılıkta artışa yol açmıştır (219). İmmün yetmezlikli hayvanlarda yapılan çalışmalarda da tek başına veya kemoterapi ile birlikte CD40L tedavisinin meme ve over tümörlerinde tümör büyümesini engellediği ve tümörlü hayvanların yaşam sürelerini uzattığı gösterilmiştir (220-222). CD40 aynı zamanda karsinom hücrelerinde ölüm sinyallerini de iletmektedir. CD40, TNF reseptör-1, Fas ve TRAIL reseptörleri gibi ölüm reseptörlerinin taşıdığı ölüm bölgelerine sahip değildir. Ayrıca karsinomlarda CD40 bağlanmasının pro-apoptotik etkilerinin, protein sentezi inhibitörü siklohekzimid (223, 224) veya protein sentezini engelleyen kemoterapötik ajanlar (219, 222) kullanıldığında belirgin olarak arttığı bilinmektedir. CD40' ın CD40L' la bağlanması sonrasında güçlü yaşam sinyalleri ileterek apoptozis uyarıcı etkilerini karşıladığı söylenebilir. Karsinom hücrelerinde CD40 bağlanması sonucu oluşan pro-apoptotik etkiler, otokrin ve/veya parakrin hücre ölümüne yol açan FasL (CD95L), TNF ve TRAIL gibi TNF ailesine ait

membrana bağlı sitotoksik ligandların artışına bağlı olarak gelişmektedir (223, 225, 226). İnsan over tümör zenograftlarını taşıyan farelerde de CD40L uygulamasının tümör kitlesinde FasL uyarılmasına yol açtığı gösterilmiştir (222). CD40 bağlanması ile aktiflenen pro-apoptotik sinyallerin Fosfoinositid-3 Kinaz (PI3K) ve ERK yolaklarının aktivasyonu ile etkisiz hale getirilebildiği de bildirilmiştir (196). Tüm bunlara dayanarak CD40L aracılı tümör immün tedavilerinde, CD40' la uyarılan yaşam sinyallerinin protein sentez basamaklarının veya protein sentezi öncesindeki kinaz aktivitelerinin kemoterapi ile bozularak, karsinom hücrelerinin CD40L aracılı apoptozise duyarlı hale getirilmeleri anlamlı görünmektedir.

CD40L bağlanmasının tümörler üzerinde doğrudan oluşturduğu anti-proliferatif etkinin yanında, CD40L molekülünün immün tanınmada ve sitotoksik T-hücre cevaplarının oluşumundaki etkisi de, kansere karşı immün tedavi seçeneklerinin oluşturulmasında önemli rol oynamaktadır. B-hücre büyümesi ve diferansiyasyonundaki rolü haricinde, CD40-CD40L etkileşimi STL cevaplarının oluşması sırasındaki T-hücre yardımında kilit rol oynamaktadır (227, 228). Bu etki, dendritik hücrelerin yüzeyindeki CD40 ile antijenle uyarılmış yardımcı T-hücrelerinin yüzeyindeki CD40L molekülünün bağlanması ile gerçekleşir. Güçlü tümör aşılarına karşı gelişen koruyucu immün cevapların oluşması anti-CD40L antikorlarının kullanılmasıyla engellenmiş ve CD40' dan yoksun farelerin anti-tümör immün cevap geliştiremediği gösterilmiştir (229). CD40 bağlanmasının tümör hücrelerinin yüzeyindeki CD40 ekspresyonundan bağımsız olarak, anti-tümör immün cevapları arttırdığı, bu etkinin de CD40L' ın dendritik hücre olgunlaşmasını uyarma yeteneğinden kaynaklandığını gösteren bir çok çalışma yapılmıştır (230). Tümöre özgül T-hücrelerinin aktivasyonu dışında, CD40L uyarılması CD40-pozitif tümörlerin antijen işleme ve sunumunu (203, 231) ve NK hücre sitotoksisitesini (232) arttırmaktadır.

CD40L geninin tümör hücrelerine veya dendritik hücrelere aktarılmasını hedefleyen gen tedavisi çalışmaları da yapılmaktadır. İlk çalışmalarda, CD40L geninin tümör hücrelerinin küçük bir bölümünde stabil ekspresyonunun $CD8^+$ T-hücreleri üzerinden uzun süreli sistemik anti-tümör

cevabı uyarmada yeterli olduğu gösterilmiştir (233). Çeşitli *in vivo* deneysel modelde tümörlere veya dendritik hücrelere doğrudan CD40L aktarmak amacıyla rekombinant adenovirüsler kullanılmıştır. Sinjenik deneysel melanom, kolon karsinomu ve akciğer karsinomu modellerinde CD40L genini taşıyan rekombinant adenoviral vektörün cilt altı tümörlere doğrudan enjeksiyonu tümör gerilemesine yol açmıştır (234). Dendritik hücrelerin *ex vivo* transfeksiyonu sonrası cilt altı tümörlere enjekte edilmesi ise tümör nodülünü yok ettiği gibi, aynı farede enjeksiyon yapılmayan tümörlerde gerileme ve daha sonraki tümör oluşturma uygulamasına karşı da korunma sağlamıştır (235). Sinjenik kolorektal karsinomu, akciğer karsinomu ve melanom modellerinde tümör içi adenoviral vektör enjeksiyonu ile görülen tedavi edici etkinin lokal sitokin ve kemokin artışıyla ilişkili olduğu da gösterilmiştir (234, 236). CD40L geninin diğer sitokin genleriyle birlikte kullanıldığı bazı çalışmalarda da anti-tümör immünitenin daha da artarak elde edildiği görülmüştür (237). İlerlemiş solid tümörlü ve non-Hodgkin lenfomalı hastalara cilt altı uygulanan veya KLL' li hastaların hücrelerine *ex vivo* uygulanan rekombinant adenoviral vektör ile CD40L gen tedavisi faz I klinik çalışmalarında belirgin bir sitotoksisite saptanmamış ve klinik etkinlik elde edilmiştir (238, 239).

Trimerik CD40L genini ve bir model tümör antijenini eksprese eden iki ayrı plazmidin cilt altı enjeksiyonu etkin STL uyarımı sonucu metastatik tümör büyümesini engellemiştir (240). CD40L' la birleştirilmiş tümör-ilişkili antijen eksprese eden rekombinant adenovirüslerle yapılan bir başka çalışmada da *self*-antijene karşı tolerans yenilmiş, tümörlerde gerileme tespit edilmiş ve koruyucu anti-tümör immünite gelişmiştir (241).

Lentiviral vektörlerle yapılan bir çalışmada ise Multipl Miyelom hastalarından elde edilen multipl miyelom hücrelerine CD80 ve CD40L genleri aktarılarak antijen sunucu hücre yeteneklerinin arttırılması hedeflenmiştir (242). Hücreler *in vitro* değerlendirildiğinde MHC kısıtlı ve Multipl Miyeloma özgül $CD8^+$ STL cevabının geliştiği gösterilmiştir. TNF ailesine ait CD40L, NFκB Ligand' ın Reseptör Aktivatörü *(Receptor Activator of* NFκB *Ligand,* RANKL) ve 4-1BBL genlerini taşıyan rekombinant adenoviral vektörlerin iki

ayrı deneysel kanser modelinde karşılaştırmalı analizleri yapıldığında, tümör içi enjeksiyon sonrası tüm gruplarda tümör büyümesinde gerileme tespit edilmiştir (243). Rekombinant vektörlerle transdükte edilmiş dendritik hücrelerin tümör içi uygulaması sonucunda da tümörlerde gerileme saptanmıştır. Ancak CD40L geni aktarılmış dendritik hücrelerin diğerlerine göre belirgin şekilde daha yüksek IL-12, CD80, CD86 ve CD40 ekspresyonuna sahip olduğu gösterilmiş ve CD40L gen tedavisinin en güçlü anti-tümör etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Mesane kanseri modelinde yapılan tümör içi adenovirüs aracılı CD40L gen tedavisi ile de etkili anti-tümör cevabı elde edilmiş ve tedavinin Th1 sitokinlerini arttırdığı gösterilmiştir (244). Regülatör T-hücre cevaplarının da araştırıldığı bu çalışmada farklı tedavi grupları arasında, tümör örneklerinde regülatör T-hücre transkripsiyon faktörü *Forkhead box* P3 (Foxp3) mRNA düzeyleri arasında fark olmadığı, ancak CD40L aktarılan grubun lenf nodlarında Foxp3 mRNA miktarının azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca CD40L ile tedavi edilen gruba ait T-hücrelerinin naive T-hücrelerinin proliferasyonunu engelleyemediği, tümör taşıyan kontrol grubunda ise inhibisyon etkisinin olduğu gösterilmiştir.

Tüm bu bilgiler ışığında, bu çalışmada kanser immüngen tedavisinde kullanılmak üzere fare IL-18 ve CD40L genlerini taşıyan metabolik zayıflatılmış *STaroB* suşlarının oluşturulması planlandı. *Salmonella*, doğal hedefinin monosit-makrofaj sistemi olması ve tümör dokularını yüksek oranda kolonize etmesi nedeniyle vektör olarak seçilmiştir. Hem bakterinin hem de memeli dokusunda eksprese olan IL-18 ve CD40L moleküllerinin etkisiyle anti-tümör immün cevapları uyarmak için *STaroB* gen tedavisi vektörlerinin geliştirilmesi ve etkinliklerinin *in vivo* değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuarları, Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuarı ve University of Cambridge, Centre for Veterinary Science, Department of Veterinary Medicine Laboratuarları' nda gerçekleştirildi. Otomatik DNA dizi analizi deneyleri ise Ankara Üniversitesi, Hepatoloji Enstitüsü Laboratuarları' nda yapıldı.

3.1. Gereçler

3.1.1. Hayvanlar

Periferik kan mononükleer hücre ve splenosit eldesi amacıyla kullanılan 6-8 haftalık dişi Balb/*c* fareler, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı, Deney Hayvanlar Kısmı' ndan temin edildi. Rekombinant *STaroB* bakterisiyle yapılan *in vivo* deneyler University of Cambridge, Centre for Veterinary Science, Department of Veterinary Medicine Laboratuarları' nda gerçekleştirildi ve 6-8 haftalık dişi inbred Balb/*c* fareler (H-2^d) Harlan Olac Ltd. (Blackthorn, Bicester, İngiltere)' den satın alındı. Hayvan deneyleri, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu' nun 22.08.2001 tarih, 2001/50 dosya numaralı ve 2001/50-1 karar numaralı onayı (Bkz. Ek 1) ve University of Cambridge, Centre for Veterinary Science, Department of Veterinary Medicine, Lokal Etik Komitesi izniyle gerçekleştirildi.

3.1.2. Bakteriler

Salmonella typhimurium aroB mutant suşu ve XL1-Blue *E.Coli* suşu Yard.Doç.Dr.A.Günel Özcan (Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı) tarafından hediye edildi. JM-109 *E.Coli* suşu pTargeT Mammalian Expression Vector System (Promega, Madison, WI, ABD) içerisinde satın alındı. Ayrıca, moleküler klonlama çalışmalarında DH5α *E.Coli* kompetan hücreleri (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) kullanıldı. *Salmonella* suşu LB5010, Dr.A.J.Grant (University of Cambridge, Centre for

Veterinary Science, Department of Veterinary Medicine, Cambridge, İngiltere) tarafından hediye edildi.

3.1.3. Memeli Ekspresyon Vektörleri

pTargeT memeli ekspresyon vektörü, pTargeT Mammalian Expression Vector System (Promega, Madison, WI, ABD) içerisinde satın alındı. pcDNA3 (Invitrogen) memeli ekspresyon vektörü, Dr.A.J.Grant (University of Cambridge, Centre for Veterinary Science, Department of Veterinary Medicine, Cambridge, İngiltere) tarafından hediye edildi.

3.1.4. Hücre Hatları

NIH/3T3 fare fibroblast hücre hattı, Dr.K.Ryan (Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, İngiltere) tarafından hediye edildi. HEK293, insan embriyonik böbrek epitelyal hücre hattı Dr.C.E.Bryant ve C.Walsh (University of Cambridge, Centre for Veterinary Science, Department of Veterinary Medicine, Cambridge, İngiltere) tarafından hediye edildi.

3.1.5. Kimyasal Ajanlar, Reaktifler ve Çeşitli Sarf Malzemeleri

Bacto®-tryptone (Becton Dickinson, Fransa).

Bacto®-yeast extract (DIFCO, Becton Dickinson, ABD).

Bacto®-agar (Becton Dickinson, Fransa).

NaCl (Sigma, Almanya).

Noble agar (Sigma, Almanya).

Glukoz çözeltisi (%45): D(+)-Glucose Solution (45 %) (Sigma, Almanya).

KCl (Carlo Erba, İtalya).

PBS (Phosphate Buffered Saline, Fosfatla Tamponlanmış Tuz) (Sigma, ABD).

X-Gal: 100 mg X-Gal (5-bromo-4-chloro-3 indolyl-β-D-galactoside) (Promega, Madison, WI, ABD) 2 ml N,N´-dimetilformamid (Sigma, Almanya) içerisinde çözüldü. X-Gal stok konsantrasyonu: 50 mg/ml.

IPTG: 1.2 g IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside), Dioxane free (Promega, Madison, WI, ABD) üzerine 50 ml' ye kadar ddH_2O eklendi ve

0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. IPTG stok konsantrasyonu: 0.1 M.

Ampisilin: Ampicillin sodium salt (Sigma, Belçika), stok konsantrasyonu 100 mg/ml olacak şekilde ddH_2O içerisinde çözüldü ve 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi.

Kanamisin: Kanamycin monosulfate (Sigma, Çin), stok konsantrasyonu 40 mg/ml olacak şekilde ddH_2O içerisinde çözüldü ve 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi.

G-418 Antibiyotik: G-418 (Promega, Madison, WI, ABD) antibiyotik (neomisin analoğu) stok konsantrasyonu 100 mg/ml olacak şekilde steril ddH_2O içerisinde çözüldü.

Ficoll: Biocoll Separating Solution, Biochrom AG, Almanya.

10xM9 minimal tuzları : 10xMinimal Salts (Sigma, Almanya).

$CaCl_2$ (Merck, Almanya).

$MgSO_4$ (Sigma, Almanya).

TiaminHCl (Sigma, Almanya).

$CaCl_2.2H_2O$ (Merck, Almanya).

$MnCl_2.4H_2O$ (Merck, Almanya).

$MgCl_2.6H_2O$ (Carlo Erba, İtalya).

$MgSO_4.7H_2O$ (Merck, Almanya).

TrisHCl (Applichem, Almanya).

Tris baz (Tris(hidroksimetil)aminometan): Trizma® base (Sigma, ABD).

EDTA (Etilen diamintetraasetik asit) (Sigma, ABD).

Lizozim (Sigma, ABD)

NaOH (Carlo Erba, İtalya).

HCl (Merck, Almanya)

SDS (Sodyum dodesil sülfat) (Sigma, ABD).

D(+)-Glukoz (Sigma, Almanya).

Gliserol (BDH Laboratories, England).

Sodyum asetat (CH_3COONa) (Sigma, ABD).

Metanol (Merck, Almanya).

Aseton (Merck, Almanya).

BSA (Bovine Serum Albumin, Sığır Serum Albumini)(Sigma, ABD).

LPS (Lipopolisakkarid) (Sigma, ABD).

İzopropanol (Sigma, Almanya).

Tripsin-EDTA (Sigma, ABD).

TRIzol® Reagent (GIBCO BRL, İngiltere).

Fenol (Sigma, ABD).

Kloroform (Carlo Erba, İtalya).

Etanol: Saf Etanol (Fisher Scientific, İngiltere) kullanıldı, ayrıca istenilen konsantrasyonlar steril ddH_2O eklenerek hazırlandı.

β-Merkaptoetanol (Sigma, İngiltere).

DEPC (Dietil pirokarbonat): RNA izolasyonunda kullanılan tüm solüsyonlar hazırlanırken %0.1 (hacim/hacim) DEPC (Sigma, ABD) ile muamele edilmiş ddH_2O kullanıldı. Cam şişe içerisinde %0.1 (hacim/hacim) DEPC eklenmiş ddH_2O, kapağı gevşetilmiş olarak oda sıcaklığında gece boyu bekletildi ve ertesi gün otoklavlandı.

Lympholyte M: Lympholyte M (Cedarlane Labs, Kanada) Yard.Doç.Dr.Ü.Bağrıaçık (Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı) tarafından hediye edildi.

dNTPkarışımı: dNTPmix 25 mM each, 100 mM total (Bio Line, İngiltere) ve 10 mM dNTP PCR Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD).

DMSO (Dimetil sülfoksid) (Sigma, ABD).

RNA Later (Qiagen, Hilden, Almanya).

Hücre süzgeci: Falcon Cell Strainer, 70 µm nylon (Becton Dickinson, NJ, ABD) Yard.Doç.Dr.Ü.Bağrıaçık (Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı) tarafından hediye edildi.

Elektroporasyon küvetleri: BioRad gene Pulser Cuvette, 0.2 cm (BioRad Laboratories, CA, ABD).

Stomacher torbaları: Stomacher 80 Biomaster Seward Standard Bags (İngiltere).

RNA izolasyonu için doku parçalanması ve homojenizasyonu için paslanmaz çelik bilye: Stainless steel ball bearings, 5 mm (Retsch, İngiltere).

Sterilizasyon filtreleri: Osmonics Inc, Cameo 25 AS Syringe Filter, Acetate, Sterile, 0.22 micron.

3.1.6. Tamponlar ve Çözeltiler

PBS çözeltisi: 200 ml ddH_2O içerisinde 1 PBS tableti çözüldü ve otoklavlanarak sterilize edildi.

%20 Glukoz çözeltisi: %45 glukoz çözeltisinden 20 ml alınıp üzerine 25 ml steril ddH_2O eklendi.

1 M NaCl çözeltisi: 100 ml steril ddH_2O içerisinde 5.84 g NaCl çözülerek 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi.

1 M KCl çözeltisi: 100 ml steril ddH_2O içerisinde 7.45 g KCl çözülerek 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi.

2 M Mg^{+2} stok çözeltisi: 20.33 g $MgCl_2.6H_2O$ ve 24.65 g $MgSO_4.7H_2O$ üzerine 100 ml' ye kadar ddH_2O eklenerek 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi.

10xM9 minimal tuz çözeltisi: 11.28 g 10xM9 minimal tuzları üzerine 100 ml' ye kadar ddH_2O eklenerek karıştırıldı, NaOH ile pH.7.2' ye ayarlandı ve otoklavlanarak sterilize edildi.

10 mM $CaCl_2$ çözeltisi: 0.111 g $CaCl_2$ üzerine 100 ml' ye kadar ddH_2O eklenerek karıştırıldı ve otoklavlanarak sterilize edildi.

100 mM $MgSO_4$ çözeltisi: 1.204 g $MgSO_4$ üzerine 100 ml' ye kadar ddH_2O eklenerek karıştırıldı ve otoklavlanarak sterilize edildi.

$CaCl_2$/$MgSO_4$ çözeltisi: 2 ml $CaCl_2$ çözeltisi (10 mM) ile 100 ml $MgSO_4$ çözeltisi (100 mM) karıştırıldı.

%1 Tiamin çözeltisi: 100 mg tiaminHCl 10 ml ddH_2O içerisinde çözüldü ve 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi.

Kompetan hücre çözeltisi: 656 mg sodyum asetat 50 ml ddH_2O içerisinde çözüldü, üzerine 2.94 g $CaCl_2.2H_2O$ ve 2.772 g $MnCl_2.4H_2O$ eklenerek HCl ile pH 5.5' e ayarlandı. Hacim 200 ml' ye kadar ddH_2O ile tamamlandı ve tekrar pH ölçümü yapılarak HCl ile 5.5' e ayarlandı. 0.22 µm

filtreden geçirilerek sterilize edildi. Sodyum asetat son konsantrasyonu: 40 mM, $CaCl_2.2H_2O$ son konsantrasyonu: 100 mM, $MnCl_2.4H_2O$ son konsantrasyonu: 70 mM.

Lizis tamponu: 1 ml 2 M glukoz çözeltisi, 121.1 mg Tris baz, 800 µl 500 mM EDTA çözeltisi ve 80 mg lizozim üzerine 40 ml' ye kadar steril ddH_2O eklendi ve karıştırıldı. Glukoz son konsantrasyonu: 50 mM, Tris baz son konsantrasyonu: 25 mM, EDTA son konsantrasyonu: 10 mM, lizozim son konsantrasyonu: 2 mg/ml.

2 M Glukoz çözeltisi: 39.63 g D(+)-Glucose 100 ml steril ddH_2O içinde çözüldü ve 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi.

0.2 M NaOH/ %1 SDS çözeltisi: 390 mg NaOH ve 500 mg SDS üzerine 50 ml' ye kadar steril ddH_2O eklendi ve karıştırıldı.

500 mM TrisHCl çözeltisi: 39.4 g TrisHCl, 450 ml ddH_2O içerisinde çözüldü. Karışımın pH' sı NaOH ile 8.00' a getirildi. Üzerine 500 ml' ye kadar ddH_2O eklendi ve otoklavlanarak sterilize edildi.

500 mM EDTA çözeltisi: 93 g EDTA, 450 ml ddH_2O içerisinde çözüldü. Karışımın pH' sı NaOH ile 8.00' a getirildi. Üzerine 500 ml' ye kadar ddH_2O eklendi ve otoklavlanarak sterilize edildi.

TE tampon (10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH: 8.00): 1 ml 500 mM TrisHCl çözeltisinden, 0.1 ml 500 mM EDTA çözeltisinden alınarak karıştırıldı, üzerine 50 ml' ye kadar ddH_2O eklendi ve 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi.

TE tampon (20 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH: 8.00): 2 ml 500 mM TrisHCl çözeltisinden, 0.1 ml 500 mM EDTA çözeltisinden alınarak karıştırıldı, üzerine 50 ml' ye kadar ddH_2O eklendi ve 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi.

3 M Sodyum asetat (pH: 4.8, 4.6, 6.0): 24.6 g sodyum asetat 100 ml ddH_2O içerisinde çözüldü ve 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi.

Fenol/TE tampon: Eşit hacimde fenol ve TE tampon (10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH: 8.00) karıştırılarak hazırlandı.

%80 Gliserol çözeltisi: 80 ml gliserol üzerine 20 ml ddH_2O eklendi ve otoklavlanarak sterilize edildi.

%10 Gliserol çözeltisi: 10 ml gliserol üzerine 90 ml ddH_2O eklendi ve otoklavlanarak sterilize edildi.

%80 izopropanol: 80 ml izopropanol üzerine 20 ml steril ddH_2O eklenerek hazırlandı.

Metanol-Aseton çözeltisi: Eşit hacimde metanol ve aseton birleştirilerek hazırlandı.

Bloklama tamponu: 100 ml PBS çözeltisi içinde 1 g BSA çözüldü ve 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi.

3.1.7. Bakteri Kültüründe Kullanılan Medya

Luria-Broth (LB) medyum: 10 g Bacto®-tryptone, 5 g Bacto®-*yeast extract* ve 5 g NaCl, 1 litre ddH_2O içerisinde karıştırıldıktan sonra NaOH ile pH:7.00 olarak ayarlandı ve otoklavlanarak sterilize edildi.

2xLB medyum: 20 g Bacto®-tryptone, 10 g Bacto®-*yeast extract* ve 1 g NaCl, 1 litre ddH_2O içerisinde karıştırıldıktan sonra NaOH ile pH:7.00 olarak ayarlandı ve otoklavlanarak sterilize edildi. Soğuması beklendikten sonra üzerine 10 ml %20 glukoz çözeltisi eklendi.

LB-Agar: 1 litre LB medyum içerisine 15 g Bacto®-agar eklendi ve karışım otoklavlanarak sterilize edildi.

SOC medyum: 2.0 g Bacto®-Tryptone, 0.5 g Bacto®-*yeast extract*, 1 ml 1 M NaCl ve 0.25 ml 1 M KCl 97 ml ddH_2O içerisine konuldu ve karıştırılarak çözülmesi sağlandı. Otoklavlanarak sterilize edildi ve oda sıcaklığına gelene kadar soğutuldu. 1 ml 2 M Mg^{+2} stok çözeltisi ve 1 ml 2 M glukoz çözeltisi eklenerek son konsantrasyonlarının 20 mM olması sağlandı. 100 ml' ye kadar steril ddH_2O eklendi, pH:7.00' ye ayarlandı ve 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi.

Noble agar: 3.6 g Noble agar üzerine 170 ml' ye kadar ddH_2O eklenerek karıştırıldı ve otoklavlanarak sterilize edildi.

Minimal medyum: 170 ml olarak hazırlanmış Noble agar üzerine 20 ml 10xM9 minimal tuz çözeltisi, 2 ml $CaCl_2$/$MgSO_4$ çözeltisi, 4.4 ml %45 glukoz ve 2 ml %1 tiamin çözeltisi eklenerek karıştırıldı.

X-Gal/IPTG/Ampisilinli LB-agar petrileri: Mikrodalga fırında eritildikten sonra 50°C su banyosunda bekletilerek sıcaklığı 50°C' a indirilen

LB-agar içerisine, laminer akımlı steril kabinde, sırasıyla son konsantrasyonları 0.5 mM ve 80 µg/ml olacak şekilde IPTG (0.1 M) ve X-Gal (50 mg/ml) konuldu. Son konsantrasyon 100 µg/ml olacak şekilde ampisilin eklenmesinin ardından 100 mm' lik petri kaplarına 25-30 ml dökülerek agar soğumaya bırakıldı.

Antibiyotikli LB-agar petrileri: Ampisilinli LB-agar petrileri hazırlanırken, yukarıdaki gibi eritilmiş, soğutulmuş LB-agar içerisine son konsantrasyon 100 µg/ml olacak şekilde ampisilin (100 mg/ml) eklendi, 100 mm' lik petri kaplarına 25-30 ml dökülerek agar soğumaya bırakıldı. Kanamisin de içeren LB-agar petrileri hazırlanırken son konsantrasyon 40 µg/ml olacak şekilde kanamisin (40 mg/ml) eklendi. Sadece kanamisinli LB-agar petrilerine son konsantrasyon 40 µg/ml olacak şekilde kanamisin (40 mg/ml) konuldu.

3.1.8. Hücre Kültüründe Kullanılan Medya

Tam RPMI medyum: RPMI 1640 medyum (Sigma, Almanya) %88, L-Glutamin (Sigma, Almanya) %1, Penisilin/Streptomisin (Biochrom AG, Almanya) %1, Fötal Sığır Serumu (Sigma, Almanya) %10 olacak şekilde hazırlandı.

Tam DMEM medyum:

NIH/3T3 hücrelerinin kültürü için kullanılan tam DMEM medyum: 4.5 g/l D-glukoz ve 0.584 g/ L-Glutamin içeren toz halindeki DMEM (Sigma, Almanya), hücre kültürü için steril ddH_2O (Sigma, Almanya) ile üretici firmanın talimatlarına uyularak sıvı hale getirildi. %7.5 $NaHCO_3$ (Sigma, Almanya) çözeltisinden son konsantrasyon 1.5 g/l $NaHCO_3$ olacak şekilde eklendi, HCL ile pH: 7.2 olarak ayarlandı. Donör Buzağı Serumu (Calf Serum Bovine Donor, Sigma, ABD) %10, Penisilin/Streptomisin (Biochrom AG, Almanya) %1 olacak şekilde eklenerek tam DMEM medyum hazırlandı.

HEK293 hücrelerinin kültürü için kullanılan tam DMEM medyum: 1 g/l D-glukoz ve 3.7 g/l $NaHCO_3$ içeren DMEM medyuma (Sigma, İngiltere) L-Glutamin (Sigma, İngiltere) %1, Penisilin/Streptomisin (Sigma, İngiltere) %1 ve Fötal Sığır Serumu (Sigma, İngiltere) %10 olacak şekilde eklenerek hazırlandı. PolyFect ile transfeksiyon deneyleri sırasında serum ve

penisilin/streptomisin içermeyen DMEM medyum (Sigma, İngiltere) da kullanıldı.

3.1.9. Kitler

Fermentas RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Litvanya).

SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD).

SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD).

pTargeT Mammalian Expression Vector System (Promega, Madison, WI, ABD).

ABI PRIZM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems).

TransFast Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, ABD).

PolyFect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, Almanya).

R&D Systems Quantikine M Murine IFNγ ELISA kiti (Minneapolis, MN, ABD).

Wizard *Plus* Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, ABD).

Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, ABD).

QIAPrep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Almanya).

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Almanya).

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya).

QIAshredder (Qiagen, Hilden, Almanya).

RNase Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Almanya).

DNA free set (Ambion, Austin, TX, ABD).

3.1.10. Monoklonal Antikorlar

Fare anti-CD3 monoklonal antikoru (Cedarlane Labs, Kanada) Yard.Doç.Dr.Ü.Bağrıaçık (Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı) tarafından hediye edildi.

Hamster anti-fare CD40L (CD154) monoklonal antikor: Hamster Anti Mouse CD154:FITC, klon numarası: 39H5 (Serotec, İngiltere).

IgG negatif kontrol antikoru: Hamster IgG negative control:FITC (Serotec, İngiltere).

3.1.11. Enzimler

***Taq* Polimeraz:** *Taq* Polymerase (5 ünite/µl) (MBI Fermentas, Litvanya), Platinum *Taq* Polymerase (5 ünite/µl) (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD).

T4 DNA Ligaz:

T4 DNA Ligase (3 Weiss ünite/µl) (Promega, Madison, WI, ABD), T4 DNA Ligaz Tamponu (Promega, Madison, WI, ABD): 300mM TrisHCl (pH 7.8), 100mM $MgCl_2$, 100mM dithiothreitol (DTT), 10mM ATP.

T4 DNA Ligase (400 ünite/µl) (New England Biolabs, İngiltere). T4 DNA Ligaz Tamponu (New England Biolabs, İngiltere): 50 mM TrisHCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA, 25°C' de pH:7.5

Alkalen Fosfataz: Calf Intestinal Phosphatase-CIP (1 ünite/µl) (Roche, Almanya), Calf Intestinal Phosphatase-CIP (1 ünite/µl) (Promega, Madison, WI, ABD).

Restriksiyon Enzimleri:

*Eco*RI (10 ünite/µl) (Promega, Madison, WI, ABD).

*Eco*RI (10 ünite/µl) (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD).

*Acc*I (10 ünite/µl) (New England Biolabs, İngiltere).

*Bgl*II (10 ünite/µl) (Promega, Madison, WI, ABD).

*Sal*I (10 ünite/µl) (Promega, Madison, WI, ABD).

*Sma*I (10 ünite/µl) (Promega, Madison, WI, ABD).

*Hind*III (10 ünite/µl) (Roche, Almanya).

*Xba*I (10 ünite/µl) (Roche, Almanya).

3.1.12. Primerler

Hibrid IL-18 DNA' sının elde edilmesi ve pTargeT/18 transfeksiyonu yapılan NIH/3T3 hücrelerinde IL-18 mRNA ekspresyonunun RT-PZR ile gösterilmesinde kullanılan primerler IDT (Coralville, IA, ABD)' den alındı.

Otomatik DNA dizi analizinde kullanılan *forward* primer Iontek (İstanbul, Türkiye), *reverse* primer Prizma Laboratory Products (İstanbul, Türkiye)' den alındı. pcDNA3 plazmidlerinden mRNA ekspresyonunu RT-PZR ile tespit etmek için kullanılan primerler Sigma Genosys (İngiltere)' den alındı.

3.1.13. DNA *Ladders*

50 bp DNA *Ladder* (MBI Fermentas, Litvanya), 100 bp DNA *Ladder* ve 1 kb DNA *Ladder* (Promega, Madison, WI, ABD)

3.1.14. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Sigma, ABD).

LMP agaroz (Sigma, ABD).

Etidyum Bromür (10 mg/ml) (Sigma, İngiltere),

Yükleme boyası (6x): Blue/Orange Loading Dye (6x) (Promega, Madison, WI, ABD).

TBE (Tris-Borat-EDTA) tampon: 10xTBE tampon (Applichem, Almanya) ddH_2O ile 1xTBE haline getirilerek kullanıldı.

TAE (Tris-Asetat-EDTA) tampon: 10xTAE tampon (Applichem, Almanya) ddH_2O ile 1xTAE haline getirilerek kullanıldı.

3.1.15. Laboratuar Cihazları

***Thermal cycler*:** Touchgene, Techne veya GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems kullanıldı.

DNA konsantre edici: Ependorf Concentrator 5301.

Santrifüj cihazları:

Biofuge Fresco, Heraus (soğutmalı mikrosantrifüj).

Heraeus Sepatech Suprafuge 22 (Fare polimorfonükleer hücre, splenosit ve NIH/3T3 hücre kültürü aşamalarında kullanıldı).

Heraeus Sepatech Cryofuge 8000 (Fare polimorfonükleer hücre, splenosit ve NIH/3T3 hücre kültürü aşamalarında kullanıldı).

ALC Multispeed Refrigerated Centrifuge PK131R (HEK293 hücre kültürü aşamalarında kullanıldı).

Eppendorf Centrifuge 5810R (Bakteri kültürü aşamalarında kullanıldı).

Distile su cihazı: MilliQ, Synthesis A10, MILLIPORE.

Orbital çalkalamalı su banyosu: Grant OLS 200.

Orbital çalkalamalı kuru hava inkübatörü: Innova 4300 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific).

Su banyoları: Grant Y22, Grant SUB6 ve GFL 1086.

Otomatik DNA dizi analizi cihazı: ABI Prizm 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems).

Kan sayım cihazı: Beckman Coulter MaxM, ABD.

Mikrotabaka okuyucu: Microplate Reader, Spectramax plus, (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, ABD).

Sıvı nitrojen tankı: Locator 8 Thermolyne, CryoBiological Thermo Storage System 4753.

Laminer akımlı steril kabin: ClanLAF Cyto-Baby CB1204.

İnkübatörler: Bakteri kültürü için; Swallow Incubator veya WTB binder kullanıldı. Memeli hücre kültürü için; SANYO CO_2 Incubator, Model: MCO-17A1C, Jencons-PLS veya Heraeus CO_2-Auto-Zero kullanıldı.

Floresan mikroskop: Zeiss, Almanya.

***Inverted* mikroskop:** Olympus, Japan.

Işık mikroskopu: Zeiss, Axioskop 2, Almanya.

Elektroporasyon cihazı: BioRad Pulse Controller II, Gene Pulser II (BioRad Laboratories, CA, ABD).

Stomacher: Seward Stomacher 80 Biomaster LAB System (İngiltere).

RNA izolasyonu için doku homojenizatörü: Mix Miller MM 300 (Retsch, İngiltere).

Spektrofotometreler: DNA ve RNA kalite ve miktarlarını belirlemek amacıyla UV/VIS Spectrometer, Lambda 20 (Perkin Elmer) veya Biotech photometer (WPA) kullanıldı. Bakteri konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla Jenway 6305 UV/Vis Spectrophotometer kullanıldı.

pHmetre: ORION Model 720A.

Güç kaynakları: LKB Bromma 2301 MacroDrive1 Power Supply.
CONSORT E802, E815.

UV transillüminatör: 2011 Macrovue, LKB.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hibrid IL-18 DNA' sının Elde Edilmesi

IL-18, 24 kDa (192 aa) ağırlığında biyolojik olarak inaktif öncül molekül olarak sentezlenmektedir. Öncül polipeptid, 35 aa' lik alışılmadık bir lider dizisine sahiptir ve N-glikolizasyon bölgesi veya hidrofobik sinyal peptidi bulunmamaktadır (115). Kaspaz-1 tarafından 18.3 kDa (157 aa) ağırlığındaki olgun formuna dönüştürülen IL-18 (117, 118), makrofaj benzeri hücrelerden sentezlenmektedir (245-247). Fare IFNβ sinyal dizisi ile olgun IL-18 dizisi *overlap extension* yöntemi (158, 159, 248) kullanılarak birleştirildi ve kaspaz-1 ile modifikasyona ihtiyaç duymadan kolaylıkla salınabilen biyoaktif IL-18 molekülü elde edildi.

3.2.1.1. Mononükleer Hücre Eldesi ve LPS ile Uyarılması

Altı-sekiz haftalık dişi Balb/*c* farelerden alınan periferik kandan *Ficoll-Hypaque* yöntemi ile mononükleer hücreler ayrıldı. Serumsuz RPMI medyum ile 1:1 oranında seyreltilen kan, dansite gradienti 1077 olan *Ficoll* çözeltisi üzerine yayıldı. +4°C'de 1800 rpm devirde 20 dakika santrifüj sonrası oluşan interfaz toplandı ve iki kez 10 ml serumsuz RPMI medyum ile yıkandı. Elde edilen mononükleer hücreler T25 flaska alınarak 10-15 ml tam RPMI medyum içerisinde, 37°C ve %5 CO_2' li etüvde (standart kültür koşulları) gece boyu inkübe edildi.

Gece boyu inkübasyonun ardından uyarılmadan önce ve 1 µg/ml LPS ile 2 ve 24 saat ve 2 µg/ml LPS ile 2 saat uyarılma sonrasında flask tabanına yapışan mononükleer hücreler tripsinize edildi. Tripsinizasyon işlemi için öncelikle flask içindeki medyumda süspanse halde bulunan, yapışmayan hücreler dışarı alındı. Flask tabanı steril PBS çözeltisi ile 2 kez yıkandı. 500 µl Tripsin–EDTA eklenerek tüm tabanı kaplaması sağlandı. Flaskın kenarına avuç içi ile hafifçe vurma (*tapping*) işlemi sonrasında 37°C' da 1-5 dakika inkübasyon yapıldı. Tekrar *tapping* yapılmasını takiben reaksiyon 10 ml tam RPMI medyum eklenerek durduruldu. Medyum içindeki hücreler 15 ml' lik santrifüj tüpüne aktarıldı, ardından iki kez 10 ml steril PBS çözeltisi ile yıkanarak total hücresel RNA izolasyonuna geçildi.

3.2.1.2. Total RNA İzolasyonu

Elde edilen hücrelerden TRIzol yöntemi (249) ile ayrı ayrı total hücresel RNA izole edildi. İki kez PBS çözeltisi ile yıkanmış hücreler üzerine 1 ml TRIzol konularak mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Pipetleme ve ardından oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon yapılarak nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrılması sağlandı. 200 µl kloroform eklenmesini takiben karışım 15 saniye nazikçe, elle karıştırıldı, oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyonun ardından +4°C' da, 10000 *g* devirde 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında karışım, en üstte RNA içeren renksiz, berrak kısım, ortada DNA içeren interfaz ve en altta TRIzol ve diğer hücre artıklarını içeren açık kırmızı kısım olmak üzere üç faza ayrıldı. RNA içeren berrak kısım toplanarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 500 µl izopropanol eklenmesi ve karıştırılmasını takiben karışım 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. +4°C' da, 10000 *g* devirde 10 dakika santrifüj sonrası tüpün dibinde beyaz renkli RNA çökeltisi oluştu. Süpernatan atılarak RNA çökeltisi 500 µl %75 etanol ile iki kez yıkandı ve ardından tüp kapağı açık bırakılarak kuruması sağlandı. 5-10 µl TE (10mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH: 8.0) tampon eklenerek çökeltinin çözünmesi sağlandı ve -80˚C dondurucuya kaldırıldı.

3.2.1.3. PZR Amplifikasyonu İçin İlk Zincir cDNA Sentezi

Elde edilen total hücresel RNA' lardan Fermentas RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Litvanya) kullanılarak cDNA elde edildi. Bir mikrosantrifüj tüpünde 0.1-5 µg RNA, 1 µl Oligo$(dT)_{18}$ primer (0.5 µg/µl) ile karıştırıldı ve reaksiyon hacmi DEPC ile muamele edilmiş ddH_2O ile 12 µl' ye tamamlandı. Negatif kontrol reaksiyonu için RNA yerine DEPC ile muamele edilmiş ddH_2O konuldu. 70°C su banyosunda 5 dakika inkübasyonun ardından karışımı içeren tüp buz üstünde soğutuldu. 4 µl 5x reaksiyon tamponu, 1 µl Ribonükleaz inhibitörü (20 ünite/µl) ve 2 µl dNTPkarışımı (10 mM) eklenmesini takiben 5 dakika 37°C su banyosunda bekletildi. 1 µl RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200ünite/µl) eklendikten sonra 1 saat 37°C' da inkübasyon yapıldı. Reaksiyon karışımı 70°C' da 10 dakika bekletilerek reaksiyon sonlandırıldı, buz üzerinde soğutmanın ardından cDNA sentez reaksiyonu -20°C dondurucuya kaldırıldı.

3.2.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

$MgCl_2$ son konsantrasyonları 1, 1.5, 2, 2.25, 2.5, 3, 3.5, 4 mM, dNTP son konsantrasyonları 0.2, 0.4, 0.5 mM ve primer son konsantrasyonları 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 µg/ml olacak şekilde farklı PZR (250) koşulları denendi. Primer dizileri Tablo 3.1' de verilmektedir. Primerler fare IFNβ mRNA (GenBank erişim numarası: NM010510) ve fare IL-18 mRNA (GenBank erişim numarası: NM008360) dizileri kullanılarak tasarlandı. IFNβ sinyal ve IL-18 moleküllerinin hibridizasyonunu sağlamak amacıyla IL-18 *forward* primeri (3 no' lu primer) ve IFNβ sinyal *reverse* primeri (4 no' lu primer) 5' uçlarında 20 bp (koyu renk ile yazılmış bölge) birbirine komplementer olacak şekilde tasarlandı. Bağlanma sıcaklığı olarak 48, 49, 50, 55 °C ve değişik süreler denenmesi sonucunda Tablo 3.2' deki konsantrasyonlar ve PZR koşulları kullanılarak 2 µg/ml LPS ile 2 saat uyarılmış aderan mononükleer hücrelerden IL-18 olgun ve IFNβ sinyal ürünü elde edildi.

Tablo 3.1. IL-18 olgun ve IFNβ sinyal dizisinin çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri. 3 ve 4 no' lu primerlerin koyu renk ile yazılmış 20 bp büyüklüğündeki bölgeleri birbirine komplementerdir. Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems)' da otomatik olarak gerçekleştirildi.

Primer	Dizi (5'→3')	Ürün (bp)	Tm (°C)
IL-18 *Forward* (3)	**AGCCCTCTCCAACTTTGGCC**GACTTCACTG	493	68.9
IL-18 *Reverse* (2)	CCTCCCCACCTAACTTTGATGTAAGTTAGT		61.5
IFNβ sinyal *Forward* (1)	ACCAGCCTGGCTTCCATCATGAACAACA	91	66.2
IFNβ sinyal *Reverse* (4)	**GGCCAAAGTTGGAGAGGGCT**GTGGTGGAGA		70.5

Taq polimeraz (5 ünite/µl) ve eklenecek tamponun yarısı 0.2 ml' lik bir PZR tüpüne, geri kalan reaktanlar ise ayrı bir PZR tüpüne konuldu. 80°C' de 5 dakika *hot start* sonrası tüm reaktanlar birleştirildi ve *thermal cycler* (Techne, Touchgene)' da PZR gerçekleştirildi. Negatif kontrol reaksiyonu için kalıp cDNA yerine steril ddH_2O konuldu.

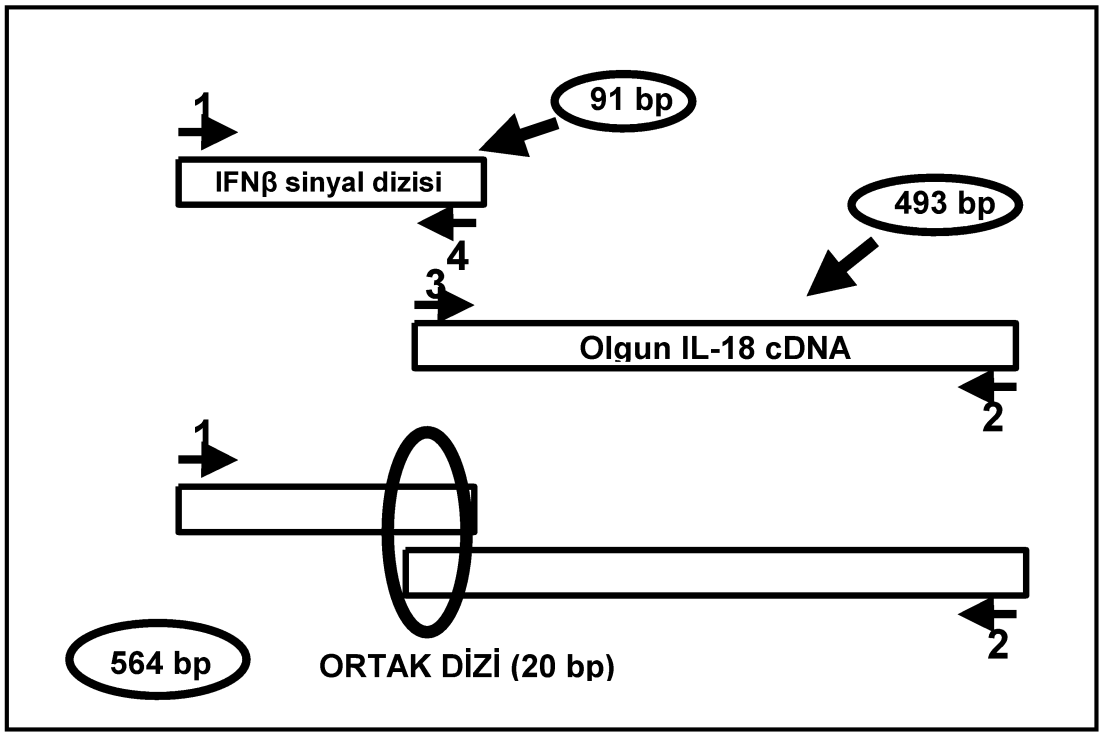
Tablo 3.2. IL-18 ve IFNβ sinyal dizisinin çoğaltılmasında kullanılan PZR koşulları.

Reaktanlar	Stok konsantrasyon	Eklenen hacim (µl)	Son konsantrasyon
Tampon	10x	5	1x
$MgCl_2$	25 mM	4.5	2.25 mM
dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	10 mM (her biri)	1	0.2 mM (her biri)
Forward primer	10 µg/ml	2	0.4 µg/ml
Reverse primer	10 µg/ml	2	0.4 µg/ml
Taq polimeraz	5 ünite/µl	0.5	0.05 ünite/µl
Kalıp cDNA		2	
Steril ddH_2O		33	
Toplam Reaksiyon Hacmi:		50 µl	
PZR koşulları: İlk denatürasyon		95ºC 30″	
Denatürasyon		95ºC 30″	
Primer bağlanması		55ºC 30″	30 siklus
Uzama		72ºC 1′	
Son uzama		72ºC 10′	

3.2.1.5. *Overlap Extension* Yöntemi:

Elde edilen IFNβ sinyal (91 bp) ve IL-18 olgun (493 bp) DNA' larını hibridize etmek için *overlap extension* yöntemi uygulandı (Şekil 3.1). Hibridizasyon sonrası hibrid DNA, 1 ve 2 no' lu primerler varlığında PZR ile çoğaltıldı.

Kısaca; elde edilen IL-18 ve IFNβ sinyal dizisi PZR ürünlerinden 4'er µl alınarak birleştirildi. 3 dakika 94°C' da inkübasyon sonrası sıcaklık 1 saatte 37°C' a düşürüldü. 15 dakika 37°C' da inkübasyonun ardından primerler hariç diğer PZR reaktanları eklendi. Karışımın sıcaklığı aşamalı olarak 72°C' ye getirildi ve bu sıcaklıkta 5 dakika inkübe edildi. Primer 1 ve 2' nin eklenmesi sonrasında aynı PZR koşullarında amplifikasyon reaksiyonu gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Hibrid IL-18 DNA' sının *overlap extension* yöntemiyle elde edilmesi. 3 ve 4 no' lu primerler birbirine 20 bp komplementer olacak şekilde tasarlandı. İki PZR ürününün bir araya getirilip birleştirilmesinin ardından, 1 ve 2 no' lu primerler ile PZR yapılarak hibrid IL-18 molekülü çoğaltıldı.

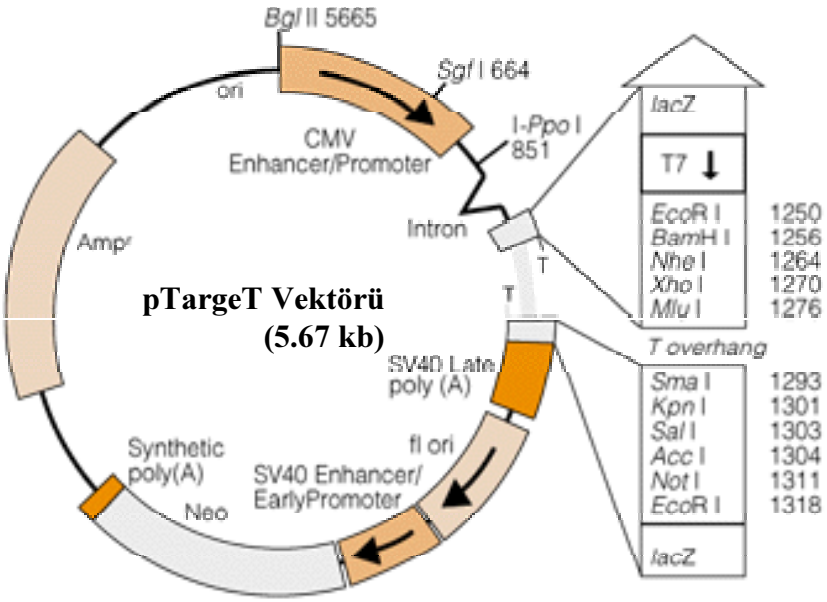
3.2.2. Hibrid IL-18 DNA' sının pTargeT Vektörüne T-A Klonlama Yöntemiyle Klonlanması

pTargeT (Promega, Madison, WI, ABD) vektörü (Şekil 3.2), iki ucunda 3' terminal timidin nükleotidi taşıyan bir memeli ekspresyon vektörüdür. 3' uçlarında bulunan birer T-asılma bölgeleri, *Taq* polimeraz enziminin PZR ürününün uçlarına eklediği adenin nükleotidleri ile komplementasyon sağlayarak klonlamanın gerçekleşmesini sağlamaktadır (Şekil 3.3). 3'-Timidin askıları aynı zamanda vektör uçlarının birbiriyle bağlanmasını da engellemektedir. Ampisilin dirençliliğine sahiptir, böylece *in vitro* ampisilinli ortamda seçilebilir ve çoğaltılabilir.

pTargeT vektörü *β-galaktozidaz* geninin α-peptidinin kodlanan dizisinin değiştirilmiş bir halini de taşımaktadır. Bu nedenle mavi/beyaz rekombinant taramasına da olanak tanımaktadır. Çoklu klonlama bölgesi *lacZα* geninin içerisinde yer almaktadır. β-galaktozidaz gen aktivatörü olan IPTG varlığında eksprese olan α parçası, uygun konak bakteride üretilen β-galaktozidaz' ın karboksi terminal kısmı ile birleşerek enzimatik olarak aktif proteini oluşturur. Buna α-komplemantasyon denilmektedir. Aktif enzim kromojenik bir ajan olan X-Gal molekülünü mavi renk veren ürünlere dönüştürmektedir. *İnsert* DNA taşıyan plazmidde ise β-galaktozidaz aktivitesi engellendiği için beyaz renkli koloniler oluşmaktadır.

pTargeT vektörü, klonlanan genin memeli hücrelerinde yapısal ekspresyonunu sağlayan insan CMV en-erken *enhancer*/promotor bölgesini taşımaktadır. Ayrıca memeli hücrelerinde seleksiyon belirteci olarak neomisin fosfotransferaz genini de içermektedir. pTargeT vektörü geçici ekspresyon elde etmek için kullanılabileceği gibi, transfekte hücrelerin G-418 antibiyotiği ile seçilmesi sonucu stabil ekspresyon elde etmek de mümkündür.

pTargeT vektörünün ana iskeleti pGEM-3Zf(+) vektöründen türetilmiştir. Yüksek-kopya sayısına sahip bir plazmiddir ve filamentöz faj f1' in replikasyon başlangıcını taşımaktadır (251).



Şekil 3.2. pTargeT vektör haritası ve dizi referans noktaları.

Sitomegalovirüs en-erken *enhancer* 1-659

Sitomegalovirüs en-erken promotor 669-750

Kimerik intron 890-1022

pTargeT dizi analizi primeri 1367-1344

lacZα başlangıç kodonu 1377

lacZα sonlanma kodonu 1053

lac operon dizileri 1066-1226, 1363-1499

lac operatör 1397-1413

T7 promotor (-17 -+3) 1229-1248

Çoklu klonlama bölgesi 1250-1323

SV40 geç poliadenilasyon sinyali 1535-1755

Faj f1 bölgesi 1798-2252

Neomisin seleksiyon belirteci

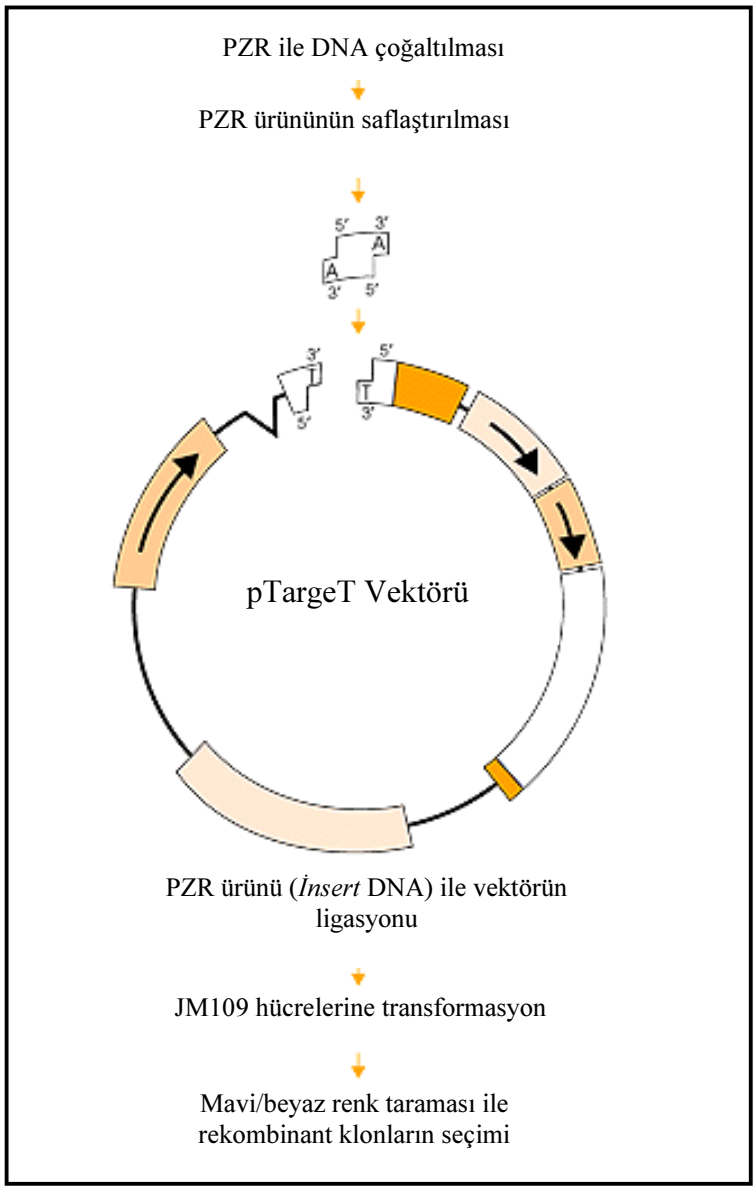
SV40 *enhancer* ve erken promotoru 2260-2630

SV40 minimum replikasyon başlangıcı 2528-2593

Neomisin fosfotransferaz kodlama bölgesi 2675-3469

Sentetik poliadenilasyon sinyali 3533-3581

β-laktamaz (Amp^r) kodlama bölgesi 3978-4838



Şekil 3.3. pTargeT vektörüne T-A klonlama stratejisi.

3.2.2.1. *Low Melting Point* (LMP) Agaroz Jelden DNA İzolasyonu ve Fenol/Kloroform Ekstraksiyonu ile DNA Saflaştırması

Soğuk odada (+4°C), %0.9' luk LMP agaroz jel hazırlandı. Hibrid IL-18 DNA' sı soğuk odada LMP agaroz jelde yürütüldü. Hibrid IL-18 DNA' sına ait bant, UV transillüminatör altında bistüri ile kesilerek çıkartıldı ve 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. +4°C' da, 10000 *g* devirde 1 dakika santrifüj edildi. Bandı içeren jelin hacminin 5 katı kadar TE tampon (20 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH: 8.0) ilave edildi ve 65˚C su banyosunda 5 dakika bekletilerek jelin erimesi sağlandı. Eşit hacimde fenol/TE tampon eklendi ve 20 saniye

vortekslendi. 65°C su banyosunda 1 dakika inkübasyon sonrası oda sıcaklığında, 10000 *g* devirde 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan aköz faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve eşit hacimde Fenol/TE eklenerek yukarıdaki işlem tekrarlandı. Yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınan aköz faz üzerine eşit hacimde kloroform eklendi ve 20 saniye vorteksleme sonrası oda sıcaklığında, 10000 *g* devirde 10 dakika santrifüj edildi. Aköz faz yeni bir santrifüj tüpüne alındı, 1/10 hacimde 3 M sodyum asetat (pH: 6) ve 2 hacim saf etanol eklenerek pipetleme ile karıştırıldı. Gece boyu -80˚C dondurucuda bekletildi. +4˚C' da, 10000 *g* devirde 30 dakika santrifüj sonrası süpernatan atıldı. DNA çökeltisi 500 µl %75' lik etanol içerisinde süspanse edildikten sonra +4˚C' da, 10000 *g* devirde 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatan atılarak etanol ile yıkama işlemi tekrarlandı. DNA konsantre edicide 30°C' da 2 dakika çevrilerek DNA çökeltisi kurutuldu ve 30-50 µl TE (10 mM TrisHCL, 1 mM EDTA, pH: 8.0) tampon içerisinde çözülerek -20°C dondurucuya kaldırıldı.

LMP jelden izole edilen hibrid IL-18 DNA' sı fenol/kloroform ekstraksiyonu ile saflaştırıldı. Bu amaçla, eşit hacimde fenol eklendi ve vortekslendi. +4°C' da, 10000 *g* devirde 3 dakika santrifüj sonrası aköz faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Eşit hacimde kloroform eklendi ve vortekslendi. +4°C' da, 10000 *g* devirde 10 dakika santrifüj edildi ve aköz faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 1/10 hacim 3 M sodyum asetat (pH: 4.8) ve 1 hacim izopropanol eklendikten sonra 1 saat -20°C' da inkübe edildi. +4°C' da, 10000 *g* devirde 15 dakika santrifüj sonrası iki kez 500 µl %75' lik etanol ile yıkama yapıldı. Yıkamalar sırasında santrifüj işlemleri +4°C' da, 10000 *g* devirde 10 dakika olarak gerçekleştirildi. DNA konsantre edicide 30°C' da 2 dakika çevrilerek DNA çökeltisi kurutuldu ve 50 µl steril ddH_2O içerisinde çözülerek -20°C dondurucuya kaldırıldı.

3.2.2.2. Ligasyon

LMP jelden izole edilen DNA' ların kalite ve konsantrasyonları spektrofotometre ölçümü (Bkz. Bölüm 3.2.12) ile değerlendirildikten sonra ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Ligasyon reaksiyonunda kullanılacak olan vektör ve *insert* DNA miktarları Formül 3.1' e göre hesaplandı.

$$\text{İnsert DNA miktarı (ng)} = \frac{\text{vektör miktarı (ng)} \times \text{insert DNA büyüklüğü (kb)}}{\text{vektör büyüklüğü (kb)}} \times \text{insert:vektör konsantrasyon oranı} \quad (3.1)$$

pTargeT vektörü 5.67 kb büyüklüğündedir ve 60 ng/µl konsantrasyonundadır. IL-18 hibrid DNA' sı 564 bp büyüklüğündedir. Ligasyon reaksiyonunda kullanılan IL-18 hibrid DNA' sının konsantrasyonu 20 ng/µl olarak belirlendi. *İnsert*:vektör konsantrasyon oranı 3:1 ve 5:1 olacak şekilde ligasyon reaksiyonları gerçekleştirildi, 5:1 oranı kullanılarak yapılan reaksiyon sonucunda *insert* DNA taşıyan koloni elde edildi. Pozitif kontrol reaksiyonunda, üretici firmanın tavsiyelerine uyularak 1.4:1 *insert*:vektör oranı kullanıldı. Ligasyon reaksiyonu +4°C' da, 16 saatte gerçekleştirildi. Ligasyon reaksiyonunda kullanılan reaktan ve miktarları Tablo 3.3' de gösterilmektedir.

Tablo 3.3. pTargeT-IL-18 ligasyon reaksiyonunda kullanılan reaktan ve miktarları. *İnsert*:vektör konsantrasyon oranı 5:1 olarak kullanıldı. Pozitif kontrol reaksiyonunda *insert*:vektör konsantrasyon oranı 1.4:1' dir.

	Reaksiyon	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
T4 DNA Ligaz 10x Tampon	1 µl	1 µl	1 µl
pTargeT Vektör DNA (60 ng/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
İnsert DNA	1.5 µl	-	-
Kontrol *insert* DNA (4 ng/µl)	-	2 µl	-
T4 DNA Ligaz (3 Weiss ünite/µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Steril ddH_2O	5.5 µl	5 µl	7 µl
Toplam reaksiyon hacmi	10 µl	10 µl	10 µl

3.2.2.3. JM109 Kompetan Hücre Hazırlanması

JM109 hücreleri (Promega, Madison, WI, ABD), kompetan hale getirilmeden önce üretici firmanın talimatlarına uygun olarak tiamin hidroklorür eklenmiş M9 minimal medyumda çoğaltıldı. Bu sayede hücrelerin F' epizom taşıması garanti altına alınmaktadır. F' epizomu, minimal

medyumda büyüme için gerekli olan prolin biyosentezinde gereken genetik bilgiyi içermektedir. F' epizomu ayrıca mavi/beyaz renk taraması için gerekli olan lacIqZΔM15 bölgesini de içermektedir.

M9 minimal medyumda çoğaltılmış kolonilerden bir tanesi alınarak 15 ml' lik santrifüj tüpündeki 3 ml 2xLB içerisine çalkalanarak ekildi. Gece boyu 30˚C' da, orbital çalkalamalı su banyosunda 150 rpm devirde inkübe edildi. Gece boyu inkübasyonun ardından 250 ml hacimli *Erlen* içerisinde önceden ısıtılmış 30 ml 2xLB' ye 1:100 oranında eklenerek 30°C' da, orbital çalkalamalı su banyosunda, 150 rpm devirde, OD_{600} değeri 0.45-0.55 olana kadar inkübe edildi. Buz içerisinde 2 saat soğutulduktan sonra +4°C' da 20 dakika 2500 *g* devirde santrifüj edildi. Bakteri çökeltisi, buzda soğutulmuş, başlangıç hacminin yarısı kadar kompetan hücre çözeltisi içerisinde süspanse edildikten sonra buz üzerinde 45 dakika bekletildi. +4°C' da 10 dakika 1800 *g* devirde santrifüj sonrası, çökelti, buzda soğutulmuş, başlangıç hacminin 1:20' si kadar hacimde kompetan hücre çözeltisi içerisinde süspanse edildi. Kompetan hücreler taze olarak kullanıldı veya son konsantrasyon %15 olacak şekilde %80 gliserol eklenerek dondurma tüplerine konuldu ve kullanılana kadar -80°C dondurucuda saklandı.

3.2.2.4. Isı Şoku Transformasyonu

Buz üzerinde 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüpü içerisine 2 µl ligasyon reaksiyonu konuldu. 50 µl JM109 kompetan hücresi eklenerek elle, nazikçe karıştırıldı ve 20 dakika buz içerisinde bekletildi. 42°C su banyosunda 45-50 saniye bekletilmesinin ardından hemen buz üzerine alındı ve 2 dakika buz içerisinde inkübe edildi. 450 µl SOC medyumun eklenmesinin ardından ligasyon reaksiyonu ile transforme edilmiş hücreler 37°C' da, orbital çalkalamalı su banyosunda 150 rpm devirde inkübe edildi. Bir buçuk saat sonunda transformasyon reaksiyonundan 100' er µl X-Gal/IPTG/ampisilinli LB-agar petrilerine yayıldı ve 16-24 saat 37°C inkübatörde bekletildi.

3.2.2.5. Koloni Seçimi ve Plazmid DNA İzolasyonu

İnsert DNA taşıması muhtemel beyaz koloniler seçilerek 15 ml' lik santrifüj tüpünde, 100 µg/ml ampisilin içeren 3 ml LB içine çalkalanarak ekildi

ve 37°C' da, orbital çalkalamalı su banyosunda 150 rpm devirde gece boyu çoğaltıldı. Gece boyu kültürlerinden plazmid DNA izolasyonu manuel olarak veya Wizard *Plus* Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, ABD) kullanılarak yapıldı. Hücre transfeksiyon ve elektroporasyon deneylerinde kit ile izole edilmiş plazmid DNA' lar kullanıldı.

Manuel ekstraksiyon için, kültürler 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerine alınarak 10000 *g* devirde 1-2 dakika santrifüj edildi ve bakteri çökeltisi elde edildi. Çökelti 200 µl buzda soğutulmuş lizis tampon içerisinde vortekslenerek süspanse edildikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 400 µl 0.2 M NaOH/%1 SDS çözeltisi eklendi, 3-4 kez mikrosantrifüj tüpü baş aşağı edilerek karıştırıldı ve buz üzerinde 5 dakika bekletildi. 300 µl buzda soğutulmuş sodyum asetat (3 M, pH:4.8) eklenmesini takiben iyice karıştırıldı ve 10 dakika buz üzerinde bekletildi. 10 dakika 10000 *g* devirde santrifüjün ardından oluşan süpernatan ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 480 µl izopropanol eklenerek -20°C' da 1 saat bekletildi. 15 dakika 10000 *g* devirde santrifüjün ardından süpernatan atıldı ve oluşan DNA çökeltisi iki kez 500 µl %95 etanol ile yıkanarak 50-100 µl TE tampon (10mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH: 8.00) içerisinde çözülerek -20°C dondurucuya kaldırıldı. Manuel olarak izole edilen tüm plazmid DNA' lar Bölüm 3.2.2.1' de anlatılan fenol/kloroform ekstraksiyon yöntemi ile saflaştırıldı.

Wizard *Plus* Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, ABD) kullanılarak yapılan plazmid DNA izolasyonunda ise üretici firmanın tavsiyelerine uyuldu. Bakteri çökeltisinin elde edilmesinin ardından, çökelti 300 µl resüspansiyon çözeltisinde süspanse edildi. 300 µl hücre lizis çözeltisi eklenerek mikrosantrifüj tüpü 4 kez baş aşağı edilerek karıştırıldı. 300 µl nötralizasyon çözeltisinin eklenmesini takiben yukarıdaki gibi karıştırıldı ve 5 dakika 10000 *g* devirde santrifüj edilerek berrak lizat elde edildi. Minikolonlar 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. 2 ml' lik steril şırınganın pistonu çıkartılarak minikolon üzerine yerleştirildi. 1 ml rezin şırınganın içerisine konuldu ve üzerine elde edilen berrak lizat eklendi. Şırınganın pistonu takılarak rezin-lizat karışımı minikolondan geçirildi. Şırınga minikolon üzerinden alındı, piston şırıngadan ayrıldı ve şırınga tekrar minikolon üzerine

yerleştirildi. Şırınga içerisine 2 ml kolon yıkama çözeltisi konuldu ve pistonun yerleştirilerek ittirilmesi sonucu minikolonun yıkanması sağlandı. Mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiş minikolon 10000 *g* devirde 2 dakika santrifüj edildikten sonra yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Minikolon, içerisine 50 µl nükleaz içermeyen ddH_2O konulmasını takiben 1-2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 10000 *g* devirde 20 saniye santrifüj edilerek plazmid DNA' nın elüsyonu sağlandı. Elde edilen plazmid DNA -20°C dondurucuya kaldırıldı.

3.2.2.6. Restriksiyon Enzim Analizi

Elde edilen plazmid DNA' ların *insert* DNA taşıyıp taşımadıkları *Eco*RI restriksiyon enzim analizi ile belirlendi. Toplam 20 µl reaksiyon hacmi içerisinde 1 µl plazmid DNA; 2 µl 10x restriksiyon tampon H, 2 µl asetillenmiş BSA (1 µg/µl) varlığında, 0.5 µl *Eco*RI (Promega, Madison, WI, ABD), (10 ünite/µl) ile 37°C' da 1-4 saat tutularak kesildi.

3.2.3. CD40L DNA' sının pTargeT Vektörüne Restriksiyon Klonlama Yöntemiyle Klonlanması

Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuarları' nda T-A klonlama yöntemiyle fare CD40L DNA' sı takılmış olan pTargeT vektörünün (252) restriksiyon enzim analizi yapıldı ve *insert* DNA yönünün ters olduğu belirlendi. Fare CD40L *insert* DNA' sı aşağıda anlatıldığı gibi elde edildi ve restriksiyon klonlama yöntemiyle pTargeT vektörüne klonlandı.

3.2.3.1. Restriksiyon Enzim Analizi ile CD40L DNA' sını Taşıyan pTargeT Vektöründe *İnsert* DNA Yönünün Belirlenmesi

*Acc*I restriksiyon enzimi, CD40L *insert* DNA' sını 520-525 bp bölgesinden keserken, pTargeT vektörünü de 1304-1309 bp bölgesinden kesmektedir. *İnsert* DNA' nın doğru yerleşimli olması durumunda plazmidin *Acc*I ile kesimi sonucunda agaroz jel elektroforezinde 305 bp büyüklüğünde bir band görülmesi gerekmektedir. Ters yerleşim durumunda ise 540 bp büyüklüğünde bir band görülmesi söz konusudur. CD40L DNA' sı takılmış pTargeT plazmidini taşıyan JM109 hücrelerinin gece boyu çoğaltılmalarının

ardından Bölüm 3.2.2.5' de anlatılana uygun olarak Wizard *Plus* Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, ABD) kullanılarak plazmid DNA izolasyonunun yapılmasını takiben 1 µl plazmid DNA, toplam 50 µl reaksiyon hacmi içerisinde, 5 µl 10x restriksiyon tampon 4 varlığında, 0.75 µl *Acc*I (New England Biolabs, İngiltere), (10 ünite/µl) ile 37°C' da 2-3 saat tutularak kesildi.

3.2.3.2. pTargeT Vektör ve *İnsert* CD40L DNA' larının Elde Edilmesi

Vektörün *Eco*RI ile Kesilmesi

Restriksiyon klonlamada kullanmak amacıyla, CD40L DNA' sı takılmış pTargeT plazmid DNA' sından 30 µl, toplam 50 µl reaksiyon hacmi içerisinde 5 µl 10x restriksiyon tampon H, 5 µl asetillenmiş BSA (1 µg/µl) varlığında, 2.5 µl *Eco*RI (Promega, Madison, WI, ABD), (10 ünite/µl) ile 37°C' da 4 saat tutularak kesildi.

pTargeT Vektör DNA Defosforilasyonu

Vektörün ligaz enzimi ile kendi kendine bağlanmasını engellemek amacıyla, LMP agaroz jelden ekstrakte edilmiş ve fenol/kloroform ekstraksiyonu ile saflaştırılmış 50 µl pTargeT vektör DNA' sı 60 µl toplam reaksiyon hacminde 6 µl 10x defosforilasyon tamponu ve 4 µl alkalen fosfataz (*Calf Intestinal Phosphatase*-CIP), (Roche, Almanya), (1 ünite/µl) ile defosforile edildi. Reaksiyon 37°C su banyosunda 1 saatte gerçekleştirildi. CIP, DNA' dan 5' fosfat gruplarının uzaklaştırılmasını katalizler. CIP ile muamele edilmiş DNA' lar, ligaz enzimi için gerekli olan 5' fosforil uçlarına sahip olmadıkları için, kendi kendilerine bağlanamazlar.

Low Melting Point (LMP) Agaroz Jelden DNA İzolasyonu ve Fenol/Kloroform Ekstraksiyonu ile DNA Saflaştırması

*Eco*RI ile kesim sonrası vektör ve CD40L DNA' larının ve alkalen fosfataz ile muamele edilmiş vektör DNA' sının soğuk odada (+4°C), %0.9' luk LMP agaroz jel elektroforezi yapıldı. LMP agaroz jelden DNA' ların izolasyonu Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison,

WI, ABD) ile üretici firmanın LMP agaroz jelden DNA saflaştırması için önerdiği talimatlara uyularak gerçekleştirildi. Jel hazırlanmasında ve yürütülmesinde 1xTAE tampon kullanıldı. DNA bandları, UV transillüminatör altında bistüri ile kesilerek çıkartıldı ve mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 70°C su banyosunda agaroz eriyene kadar bekletilmelerinin ardından 1 ml rezin eklenerek karıştırıldı. Minikolonlar 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. 2 ml' lik steril şırınganın pistonu çıkartılarak minikolon üzerine yerleştirildi. Rezin/DNA karışımı şırınganın içerisine konuldu ve piston yavaşça ilerletilerek DNA' nın minikolon çeperlerine tutunması sağlandı. Şırınga minikolon üzerinden alındı, piston şırıngadan ayrıldı ve şırınga tekrar minikolon üzerine yerleştirildi. Şırınga içerisine 2 ml %80 izopropanol konuldu ve pistonun yerleştirilerek ittirilmesi sonucu minikolonun yıkanması sağlandı. Mikrosantrifüj tüpü üzerindeki minikolon 10000 *g* devirde 2 dakika santrifüj edildikten sonra yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Minikolon, içerisine 50 µl nükleaz içermeyen ddH_2O konulmasını takiben 1-2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 10000 *g* devirde 20 saniye santrifüj edilerek DNA' nın elüsyonu sağlandı. Elde edilen vektör ve *insert* DNA' ları Bölüm 3.2.2.1' de anlatılana uygun olarak fenol/kloroform ekstraksiyonu ile saflaştırıldı.

3.2.3.3. Ligasyon

Ligasyon reaksiyonunda kullanılacak vektör ve CD40L *insert* DNA' sının miktarlarını belirlemek amacıyla 10' ar µl DNA örneği ile %1 agaroz jel elektroforezi yapıldı. Yaklaşık 50 ng vektör DNA' sı ile *insert*:vektör konsantrasyon oranı 1:1 olacak şekilde Tablo 3.4' deki reaktan miktarları kullanılarak 15°C' da 16 saatte reaksiyon gerçekleştirildi. Defosforilasyonun etkinliğini göstermek amacıyla ligasyon reaksiyonu defosforile edilmemiş vektör DNA' sı ile de gerçekleştirildi.

Tablo 3.4. pTargeT-CD40L ligasyon reaksiyonunda kullanılan reaktan ve miktarları. *İnsert*:vektör konsantrasyon oranı 1:1 olarak kullanıldı.

Defosforile Vektör-CD40L Ligasyon	**Reaksiyon**	**Negatif Kontrol**
T4 DNA Ligaz 10x Tampon	1 µl	1 µl
Defosforile pTargeT Vektör DNA	2 µl	2 µl
İnsert DNA	6 µl	-
T4 DNA Ligaz (3 Weiss ünite/µl)	1 µl	1 µl
Steril ddH_2O	-	6 µl
Toplam reaksiyon hacmi	10 µl	10 µl
Fosforile Vektör-CD40L Ligasyon	**Reaksiyon**	**Negatif Kontrol**
T4 DNA Ligaz 10x Tampon	1 µl	1 µl
Fosforile pTargeT Vektör DNA	1 µl	1 µl
İnsert DNA	6 µl	-
T4 DNA Ligaz (3 Weiss ünite/µl)	1 µl	1 µl
Steril ddH_2O	1 µl	7 µl
Toplam reaksiyon hacmi	10 µl	10 µl

3.2.3.4. XL1-Blue Kompetan Hücre Hazırlanması

LB-agar petrisinde çoğaltılmış tek kolonilerden bir tanesi alınarak 15 ml' lik santrifüj tüpündeki 3 ml 2xLB içerisine çalkalanarak ekildi. Gece boyu 30°C' da, orbital çalkalamalı kuru hava inkübatöründe 140 rpm devirde inkübe edildi. Gece boyu inkübasyonun ardından, 250 ml hacimli erlen içerisinde önceden ısıtılmış 30 ml LB' ye 1:100 oranında eklenerek 30°C' da, orbital çalkalamalı kuru hava inkübatöründe 140 rpm devirde OD_{600} değeri 0.45 olana kadar inkübe edildi. Buz içerisinde 2 saat soğutulduktan sonra +4°C' da 20 dakika 2500 *g* devirde santrifüj edildi. Bakteri çökeltisinin buzda soğutulmuş, başlangıç hacminin yarısı kadar kompetan hücre çözeltisi içerisinde süspanse edilmesini takiben, bakteri süspansiyonu buz üzerinde 45 dakika bekletildi. +4°C' da 10 dakika 1800 *g* devirde santrifüj sonrası, başlangıç hacminin 1:20' si kadar hacimde, buzda soğutulmuş kompetan hücre çözeltisi içerisinde süspanse edildi. Taze olarak kullanıldı veya son

konsantrasyon %15 olacak şekilde %80 gliserol eklenerek dondurma tüplerine konuldu ve kullanılana kadar -80°C dondurucuda saklandı.

3.2.3.5. Isı Şoku Transformasyonu

Buz üzerinde 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüpü içerisine 5 µl ligasyon reaksiyonu konuldu. 200 µl XL1-Blue kompetan hücresi ve 45 µl ddH_2O eklenerek elle, nazikçe karıştırıldı ve 1 saat buz içerisinde bekletildi. 37°C su banyosunda 5 dakika bekletilmesinin ardından hemen buz üzerine alındı ve 2 dakika buzda inkübe edildi. 800 µl LB eklenmesinin ardından ligasyon reaksiyonu ile transforme edilmiş hücreler 37°C' da, orbital çalkalamalı kuru hava inkübatöründe 140 rpm devirde inkübe edildi. Bir saat sonunda transformasyon reaksiyonundan 200' er µl X-Gal/IPTG/ampisilinli LB-agar petrilerine yayıldı ve 16-24 saat 37°C inkübatörde bekletildi.

3.2.3.6. Koloni Seçimi ve Plazmid DNA İzolasyonu

İnsert DNA taşıması muhtemel beyaz koloniler seçilerek 15 ml' lik santrifüj tüpünde, 100 µg/ml ampisilin içeren 3 ml LB içine çalkalanarak ekildi ve 37°C' da, orbital çalkalamalı su banyosunda 150 rpm devirde gece boyu çoğaltıldı. Gece boyu kültürlerinden plazmid DNA izolasyonu Bölüm 3.2.2.5' de anlatılana uygun olarak Wizard *Plus* Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, ABD) kullanılarak yapıldı.

3.2.3.7. Restriksiyon Enzim Analizi

Elde edilen plazmid DNA' ların *insert* DNA' yı taşıyıp taşımadıkları ve *insert* DNA' nın yönü *Bgl*II ve *Sal*I restriksiyon enzim analizi ile belirlendi. *İnsert* DNA' nın doğru yerleşimli olması durumunda plazmidin *Bgl*II *ve Sal*I ile çift kesimi sonucunda agaroz jel elektroforezinde 1266 bp büyüklüğünde bir band görülmesi gerekmektedir. Ters yerleşim durumunda ise 2108 bp büyüklüğünde bir band görülmesi söz konusudur. Toplam 20 µl reaksiyon hacmi içerisinde 2 µl plazmid DNA; 2 µl 10x restriksiyon tampon D, 2 µl asetillenmiş BSA (1 µg/µl) varlığında, 0.5 µl *Bgl*II (Promega, Madison, WI, ABD), (10 ünite/µl) ve 0.5 µl *Sal*I (Promega, Madison, WI, ABD), (10 ünite/µl) ile 37°C' da 2 saat tutularak kesildi.

3.2.4. pTargeT/18 ve pTargeT/40L Vektörlerinin DNA Dizi Analizi

pTargeT/18 ve pTargeT/40L vektörlerinin *insert* DNA dizilerinin analizi Ankara Üniversitesi, Hepatoloji Enstitüsü Laboratuarları' nda gerçekleştirildi.

3.2.4.1. DNA Dizi Analizi PZR

DNA dizi analizi dideoksi-zincir sonlanma yöntemi ile yapıldı ve dizi analizi PZR için ABI PRIZM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems) kullanıldı. DNA dizi analizi PZR' nda kullanılan reaktan ve miktarları Tablo 3.5' de, primerler Tablo 3.6' da gösterilmektedir. PZR, 0.2 ml' lik PZR tüplerinde, Gene Amp PCR System 9700 PE Applied Biosystems *thermal cycler* kullanılarak yapıldı.

Tablo 3.5. DNA dizi analizi PZR' nda kullanılan reaktanlar ve PZR koşulları.

Reaktanlar	Stok konsantrasyon	Eklenen hacim (µl)	Son konsantrasyon
Big Dye Master Mix (2.5x, Dizi analizi tamponu ile birlikte)	2.5 x	8	1x
Primer	1 pmol/µl	4	0.2 pmol/µl
Kalıp plazmid DNA		6	
Steril ddH_2O		2	
Toplam reaksiyon hacmi:		20 µl	
PZR koşulları: İlk denatürasyon		94°C 30″	
Denatürasyon		96°C 10″	30 siklus
Primer bağlanması		50°C 5″	
Uzama		60°C 4′	

Tablo 3.6. DNA dizi analizinde kullanılan primerler.

Primer	Dizi (5'→3')	Tm değeri (°C)
Forward primer: M13 *Forward*	GTAAAACGACGGCCAG	46
Reverse primer: pTargeT dizi analizi primeri	TTACGCCAAGTTATTTAGGTGACA	52.6

3.2.4.2. Sodyum Asetat-Etanol Çöktürmesi ile DNA' ların Temizlenmesi

0.6 ml' lik mikrosantrifüj tüpünde 20 µl PZR ürünü üzerine 2 µl sodyum asetat (3 M, pH: 4.6) ve 50 µl %95 etanol eklendi. Mikrosantrifüj tüpü 4-5 kez baş aşağı çevrilerek karıştırıldı ve buz üzerinde 10 dakika inkübe edildi. Oda sıcaklığında, 10000 *g* devirde 30 dakika santrifüj edilmesinin ardından süpernatan uzaklaştırıldı. 150 µl %70 etanol eklenmesini takiben 4-5 kez baş aşağı çevrilerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında, 10000 *g* devirde 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatanın uzaklaştırılmasının ardından, 1 dakika 90˚C ısı bloğunda bekletildi. 25 µl kalıp baskılama reajanı (*Template Supression Reagent*, ABI Prizm Perkin Elmer) eklendi, vortekslendi ve 2 dakika 95°C ısı bloğunda inkübe edildikten sonra buz üzerine alınarak soğutuldu. Vorteksle karıştırıldıktan sonra 10000 *g* devirde kısaca santrifüjlendi ve DNA dizi analizine geçildi.

3.2.4.3. Otomatik DNA Dizi Analizi

Hazırlanan DNA örneklerinin dizi analizi ABI Prizm 310 Genetic Analyzer' da (PE Applied Biosystems) otomatik olarak gerçekleştirildi.

3.2.5. pTargeT/18 ve pTargeT/40L Vektörlerinin NIH/3T3 Hücrelerine Katyonik Lipozom Aracılı Transfeksiyonu ve *İn Vitro* Ekspresyonun Gösterilmesi

Elde edilen pTargeT vektörlerinin memeli hücrelerinde ekspresyonunu araştırmak amacıyla plazmidler NIH/3T3 fare fibroblastlarına katyonik bir lipozom olan TransFast Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, ABD) kullanılarak aktarıldı. pTargeT/18 transfeksiyonu yapılan NIH/3T3 hücrelerinin süpernatanı ile anti-CD3 monoklonal antikor (mAb) ile uyarılmış Balb/*c* splenositlerinin kültürü sonucu süpernatanda *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ile IFNγ tayini yapıldı. Hücre yüzeyindeki CD40L ekspresyonu ise immünfloresan boyama ile değerlendirildi.

3.2.5.1. NIH/3T3 Hücrelerinin *İn Vitro* Kültürü

NIH/3T3, *NIH Swiss* fare embriyo kültürlerinden geliştirilmiş olan ve temasla yüksek derecede inhibe olabilen devamlı bir hücre hattıdır. Fibroblast karakterindedir ve hücre transfeksiyon çalışmaları için çok uygundur (253). NIH/3T3 hücreleri, %10 Donör Buzağı Serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren tam DMEM içerisinde, T25 ve T75 hücre kültür flasklarında büyütüldü ve çoğaltıldı. Üç-dört günde bir, hücreler flask tabanını tam olarak kaplamadan Bölüm 3.2.1.1' de anlatıldığı şekilde tripsinizasyon işlemi ile tabandan ayrıldı. T75 flask tabanından tripsinizasyon sırasında 500-1000 µl Tripsin-EDTA kullanıldı. Tripsinizasyon sonrası 1:10 oranında dilüsyon yapılarak kültür devam ettirildi. Kültür flaskları 37°C sıcaklıkta, %5 CO_2' li etüvde (standart kültür koşulları) inkübe edildi.

3.2.5.2. NIH/3T3 Hücrelerinin Dondurularak Saklanması ve Çözülmesi

Tripsinizasyon sonrasında tam DMEM ile reaksiyonun durdurulmasının ardından hücreler 50 ml' lik santrifüj tüpüne aktarıldı. 1800 rpm devirde, 5 dakika santrifüj edilmesinin ardından süpernatan uzaklaştırıldı ve hücre çökeltisi tam DMEM medyum içerisinde süspanse edildi. Süspansiyon içerisindeki hücreler kan sayım cihazında (Beckman Coulter MaxM, ABD) sayıldı ve mililitrede 1-2x10^6 hücre olacak şekilde, gereken miktarda tam DMEM eklendi. %5 veya 10 oranında DMSO eklenmesini takiben her dondurma tüpüne 1 ml hücre süspansiyonu-DMSO karışımı konuldu, tüpler kademeli dondurma sağlamak amacıyla stratofor kutu içerisine yerleştirilmiş pamuk arasına konularak -80°C dondurucuda 2 saat bekletildikten sonra sıvı nitrojen tankına kaldırıldı.

Dondurulmuş olan hücrelerin açılıp kültürleri yapılmak istendiği zaman, hücre süspansiyonunu içeren dondurma tüpü, sıvı nitrojen tankından alındı ve doğrudan 37°C su banyosuna alınarak tamamen çözünmesi sağlandı. İçerisine önceden 10 ml tam DMEM konulmuş 15 ml' lik santrifüj tüpüne aktarılıp 1800 rpm devirde 5 dakika santrifüj edilmesinin ardından süpernatan uzaklaştırıldı. Hücre çökeltisi 10 ml serum içermeyen DMEM içerisinde süspanse edilerek 1800 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi.

Yukarıdaki işlem tekrarlanarak hücrelerin ikinci kez yıkanması sağlandı ve hücre çökeltisi tam DMEM içerisinde süspanse edilerek standart kültür koşullarında kültürü yapıldı.

3.2.5.3. pTargeT/18 ve pTargeT/40L Plazmidlerinin TransFast Transfeksiyon Reaktifi ile NIH/3T3 Hücrelerine Transfeksiyonu

TransFast Transfeksiyon Reaktifi sentetik bir katyonik lipid olan (+)-N,N[bis (2-hidroksietil)-N-metil-N-[2,3-di(tetradekanoyiloksi)propil] amonyum iyodür ve nötral bir lipid olan L-dioleoyil fosfatidiletanolamin (DOPE)' den oluşmaktadır. DOPE çeşitli sentetik katyonik lipidlerin gen transfer kabiliyetini arttırmaktadır. TransFast Transfeksiyon Reaktifi, ökaryötik hücrelere *in vitro* ve *in vivo* olarak nükleik asit aktarmak amacıyla tasarlanmış (254) ve pek çok hücre hattında başarıyla çalışılmıştır.

pTargeT/18, pTargeT/40L ve pTargeT/sadece vektör DNA' ları, plazmidleri içeren JM-109 hücrelerinin 100 µg/ml ampisilin içeren LB-agar petrilerine ekim sonrası oluşan tek kolonilerin çoğaltılması sonrasında elde edildi. TransFast:DNA oranı 1:1 ve 2:1 olarak çalışıldı. 60 mm' lik petrilerde 5 veya 8 µg plazmid DNA kullanılarak yapılan transfeksiyon deneylerinde kullanılan DNA ve reaktif miktarları üretici firmanın önerdiği şekilde hesaplandı ve Tablo 3.7' de belirtilmektedir. pTargeT/18 DNA' sı klonlama sonrası 3 no' lu koloniden elde edildiği için "3", pTargeT/40L DNA' sı klonlama sonrası 4 no' lu koloniden elde edildiği için "4", pTargeT/sadece vektör ise "V" harfiyle gösterilmektedir. 5 µg DNA kullanılan deneyler "5", 8 µg DNA kullanılan deneyler "8", TransFast:DNA oranı 1:1 olduğunda "1", 2:1 olduğunda "2" ile belirtilmektedir.

Transfeksiyon yapılmasından 1 gün önce; 60 mm' lik petrilere, petri başına $5.5x10^5$ NIH/3T3 hücresi gelecek şekilde ekim yapıldı. TransFast reaktifi, hidrasyonunun sağlanması üzerine multilamellar veziküller oluşturan, kurutulmuş lipid film tabaka olarak satın alınmaktadır. Bu nedenle transfeksiyondan 1 gün önce 0.4 mg reaktif içeren tüp içerisine 400 µl nükleaz içermeyen ddH_2O eklenerek lipid filmi süspanse edebilmek amacıyla 10 saniye vortekslendi. Suyun eklenmesiyle katyonik lipid bileşeninin son

konsantrasyonu 1 mM oldu. Süspanse haldeki reaktif -20°C dondurucuya kaldırıldı.

Tablo 3.7. pTargeT vektörlerinin TransFast reaktifi ile NIH/3T3 hücrelerine transfeksiyonunda kullanılan reaktif ve DNA miktarları.

pTargeT/18 transfeksiyon	**3.5.1**	**3.5.2**	**3.8.1**	**3.8.2**
TransFast:DNA oranı	1:1	2:1	1:1	2:1
pTargeT/18 DNA	5 µg	5 µg	8 µg	8 µg
TransFast reaktifi	15 µl	30 µl	24 µl	48 µl
pTargeT/40L transfeksiyon	**4.5.1**	**4.5.2**	**4.8.1**	**4.8.2**
TransFast:DNA oranı	1:1	2:1	1:1	2:1
pTargeT/40L DNA	5 µg	5 µg	8 µg	8 µg
TransFast reaktifi	15 µl	30 µl	24 µl	48 µl
pTargeT/sadece vektör transfeksiyon	**V.5.1**	**V.5.2**	**V.8.1**	**V.8.2**
TransFast:DNA oranı	1:1	2:1	1:1	2:1
pTargeT/sadece vektör DNA	5 µg	5 µg	8 µg	8 µg
TransFast reaktifi	15 µl	30 µl	24 µl	48 µl

Transfeksiyon günü, -20°C dondurucuda bulunan reaktifi içeren tüp oda sıcaklığında çözüldü ve vorteksle karıştırılarak kullanıma hazır hale getirildi. Steril tüplerde toplam reaksiyon hacmini 2 ml' ye tamamlayacak miktarda serumsuz DMEM üzerine Tablo 3.7' de belirtilen miktarlarda DNA konulup vortekslendi, ardından karşılık gelen miktarlarda TransFast reaktifi eklenip vortekslendi ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Bu arada hücrelerin üzerlerindeki medyum alındı. İnkübasyon süresi sonunda vortekslenen 2 ml TransFast/DNA karışımı hücrelerin üzerine eklendi. Bir saat standart kültür koşullarında inkübasyonu takiben, her petriye 4 ml tam medyum eklenerek 48 saat boyunca inkübasyona devam edildi.

48. saat sonunda stabil transfeksiyon deneylerine geçildi. pTargeT plazmidi neomisin dirençlilik genine sahip olduğu için plazmid ile transfekte olan hücrelerin G-418 neomisin analoğuna dirençli olmaları gerekirken, transfekte olmayanların G-418 varlığında ölmeleri beklenmektedir. Bu nedenle 48. saat sonunda hücreler 400 µl Tripsin-EDTA ile tripsinize edilerek petri tabanlarından ayrılmaları sağlandı. Reaksiyon 5 ml tam DMEM ile durduruldu. 1800 rpm devirde 5 dakika santrifüj edilmelerinin ardından süpernatanlar uzaklaştırıldı ve hücre çökeltileri 10 ml tam DMEM' de süspanse edildi. Her hücre grubunun 1/20, 1/100 ve 1/200 oranlarında

dilüsyonları yapılarak 60 mm' lik petrilerde, 700 µg/ml G418 antibiyotik içeren tam DMEM içinde kültürü yapıldı. Haftada iki kez hücrelerin antibiyotikli medyumları değiştirilerek yenilendi. G-418 seleksiyonunun 17. gününde transfekte edilen tüm hücre grupları tripsinizasyon işlemi ile petri tabanlarından ayrıldı ve %10 DMSO eklenerek dondurma tüplerine konuldu. Tüpler Bölüm 3.2.5.2' de anlatıldığı gibi kademeli olarak dondurularak sıvı nitrojen tankına aktarıldı. Ekspresyon analizi için gerçekleştirilen deneylerde kullanılacakları zaman, hücreler Bölüm 3.2.5.2' de anlatıldığı gibi çözüldü ve 700 µg/ml G418 antibiyotik içeren tam DMEM içinde bir hafta kültürleri yapıldıktan sonra kullanıldı.

3.2.5.4. pTargeT/18 Transfeksiyonu Yapılan NIH/3T3 Hücrelerinde IL-18 mRNA Ekspresyonunun RT-PZR ile ve Molekülün Fonksiyonelliğinin ELISA ile Gösterilmesi

Anti-CD3 monoklonal antikoru (mAb) varlığında aktiflenen T-lenfositlerinin IL-18 uyarımıyla yüksek miktarda IFNγ salıverdikleri bilinmektedir (115, 255). pTargeT/18 transfekte edilen hücrelerde IL-18 ekspresyonu RT-PZR ile ve bu hücrelerin kültür süpernatanları ile, anti-CD3 mAb ile uyarılmış dalak lenfositlerinin kültürü yapıldığında IFNγ ekspresyonundaki değişim ELISA ile araştırıldı.

pTargeT/18 Transfekte Edilmiş NIH/3T3 Hücrelerinde IL-18 Ekspresyonunun RT-PZR ile Gösterilmesi

pTargeT/18 transfekte edilmiş NIH/3T3 hücreleri sıvı nitrojen tankından alınarak çözüldü. Bir hafta G-418 antibiyotik seleksiyonu uygulandıktan sonra tripsinizasyon ile flask tabanından ayrılan hücreler 2 kez steril PBS çözeltisi ile yıkanarak antibiyotikten iyice arınmaları sağlandı. Hücrelerin G-418 içermeyen tam RPMI medyum içinde, standart kültür koşullarında 48 saat kültürü yapıldı. 48 saat kültür sonucunda pTargeT/18 transfekte edilmiş 3.5.1, 3.5.2, 3.8.1, 3.8.2 (Bkz. Bölüm 3.2.5.3) ve transfekte olmamış NIH/3T3 hücrelerinin süpernatanları toplandı. Tripsinizasyon işlemi sonrası hücrelerden Bölüm 3.2.1.2' de anlatılana uygun olarak TRIzol ile total RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen total hücresel RNA' lardan Bölüm

3.2.1.3' deki gibi Fermentas RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Litvanya) kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Tablo 3.1' de belirtilen 1 ve 2 no' lu primerler kullanılarak Bölüm 3.2.1.4' deki koşullar ile PZR gerçekleştirildi.

Anti-CD3 mAb ile Doku Kültür Tabakasının Kaplanması

1 mg/ml konsantrasyondaki fare anti-CD3 mAb, steril PBS çözeltisi ile seyreltilerek 3 µg/ml konsantrasyonuna getirildi. Laminer akımlı steril kabinde 96 kuyulu doku kültür tabakasının her kuyusuna 100 µl konularak +4°C' da 24 saat bekletildi. İnkübasyon süresinin sonunda 3 kez steril PBS çözeltisi ile yıkandı.

Balb/*c* Fareden Splenosit İzolasyonu ve Lenfosit Eldesi

Laminer akımlı steril kabinde yedi haftalık bir dişi Balb/*c* farenin servikal dislokasyonunun ardından dalağı çıkartılarak 30 ml steril PBS çözeltisi içeren bir petri kabına alındı. Kapsül altına 10 ml' lik bir enjektörle girildi ve steril PBS çözeltisi ile yıkama yapılarak splenositler PBS çözeltisi içerisine alındı. Splenositleri içeren PBS çözeltisi toplanarak 50 ml' lik santrifüj tüpüne konuldu ve 1800 rpm devirde 5 dakika santrifüj sonrası süpernatan uzaklaştırıldı. Hücre çökeltisi, 5 ml tam RPMI medyum içerisinde süspanse edildi.

15 ml' lik santrifüj tüpüne 5 ml Lympholyte M (Cedarlane Labs, CL5031) konuldu. Üzerine 5 ml splenosit süspansiyonu yayıldı ve oda sıcaklığında 1500 rpm devirde 30 dakika santrifüj sonrası, interfazda yer alan lenfositler toplanarak dibe çöken eritrositlerden ayrılmaları sağlandı. Toplanan lenfositler, 15 ml' lik santrifüj tüpüne konuldu ve üzerine 12 ml' ye kadar tam RPMI medyum konularak 1800 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatanın uzaklaştırılmasının ardından hücre çökeltisi 12 ml tam RPMI medyumda süspanse edildi ve 70 µm' lik hücre süzgecinden (Becton-Dickinson, NJ, ABD) geçirildi. Hücreler kan sayım cihazında (Beckman Coulter MaxM, ABD) sayılarak hücre süspansiyonu 1 ml' de $2x10^6$ hücre olacak şekilde tam RPMI medyum ile seyreltildi.

Lenfositlerin Anti-CD3 mAb ve IL-18 İçeren Kültür Süpernatanları ile Uyarılması

Anti-CD3 mAb ile kaplanmış kuyulara 100 µl lenfosit süspansiyonu ($2x10^5$ hücre) konuldu. pTargeT/18 transfekte edilmiş (3.8.1) ve edilmemiş NIH/3T3 hücrelerinin 48. saat kültür süpernatanları, karşılık gelen kuyulara 100' er µl eklendi. Kokültürün 12, 18, 24, 48, 72. saatlerinde süpernatanlar toplanmak üzere her örnek için beş kuyu hazırlandı ve her örnek üçlü çalışıldı.

Kültür Süpernatanlarında ELISA ile IFNγ Tayini

Belirtilen saatlerde kültür süpernatanları toplandı ve -80°C derin dondurucuya kaldırıldı. R&D Systems Quantikine M Murine IFNγ ELISA kiti (Minneapolis, MN, ABD) kullanılarak süpernatanlarda IFNγ ölçümü yapıldı. Deney koşulları üretici firmanın tavsiyelerine uygun olarak oluşturuldu ve her örnek duplike çalışıldı.

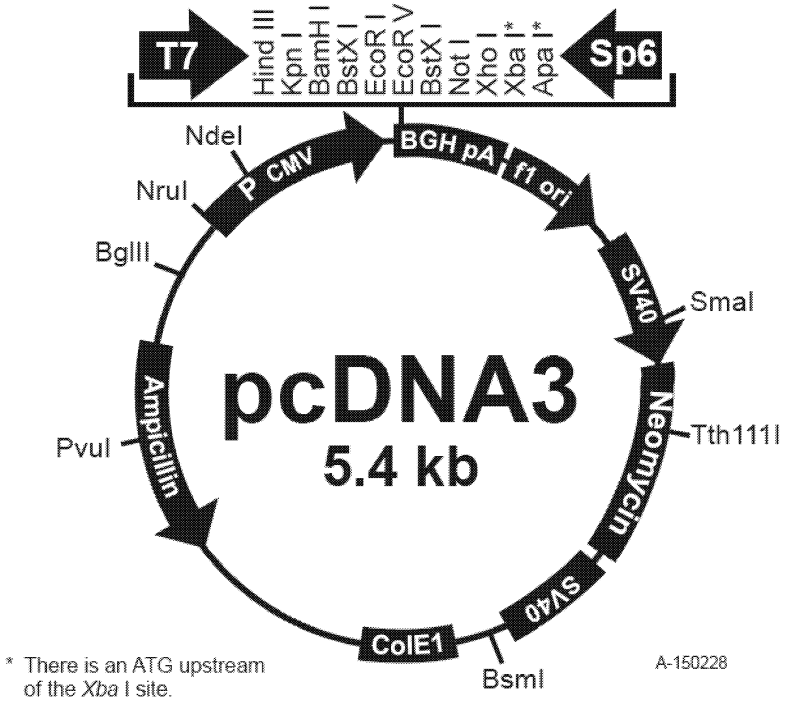
Kısaca; her kuyuya 50 µl *assay* seyrelticisi konuldu. 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.8 ve 9.4 pg/ml konsantrasyonlarında standartlar oluşturuldu. Standartlardan, pozitif kontrolden ve örneklerden 50' şer µl kendi kuyularına konuldu. 0 pg/ml standart kuyularına 50' şer µl *assay* seyrelticisi konuldu. 2 saat oda sıcaklığında inkübasyon sonrası, kuyular 5 kez yıkama çözeltisi ile yıkandı. Her kuyuya 100 µl konjugat konuldu ve 2 saat oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. Kuyular 5 kez yıkama çözeltisi ile yıkandı. Her kuyuya 100 µl substrat çözeltisi eklenmesi sonrasında, oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her kuyuya 100 µl durdurma çözeltisi eklendi. Mikrotabaka okuyucuda, 450 ve 540 nm dalga boyunda optik dansiteleri belirlendi. Her kuyunun 540 nm' deki optik dansite değeri 450 nm' deki optik değerinden çıkartılarak düzeltilmiş optik dansite değeri hesaplandı. Standart kuyularının düzeltilmiş optik değerleri ile konsantrasyonları arasında lineer bir grafik çizilerek, konsantrasyon ile optik dansite arasındaki ilişki formülleştirildi.

3.2.5.5. pTargeT/40L Transfeksiyonu Yapılan NIH/3T3 Hücrelerinde CD40L Ekspresyonunun İmmünfloresan Boyama ile Gösterilmesi

pTargeT/40L (4.8.1) ve pTargeT/sadece vektör transfekte edilmiş NIH/3T3 hücreleri sıvı nitrojen tankından alınarak çözüldü. Bir hafta boyunca 700 µg/ml G-418 içeren tam DMEM içerisinde kültürü yapılarak seleksiyon uygulandıktan sonra tripsinizasyon ile hücrelerin flask tabanından ayrılmaları sağlandı. Hücrelerin 700 µg/ml G-418 içeren tam DMEM' de, içerisine steril bir lam yerleştirilmiş 100 mm' lik petri kabında 48 saat kültürü yapılarak lam üzerine yapışmaları ve büyümeleri sağlandı. 48 saat sonunda lamların üzerine PBS çözeltisi konularak bir kez yıkandı. Ardından lamlar buzda soğutulmuş metanol-aseton (1:1) karışımına batırıldı ve -20°C' da 10 dakika inkübe edilerek hücreler tespit edildi. Lamlar kağıt havlu üzerine alınarak havada kurumaları sağlandı. PBS çözeltisi ile bir kez yıkanmalarının ardından her lamın üzerine 500 µl bloklama tamponu (PBS çözeltisi içinde %1 BSA) konularak tüm yüzeyin kaplanması sağlandı. 37°C' da 30 dakika inkübasyonun ardından bloklama tamponu uzaklaştırıldı. Bloklama tamponu içerisinde seyreltilerek 10 µg/ml konsantrasyona getirilen *hamster* anti-fare CD154-FITC veya *hamster* IgG negatif kontrol:FITC antikorlarından lam üzerine 500 µl konularak yüzeyi iyice kaplaması sağlandı. Bir saat oda sıcaklığında inkübasyonun ardından antikor çözeltisi akıtıldı ve lamlar PBS çözeltisi içerisinde 5 dakika bekletilerek yıkandı. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı ve lamların üzerine lamel kapatılarak floresan mikroskopta incelendi.

3.2.6. CD40L ve Hibrid IL-18 DNA' larının pcDNA3 Vektörüne Subklonlanması

Subklonlama için insan en erken CMV promotoruna sahip 5446 bp büyüklüğündeki pcDNA3 (Invitrogen) vektörü kullanıldı. pcDNA3 plazmidi *ColE1* replikasyon başlangıcı taşıdığı için yüksek kopya numarasına (256) sahip bir plazmiddir. Ampisiline dirençlidir, böylece *in vitro* ampisilinli ortamda seçilebilir ve çoğaltılabilir.



Şekil 3.4. pcDNA3 vektör haritası ve dizi referans noktaları.

Sitomegalovirüs promotoru 209-863

T7 promotoru 864-882

Çoklu bağlanma 889-994

Sp6 promotoru 999-1016

Sığır Büyüme Hormonu (*Bovine Growth Hormone*, BGH) poliA 1018-1249

SV40 promotoru 1790-2115

SV40 replikasyon başlangıcı 1984-2069

Neomisin açık okunma kalıbı (*Open Reading Frame*, ORF) 2151-2945

SV40 poliA 3000-3372

ColE1 başlangıcı 3632-4305

Ampisilin ORF 4450-5310

3.2.6.1. pTargeT/18 ve pTargeT/40L DNA' larının Kimyasal Kompetan DH5α Hücrelerine Isı Şoku Transformasyonu

Buz üzerinde 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüpü içerisine plazmid DNA' larından 2 µl konuldu. 50 µl DH5α kompetan hücresi (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) eklenerek elle, nazikçe karıştırıldı ve 20 dakika buz içerisinde bekletildi. Daha sonra 37°C ısı bloğunda 50 saniye bekletildi ve hemen buz üzerine alındı, 2 dakika buzda inkübe edildi. 950 µl SOC medyum eklenmesinin ardından 37°C ısı bloğunda 1.5 saat inkübe edildi. Bir buçuk saat sonunda, transformasyon reaksiyonu, SOC medyum içerisinde 1:100 oranında seyreltilerek, petri başına 100 µl gelecek şekilde ampisilinli LB-agar petrilerine yayıldı ve 16-24 saat 37°C inkübatörde bekletildi.

3.2.6.2. Koloni Seçimi ve Plazmid DNA İzolasyonu

Ampisilinli LB-agarda çoğalan, *insert* DNA taşıması muhtemel DH5α tek kolonileri ve pcDNA3/sadece vektör taşıyan DH5α tek kolonileri seçilerek 30 ml' lik *universal* tüpte, 100 µg/ml ampisilin içeren 10 ml LB içine çalkalanarak ekildi ve 37°C' da, orbital çalkalamalı kuru hava inkübatöründe 130 rpm devirde gece boyu çoğaltıldı. Gece boyu kültürlerinden plazmid DNA izolasyonu, üretici firmanın tavsiyelerine uygun olarak QIAPrep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak yapıldı. Bakteri süspansiyonunun her 3 ml' si için bir kolon kullanıldı. Bakteri süspansiyonunun her 3 ml' sinden çökelti elde edilmesinin ardından, çökelti 250 µl P1 tamponunda süspanse edildi ve 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Ardından 250 µl P2 tampon eklendi ve 4-6 kez baş aşağı edilerek karıştırıldı. 350 µl N3 tampon eklendikten sonra 4-6 kez baş aşağı edilerek karıştırıldı. 10000 *g* devirde 10 dakika santrifüj sonrası oluşan süpernatan alınarak 1,5 ml' lik ependorf üzerine yerleştirilmiş olan kolona konuldu. Kolonun 1 dakika 10000 *g* devirde santrifüj edilmesinden sonra, kolona 750 µl PE tampon eklendi ve 1 dakika 10000 *g* devirde santrifüj edilerek kolonun yıkanması sağlandı. Bir kez daha santrifüj işlemi tekrarlanarak arda kalan yıkama tamponunun uzaklaşması sağlandı. Kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Kolonun merkezine 50 µl nükleaz içermeyen steril ddH_2O konularak 1 dakika bekletildi. Bir dakika 10000 *g* devirde santrifüj yapılarak plazmid DNA' nın elüsyonu sağlandı.

3.2.6.3. pcDNA3 Vektör ve IL-18 ve CD40L *İnsert* DNA' larının Eldesi

pTargeT/18, pTargeT/40L ve pcDNA3 DNA' larının *Eco*RI ile Kesilmesi

Restriksiyon klonlamada kullanılmak amacıyla, 100 µl plazmid DNA, toplam 120 µl reaksiyon hacmi içerisinde 12 µl 10x React 3 tampon varlığında, 8 µl *Eco*RI (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD), (10 ünite/µl) ile 37°C' da 3-4 saat tutularak kesildi.

pcDNA3 DNA' sının *Eco*RI Restriksiyon Enzim Reaksiyonu Karışımından Saflaştırılması

*Eco*RI ile reaksiyona sokulan pcDNA3 DNA' sını temizlemek amacıyla QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanıldı. Üreticinin tavsiyelerine uyularak PZR saflaştırma protokolü kullanıldı. 120 µl DNA-enzim reaksiyonuna 600 µl PB tamponu eklendi ve karıştırıldı. Karışım ikiye bölünerek iki ayrı kolon kullanıldı. Kolonlar 2 ml' lik toplama tüpüne yerleştirildi. 360 µl karışım kolona uygulandıktan sonra 1 dakika 10000 *g* devirde santrifüj edilerek DNA' nın kolona bağlanması sağlandı. 750 µl PE tamponu eklenip 1 dakika 10000 *g* devirde santrifüj edilerek kolonun yıkanması sağlandı. Arda kalan yıkama tamponunu tamamen uzaklaştırmak için bir kez daha santrifüj edildi. Kolonun yeni bir mikrosantrifüj tüpüne konulmasının ardından, merkezine 50 µl nükleaz içermeyen steril ddH_2O konularak 1 dakika bekletildi. Bir dakika 10000 *g* devirde santrifüj yapılarak plazmid DNA' nın elüsyonu sağlandı.

pcDNA3 Vektör DNA Defosforilasyonu ve Defosforile DNA' nın Fenol Ekstraksiyonu ile Saflaştırılması

Vektörün ligaz enzimi ile kendi kendine bağlanmasını engellemek amacıyla, saflaştırılmış 96 µl pcDNA3 vektör DNA' sı 120 µl toplam reaksiyon hacminde 12 µl 10x alkalen fosfataz tamponu, 7 µl steril nükleaz içermeyen su varlığında 5 µl alkalen fosfataz (*Calf Intestinal Phosphatase*-CIP), (Promega, Madison, WI, ABD), (1 ünite/µl) ile defosforile edildi. Reaksiyon

37ºC su banyosunda 1 saatte gerçekleştirildi. CIP, DNA' dan 5' fosfat gruplarının uzaklaştırılmasını katalizler ve bu nedenle CIP ile muamele edilmiş DNA' lar, ligaz enzimi için gerekli olan 5' fosforil uçlarına sahip olmadıkları için kendi kendilerine bağlanamazlar. CIP reaksiyonu, son konsantrasyon 5 mM olacak şekilde EDTA (500 mM, pH: 8.00) eklenmesi ve ardından 65˚C ısı bloğunda 10 dakika inkübasyon ile sonlandırıldı.

Saflaştırma ve temizleme amacıyla, defosforilasyon reaksiyon karışımı, üzerine 1:1 oranında fenol eklenmesini takiben vortekslendi, 2 dakika 10000 *g* devirde santrifüj sonrası DNA' yı içeren aköz faz toplanarak ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.

Agaroz Jelden DNA İzolasyonu

*Eco*RI ile kesilen pTargeT/18 ve pTargeT/40L DNA' ları ve defosforile edilmiş pcDNA3 DNA' sı %1' lik agaroz jel elektroforezi sonrası jelden QIAquick Gel Extraction Kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) ile üretici firmanın talimatlarına uyularak izole edildi. DNA bandları, UV transillüminatör altında bistüri ile kesilerek çıkartıldı ve mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üç hacim QG tampon eklenmesinin ardından 50˚C ısı bloğunda 10 dakika inkübe edilerek jelin erimesi sağlandı. Bir hacim izopropanol eklenmesini takiben karışım 2 ml' lik toplama tüpüne yerleştirilmiş kolona uygulandı ve kolon 1 dakika 10000 *g* devirde santrifüj edildi. Kolon, 500 µl QG tampon eklenmesini takiben 1 dakika 10000 *g* devirde santrifüj edildi ve ardından 750 µl PE tampon eklenip santrifüj edilerek kolonun yıkanması sağlandı. Arda kalan yıkama tamponunu tamamen uzaklaştırmak için bir kez daha santrifüj edildi. Kolonun yeni bir mikrosantrifüj tüpüne konulmasının ardından, merkezine 50 µl nükleaz içermeyen steril ddH_2O konularak 1 dakika bekletildi. Bir dakika 10000 *g* devirde santrifüj yapılarak plazmid DNA' nın elüsyonu sağlandı. DNA konsantre edicide 60°C' da 30 dakika çevrilerek hacim 10-15 µl' ye indirilerek DNA' nın yoğunlaşması sağlandı.

3.2.6.4. Ligasyon

Ligasyon reaksiyonunda kullanılacak vektör ve *insert* DNA' larının miktarlarını belirlemek amacıyla 2' şer µl DNA örneği ile %1 agaroz jel

elektroforezi yapıldı. Yaklaşık 100 ng vektör DNA' sı kullanılarak *insert*:vektör konsantrasyon oranı yaklaşık 1:1 olacak şekilde, Tablo 3.8' deki reaktan miktarları kullanılarak 16°C' da 19-21 saatte ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3.8. pcDNA3 vektörüyle ligasyon reaksiyonunda kullanılan reaktan ve miktarları. *İnsert*:vektör konsantrasyon oranı 1:1 olarak kullanıldı.

Defosforile pcDNA3-IL-18 Ligasyon	**Reaksiyon**	**Negatif Kontrol**
T4 DNA Ligaz 10x Tampon	2 µl	2 µl
Defosforile pcDNA3 Vektör DNA	0.5 µl	0.5 µl
İnsert DNA (IL-18)	10 µl	-
T4 DNA Ligaz (400 ünite/µl)	1 µl	1 µl
Steril ddH_2O	6.5	16.5 µl
Toplam reaksiyon hacmi	20 µl	20 µl
Defosforile pcDNA3-CD40L Ligasyon	**Reaksiyon**	**Negatif Kontrol**
T4 DNA Ligaz 10x Tampon	1 µl	1 µl
Defosforile pcDNA3 Vektör DNA	1 µl	1 µl
İnsert DNA (CD40L)	4 µl	-
T4 DNA Ligaz (400 ünite/µl)	1 µl	1 µl
Steril ddH_2O	3 µl	7 µl
Toplam reaksiyon hacmi	10 µl	10 µl

3.2.6.5. Isı Şoku Transformasyonu

Buz üzerinde 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüpü içerisine ligasyon reaksiyonunun tamamı konuldu. Transformasyon etkinliğini belirlemek amacıyla 2.5 µl pUC19 DNA (100 pg/µl) kullanıldı. 100 µl DH5α kompetan hücresi (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) eklenerek elle, nazikçe karıştırıldı ve 20 dakika buz içerisinde bekletildi. 37°C ısı bloğunda 50 saniye bekletilmesinin ardından hemen buz üzerine alındı ve 2 dakika buzda inkübe edildi. 1 ml' ye kadar SOC medyum eklenmesinin ardından 37°C ısı bloğunda 1.5 saat inkübe edildi. Bir buçuk saat sonunda transformasyon

reaksiyonundan ve SOC medyum içindeki 1:10 dilüsyonundan 100' er µl ampisilinli LB-agar petrilerine yayıldı ve 16-24 saat 37°C inkübatörde inkübe edildi. pUC19 DNA' sının transformasyonu sonucu koloni sayıları değerlendirilerek Formül 3.2' ye göre transformasyon etkinliği hesaplandı.

$$\text{Transformasyon etkinliği (transforman sayısı/µg DNA)} = \frac{\text{Koloni sayısı}}{\text{pg pUC19 DNA}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{\text{µg}} \times \frac{\text{transforman hacmi}}{\text{yayılan hacim}} \times \text{dilüsyon faktörü} \qquad (3.2)$$

3.2.6.6. Koloni Seçimi ve Plazmid DNA İzolasyonu

Ampisilinli LB-agarda çoğalan, *insert* DNA taşıması muhtemel tek koloniler seçilerek 30 ml' lik *universal* tüpte, 100 µg/ml ampisilin içeren 5 ml LB içine çalkalanarak ekildi ve 37°C' da, orbital çalkalamalı kuru hava inkübatöründe 130 rpm devirde gece boyu çoğaltıldı. Gece boyu kültürlerinden plazmid DNA izolasyonu, üretici firmanın tavsiyelerine uygun olarak, Bölüm 3.2.6.2' deki gibi QIAPrep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak yapıldı.

3.2.6.7. Restriksiyon Enzim Analizi

Elde edilen plazmid DNA' ların *insert* DNA' yı taşıyıp taşımadıkları ve *insert* DNA' nın yönü *Eco*RI, *Sma*I ve *Hind*III/*Xba*I çift kesimi ile belirlendi. Beklenen bant büyüklükleri Tablo 3.9' da gösterilmektedir.

Tablo 3.9. pcDNA3 vektörlerinin restriksiyon enzim analizi sonucunda beklenen DNA büyüklükleri.

		pcDNA3/18	pcDNA3/40L
*Eco*RI		629 bp	870 bp
*Hind*III/*Xba*I		723 bp	964 bp
*Sma*I	Doğru	1179 bp	2009 bp
	Ters	1758 bp	1179 bp

*Eco*RI restriksiyon enzim analizinde, 2 µl plazmid DNA, toplam 20 µl reaksiyon hacmi içerisinde 2 µl 10x React 3 tampon varlığında, 0.5 µl *Eco*RI

(Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD), (10 ünite/µl) ile 37°C' da 1 saat tutularak kesildi. *Sma*I restriksiyon enzim analizinde, 2 µl plazmid DNA, toplam 20 µl reaksiyon hacmi içerisinde 2 µl 10x tampon J ve 2 µl asetillenmiş BSA (1 µg/µl) varlığında, 0.5 µl *Sma*I (Promega, Madison, WI, ABD) (10 ünite/µl) ile 25°C' da 1 saat tutularak kesildi. *Hind*III/*Xba*I (Roche, Almanya) restriksiyon enzim analizinde, 2 µl plazmid DNA, toplam 20 µl reaksiyon hacmi içerisinde 2 µl 10x tampon B varlığında, iki enzimden de 0.5' er µl (10 ünite/µl) ile 37°C' da 1 saat tutularak kesildi.

3.2.7. pcDNA3/18 ve pcDNA3/40L Vektörlerinin HEK293 Hücrelerine Katyonik Polimer Aracılı Transfeksiyonu ve *İn Vitro* Ekspresyonun Gösterilmesi

Elde edilen pcDNA3 vektörlerinin memeli hücrelerinde ekspresyonunu araştırmak amacıyla plazmidler HEK293 insan embriyonik böbrek epitelyal hücre hattına katyonik bir polimer olan PolyFect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak aktarıldı. Ardından plazmid aktarılmış hücrelerde IL-18 ve CD40L ekspresyonları RT-PZR ile araştırıldı.

3.2.7.1. HEK293 Hücrelerinin *İn Vitro* Kültürü

HEK293, insan embriyonik böbrek epitelyal hücre hattıdır ve hücre transfeksiyon çalışmalarında konak olarak sıklıkla kullanılmaktadır. HEK293 hücreleri %10 fötal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren tam DMEM' de T75 hücre kültür flasklarında büyütüldü ve çoğaltıldı. Haftada bir, hücreler flask tabanını tam olarak kaplamadan Bölüm 3.2.1.1' de anlatıldığı şekilde tripsinizasyon işlemi ile tabandan ayrıldı ve 1:5 oranında dilüsyon yapılarak kültür devam ettirildi. Tripsinizasyon sırasında 2 ml Tripsin-EDTA kullanıldı ve tüm santrifüj işlemleri 1000 rpm devirde 5 dakika süreyle gerçekleştirildi. Kültür flaskları 37°C sıcaklıkta, %5 CO_2' li inkübatörde (standart kültür koşulları) inkübe edildi.

3.2.7.2. pcDNA3/18 ve pcDNA3/40L Plazmidlerinin PolyFect Transfeksiyon Reaktifi ile HEK293 Hücrelerine Geçici Transfeksiyonu

PolyFect transfeksiyon reaktifi, üretici firmanın tarifine göre, sık kullanılan hücre hatlarının transfeksiyonu için geliştirilmiş, aktiflenmiş bir dendrimer transfeksiyon reaktifidir. Reaktif, çekirdek merkezden çevreye doğru yayılan ve yüklü amino gruplarıyla sonlanan dalların oluşturduğu küresel bir yapıya sahiptir. PolyFect reaktifi DNA ile kompakt bir yapı oluşturup DNA' nın hücre içerisine girişini sağlar. Ayrıca hücre içerisinde, endozomla birleşmesini takiben lizozomu tamponlayarak lizozomal nükleazların pH inhibisyonuna neden olur. Böylece PolyFect-DNA kompleksinin stabilitesi ve nükleusa sağlam DNA' nın taşınması sağlanmış olur.

pcDNA3/18, pcDNA3/40L ve pcDNA3/sadece vektör DNA' ları, plazmidleri içeren DH5α hücrelerinin 100 µg/ml ampisilin içeren LB-agar petrilerine ekim sonrası oluşan tek kolonilerin çoğaltılması sonrasında elde edildi. Geçici transfeksiyon üretici firmanın tavsiyelerine uyularak gerçekleştirildi. Transfeksiyondan 1 gün önce altı kuyulu kültür tabakalarında her kuyuya, 3 ml tam DMEM medyum içerisinde süspanse edilmiş $6x10^5$ hücre ekildi. Her plazmid için iki kuyu ayrıldı. Transfeksiyon günü hücrelerin yaklaşık %80 oranında kuyu tabanlarını kapladığı gözlendi. Suda çözünmüş halde bulunan plazmid DNA' larına 1:10 oranında 10xTE tampon çözeltisi eklendi. 2 µg DNA, 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüpünde, son hacim 100 µl olacak şekilde serum ve antibiyotik içermeyen DMEM medyumla, seyreltilerek karıştırıldı. Medyumla seyreltilmiş DNA üzerine 20 µl PolyFect reaktifi konularak 5 kez pipetlendi. Karışım 10 dakika oda sıcaklığında bekletilerek DNA-polimer kompleksinin oluşumu sağlandı. Bu arada hücrelerin üzerindeki medyum alınarak 1.5 ml serum ve antibiyotik (%1 penisilin-streptomisin) içeren taze tam DMEM medyum konuldu. DNA-polimer karışımının üzerine de 600 µl tam DMEM medyum eklenip iki kez pipetlenerek karıştırıldı ve karışımın tamamı hücrelerin üzerine aktarıldı. Hücreler 37°C sıcaklıkta, %5 CO_2' li inkübatöre kaldırıldı. Altı saat sonra hücrelerin medyumu yenilendi.

3.2.7.3. pcDNA3/18 ve pcDNA3/40L Transfekte Edilmiş HEK293 Hücrelerinde IL-18 ve CD40L Ekspresyonunun RT-PZR ile Gösterilmesi

RNA İzolasyonu ve Kolon Üzerinde (*On-column DNase Digestion*) DNaz Uygulaması

Transfeksiyonun 48. saatinde transfekte edilmiş hücreler toplandı ve RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) ile üreticinin önerilerine uyularak total RNA izolasyonu yapıldı.

Hücrelerin tabandan ayrılması ve parçalanması amacıyla her kuyuya 350 µl RLT tampon konuldu ve oluşan lizat toplanarak 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Homojenizasyonu sağlamak amacıyla, lizat QIAshredder spin kolonuna (Qiagen, Hilden, Almanya) uygulandı ve kolon 2 dakika 10000 *g* devirde santrifüj edildi. Toplama tüpündeki homojenize lizat üzerine 1 hacim %70 etanol eklendi ve pipetleme ile karıştırıldı. Karışım, 2 ml' lik toplama tüpüne yerleştirilmiş olan mini kolon üzerine uygulandı ve 15 saniye 10000 *g* devirde santrifüj edilerek RNA' nın kolona tutunması sağlandı.

RNase Free DNase Set (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak kolon üzerinde DNase uygulaması yapıldı. Kısaca, kolona 350 µl RW1 tampon konuldu ve 15 saniye 10000 *g* devirde santrifüj edildi. 10 µl DNaz stok çözeltisine 70 µl RDD tamponu eklendi ve karışım kolonun silika-jel membranına konularak 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, kolona 350 µl RW1 tampon uygulandı ve 15 saniye 10000 *g* devirde santrifüj edildi. Kolon yeni bir 2 ml' lik toplama tüpüne aktarıldı ve aşağıdaki yıkama aşamalarına geçildi.

Kolona 500 µl RPE tampon konuldu ve 15 saniye 10000 *g* devirde santrifüj edildi. Tekrar 500 µl RPE tampon konulmasının ardından 2 dakika 10000 *g* devirde santrifüj sonrası kolon, yeni bir 2 ml' lik toplama tüpüne alındı ve 1 dakika 10000 *g* devirde santrifüj edilerek silika-jel membranın iyice kuruması sağlandı. Kolonun yeni bir mikrosantrifüj tüpüne konulmasının ardından 30 µl RNaz içermeyen steril ddH_2O, kolonun merkezine konuldu ve 1 dakika 10000 *g* devirde santrifüj yapılarak RNA' nın elüsyonu sağlandı.

DNaz Uygulaması

Elde edilen RNA' ların DNA içermediğinden emin olmak için tüm örnekler DNaz ile tekrar reaksiyona sokuldu. *DNA free set* (Ambion, Austin, TX, ABD) üreticinin önerilerine uyularak kullanıldı. 0.6 ml' lik mikrosantrifüj tüpünde, RNA örneğinin üzerine 0.1 hacim 10xDNaz I tampon ve 1 µl rDNaz I (2 ünite/µl) eklendi ve 37°C' da 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda 0.1 hacim inaktivasyon reaktifi eklendi ve vortekslenerek karıştırıldı. Arada bir vortekslenerek oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi, 10000 *g* devirde 1.5 dakika santrifüj sonrası RNA' yı içeren süpernatan toplanarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.

PZR Amplifikasyonu İçin İlk Zincir cDNA Sentezi

pcDNA3 transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinden elde edilen RNA' lardan cDNA sentezi SuperScriptIII First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) ile üretici firmanın tavsiyelerine uyularak gerçekleştirildi. DNA kontaminasyonunun olmadığından emin olmak amacıyla her örnek için bir tane de *Reverse* Transkripsiyon negatif (RT(-)) kontrol çalışıldı.

Transfekte hücrelerden elde edilen RNA' lardan 4 µl 0.2 ml' lik PZR tüpüne konuldu ve üzerine 1 µl oligo$(dT)_{20}$ (50 µM), 1 µl bağlanma tamponu ve 2 µl nükleaz içermeyen ddH_2O ilave edildi. Negatif kontrol reaksiyonu için RNA yerine nükleaz içermeyen steril ddH_2O konuldu. 65°C' da 5 dakika inkübasyonun ardından 1 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 10 µl 2x ilk zincir reaksiyon karışımı ve 2 µl Superscript III/RNazOUT Enzim karışımı eklendi. RT(-) kontrol reaksiyonu için enzim karışımı yerine 2 µl nükleaz içermeyen ddH_2O eklendi. Vorteksle karıştırılıp kısaca santrifüjlendikten sonra 50°C' da 50 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 85°C' da 5 dakika bekletilerek sonlandırıldı. Buz üzerinde soğutulmasının ardından cDNA sentez reaksiyonu -20°C dondurucuya kaldırıldı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

IL-18, CD40L ve RNA ekspresyonunun pozitif kontrolü olarak bir *housekeeping* gen olan *gapdh* ekspresyonu, pcDNA3 vektörleri transfekte edilmiş hücrelerden elde edilen cDNA' lardan PZR yapılarak değerlendirildi. Kullanılan primer dizileri Tablo 3.10' da belirtilmektedir. IL-18 *insert* DNA'sı IFNβ sinyal dizisi ve IL-18 olgun PCR ürünlerinin hibridizasyonu sonucu oluşturulduğu için IL-18 DNA' sının çoğaltılmasında kullanılan *forward* primer dizisi, IFNβ sinyal dizisinin eldesinde ve *overlap extension* yönteminde kullanılan 1 no' lu primer dizisi ile aynıdır, *reverse* primer dizisi de olgun IL-18 DNA' sının eldesinde ve *overlap extension* yönteminde kullanılan 2 no' lu primer dizisi ile aynıdır. CD40L *forward* primeri fare CD40L mRNA dizisi (GenBank erişim numarası: NM011616), *reverse* primer ise plazmid DNA' da CD40L *insert* DNA' sının 3' ucunda yer alan ve mRNA' ya transkribe olan restriksiyon enzim bölgesi dizisi temel alınarak belirlendi. Bu sayede iki molekül için de eksojen olarak plazmidden eksprese olan mRNA ekspresyonu araştırılırken yanlışlıkla endojen mRNA ekspresyonunun belirlenmesinin önüne geçildi. RT(-) cDNA sentez reaksiyonları da PZR için kalıp olarak kullanılarak olası bir plazmid DNA kontaminasyonunun gösterilmesi amaçlandı. Böylelikle PZR sonucu RT(+) örneklerde tespit edilen çoğalmanın plazmid DNA' larından mRNA ekspresyonu sonucu olduğu kesin olarak ispatlandı. *Forward* ve *reverse gapdh* primerleri ise fare *gapdh* mRNA dizisine (GenBank erişim numarası: BC083080) uygun olarak belirlendi. PZR pozitif kontrolü olarak steril ddH_2O içerisinde 1:100 oranında seyreltilmiş plazmid DNA' ları kullanıldı. PZR Bölüm 3.2.1.4 ve Tablo 3.2' dekine uygun olarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.10. IL-18 veya CD40L kodlayan pcDNA3 vektörlerinden IL-18 ve CD40L ekspresyonunun ve hücrelerde RNA ekspresyonunun pozitif kontrolü olarak *gapdh* ekspresyonunun RT-PZR ile belirlenmesinde kullanılan primer dizileri.

Primer	Dizi (5'→3')	Ürün (bp)	Tm (°C)
IFNβ sinyal *Forward* (1)	ACCAGCCTGGCTTCCATCATGAACAACA	564	77.3
IL-18 *Reverse* (2)	CCTCCCCACCTAACTTTGATGTAAGTTAGT		68.1
CD40L *Forward*	TTCAGTCAGCATGATAGAAACATACA	841	63.4
CD40L *Reverse*	GAATTCGGATCCTTGCTAGCC		65.7
gapdh Forward	ACCACAGTCCATGCCATCAC	452	66.0
gapdh Reverse	TCCACCACCCTGTTGCTGTA		66.6

3.2.8. IL-18 veya CD40L Kodlayan pTargeT ve pcDNA3 Vektörlerinin LB5010 ve *STaroB Salmonella* Suşlarına Elektroporasyon ile Aktarılması

Zayıflatılmış *STaroB* suşu doğal-tip C5 *ST* suşunda insersiyonel mutasyon oluşturularak elde edilmiştir ve kanamisine dirençlidir (1). Rekombinant DNA' lar önce restriksiyon negatif (r^-), modifikasyon pozitif (m^+) *Salmonella* suşu LB5010' a (257) aktarıldı. Elde edilen kolonilerin çoğaltılmasının ardından izole edilen plazmid DNA' ları daha sonra *STaroB* suşuna aktarılarak *STaroB* içerisinde restriksiyon enzimlerinden etkilenmelerinin önüne geçildi.

3.2.8.1. *Salmonella* Suşlarının Kültürü ve Çoğaltılması

Bakteriler LB içerisinde 37°C orbital çalkalamalı kuru hava inkübatöründe 130 rpm devirde gece boyu çalkalanarak veya LB-agar petrilerinde 37°C inkübatörde gece boyu bekletilerek çoğaltıldı. *STaroB* suşu kanamisine dirençli olduğu için tüm kültürlerine son konsantrasyon 40 µg/ml olacak şekilde kanamisin eklendi. Plazmid DNA' ları aktarılmış olan

bakterilerin 100 µg/ml ampisilin içeren medyumda kültürü yapıldı. Gece boyu LB içerisinde çalkalanarak çoğaltılan bakterilere son konsantrasyon %15 olacak şekilde %80 gliserol eklenerek dondurma tüplerine konuldu ve kullanılana kadar -80°C dondurucuda saklandı. LB-agara ekim yapılacağı zaman istenen bakteriye ait tüp -80°C dondurucudan çıkartılarak 10-20 µl bakteri süspansiyonu öze ile agar üzerine yayıldı.

3.2.8.2. Elektrokompetan Hücre Hazırlanması

LB-agarda çoğaltılmış olan LB5010 ve *STaroB* bakterilerinden tek koloniler alınarak 30 ml' lik *universal* tüpte, 5 ml LB içerisine çalkalanarak gece boyu çoğaltıldı. 100 ml LB içerisinde 1:100 oranında seyreltilerek orbital çalkalamalı kuru hava inkübatöründe 130 rpm devirde inkübe edildi. OD_{600} değeri 0.5-0.55 civarına ulaştığında buz içerisine alınarak 15 dakika bekletildi ve soğuması sağlandı. Hücreler 50 ml' lik iki santrifüj tüpüne aktarıldı ve 4000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilerek hücre çökeltileri elde edildi. Süpernatanın atılmasını takiben hücre çökeltileri 50' şer ml, buzda soğutulmuş steril %10 gliserol içinde süspanse edildi ve 4000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatanın atılmasını takiben iki tüpteki hücre çökeltisi toplam 50 ml buzda soğutulmuş steril %10 gliserol içinde süspanse edilerek birleştirildi ve yukarıda anlatıldığı şekilde santrifüj edildi. 20 ml steril %10 gliserol ile yukarıdaki gibi tekrar yıkanmasını takiben, bakteri çökeltisi 500 µl %10 gliserol içinde süspanse edildi. Elektrokompetan hücreler taze olarak kullanıldı veya dondurma tüplerine konularak -80°C dondurucuya kaldırıldı ve kullanılacakları zaman dondurucudan alınarak buz üzerinde çözüldü.

3.2.8.3. Elektroporasyon

Buz üzerinde soğutulmuş 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüpünde, 40-50 µl elektrokompetan hücre üzerine 1.5-10 µl plazmid DNA eklendi ve buz üzerinde 1 dakika inkübasyonu takiben, önceden buz üzerinde soğutulmuş 0.2 cm' lik elektroporasyon küvetine aktarıldı. Elektroporasyon koşulları 2.5 kV, 200 Ω rezistans, 25 µF kapasitans (12.5 kV/cm, vuruş süresi 5 ms) olarak uygulandı (111, 258). Elektroporasyon sonrası küvete 1 ml SOC medyum eklendi ve hücreler hızla mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak 37°C kuru blokta 1-

1.5 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda elektroporasyon reaksiyonundan ve SOC medyum içinde hazırlanan 1:10 ve 1:100 dilüsyonlarından 200' er µl, antibiyotikli LB-agar petrilerine yayıldı ve 16-24 saat 37°C inkübatörde bekletildi.

3.2.8.4. Plazmid DNA İzolasyonu ve Restriksiyon Enzim Analizi

Elektroporasyon sonrası elde edilen bakteri kolonilerinin plazmid DNA taşıdıkları, kolonilerden izole edilen DNA' ların restriksiyon enzim analizi ile belirlendi. LB medyum içerisinde uygun antibiyotikler varlığında gece boyu çoğaltılmalarının ardından, plazmid DNA izolasyonu Bölüm 3.2.6.2' de anlatıldığı gibi QIAPrep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak yapıldı. Ek olarak, üretici firmanın doğal-tip bakterilerden plazma DNA izolasyonu tavsiyelerine uyularak PE tamponla yıkama öncesi, kolon 500 µl PB tampon ile bir kez yıkandı. pTargeT/18 plazmidi aktarılarak elde edilen kolonilerin *Eco*RI restriksiyon enzim analizinde, 2 µl plazmid DNA, toplam 20 µl reaksiyon hacmi içerisinde 2 µl 10x React 3 tampon varlığında, 0.5 µl *Eco*RI (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) (10 ünite/µl) ile 37°C' da 1 saat tutularak kesildi. pTargeT/40L plazmidi aktarılarak elde edilen kolonilerin *Bgl*II ve *Sal*I restriksiyon enzim analizinde, toplam 20 µl reaksiyon hacmi içerisinde 2 µl plazmid DNA; 2 µl 10x restriksiyon tampon D, 2 µl asetillenmiş BSA (1 µg/µl) varlığında, 0.5 µl *Bgl*II (Promega, Madison, WI, ABD), (10 ünite/µl) ve 0.5 µl *Sal*I (Promega, Madison, WI, ABD), (10 ünite/µl) ile 37°C' da 2 saat tutularak kesildi.

pcDNA3 plazmidleri aktarılarak elde edilen kolonilerin *Hind*III/*Xba*I (Roche, Almanya) restriksiyon enzim analizinde, 2-10 µl plazmid DNA, toplam 20 µl reaksiyon hacmi içerisinde 2 µl 10x tampon B varlığında, iki enzimden de 0.5' er µl (10 ünite/µl) ile 37°C' da 2 saat tutularak kesildi.

3.2.9. Koloni Oluşturan Birim (*colony forming unit*-cfu) Sayılarının Belirlenmesi

pTargeT ve pcDNA3 plazmidlerinin *STaroB* içerisinde *in vitro* stabilitelerini belirlemek amacıyla rekombinant bakteriler Bölüm 3.2.8.1' de daha önce anlatıldığı şekilde antibiyotikli (ampisilin ve kanamisinli) LB-agar

petrilerinde çoğaltıldı. Öze ile bir *loop* bakteri alınarak 50 ml' lik santrifüj tüplerinde 20 ml antibiyotikli LB içerisine çalkalanarak gece boyu çoğaltıldı. LB-agar mikrodalga fırında eritildi ve 50°C su banyosunda 1-2 saat bekletilerek sıcaklığın 50°C' ye düşmesi sağlandı. Gece boyu kültürlerinin steril PBS çözeltisi içerisinde 10^{-1}' den 10^{-6}' ya kadar seri dilüsyonları hazırlandı. 10^{-4}, 10^{-5} ve 10^{-6} dilüsyonlarından 100' er µl alınarak antibiyotiksiz veya antibiyotikli LB-agarla birlikte 100 mm' lik petri kaplarına dökülerek oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Her dilüsyon için ekimler duplike çalışıldı. 37°C inkübatörde gece boyu inkübe edilmelerinin ardından tüm petrilerideki canlı koloni sayıları belirlendi. Gece boyu kültürlerinin mililitresinde bulunan koloni oluşturan birim miktarı Formül 3.3' e göre hesaplandı. Plazmid içermeyen *STaroB* bakterisinin cfu sayıları da aynı şekilde belirlendi, ancak medyaya antibiyotik olarak sadece kanamisin eklendi.

$$\text{cfu/ml} = \text{Duplike petrilerdeki cfu sayısının ortalaması} \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 10 \quad (3.3)$$

3.2.10. *İn Vitro* Plazmid Stabilitesi

İn vitro stabilite yüzdesi, her plazmid için antibiyotikli agarda belirlenen cfu sayısının antibiyotiksiz agarda belirlenen toplam cfu sayısına oranı 100 ile çarpılarak hesaplandı.

3.2.11. Rekombinant *Salmonella' nın İn Vivo* Uygulaması ve Değerlendirilmesi

pcDNA3/18, pcDNA3/40L veya pcDNA3/sadece vektör plazmidlerini taşıyan *STaroB* bakterileri 6-8 haftalık dişi inbred Balb/*c* farelere intravenöz (i.v.) uygulanarak *STaroB* suşunun gen tedavisi vektörü olarak etkinliği ve plazmidlerin *in vivo* stabilitesi ve ekspresyonları araştırıldı.

3.2.11.1. *İn Vivo* Uygulama Öncesi Bakterilerin cfu Sayılarının Hesaplanması

Plazmid taşıyan *STaroB* bakterilerinin Bölüm 3.2.9' da anlatıldığı gibi gece boyu kültürleri yapıldı. Gece boyu kültürlerinin LB içerisinde 10^{-1}' den 10^{-10}' a kadar seri dilüsyonları hazırlandı. Her dilüsyon için OD_{600} değerleri

ölçüldü. Bölüm 3.2.9' daki yöntemle gece boyu kültürlerinin steril PBS çözeltisi içerisinde seri dilüsyonları yapılarak mililitredeki cfu sayıları hesaplandı.

Kültürlerin seri dilüsyonu sonucu elde edilen OD_{600} değerleri ile aynı dilüsyonların cfu sayıları arasında lineer bir grafik çizilerek cfu miktarının OD_{600} değerine bağlı olarak değişimi formülleştirildi.

3.2.11.2. Bakterilerin İntravenöz Uygulanması

pcDNA3/18, pcDNA3/40L ve pcDNA3/sadece vektör taşıyan *STaroB* suşlarının gliserol stoklarından antibiyotikli LB-agar petrilerine ekimleri yapılarak çoğaltıldı. *İn vivo* uygulama yapılmadan bir gün önce Bölüm 3.2.9' da anlatıldığı gibi rekombinant bakterilerin gece boyu kültürleri hazırlandı. Enjeksiyon günü, tüm gece boyu kültürlerinin OD_{600} değerleri ölçülerek mililitredeki cfu sayıları hesaplandı. 200 µl' de $1x10^6$ bakteri olacak şekilde steril PBS çözeltisi içerisinde dilüsyonları yapıldı. Ayrıca, IL-18 ve CD40L kodlayan bakterilerin 100 µl' de $1x10^6$ bakteri olacak şekilde steril PBS çözeltisi içerisinde dilüsyonları yapılarak birleştirildi. Böylece iki suşun birlikte verileceği grup için 200 µl' de $1x10^6$ pcDNA3/18 ve $1x10^6$ pcDNA3/40L taşıyan bakteri olması sağlandı. Toplam 25 tane 6-8 haftalık dişi Balb/*c* faresi alınarak sadece PBS çözeltisi, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör, *STaroB*-pcDNA3/18, *STaroB*-pcDNA3/40L ve *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L birleşik grup olmak üzere 5 grup oluşturuldu ve her grup için 5 fareye i.v. enjeksiyon uygulandı. Negatif kontrol PBS grubuna 200 µl steril PBS çözeltisi uygulandı. Her fareye, karşılık gelen *STaroB* suşu süspansiyonunun 200 µl' si kuyruk veninden enjekte edildi. Verilen bakterilerin gece boyu kültürlerinin Bölüm 3.2.9' daki gibi seri dilüsyonları hazırlanarak, antibiyotikli ve antibiyotiksiz LB-agar içine ekildi ve ertesi gün canlı koloni sayımları yapılarak enjekte edilen koloni sayıları gösterildi.

3.2.11.3. Karaciğer ve Dalakta Bakteri Kolonizasyonları

Rekombinant bakteri enjeksiyonundan 4 gün sonra tüm gruplardaki fareler servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Tüm farelerin karaciğer ve dalakları aseptik koşullara uygun olarak disseke edildi. Organların yarısı steril

bistüri ile kesilerek steril Stomacher torbalarına (Seward, İngiltere) konuldu. Her torbaya 10 ml steril ddH_2O eklenmesini takiben Seward Stomacher 80 (Seward, İngiltere) kullanılarak homojenize edildi. Homojenize organların steril PBS çözeltisi içerisinde 10^{-1}-10^{-4} seri dilüsyonları yapılarak homojenatın kendisi ve her dilüsyondan 100 µl, 4 ml antibiyotikli veya antibiyotiksiz LB-agar ile birlikte 6 kuyulu hücre tabakalarına döküldü (259). Her örnek duplike çalışıldı. Gece boyu 37°C inkübatörde bekletilmelerinin ardından canlı koloni sayımları yapıldı, her organ için ortalama cfu değeri Formül 3.4' e göre belirlendi ve her grupta karaciğer ve dalak için ortalama $\log_{10}$cfu değerleri hesaplandı.

$$\text{cfu/organ} = \underset{\text{ortalaması}}{\text{Duplike petrilerdeki cfu sayısının}} \times \underset{\text{Faktörü}}{\text{Dilüsyon}} \times 200 \qquad (3.4)$$

3.2.11.4. *İn Vivo* Plazmid Stabilitesi

İn vivo stabilite yüzdesi, her grupta karaciğer ve dalak için antibiyotikli agarda belirlenen cfu sayısının ortalamasının antibiyotiksiz agarda belirlenen toplam cfu sayısının ortalamasına oranı 100 ile çarpılarak hesaplandı.

3.2.11.5. *İn Vivo* Ekspresyonun RT-PZR ile Değerlendirilmesi

Rekombinant *STaroB* suşlarının dokulara aktardıkları plazmid DNA' lardan IL-18 ve CD40L ekspresyonunu araştırmak için tüm gruplardan disseke edilen karaciğer ve dalaklardan RNA izolasyonu ve ardından RT-PZR yapıldı.

RNA İzolasyonu İçin Doku Örneklerinin Alınması ve Saklanması

Her organın diseksiyonunu takiben, hızla 20-30 mg büyüklüğünde ikişer parça kesilerek her parça 850 µl RNA Later (Qiagen, Hilden, Almanya) içerisinde dondurma tüpüne konuldu ve bir tüp RNA izolasyonunda kullanılmak üzere +4°C soğutucuya, diğer tüp arşivleme amacıyla -20°C dondurucuya kaldırıldı.

Dokulardan RNA İzolasyonu

Karaciğer ve dalak örneklerinden total RNA izolasyonu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) ile üreticinin önerilerine uyularak gerçekleştirildi. RNazdan yoksun steril 2 ml' lik toplama tüpüne 600 µl RLT tampon eklendi ve içerisine bir tane 5 mm' lik paslanmaz çelik bilye (Retsch Ltd, İngiltere) konuldu. Üzerine ağırlığı 30 mg' dan daha az olan doku parçası eklendi. Mixer Mill MM 300 (Retsch) homojenizatörde 20 Hz' de 2 dakika homojenize edildi. Eşit homojenizasyonu sağlamak için tüplerin konulduğu raflar yer değiştirilerek 2 dakika daha homojenize edildi. Tüplerin 10000 *g* devirde 3 dakika santrifüj edilmesinin ardından süpernatan toplanarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Homojenize lizat üzerine 600 µl %70 etanol eklendi ve pipetleme ile karıştırıldı. Karışım, 2 ml' lik toplama tüpüne yerleştirilmiş olan mini kolon üzerine uygulandı ve 15 saniye 10000 *g* devirde santrifüj edilerek RNA' nın kolona tutunması sağlandı. Kolona 700 µl RW1 tampon uygulandı ve 15 saniye 10000 *g* devirde santrifüj edildi. Kolon yeni bir 2 ml' lik toplama tüpüne aktarıldı ve yıkama aşamalarına geçildi. Kolona 500 µl RPE tampon konuldu ve 15 saniye 10000 *g* devirde santrifüj edildi. Tekrar 500 µl RPE tampon konulmasının ardından 2 dakika 10000 *g* devirde santrifüj sonrası kolon yeni bir 2 ml' lik toplama tüpüne alındı ve 1 dakika 10000 *g* devirde santrifüj edilerek silika-jel membranın iyice kuruması sağlandı. Kolonun yeni bir mikrosantrifüj tüpüne konulmasının ardından 40 µl RNaz içermeyen steril ddH_2O kolonun merkezine eklendi ve 1 dakika 10000 *g* devirde santrifüj yapılarak RNA' nın elüsyonu sağlandı.

DNaz Uygulaması

Elde edilen RNA' ların DNA içermediğinden emin olmak için tüm örnekler DNaz ile reaksiyona sokuldu. DNA *free set* (Ambion, Austin, TX, ABD), üreticinin önerilerine göre kullanıldı. 0.6 ml' lik mikrosantrifüj tüpünde RNA örneğinin üzerine 0.1 hacim 10xDNaz I tampon ve 1 µl rDNaz I (2 ünite/µl) eklendi ve 37°C' da 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda 0.1 hacim inaktivasyon reaktifi eklendi ve vortekslenerek karıştırıldı. Arada bir karıştırılarak oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi, 10000 *g* devirde

1.5 dakika santrifüj sonrası RNA' yı içeren süpernatan toplanarak yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı.

PZR Amplifikasyonu İçin İlk Zincir cDNA Sentezi

Karaciğer ve dalaktan elde edilen RNA' lardan cDNA sentezi SuperScriptIII First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) ile üretici firmanın tavsiyelerine uygun olarak gerçekleştirildi. DNA kontaminasyonunun olmadığından emin olmak amacıyla her örnek için bir tane de *Reverse* Transkripsiyon negatif (RT(-)) kontrol çalışıldı.

4 µl RNA 0.2 ml' lik PZR tüpüne konuldu ve üzerine 1 µl oligo$(dT)_{20}$ (50 µM), 1 µl bağlanma tamponu ve 4 µl nükleaz içermeyen ddH_2O ilave edildi. Negatif kontrol reaksiyonu için RNA yerine nükleaz içermeyen ddH_2O konuldu. 65°C' da 5 dakika inkübasyonun ardından 1 dakika buz üzerinde bekletildi. Ayrı bir tüpte her reaksiyon için 2 µl 10x RT tamponu, 4 µl $MgCl_2$ (25 mM), 2 µl DTT (0.1 M), 1 µl RNazOUT (40 ünite/µl), 1 µl Superscript III RT (200 ünite/µl)' den oluşan cDNA sentez karışımı hazırlandı. RT(-) kontrol reaksiyonu için Superscript III RT (200 ünite/µl) yerine 1 µl nükleaz içermeyen ddH_2O eklendi. RNA/primer karışımının üzerine cDNA sentez karışımından 10 µl eklendi ve pipetlenerek karıştırıldı. Kısa bir santrifüj sonrası 50°C' da 50 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 85°C' da 5 dakika bekletilerek sonlandırıldı. Buz üzerinde soğutulmasının ardından kısa bir santrifüj yapıldı ve 1 µl RNaz H eklenerek 20 dakika 37°C' da inkübe edildi. İnkübasyonu takiben cDNA sentez reaksiyonu -20°C dondurucuya kaldırıldı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

IL-18, CD40L ve RNA ekspresyonunun pozitif kontrolü olarak bir *housekeeping* gen olan *gapdh* ekspresyonu, karaciğer ve dalaktan elde edilen cDNA' lardan PZR yapılarak değerlendirildi. PZR reaktan ve koşulları Bölüm 3.2.7.3' de pcDNA3 vektörleri transfekte edilmiş hücrelerdeki ekspresyonu değerlendirmek için yapılan PZR reaktan ve koşulları ile aynıdır. PZR pozitif kontrol cDNA olarak, pcDNA3 vektörleri transfekte edilmiş olan HEK293 hücrelerinden elde edilmiş olan RT(+) cDNA sentez reaksiyonları

kullanıldı. RT(+) ve RT(-) sentez reaksiyonlarından gerçekleştirilen *gapdh* PZR için, PZR negatif kontrol RT(-) cDNA' sı olarak pcDNA3 vektörleri transfekte edilmiş olan HEK293 hücrelerinden elde edilmiş olan RT(-) cDNA sentez reaksiyonları kullanıldı.

3.2.12. Spektrofotometrik Değerlendirme

Nükleik asitlerin kalite ve miktarlarını belirlemek amacıyla UV/VIS Spectrometer Lambda 20 (Perkin Elmer) veya Biotech photometer (WPA) kullanıldı. 260 nm ve 280 nm dalga boyunda ölçümler yapıldı. 260 nm dalga boyundaki optik dansite (OD_{260}) miktar hesaplamasında kullanılırken, OD_{260}/OD_{280} oranı DNA ve RNA' nın saflığını belirlemek için kullanıldı (260). 1 OD_{260} değerinin çift zincirli DNA için 50 µg/ml, tek zincirli DNA ve RNA için 40 µg/ml' e karşılık geldiği bilinmektedir. Bu değerler molekül sabit değeri olarak kullanılarak, DNA ve RNA miktarları Formül 3.5' e göre hesaplandı.

$$\text{Konsantrasyon (µg/ml)} = OD_{260} \text{ x Dilüsyon Faktörü x Molekül Sabiti} \qquad (3.5)$$

OD_{260}/OD_{280} oranı DNA için 1.8 ve RNA için 2.0 civarında olduğunda molekül saf olarak kabul edildi.

Bakteri büyümesinin ve konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrofotometre analizinde Jenway 6305 UV/Vis Spectrophotometer kullanıldı. Tek kullanımlık küvetler (Sarstedt) kullanıldı ve 600 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak OD_{600} değerleri belirlendi.

3.2.13. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA parçaları horizontal agaroz jel elektroforezi ile ayrıldı ve değerlendirildi. Agaroz, son konsantrasyonu %1 veya %2 (ağırlık/hacim) olacak şekilde 1xTBE tampon içerisine konuldu. Karışım mikrodalga fırında ısıtılarak agarozun tamamen çözülmesi sağlandı ve 55°C' a kadar soğuması sağlandıktan sonra, son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. Hazırlanan jel elektroforez tankına döküldükten sonra donması beklendi. Tanka jelin üzerini tamemen kaplayacak miktarda 1xTBE tampon konulup taraklar çıkartıldı ve DNA örnekleri 1/5 hacim 6xyükleme boyası ile karıştırıldıktan sonra kuyulara

yüklendi. 50 bp DNA *Ladder* (MBI Fermentas, Litvanya) hazırlanırken, 1 hacim DNA Ladder, 1 hacim 6x yükleme boyası ve 4 hacim ddH_2O karıştırıldı ve kuyu başına 6 µl yüklendi. 100 bp ve 1 kb DNA *Ladder* (Promega, Madison, WI, ABD) hazırlanırken, 5 hacim DNA Ladder ve 1 hacim 6x yükleme boyası karıştırıldı ve kuyu başına 6 µl yüklendi. Örnekler oda sıcaklığında, 100-130 volt aralığında elektrik akımı uygulanarak yürütüldü.

LMP agaroz jel, LMP agaroz son konsantrasyonu %0.9 olacak şekilde yukarıdaki gibi hazırlandı. Ancak jel hazırlama ve elektroforez işlemleri soğuk odada (+4°C) gerçekleştirildi. Elektroforez tampon çözeltisi olarak 1xTBE veya belirtilen yerlerde 1xTAE kullanıldı. Örnekler 50 volt elektrik akımı uygulanarak yürütüldü.

3.2.14. İstatistiksel Analiz

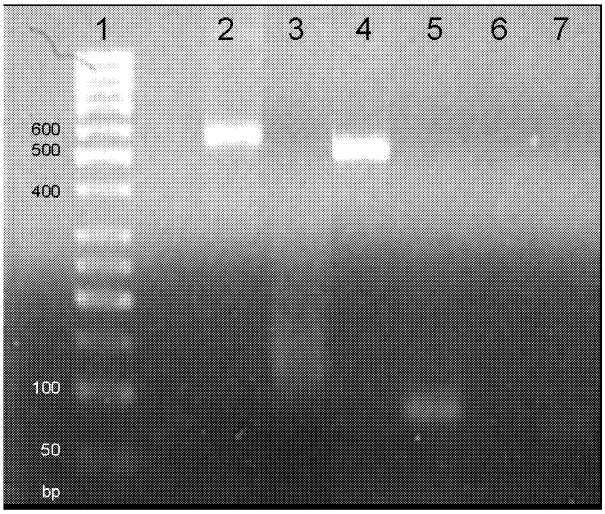
Gruplar arasındaki *in vivo* stabilite düzey karşılaştırmaları Kruskal-Wallis varyans analizi kullanılarak yapıldı. Grupların ikişerli karşılaştırmalarında Mann-Whitney *U*-testi Bonferroni düzeltmesi ile birlikte kullanıldı (ikili karşılaştırmaların her biri için düzeltilmiş *P* değeri 0.0125 olacak şekilde). Genel karşılaştırmalarda toplam tip 1 hata düzeyinin %5' in altında olduğu durum istatistiksel anlamlılık olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Hibrid IL-18 DNA' sının Elde Edilmesi

Biyoaktif ve salınabilen IL-18 molekülü elde etmek amacıyla fare IFNβ sinyal dizisi ile olgun IL-18 dizisi elde edildi ve *overlap extension* yöntemi (158, 159, 248) kullanılarak birleştirildi.

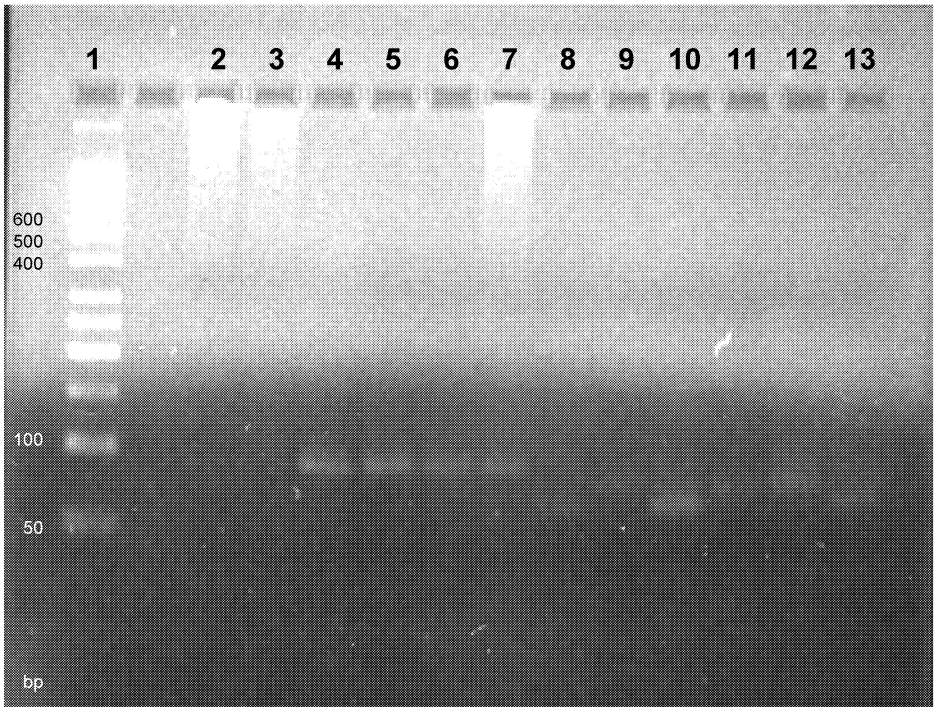
6-8 haftalık dişi Balb/*c* farelerden alınan periferik kandan izole edilen mononükleer hücrelerin 2 µg/ml LPS ile 2 saat uyarılması sonrasında total RNA izolasyonu yapıldı. *Reverse* transksripsiyon yöntemi ile cDNA eldesini takiben IFNβ sinyal ve IL-18 olgun DNA' ları PZR ile çoğaltıldı. *Overlap extension* yöntemi ile iki dizi birleştirildi ve hibrid DNA PZR ile çoğaltıldı. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi yapılarak gösterildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Hibrid IL-18 (564 bp), olgun IL-18 (493 bp) ve IFNβ sinyal (91 bp) PZR ürünlerinin %2' lik agaroz jel elektroforezi. IFNβ sinyal dizisinin 1 ve 4 no' lu primerler ile ve olgun IL-18 dizisinin 2 ve 3 no' lu primerler ile çoğaltılmasının ardından hibrid IL-18 DNA' sı *overlap extension* yöntemiyle elde edildi. Kuyular: 1. 50 bp DNA *Ladder*, 2. Hibrid IL-18 DNA (4 ve 5 no' lu kuyuların *overlap extension* ürünü), 3. *Overlap extension* yönteminin negatif kontrol reaksiyonu (6 ve 7 no' lu kuyuların *overlap extension* ürünü), 4. Olgun IL-18 DNA (2 ve 3 no' lu primerler ile çoğaltılmış PZR ürünü), 5. IFNβ sinyal dizisi (1 ve 4 no' lu primerler ile çoğaltılmış PZR ürünü), 6. ve 7. Sırasıyla 2 ve 3 no' lu primerler, ve 1 ve 4 no' lu primerler ile kalıp DNA yerine ddH_2O kullanılan negatif kontrol PZR ürünleri.

4.1.1. IFNβ Sinyal Dizisinin Primer Dimer ve Artıklarından Ayrılması

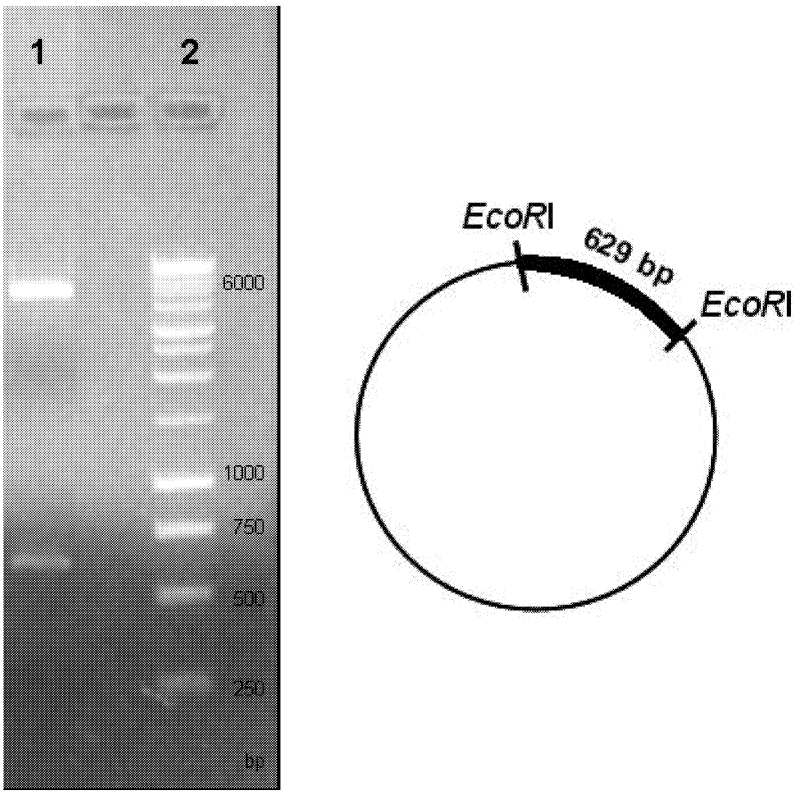
IFNβ sinyal dizisi, 91 bp olması nedeni ile jel elektroforezi yapıldığında, PZR reaksiyonu sırasında oluşan primer dimerleri ve primer artıklarıyla karışabilen bir bölgede görülmektedir. Bu nedenle farklı primer ve dNTP konsantrasyonları denenerek yapılan PZR sonucunda ayırım belirgin olarak gösterildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Farklı primer ve dNTP konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilen IFNβ sinyal dizisi (91 bp) PZR ürünlerinin %2' lik agaroz jel elektroforezi. Kuyular: 1. 50 bp DNA *Ladder*, 2. dNTP: 0.1 mM, primerler: 0.2 µg/ml, 3. dNTP: 0.2 mM, primerler: 0.2 µg/ml, 4. dNTP: 0.1 mM, primerler: 0.4 µg/ml, 5. dNTP: 0.2 mM, primerler: 0.4 µg/ml, 6. dNTP: 0.1 mM, primerler: 0.3 µg/ml, 7. dNTP: 0.2 mM, primerler: 0.3 µg/ml, 8. 2. kuyunun negatif kontrolü, 9. 3. kuyunun negatif kontrolü, 10. 4. kuyunun negatif kontrolü, 11. 5. kuyunun negatif kontrolü, 12. 6. kuyunun negatif kontrolü, 13. 7. kuyunun negatif kontrolü.

4.2. Hibrid IL-18 DNA' sının pTargeT Vektörüne T-A Klonlama Yöntemiyle Klonlanması

İnsert:vektör DNA konsantrasyon oranı 5:1 olacak şekilde gerçekleştirilen ligasyon reaksiyonu sonucunda hibrid IL-18 DNA' sı pTargeT vektörüne T-A klonlama yöntemiyle klonlandı (Şekil 4.3).



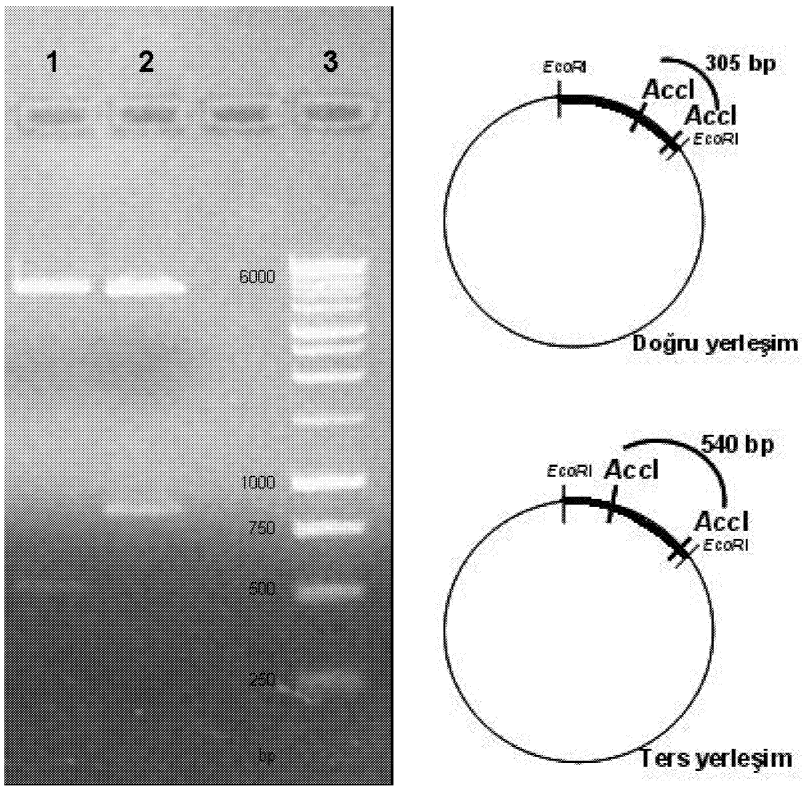
Şekil 4.3. Hibrid IL-18 DNA' sının pTargeT vektörüne klonlanmasının ardından elde edilen beyaz kolonilerden birinden (3 no' lu koloni) izole edilen plazmid DNA' nın *Eco*RI restriksiyon enzim analizi. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, kuyular: 1. *Eco*RI ile kesim sonrasında 5.67 kb büyüklüğündeki lineer pTargeT plazmidi ve 629 bp büyüklüğündeki *insert* IL-18 DNA' sı görülmektedir. 2. 1 kb DNA *Ladder.*

Hibrid IL-18-pTargeT ligasyonu sonrası transformasyon reaksiyonunun tamamının yayıldığı petrilerde toplam 3 beyaz, 4 tane de mavi koloni oluştuğu gözlendi. 100' er µl transformasyon reaksiyonu yayılan iki tane negatif kontrol petrisinde toplam 5 mavi koloni sayıldı. 100' er µl

transformasyon reaksiyonu yayılan iki pozitif kontrol petrisinde ise toplam 190 beyaz, 27 mavi koloni sayıldı.

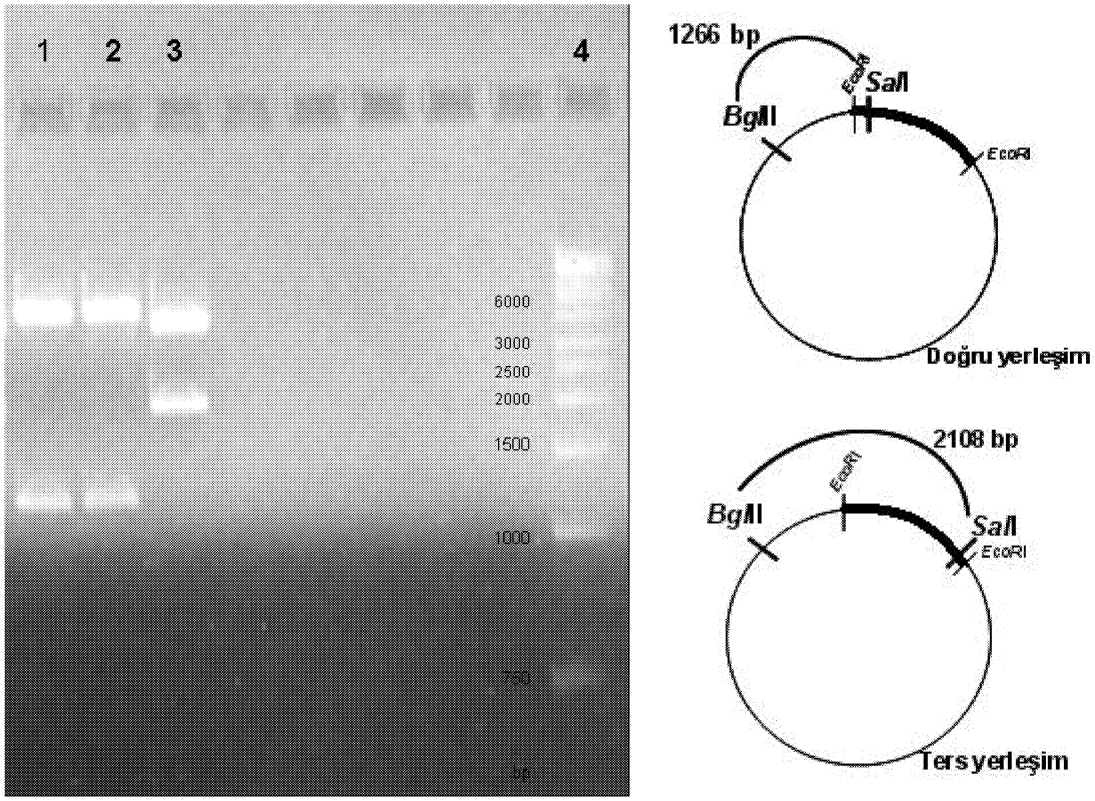
4.3. CD40L DNA' sının pTargeT Vektörüne Restriksiyon Klonlama Yöntemiyle Klonlanması

Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuarları' nda T-A klonlama yöntemiyle fare CD40L DNA' sı takılmış olan pTargeT (Promega, Madison, WI, ABD) vektörünün (252) restriksiyon enzim analizi yapıldı ve *insert* DNA yönünün ters olduğu belirlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. CD40L DNA' sı taşıyan pTargeT vektörünün restriksiyon enzim analizi. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, kuyular: 1. *Acc*I ile kesim sonucu 540 bp büyüklüğüne uyan band görülmektedir ve *insert* DNA' nın yönünün ters olduğunu göstermektedir. Doğru yerleşim olması durumunda 305 bp büyüklüğünde bir band olması gerekmektedir. 2. *Eco*RI ile kesim sonucu 870 bp büyüklüğünde *insert* DNA görülmektedir. 3. 1 kb DNA *Ladder.*

Fare CD40L *insert* DNA' sı elde edilerek restriksiyon klonlama yöntemiyle pTargetT vektörüne klonlandı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. CD40L *insert* DNA' sının pTargeT vektörüne restriksiyon klonlanması sonucu elde edilen kolonilerden plazmid DNA izolasyonunu takiben *Bgl*II/*Sal*I restriksiyon enzim analizi. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, kuyular: 1 ve 2. Doğru yerleşimli *insert* DNA' ya sahip koloniler, 1266 bp büyüklüğünde band görülmektedir, 3. Ters yerleşimli *insert* DNA' ya sahip koloni, 2108 bp büyüklüğünde band görülmektedir, 4. 1 kb DNA *Ladder*.

Klonlama reaksiyonu sonucunda elde edilen koloni sayıları Tablo 4.1' de gösterilmektedir. Alkalen fosfataz (CIP) ile reaksiyona sokulmuş vektör ile sokulmamış vektör DNA' larının negatif kontrolleri arasında belirgin fark gözlendi. Bu da vektörün CIP ile reaksiyona sokulması durumunda, kendi kendine ligasyonunun etkili bir şekilde engellendiğini göstermektedir. Ayrıca CIP ile muamele edilmiş vektör DNA' sı ile *insert* DNA ligasyonu sonucunda muamele edilmemiş vektörle ligasyona oranla daha fazla koloni olduğu gözlendi.

Tablo 4.1. CD40L-pTargeT restriksiyon klonlama sonucu X-Gal/IPTG/ ampisilinli LB-agar petrilerindeki beyaz koloni sayıları.

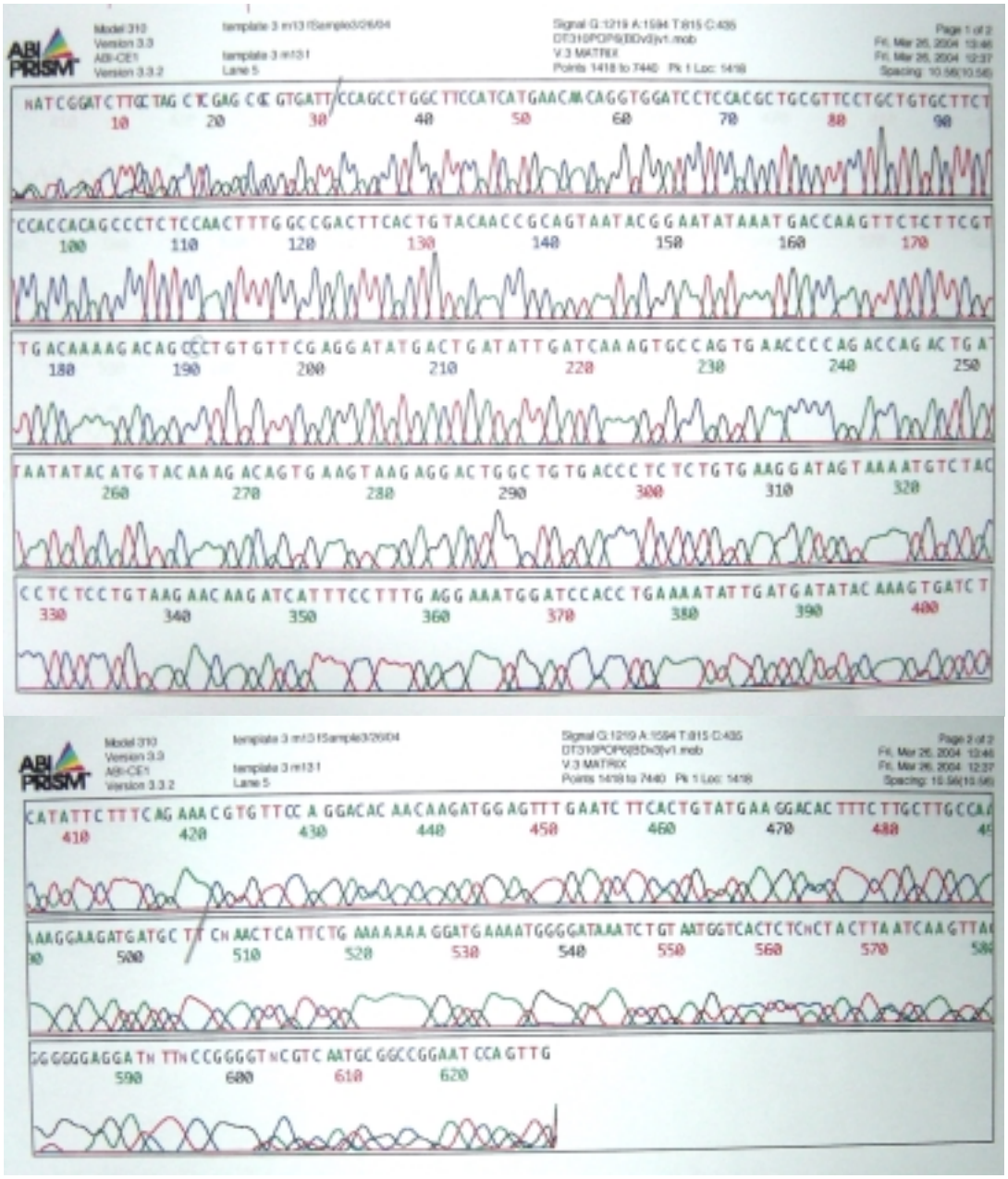
Ligasyon reaksiyonu	Petrilerdeki beyaz koloni sayıları	Toplam beyaz koloni sayısı
CIP-pTargeT+*insert* DNA	59, 33, 21, 18, 9	140
CIP-pTargeT	3, 3, 0, 0, 0	6
pTargeT+*insert* DNA	12, 12, 10, 9, 6	45
pTargeT	22, 17, 15, 6, 6	66

XL1-Blue kompetan hücreleri ile transformasyon sonucunda negatif kontroller de dahil olmak üzere hiç mavi koloni bulunmaması, XL1-Blue hücrelerinin β-galaktozidaz aktivitesinde bir problem olması olasılığını düşündürmektedir (Bkz. Bölüm 3.2.2).

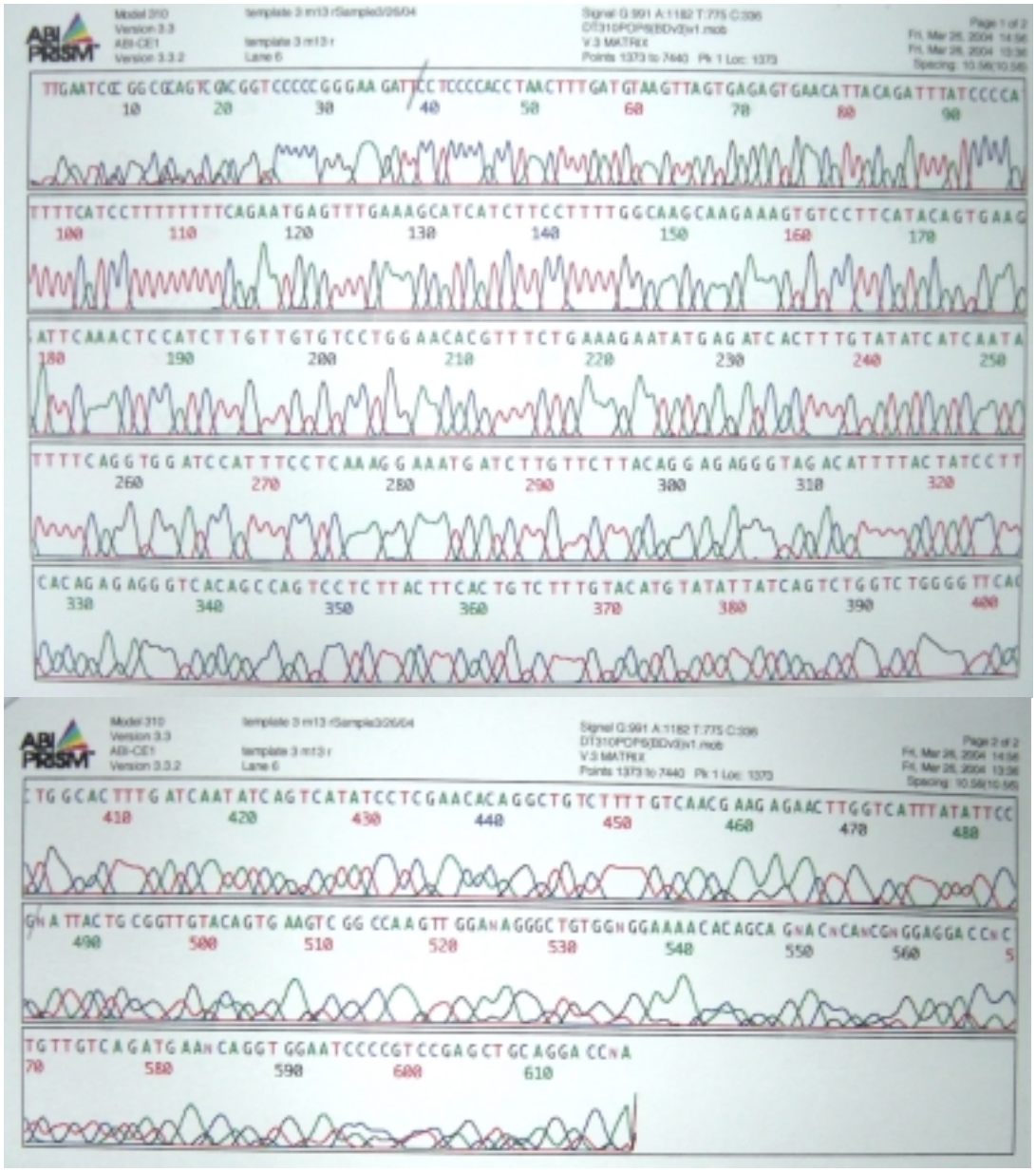
4.4. pTargeT/18 ve pTargeT/40L Vektörlerinin DNA Dizi Analizi

pTargeT/18 ve pTargeT/40L vektörlerinin *insert* DNA' larının dizi analizi Ankara Üniversitesi, Hepatoloji Enstitüsü Laboratuarları' nda, dideoksi zincir sonlanma yöntemi ile ABI Prizm 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems)' da otomatik olarak gerçekleştirildi.

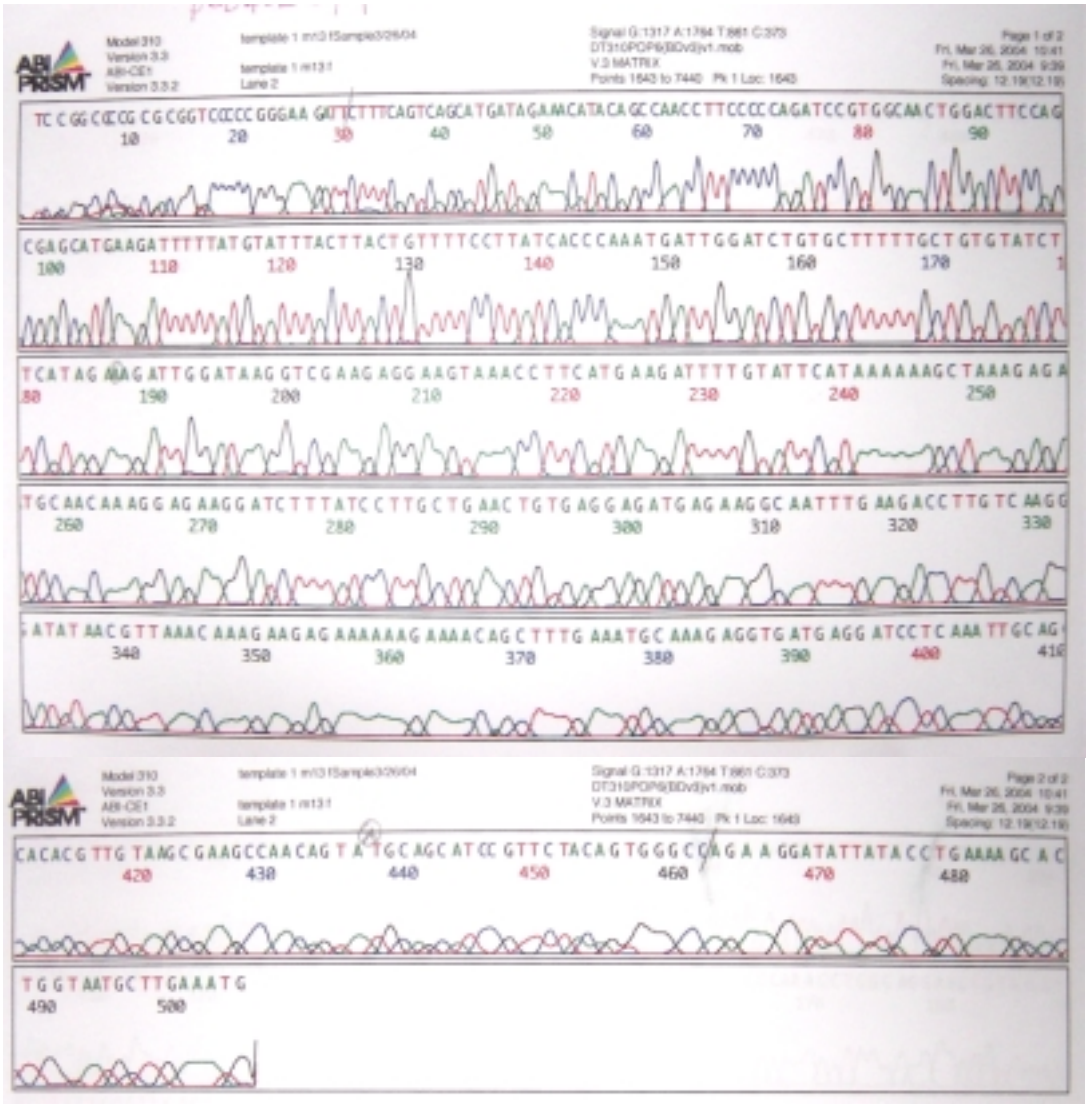
Otomatik DNA dizi analizi zonucunda hibrid IL-18 DNA' sının yönünün ve dizisinin doğruluğu gösterildi (Şekil 4.6 ve 4.7). CD40L DNA' sının ise 507. pozisyonunda A (adenin)→G (guanin) dönüşümü tespit edildi (Şekil 4.8 ve 4.9). Ancak açık okunma kalıbı değerlendirildiğinde GAA (Glu) → GAG (Glu) dönüşümü gerçekleştiğinden bu nokta mutasyonu sessiz bir mutasyondur.



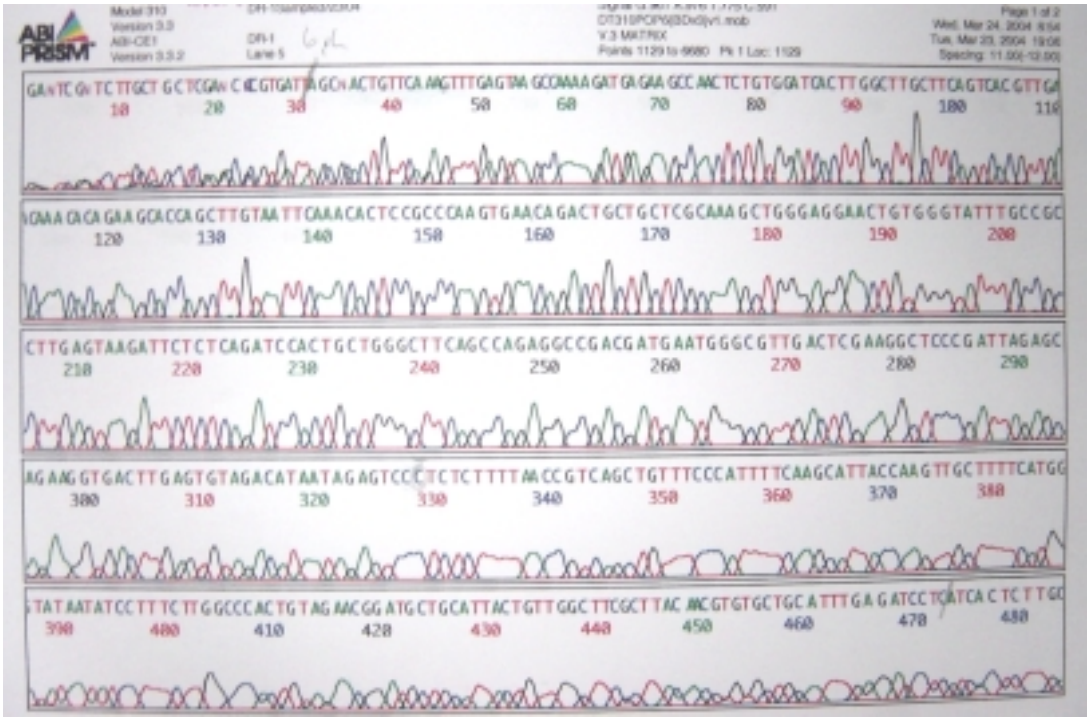
Şekil 4.6. pTarget/18 DNA' sının *forward* primer ile otomatik dizi analizi. Şekilde görülen dizinin 32. pozisyonundan başlayan IL-18 *insert* DNA'sı 505. pozisyona kadar analiz edilebilmektedir. Bu bölge, hibrid IL-18 DNA' sının 1-474. nükleotidleri arasındaki dizisiyle aynıdır.



Şekil 4.7. pTarget/18 DNA' sının *reverse* primer ile otomatik dizi analizi. Şekilde görülen dizinin 39. pozisyonundan başlayan IL-18 *insert* DNA'sı 485. pozisyona kadar analiz edilebilmektedir. Bu bölge, hibrid IL-18 DNA' sının *reverse* ve komplementer dizisinin 1-447. nükleotidleri arasındaki dizisiyle aynıdır.



Şekil 4.8. pTarget/40L DNA' sının *forward* primer ile otomatik dizi analizi. Şekilde görülen dizinin 31. pozisyonundan başlayan CD40L *insert* DNA'sı 435. pozisyona kadar analiz edilebilmektedir. Bu bölge, CD40L DNA' sının 1-405. nükleotidleri arasındaki dizisiyle aynıdır.



Şekil 4.9. pTarget/40L DNA' sının *reverse* primer ile otomatik dizi analizi. Şekilde görülen dizinin 32. pozisyonundan başlayan CD40L *insert* DNA'sı 461. pozisyona kadar analiz edilebilmektedir. 35. pozisyonda N ile ifade edilen bölgede GC nükleotidlerinin yer aldığı görülmektedir. Şekilde görülen dizinin 329. pozisyonundaki C (sitozin) hariç bu bölge CD40L DNA' sının *reverse* ve komplementer dizisinin 1-430. nükleotidleri arasındaki dizisiyle aynıdır. Şekildeki 329. pozisyon, CD40L DNA' sının *reverse* ve komplementer dizisinin 299. pozisyonuna karşılık gelmektedir. Buna göre bu pozisyonda T (timin) yerine C (sitozin) yer almaktadır. Bu da CD40L DNA dizisinin 507. pozisyonunda A (adenin)→G (guanin) dönüşümü olduğunu göstermektedir.

Otomatik DNA dizi analizi sonucu elde edilen hibrid IL-18 ve CD40L *insert* DNA dizilerine *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) analizi yapılarak nükleotid-nükleotid hizalanmasına bakıldığında, hibrid IL-18 DNA' sının 1-82 bp arasındaki nükleotid dizisinin fare IFNβ nükleotid dizisinin (GenBank ulaşım numarası: NM010510) 3-84 bp arasındaki dizisiyle ve 81-564 bp arasındaki nükleotid dizisinin ise fare IL-18 nükleotid dizisinin (GenBank ulaşım numarası: NM008360) 269-752 bp arasındaki dizisiyle tamamen aynı olduğu belirlendi (Şekil 4.10). CD40L DNA' sının da 507. pozisyondaki A→G dönüşümü hariç fare CD40L nükleotid dizisinin (GenBank ulaşım numarası: NM011616) 1-805 bp arasındaki dizisiyle aynı olduğu görüldü (Şekil 4.11).

```
Hibrid IL-18  1    ACCAGCCTGGCTTCCATCATGAACAACAGGTGGATCCTCCACGCTGCGTTCCTGCTGTGC  60
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NM 010510     3    ACCAGCCTGGCTTCCATCATGAACAACAGGTGGATCCTCCACGCTGCGTTCCTGCTGTGC  62

Hibrid IL-18  61   TTCTCCACCACAGCCCTCTCCA  82
                   ||||||||||||||||||||||
NM 010510     63   TTCTCCACCACAGCCCTCTCCA  84

Hibrid IL-18  81   CAACTTTGGCCGACTTCACTGTACAACCGCAGTAATACGGAATATAAATGACCAAGTTCT  140
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NM 008360     269  CAACTTTGGCCGACTTCACTGTACAACCGCAGTAATACGGAATATAAATGACCAAGTTCT  328

Hibrid IL-18  141  CTTCGTTGACAAAAGACAGCCTGTGTTCGAGGATATGACTGATATTGATCAAAGTGCCAG  200
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NM 008360     329  CTTCGTTGACAAAAGACAGCCTGTGTTCGAGGATATGACTGATATTGATCAAAGTGCCAG  388

Hibrid IL-18  201  TGAACCCCAGACCAGACTGATAATATACATGTACAAAGACAGTGAAGTAAGAGGACTGGC  260
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NM 008360     389  TGAACCCCAGACCAGACTGATAATATACATGTACAAAGACAGTGAAGTAAGAGGACTGGC  448

Hibrid IL-18  261  TGTGACCCTCTCTGTGAAGGATAGTAAAATGTCTACCCTCTCCTGTAAGAACAAGATCAT  320
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NM 008360     449  TGTGACCCTCTCTGTGAAGGATAGTAAAATGTCTACCCTCTCCTGTAAGAACAAGATCAT  508

Hibrid IL-18  321  TTCCTTTGAGGAAATGGATCCACCTGAAAATATTGATGATATACAAAGTGATCTCATATT  380
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NM 008360     509  TTCCTTTGAGGAAATGGATCCACCTGAAAATATTGATGATATACAAAGTGATCTCATATT  568

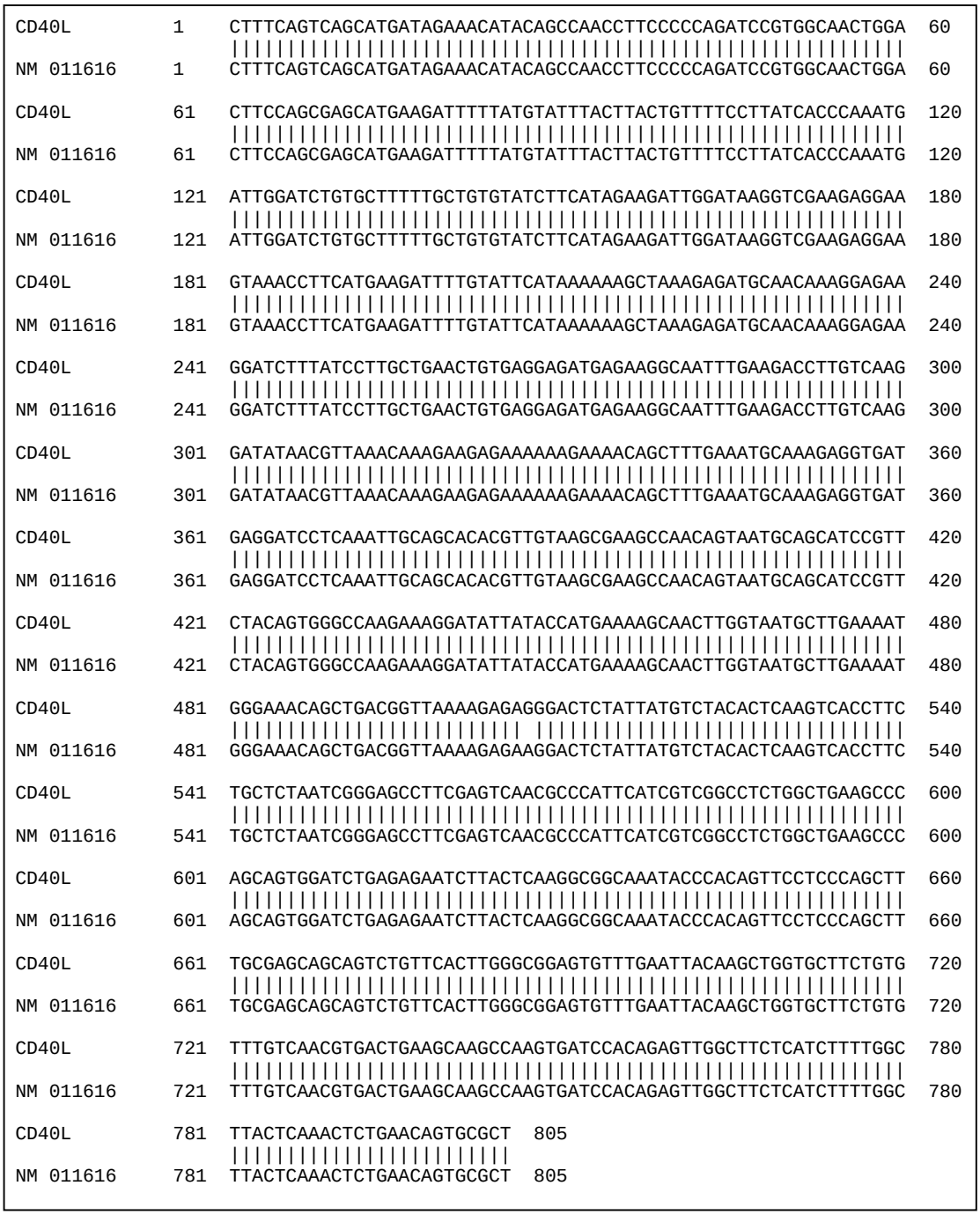
Hibrid IL-18  381  CTTTCAGAAACGTGTTCCAGGACACAACAAGATGGAGTTTGAATCTTCACTGTATGAAGG  440
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NM 008360     569  CTTTCAGAAACGTGTTCCAGGACACAACAAGATGGAGTTTGAATCTTCACTGTATGAAGG  628

Hibrid IL-18  441  ACACTTTCTTGCTTGCCAAAAGGAAGATGATGCTTTCAAACTCATTCTGAAAAAAAAGGA  500
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NM 008360     629  ACACTTTCTTGCTTGCCAAAAGGAAGATGATGCTTTCAAACTCATTCTGAAAAAAAAGGA  688

Hibrid IL-18  501  TGAAAATGGGGATAAATCTGTAATGTTCACTCTCACTAACTTACATCAAAGTTAGGTGGG  560
                   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NM 008360     689  TGAAAATGGGGATAAATCTGTAATGTTCACTCTCACTAACTTACATCAAAGTTAGGTGGG  748

Hibrid IL-18  561  GAGG  564
                   ||||
NM 008360     749  GAGG  752
```

Şekil 4.10. Hibrid IL-18 *insert* DNA' sının nükleotid dizisinin BLAST analizi sonrasında nükleotid-nükleotid hizalanması.



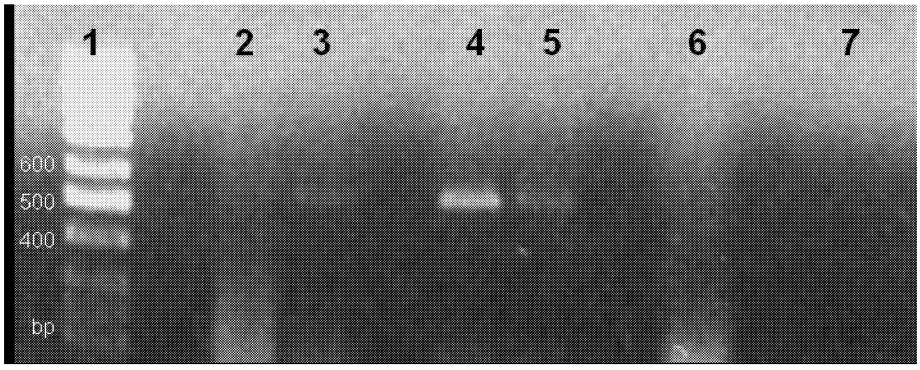
Şekil 4.11. CD40L *insert* DNA' sına ait nükleotid dizisinin BLAST analizi sonrasında nükleotid-nükleotid hizalanması.

4.5. pTargeT/18 ve pTargeT/40L Vektörlerinin NIH/3T3 Hücrelerine Katyonik Lipozom Aracılı Transfeksiyonu ve *İn Vitro* Ekspresyonun Gösterilmesi

Elde edilen pTargeT vektörlerinin memeli hücrelerinde ekspresyonunu araştırmak amacıyla plazmidler, NIH/3T3 fare fibroblastlarına katyonik bir lipozom olan TransFast Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, ABD) kullanılarak aktarıldı. Stabil transfeksiyon amacıyla yapılan G-418 antibiyotik seleksiyonunun dört-beşinci gününden itibaren transfekte edilmemiş hücreler ölmeye başlarken, vektör transfekte edilmiş hücrelerin çoğalmaya devam ettikleri gözlendi. pTargeT/18 transfekte edilen hücrelerde IL-18 ekspresyonu RT-PZR ile ve bu hücrelerin kültür süpernatanları ile anti-CD3 monoklonal antikor (mAb) ile uyarılan lenfositlerin kültürü yapıldığında IFNγ ekspresyonundaki değişim ELISA ile araştırıldı. pTargeT/40L aktarılmış hücrelerin yüzeyindeki CD40L ekspresyonu ise immünfloresan boyama ile değerlendirildi.

4.5.1. pTargeT/18 Transfeksiyonu Yapılan NIH/3T3 Hücrelerinde RT-PZR ile IL-18 Ekspresyonunun Gösterilmesi

pTargeT/18 transfekte edilen hücrelerde IL-18 ekspresyonu RT-PZR ile gösterildi (Şekil 4.12).

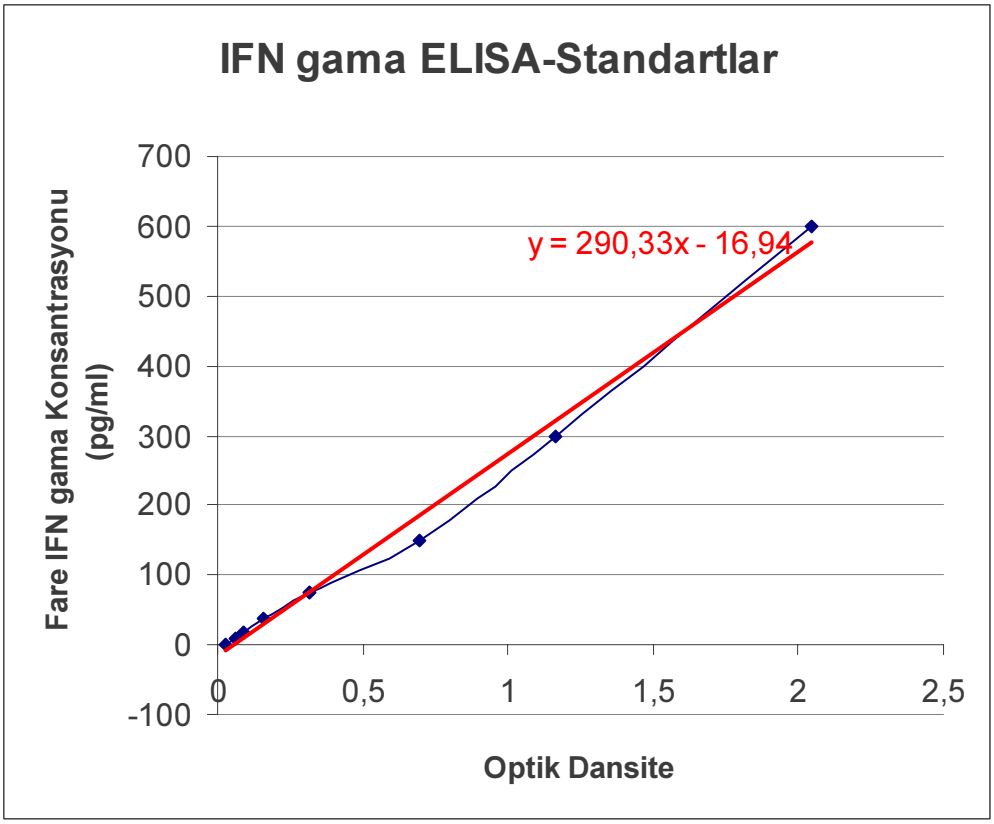


Şekil 4.12. pTargeT/18 transfekte edilmiş hücrelerden RT-PZR sonrası %1' lik agaroz jel elektroforezi. Kuyular: 1. 50 bp DNA *Ladder*, 2-5. pTarget/18 transfekte hücreler, sırasıyla 3.5.1, 3.5.2, 3.8.1, 3.8.2 olarak isimlendirilmiş hücreler (Bkz. Bölüm 3.2.5.3). 6. transfekte edilmemiş NIH/3T3 hücreleri, 7. PZR negatif kontrol, kalıp DNA yerine ddH_2O kullanıldı.

4.5.2. pTargeT/18 Transfeksiyonu Yapılan NIH/3T3 Hücrelerinde IL-18 Molekülünün Fonksiyonelliğinin ELISA ile Gösterilmesi

Anti-CD3 monoklonal antikoru (mAb) varlığında aktiflenen T-lenfositlerinin IL-18 varlığında yüksek miktarda IFNγ salgıladıkları gösterilmiştir (115, 255). pTargeT/18 transfekte edilmiş veya edilmemiş NIH/3T3 hücrelerinin kültür süpernatanları ile anti-CD3 mAb ile uyarılan dalak lenfositlerinin kültürü yapıldığında IL-18 etkisi ile IFNγ ekspresyonundaki değişim ELISA ile araştırıldı.

Standartların düzeltilmiş optik dansitesi ile konsantrasyonları arasındaki lineer grafik ve formül kullanılarak lenfosit kültür süpernatanlarındaki IFNγ konsantrasyonları belirlendi (Şekil 4.13). 290.37 pg/ml olarak ölçülen pozitif kontrol konsantrasyonunun ELISA kiti (R&D Systems Quantikine M Murine IFNγ ELISA kiti, Minneapolis, MN, ABD) içerisinde belirtilen konsantrasyona (225-375 pg/ml) uygun olduğu tespit edildi.

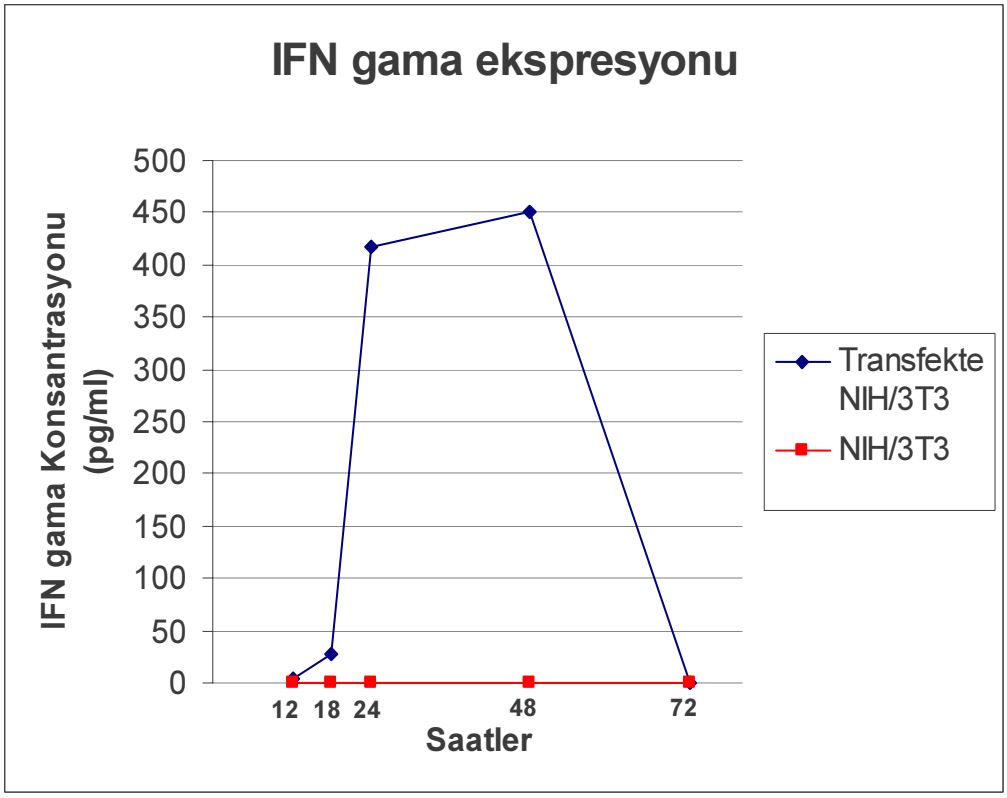


Şekil 4.13. Standartların düzeltilmiş optik dansite değerleri ile konsantrasyonları arasındaki lineer ilişki.

pTargeT/18 transfekte edilmiş NIH/3T3 hücrelerinin süpernatanları ile kültürü yapılan lenfositlerde, 12. saatte IFNγ ekspresyonunun var olduğu, 18 ve 24. saatlerde artan düzeylerde devam ettiği, 48. saatte ise en yüksek değere ulaştığı tespit edildi (Tablo 4.2, Şekil 4.14). Böylece pTargeT/18 aktarılmış NIH/3T3 hücreleri tarafından eksprese edilen IL-18 molekülünün dalak lenfositlerinde IFNγ ekspresyonunu arttırdığı gösterildi ve molekülün fonksiyonel olduğu ispat edildi.

Tablo 4.2. pTargeT/18 transfekte edilmiş veya edilmemiş NIH/3T3' lere ait kültür süpernatanı ile anti-CD3 mAb ile uyarılmış fare dalak lenfositlerinin kültürü sonucu lenfositlerin kültür süpernatanlarındaki IFNγ düzeyleri.

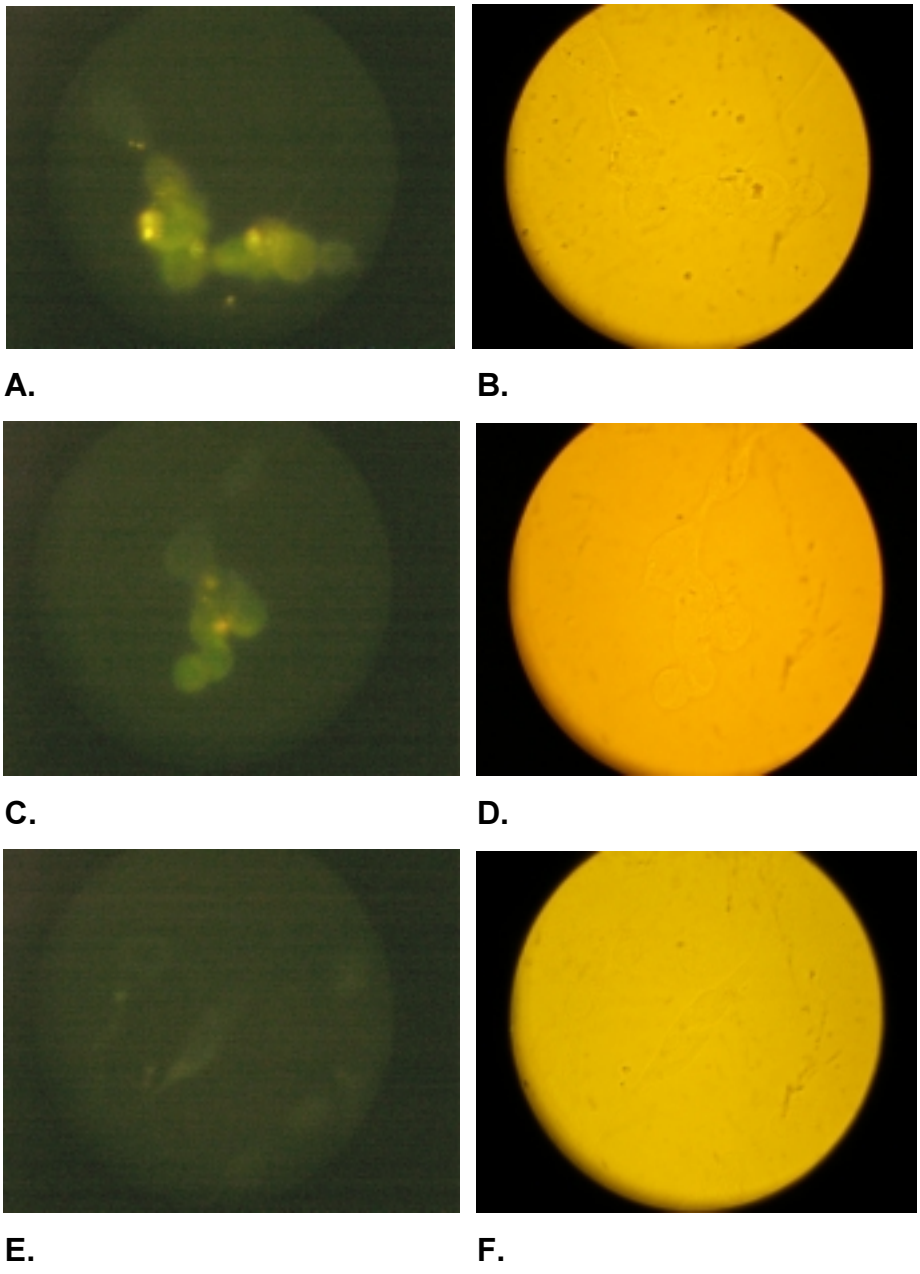
Kültür süpernatanı	IFNγ konsantrasyonu (pg/ml)				
	12. saat	18. saat	24. saat	48. saat	72. saat
Transfekte NIH/3T3	3.96	28.35	416.81	451.36	0
NIH/3T3	0	0	0	0	0



Şekil 4.14. pTargeT/18 transfekte edilmiş veya edilmemiş NIH/3T3' lere ait kültür süpernatanı ile anti-CD3 mAb ile uyarılmış fare dalak lenfositlerinin kültürü sonucu 12, 18, 24, 48 ve 72. saatlerde lenfositlerin kültür süpernatanlarındaki IFNγ düzeyleri.

4.5.3. pTargeT/40L Transfeksiyonu Yapılan NIH/3T3 Hücrelerinde CD40L Ekspresyonunun İmmünfloresan Boyama ile Gösterilmesi

Transfast Transfection Reagent ile pTargeT/40L aktarılmış NIH/3T3 hücrelerinin petri kabı içinde steril lam üzerinde çoğaltılması sonrası FITC işaretli *hamster* anti-fare CD40L monoklonal antikoru ile immünfloresan boyaması yapıldı. Kontrol olarak sadece vektör aktarılmış NIH/3T3 hücreleri kullanıldı. Floresan mikroskop altında pTargeT/40L aktarılmış hücrelerin yüzeyinde CD40L molekülünün varlığı gösterildi (Şekil 4.15).

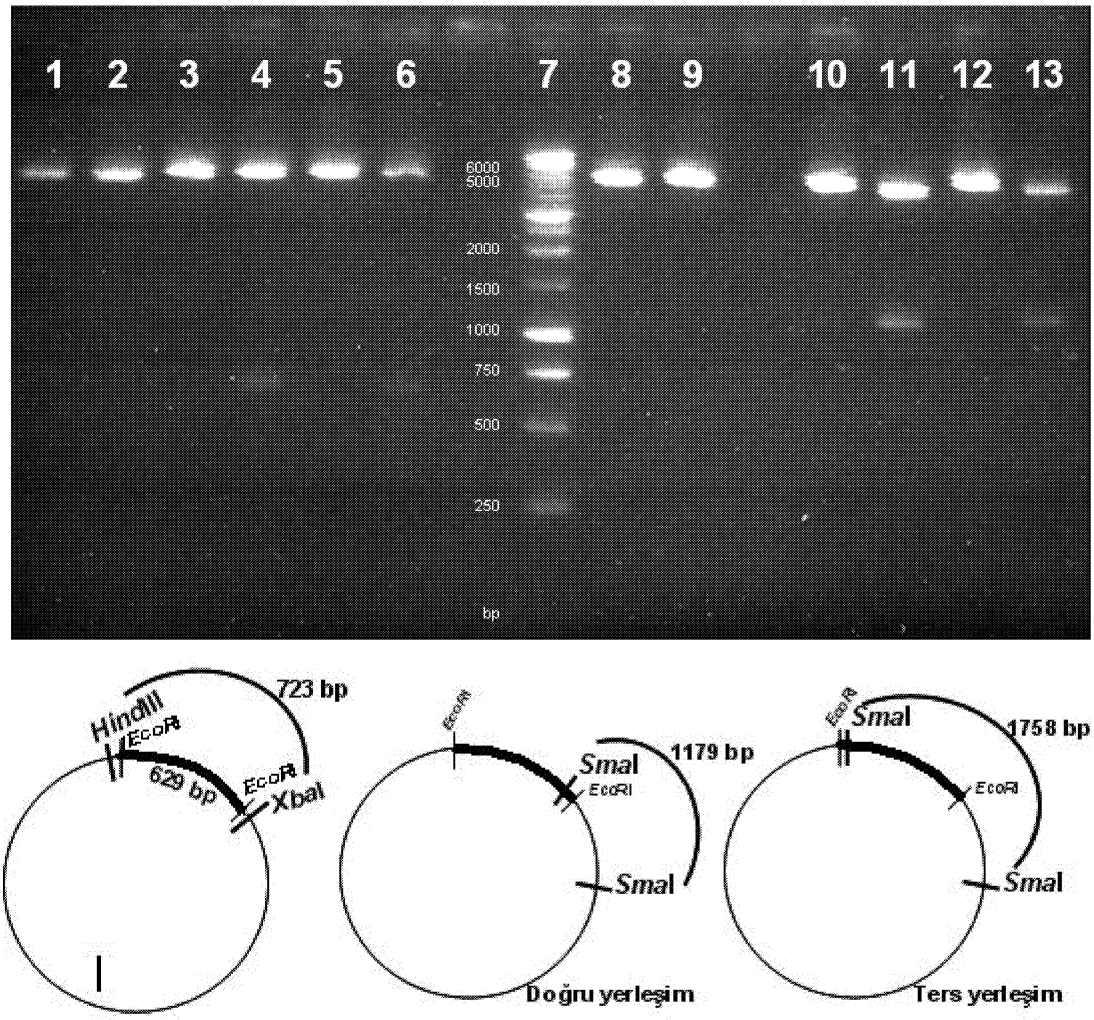


Şekil 4.15. pTargeT/40L aktarılmış NIH/3T3 hücrelerinde CD40L ekspresyonunun immünfloresan boyama ile gösterilmesi. A ve C pTargeT/40L aktarılmış NIH/3T3 hücrelerinin FITC işaretli CD40L monoklonal antikoru ile boyanma sonrası floresan mikroskop görüntüsüdür, B ve D sırasıyla aynı hücrelerin ışık mikroskopu altındaki görüntüleridir. E sadece vektör aktarılmış NIH/3T3 hücrelerinin FITC işaretli CD40L monoklonal antikoru ile boyanma sonrası floresan mikroskop görüntüsüdür, F aynı hücrelerin ışık mikroskopu altındaki görüntüsüdür.

4.6. CD40L ve Hibrid IL-18 DNA' larının pcDNA3 Vektörüne Subklonlanması

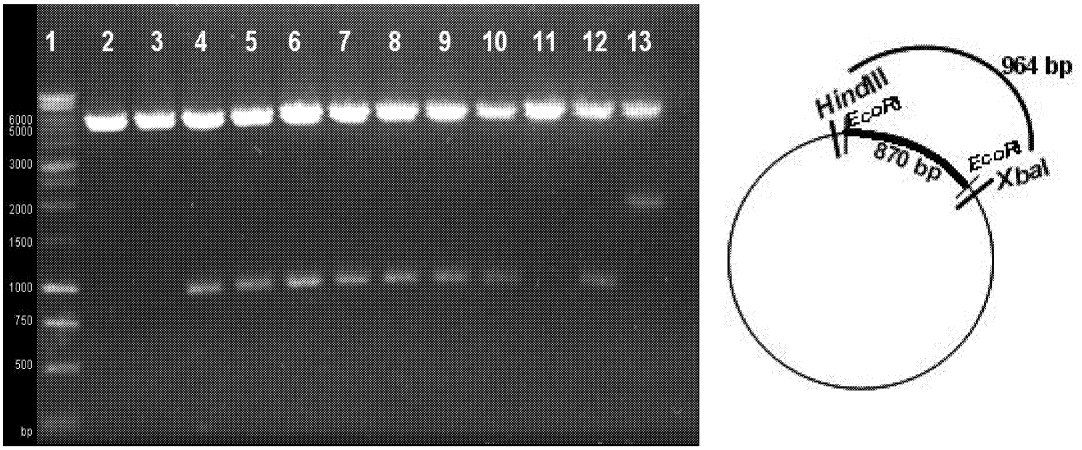
Subklonlama için insan en erken CMV promotoruna sahip 5446 bp büyüklüğündeki pcDNA3 (Invitrogen) vektörü kullanıldı. *İnsert*:vektör DNA konsantrasyon oranı 1:1 olacak şekilde gerçekleştirilen ligasyon reaksiyonları sonucunda, IL-18 ve CD40L *insert* DNA' ları pcDNA3 vektörüne restriksiyon klonlama yöntemiyle klonlandı.

IL-18 DNA' sının pcDNA3 vektörüne ligasyonu ve DH5α kompetan hücrelerine ısı şoku transformasyonu sonucunda 6 tane koloni elde edildi. pUC19 DNA' sının transformasyonu sonucu elde edilen koloni sayıları değerlendirildiğinde, transformasyon etkinliği $2.16x10^7$ transforman sayısı/µg olarak hesaplandı (Bkz. Bölüm 3.2.6.5). Elde edilen altı tane koloninin restriksiyon enzim analizi sonucunda iki kolonide *insert* DNA doğru yerleşimli olarak tespit edildi (Şekil 4.16).

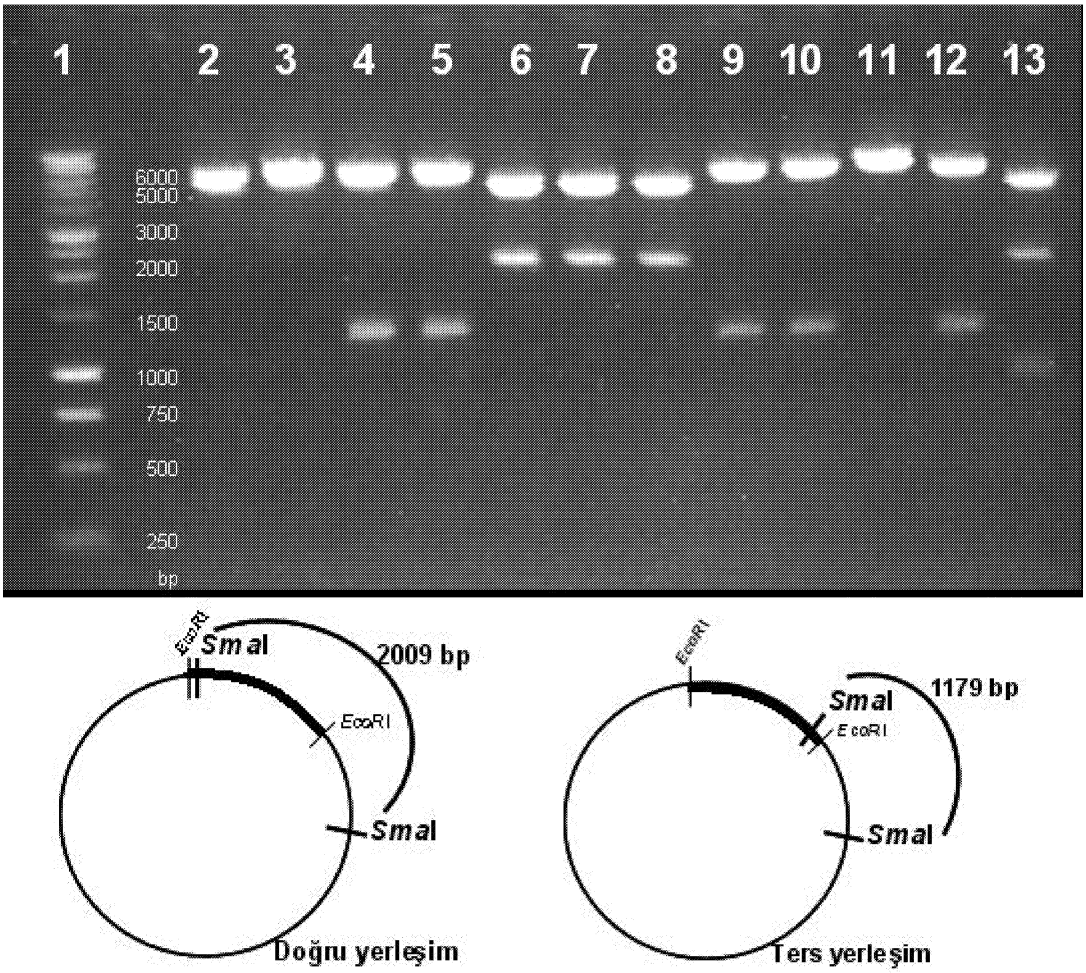


Şekil 4.16. IL-18 *insert* DNA' sının pcDNA3 vektörüne restriksiyon klonlanması sonucu elde edilen kolonilerden plazmid DNA izolasyonunu takiben restriksiyon enzim analizi. 1-6 no' lu kuyular sırasıyla 1-6 no' lu kolonilerin *Eco*RI restriksiyon enzim analizi, 7 no' lu kuyu 1 kb DNA *Ladder*, 8-13 no' lu kuyular sırasıyla aynı kolonilerin *Sma*I restriksiyon enzim analizidir. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde 4 ve 6 no' lu kolonilerin, 4 ve 6 no' lu kuyularda *Eco*RI ile kesim sonucu 629 bp' lik, 11 ve 13 no' lu kuyularda *Sma*I ile kesim sonucu 1179 bp' lik banda sahip oldukları ve *insert* DNA' yı doğru yerleşimli olarak taşıdıkları görülmektedir.

CD40L DNA' sının pcDNA3 vektörüne ligasyonu ve DH5α kompetan hücrelerine ısı şoku transformasyonu sonucunda 42 tane koloni elde edildi. pUC19 DNA' sının transformasyonu sonucu elde edilen koloni sayıları değerlendirildiğinde transformasyon etkinliği $8x10^6$ transforman sayısı/µg olarak hesaplandı (Bkz. Bölüm 3.2.6.5). 12 tane kolonin restriksiyon enzim analizi sonucunda üç kolonide *insert* DNA yerleşimi doğru olarak tespit edildi (Şekil 4.17 ve 4.18).

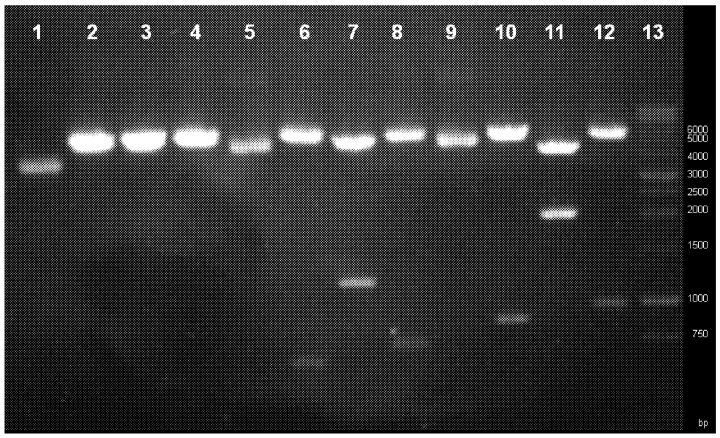


Şekil 4.17. CD40L *insert* DNA' sının pcDNA3 vektörüne restriksiyon klonlanması sonucu elde edilen kolonilerden plazmid DNA izolasyonunu takiben *Hind*III/*Xba*I restriksiyon enzim analizi. 1 no' lu kuyu 1 kb DNA *Ladder,* 2-13 no' lu kuyular sırasıyla 1-12 no' lu kolonilere ait restriksiyon enzim analizidir. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, 4-10 ve 12 no' lu kuyularda, sırasıyla 3-9 ve 11 no' lu kolonilerin 964 bp' lik *insert* DNA' yı taşıdığı görülmektedir. 13 no' lu kuyuda, 12 no' lu kolonin 1834 bp büyüklüğüne uyan yerde banda sahip olduğu görülmektedir ve iki *insert* DNA' nın uç uca bağlandığını göstermektedir. Diğer koloniler *insert* DNA taşımamaktadır.



Şekil 4.18. CD40L *insert* DNA' sının pcDNA3 vektörüne restriksiyon klonlanması sonucu elde edilen kolonilerden plazmid DNA izolasyonunu takiben *Sma*I restriksiyon enzim analizi. 1 no' lu kuyu 1 kb DNA *Ladder,* 2-13 no' lu kuyular sırasıyla 1-12 no' lu kolonilere ait restriksiyon enzim analizidir. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde 6, 7 ve 8 no' lu kuyularda 5, 6 ve 7 no' lu kolonilerin 2009 bp' lik banda sahip oldukları ve *insert* DNA' yı doğru yerleşimli olarak taşıdıkları görülmektedir. 4, 5, 9, 10 ve 12 no' lu kuyularda sırasıyla 3, 4, 8, 9 ve 11 no' lu kolonilerin 1179 bp büyüklüğünde banda sahip oldukları görülmektedir, bu da *insert* DNA' nın ters yerleşimli olduğunu göstermektedir. 2, 3 ve 11 no' lu kuyularda sırasıyla 1, 2 ve 10 no' lu kolonilerin *insert* DNA taşımadığı görülmektedir. 13 no' lu kuyuda izlendiği üzere, 12 no' lu kolonin *Sma*I ile kesilmesi 2009 ve 870 bp' lik iki band oluşmasına yol açmıştır, bu da 12 no' lu kolonin birbirine uç uca bağlanmış iki *insert* DNA taşıdığını göstermektedir.

pcDNA3/sadece vektör taşıyan bir koloni, pcDNA3/18 taşıyan 4 no' lu koloni ile pcDNA3/40L taşıyan 7 no' lu koloni seçilerek çoğaltıldı, gliserol stokları hazırlandı ve restriksiyon enzim analizi ile *insert* DNA taşıdıkları tekrar gösterildi (Şekil 4.19).

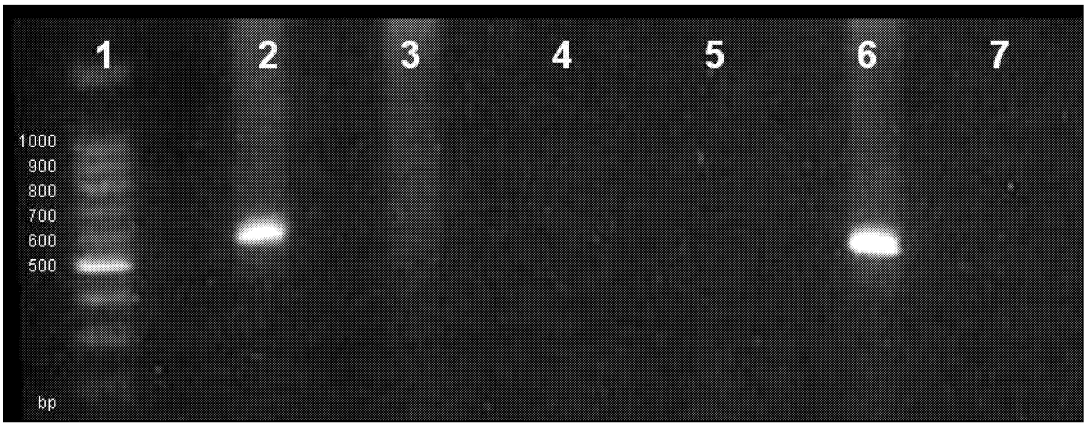


Şekil 4.19. pcDNA3/sadece vektör taşıyan bir koloni, pcDNA3/18 taşıyan 4 no' lu koloni ile pcDNA3/40L taşıyan 7 no' lu kolonin *Eco*RI, *Sma*I ve *Hind*III/*Xba*I restriksiyon enzim analizi. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, 1-4 no' lu kuyular pcDNA3/sadece vektör kolonisine aittir, 1 no' lu kuyu kesilmemiş, 2 no' lu kuyu *Eco*RI ile kesilmiş, 3 no' lu kuyu *Sma*I ile kesilmiş, 4 no' lu kuyu *Hind*III/*Xba*I ile kesilmiş DNA' lara aittir, 1 no' lu kuyuda sirküler plazmid DNA' sına ait band, 2-4 no' lu kuyularda lineer plazmid DNA' sına ait yaklaşık 5.4 kb büyüklüğündeki bandlar görülmektedir. 5-8 no' lu kuyular pcDNA3/18 kolonisine aittir, 5 no' lu kuyu kesilmemiş, 6 no' lu kuyu *Eco*RI ile kesilmiş, 7 no' lu kuyu *Sma*I ile kesilmiş, 8 no' lu kuyu *Hind*III/*Xba*I ile kesilmiş DNA' lara aittir, 5 no' lu kuyuda sirküler plazmid DNA' sına ait yaklaşık 6 kb büyüklüğündeki band, 6, 7 ve 8 no' lu kuyularda sırasıyla 629 bp, 1179 bp ve 723 bp büyüklüğündeki insert DNA' ya ait bandlar görülmektedir. 9-12 no' lu kuyular pcDNA3/40L kolonisine aittir, 9 no' lu kuyu kesilmemiş, 10 no' lu kuyu *Eco*RI ile kesilmiş, 11 no' lu kuyu *Sma*I ile kesilmiş, 12 no' lu kuyu *Hind*III/*Xba*I ile kesilmiş DNA' lara aittir, 9 no' lu kuyuda sirküler plazmid DNA' sına ait yaklaşık 6.3 kb büyüklüğündeki band, 10, 11 ve 12 no' lu kuyularda sırasıyla 870 bp, 2009 bp, 964 bp büyüklüğündeki insert DNA' ya ait bandlar görülmektedir. 13 no' lu kuyu 1 kb DNA *Ladder*' dır.

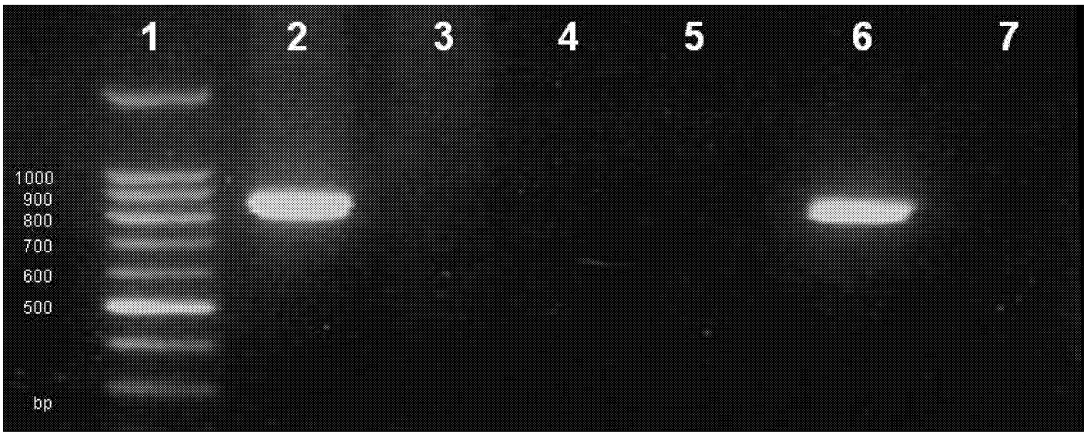
4.7. pcDNA3/18 ve pcDNA3/40L Vektörlerinin HEK293 Hücrelerine Katyonik Polimer Aracılı Transfeksiyonu ve *İn Vitro* Ekspresyonun Gösterilmesi

Elde edilen pcDNA3 vektörlerinin memeli hücrelerinde ekspresyonunu araştırmak amacıyla plazmidler, HEK293 insan embriyonik böbrek epitelyal hücre dizisine, katyonik bir polimer olan PolyFect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak aktarıldı. Ardından plazmid aktarılmış hücrelerde IL-18 ve CD40L ekspresyonları RT-PZR ile gösterildi.

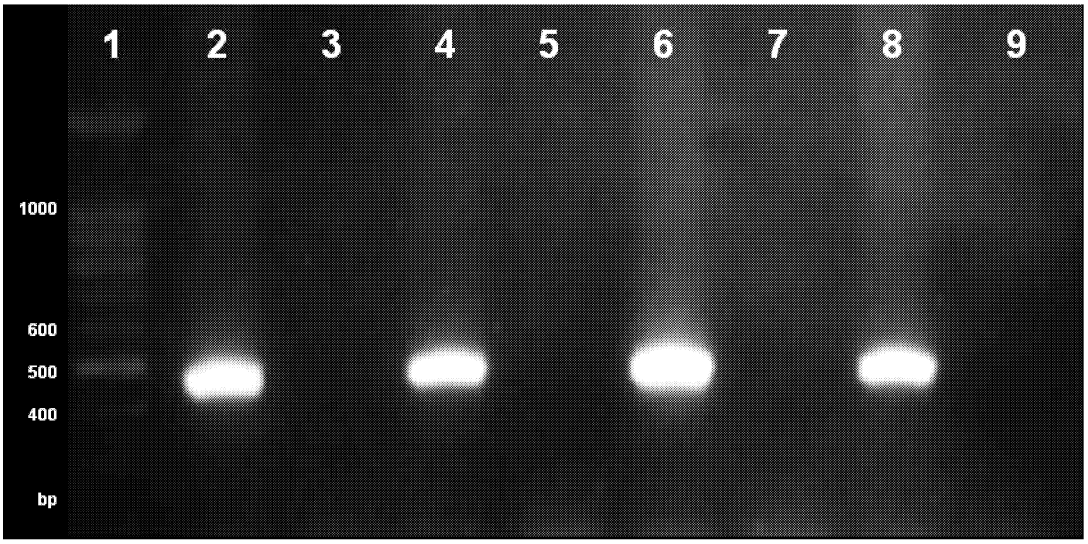
pcDNA3/18 aktarılmış HEK293 hücrelerinde IL-18 (Şekil 4.20) ve pcDNA3/40L aktarılmış HEK293 hücrelerinde CD40L ekspresyonu (Şekil 4.21) tespit edilirken, sadece vektör aktarılmış hücrelerde ve RT(-) cDNA sentez reaksiyonu örneklerinde ekspresyon tespit edilmedi. Aynı zamanda tüm örneklere *gapdh* primerleri ile PZR yapılarak RT(+) örneklerin tamamında *gapdh* ekspresyonu gösterilirken RT(-) cDNA sentez reaksiyonu örneklerinde amplifikasyon olmadığı gösterildi (Şekil 4.22). Böylece HEK293 hücrelerinde plazmid DNA' larından mRNA ekspresyonunun varlığı ispatlandı.



Şekil 4.20. pcDNA3/18 aktarılmış HEK293 hücrelerinde IL-18 mRNA ekspresyonunun RT-PZR ile gösterilmesi. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, 1 no' lu kuyu 100 bp DNA *Ladder*, 2-7 no' lu kuyular IL-18 primerleri ile yapılmış PZR ürünlerine aittir. 2 ve 4 no' lu kuyular pcDNA3/18 transfekte, 3 ve 5 no' lu kuyular pcDNA3/sadece vektör transfekte hücrelerden elde edilen RNA' lardan sentezlenen cDNA' ların kalıp olarak kullanıldığı PZR ürünleridir. 2 ve 3 no' lu kuyular RT(+), 4 ve 5 no' lu kuyular RT(-) cDNA sentez reaksiyonlarının kalıp olarak kullanıldığı PZR ürünleridir. 2 no' lu kuyuda 564 bp büyüklüğünde, IL-18' e ait band görülmektedir. 6 no' lu kuyu pozitif kontrol (kalıp: plazmid DNA), 7 no' lu kuyu negatif PZR (kalıp: ddH_2O) kontrolüdür.



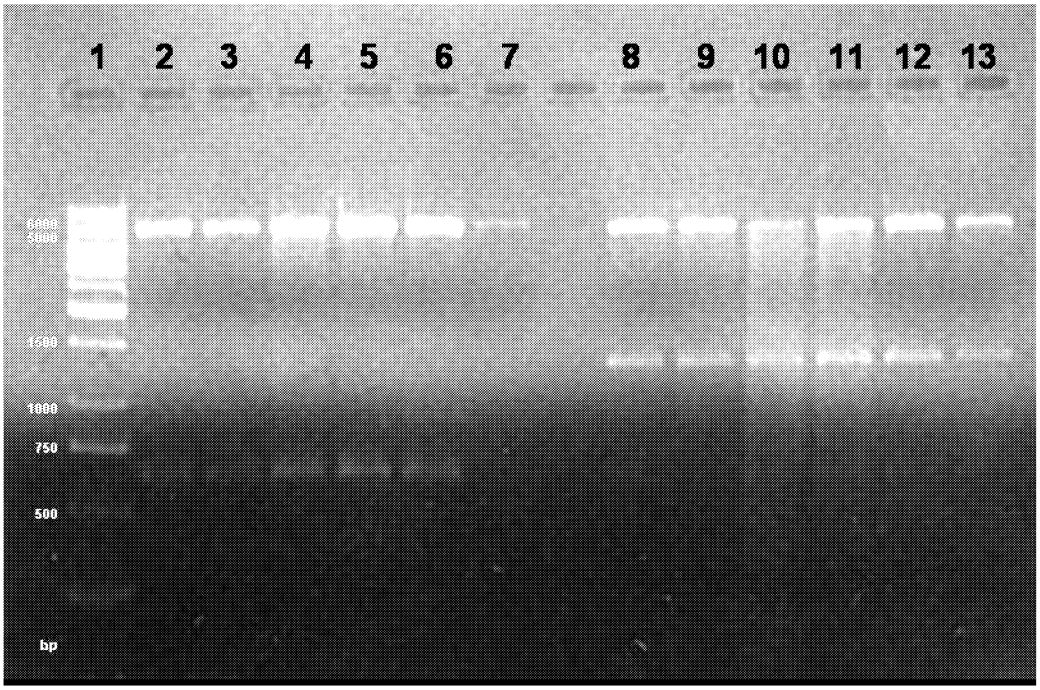
Şekil 4.21. pcDNA3/40L aktarılmış HEK293 hücrelerinde CD40L mRNA ekspresyonunun RT-PZR ile gösterilmesi. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, 1 no' lu kuyu 100 bp DNA *Ladder*, 2-7 no' lu kuyular CD40L primerleri ile yapılmış PZR ürünlerine aittir. 2 ve 4 no' lu kuyular pcDNA3/40L transfekte, 3 ve 5 no' lu kuyular pcDNA3/sadece vektör transfekte hücrelerden elde edilen RNA' lardan sentezlenen cDNA' ların kalıp olarak kullanıldığı PZR ürünleridir. 2 ve 3 no' lu kuyular RT(+), 4 ve 5 no' lu kuyular RT(-) cDNA sentez reaksiyonlarının kalıp olarak kullanıldığı PZR ürünleridir. 2 no' lu kuyuda 841 bp büyüklüğünde CD40L' a ait band görülmektedir. 6 no' lu kuyu pozitif kontrol (kalıp: plazmid DNA), 7 no' lu kuyu negatif PZR (kalıp: ddH_2O) kontrolüdür.



Şekil 4.22. pcDNA3/18, pcDNA3/40L ve pcDNA3/sadece vektör aktarılmış HEK293 hücrelerinde *gapdh* mRNA ekspresyonunun RT-PZR ile gösterilmesi. %1' lik agaroz jel elektroforez görüntüsünde, 1 no' lu kuyu 100 bp DNA *Ladder,* 2 ve 3 no' lu kuyular pcDNA3/18 transfekte hücrelerden elde edilen RNA' lardan sentezlenen cDNA sentez reaksiyonlarından, 4 ve 5 no' lu kuyular pcDNA3/40L transfekte hücrelerden elde edilen RNA' lardan sentezlenen cDNA sentez reaksiyonlarından, 6 ve 7 no' lu kuyular pcDNA3/sadece vektör transfekte hücrelerden elde edilen RNA' lardan sentezlenen cDNA sentez reaksiyonlarından *gapdh* primerleri ile gerçekleştirilen PZR ürünleridir. 2, 4 ve 6 no' lu örnekler RT(+), 3, 5 ve 7 no' lu kuyular RT(-) örneklerdir. 2, 4 ve 6 no' lu kuyularda 452 bp büyüklüğünde *gapdh*' e ait bandlar görülmektedir. 8 no' lu kuyu pozitif PZR kontrol (kalıp: pozitif cDNA), 9 no' lu kuyu negatif PZR (kalıp: ddH_2O) kontrolüdür.

4.8. IL-18 veya CD40L Kodlayan pTargeT Vektörlerinin *STaroB Salmonella* Suşuna Elektroporasyon ile Aktarılması

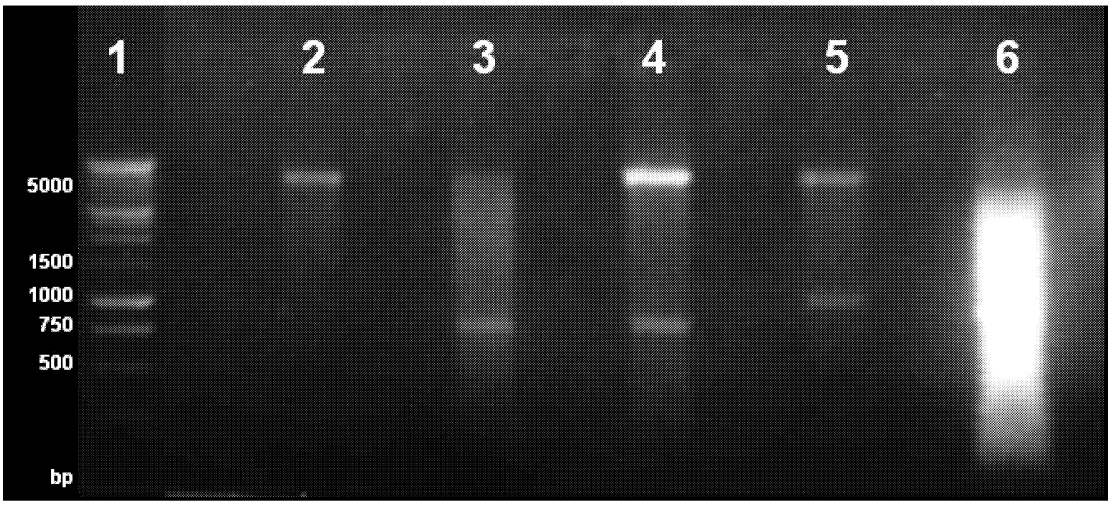
IL-18 ve CD40L genlerini taşıyan pTargeT vektörleri *STaroB* suşuna elektroporasyon ile aktarıldı. Elde edilen kolonilerin plazmid DNA' ları taşıdıkları restriksiyon enzim analizi ile gösterildi (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. *STaroB*' ye pTargeT/18 ve pTargeT/40L plazmidlerinin elektroporasyonla aktarılmasının ardından elde edilen kolonilerin restriksiyon enzim analizi. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, 1 no' lu kuyu 1 kb *Ladder*, 2-7 no' lu kuyular 6 tane *STaroB*-pTargeT/18 kolonisine ait *Eco*RI restriksiyon enzim analizidir, IL-18 *insert* DNA' sına ait 629 bp' lik bandlar görülmektedir, 8-13 no' lu kuyular 6 tane *STaroB*-pTargeT/40L kolonisine ait *Bgl*II/*Sal*I restriksiyon enzim analizidir, 1266 bp' lik bandlar CD40L DNA' sını doğru yerleşimli olarak taşıdıklarını göstermektedir.

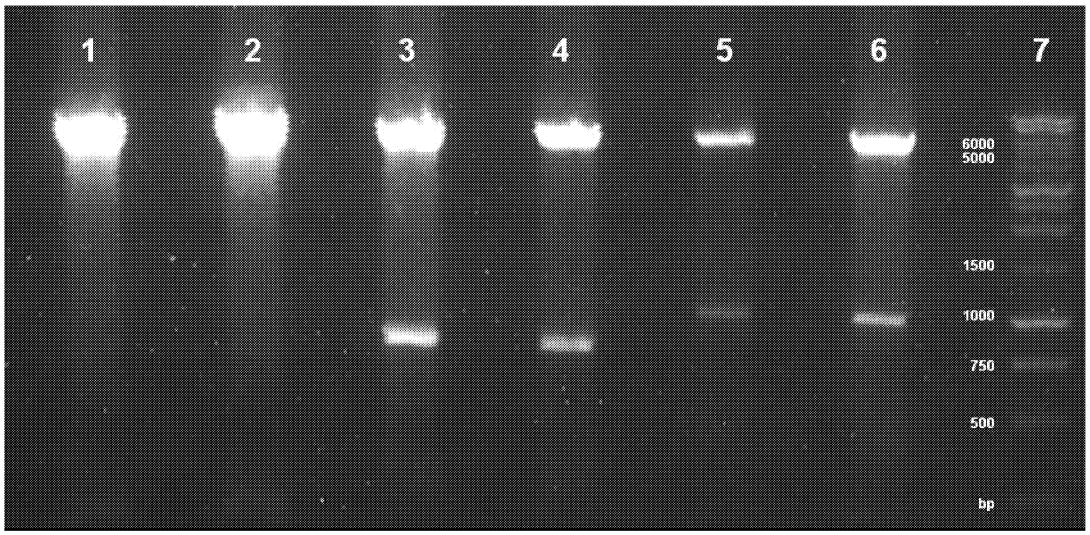
4.9. IL-18 veya CD40L Kodlayan pcDNA3 Vektörlerinin LB5010 ve *STaroB Salmonella* Suşlarına Elektroporasyon ile Aktarılması

Rekombinant DNA' lar, önce restriksiyon negatif (r^-), modifikasyon pozitif (m^+) *Salmonella* suşu LB5010' a (257) aktarıldı (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. LB5010' a pcDNA3/sadece vektör, pcDNA3/18 ve pcDNA3/40L plazmidlerinin elektroporasyonla aktarılmasının ardından elde edilen kolonilerin *Hind*III/*Xba*I restriksiyon enzim analizi. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, 1 no' lu kuyu 1 kb DNA *Ladder,* 2 no' lu kuyu pcDNA3/sadece vektör aktarılmış bir koloniye aittir, yaklaşık 5.4 kb büyüklüğündeki lineer vektör DNA' sına ait band görülmektedir, 3-4 no' lu kuyular pcDNA3/18 aktarılmış iki koloniye aittir, 723 bp' lik *insert* DNA' ya ait bandlar görülmektedir, 5-6 no' lu kuyular pcDNA3/40L aktarılmış iki koloniye aittir, 964 bp' lik *insert* DNA' ya ait bandlar görülmektedir.

pcDNA3 vektörlerini taşıyan LB5010 kolonilerinin çoğaltılmasının ardından elde edilen plazmid DNA' ları, *STaroB* suşuna elektroporasyonla aktarıldı (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. *STaroB*' ye pcDNA3/sadece vektör, pcDNA3/18 ve pcDNA3/40L plazmidlerinin elektroporasyonla aktarılmasının ardından elde edilen kolonilerin *Hind*III/*Xba*I restriksiyon enzim analizi. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, 1-2 no' lu kuyu pcDNA3/sadece vektör aktarılmış iki koloniye aittir, yaklaşık 5.4 kb büyüklüğündeki lineer vektör DNA' sına ait bandlar görülmektedir, 3-4 no' lu kuyular pcDNA3/18 aktarılmış iki koloniye aittir, 723 bp' lik *insert* DNA' ya ait bandlar görülmektedir, 5-6 no' lu kuyular pcDNA3/40L aktarılmış iki koloniye aittir, 964 bp' lik *insert* DNA' ya ait bandlar görülmektedir, 7 no' lu kuyu 1 kb DNA *Ladder*.

4.10. *İn Vitro* Plazmid Stabilitesi

İn vitro stabilite yüzdesi, her plazmid için antibiyotikli agarda belirlenen koloni oluşturan birim (*colony forming unit*-cfu) sayısının antibiyotiksiz agarda belirlenen toplam cfu sayısına oranı 100 ile çarpılarak hesaplandı.

STaroB-pTargeT/18 ve *STaroB*-pTargeT/40L rekombinant suşlarının gece boyu çoğaltılmalarının ardından 10^{-5} ve 10^{-6} dilüsyonlarından 100 µl alınıp ekilmesi sonucu elde edilen koloni sayıları Tablo 4.3' de gösterilmektedir. Her dilüsyon ikili çalışıldı ve deneyler 3 kez tekrarlandı. Rekombinant bakterilerin ampisilin ve kanamisin içeren LB-agarda yeterince çoğalmamalarına bakılarak *in vitro* stabilitelerinin bu bakterilerin *in vivo* kullanılması için yeterli olmadığına karar verildi.

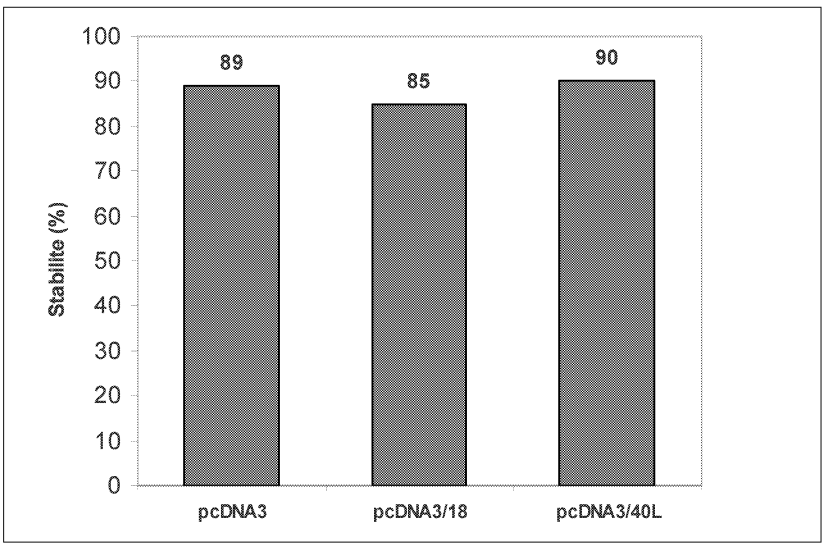
Tablo 4.3. *STaroB*-pTargeT/18 ve *STaroB*-pTargeT/40L rekombinant suşlarının gece boyu kültürlerinin ekimi sonucu elde edilen koloni sayıları.

Rekombinant Bakteri	Dilüsyon	1		2		3	
		LB-agar	Antibiyotikli LB-agar	LB-agar	Antibiyotikli LB-agar	LB-agar	Antibiyotikli LB-agar
STaroB-pTargeT/18	10^{-5}	25, 26	1, 1	41, 45	4, 8	105, 115	1, 0
	10^{-6}	3, 3	0, 1	7, 8	0, 0	20, 22	0, 0
STaroB-pTargeT/40L	10^{-5}	45, 48	0, 0	101, 117	0, 1	16, 20	1, 3
	10^{-6}	3, 5	0, 0	17, 21	0, 0	1, 2	0, 1

STaroB-pcDNA3/18, *STaroB*-pcDNA3/40L ve *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör rekombinant suşlarının gece boyu kültürlerindeki cfu sayıları Tablo 4.4' de gösterilmektedir. *STaroB* suşunun gece boyu kültürlerindeki cfu sayıları $2.8x10^8$ cfu/ml olarak belirlendi. Rekombinant bakterilerin cfu sayılarının yaklaşık 10 kat kadar az olması plazmid yükünün bakterinin çoğalmasında yavaşlamaya neden olduğunu düşündürmektedir. *İn vitro* stabilitelerinin %85' in üzerinde bulunması üzerine pcDNA3 plazmidlerini taşıyan *STaroB* rekombinant suşlarının *in vivo* uygulamasına geçildi (Şekil 4.26).

Tablo 4.4. pcDNA3 plazmidlerini taşıyan *STaroB* rekombinant suşlarının gece boyu kültürlerinin cfu sayıları.

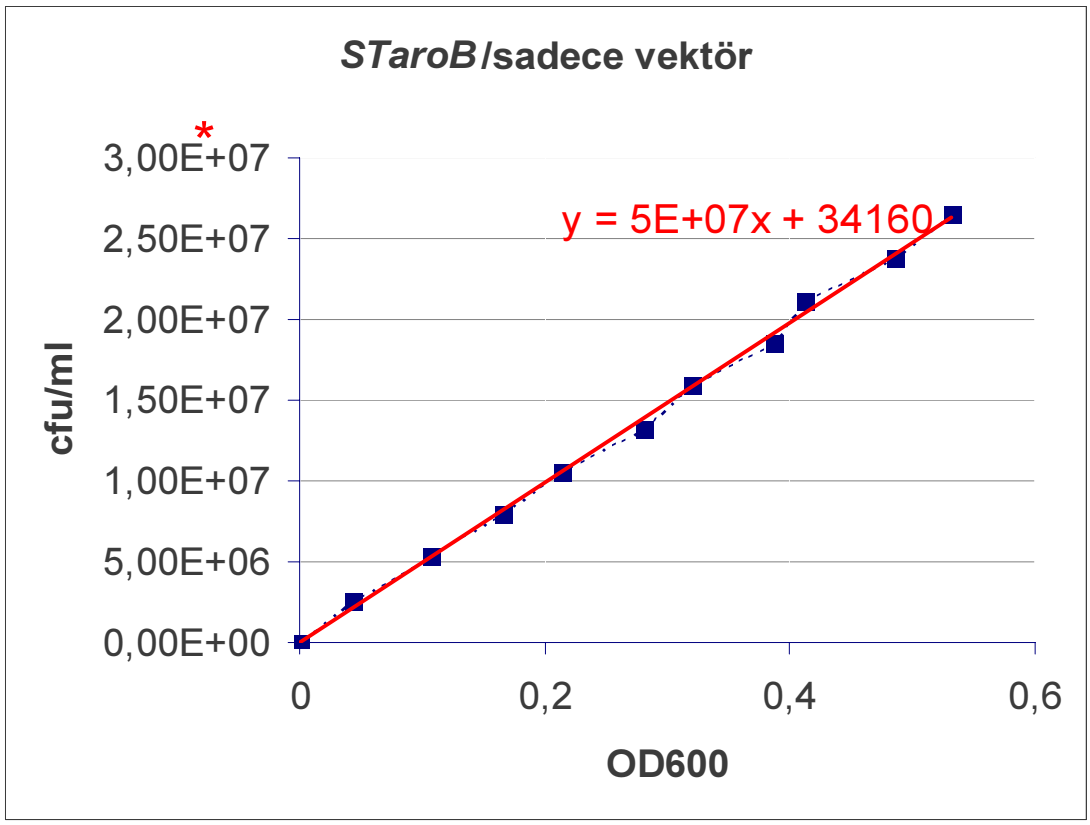
Rekombinant Bakteri	cfu/ml	
	LB-agar	Antibiyotikli LB-agar
STaroB-pcDNA3/ sadece vektör	$2.95x10^7$	$2.65x10^7$
STaroB-pcDNA3/18	$4.05x10^7$	$3.45x10^7$
STaroB-pcDNA3/40L	$3.20x10^7$	$2.90x10^7$



Şekil 4.26. pcDNA3 plazmidlerini taşıyan *STaroB* rekombinant suşlarının *in vitro* stabiliteleri. *İn vitro* stabilite oranları *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör için %89, *STaroB*-pcDNA3/18 için %85 ve *STaroB*-pcDNA3/40L için %90 olarak hesaplandı.

4.11. *İn Vivo* Uygulama Öncesi Bakterilerin cfu Sayılarının Hesaplanması

pcDNA3 plazmidlerini taşıyan *STaroB* rekombinant suşlarının Bölüm 3.2.11.1' de anlatıldığı gibi gece boyu kültürlerinin steril PBS çözeltisi içerisindeki seri dilüsyonlarının cfu sayıları ile OD_{600} değerleri arasında lineer bir grafik çizilerek cfu miktarının OD_{600} değerine bağlı olarak değişimi formülleştirildi (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. *STaroB*/sadece vektör rekombinant bakterisinin gece boyu kültürünün steril PBS çözeltisi içerisinde 10^{-1}' den 10^{-10}' a kadar yapılan dilüsyonlarının OD_{600} değerleri ile cfu miktarları arasındaki ilişki.

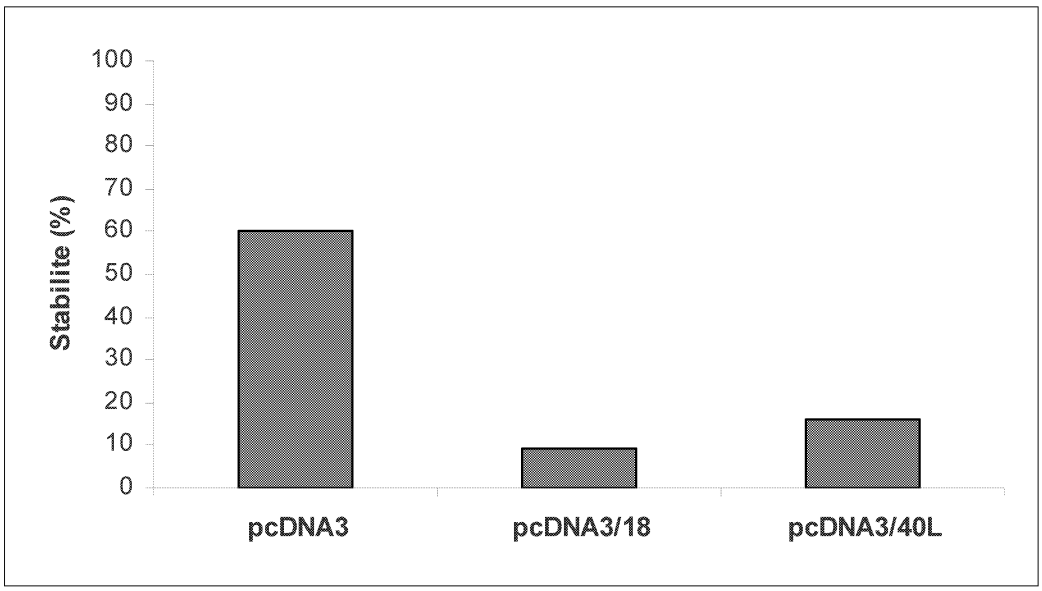
* aE+b=ax10^{b}

4.12. Rekombinant Bakterilerin İntravenöz Uygulanması

Toplam 25 tane 6-8 haftalık dişi inbred Balb/*c* faresi alınarak sadece PBS çözeltisi, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör, *STaroB*-pcDNA3/18, *STaroB*-pcDNA3/40L ve *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L birlikte verilmek üzere 5 grup oluşturuldu ve her grup için 5 fareye i.v. enjeksiyon uygulandı. Negatif kontrol PBS grubuna 200 µl steril PBS çözeltisi uygulandı. Bakterilerin gece boyu kültürlerinin OD_{600} değerleri ölçülerek Şekil 4.27' deki eşitlik kullanılarak cfu miktarları hesaplandı. 200 µl' de $1x10^6$ bakteri olacak şekilde steril PBS çözeltisi içerisinde dilüsyonları yapıldı. Ayrıca IL-18 ve CD40L kodlayan bakterilerin 100 µl' de $1x10^6$ bakteri olacak şekilde steril PBS çözeltisi içerisinde dilüsyonları yapılarak birleştirildi. Böylece iki suşun birlikte verileceği grup için 200 µl' de $1x10^6$ pcDNA3/18 ve $1x10^6$ pcDNA3/40L taşıyan bakteri olması sağlandı. Her fareye karşılık gelen *STaroB* suşu süspansiyonunun 200 µl' si kuyruk veninden enjekte edildi. Kültürlerin steril PBS çözeltisi içerisindeki dilüsyonlarının antibiyotikli ve antibiyotiksiz LB-agar içerisinde ekimleri yapıldı ve ertesi gün içerdikleri cfu miktarları hesaplandı (Tablo 4.5). Plazmid taşıyan rekombinant bakteri miktarı, verilmek istenen $1x10^6$ cfu sayısına yakın bulundu. Ancak plazmid DNA taşıyan bakteri yüzdesinin (*in vitro* stabilite) *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör için %60, *STaroB*-pcDNA3/18 için %9.2 ve *STaroB*-pcDNA3/40L için %16.2 olduğu tespit edildi (Şekil 4.28). Daha önce *in vitro* stabiliteleri %85' in üzerinde bulunan bakterilerin stabilitelerindeki bu beklenmeyen düşme, *STaroB* suşu içerisinde plazmid yapılarının stabilitesinin ne kadar değişken olduğunu göstermektedir. Bunun yanında rekombinant bakterilerin gece boyu kültürlerinin, bakterilerin gliserol stoklarından hazırlanmış petrilerden alınan bakterilerle hazırlanmış olmasının plazmid taşıma yeteneklerini etkilemiş olabileceği sorusunu akla getirmektedir. Ancak tüm kültürler uygun dozlarda ampisilin ve kanamisin varlığında yapıldı ve böylece plazmid taşımayan bakterilerin LB-agarda çoğalmasının önüne geçildi.

Tablo 4.5. *İn vivo* uygulanan rekombinant bakteri miktarları.

		UYGULANAN DOZ (cfu)	
GRUPLAR	**İSTENEN DOZ (cfu)**	**Plazmid (+)**	**Toplam**
PBS	-	-	-
pcDNA3	$1x10^6$	$1.08x10^6$	$1.8x10^6$
pcDNA3/18	$1x10^6$	$7.2x10^5$	$7.8x10^6$
pcDNA3/40L	$1x10^6$	$9.4x10^5$	$5.8x10^6$
pcDNA3/18+pcDNA3/40L	$2x10^6$	$1.66x10^6$	$1.36x10^7$



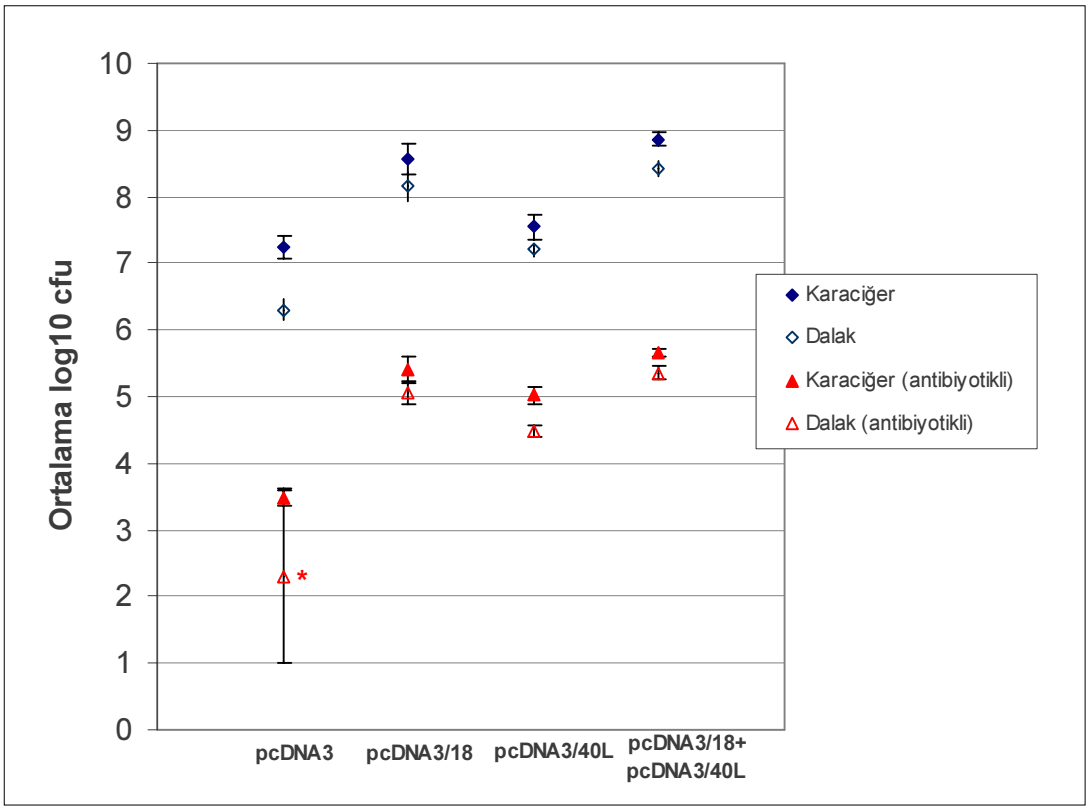
Şekil 4.28. *İn vivo* uygulanan *STaroB*-pcDNA3-sadece vektör, *STaroB*-pcDNA3/18, *STaroB*-pcDNA3/40L suşlarının gece boyu kültürlerinin plazmid stabiliteleri.

4.13. *İn Vivo* Kolonizasyon ve Plazmid Stabilitesi

Rekombinant bakteri enjeksiyonundan 4 gün sonra tüm gruplardaki fareler servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Tüm farelerin karaciğer ve dalaklarının homojenizasyonunun ardından, steril PBS çözeltisi ile seri dilüsyonları yapılarak antibiyotikli ve antibiyotiksiz LB-agar içerisinde ekimleri yapıldı. Her organ için ortalama cfu değeri belirlendi (Bkz. Bölüm 3.2.11.3) ve rekombinant bakterilerin plazmid stabiliteleri hesaplandı (Tablo 4.6). Tüm suşların karaciğer ve dalağı kolonize ettiği gösterildi (Şekil 4.29).

Tablo 4.6. Rekombinant *STaroB* suşları enjekte edilen inbred Balb/*c* farelerin organlarındaki bakteri kolonizasyonları ve *in vivo* stabiliteleri.

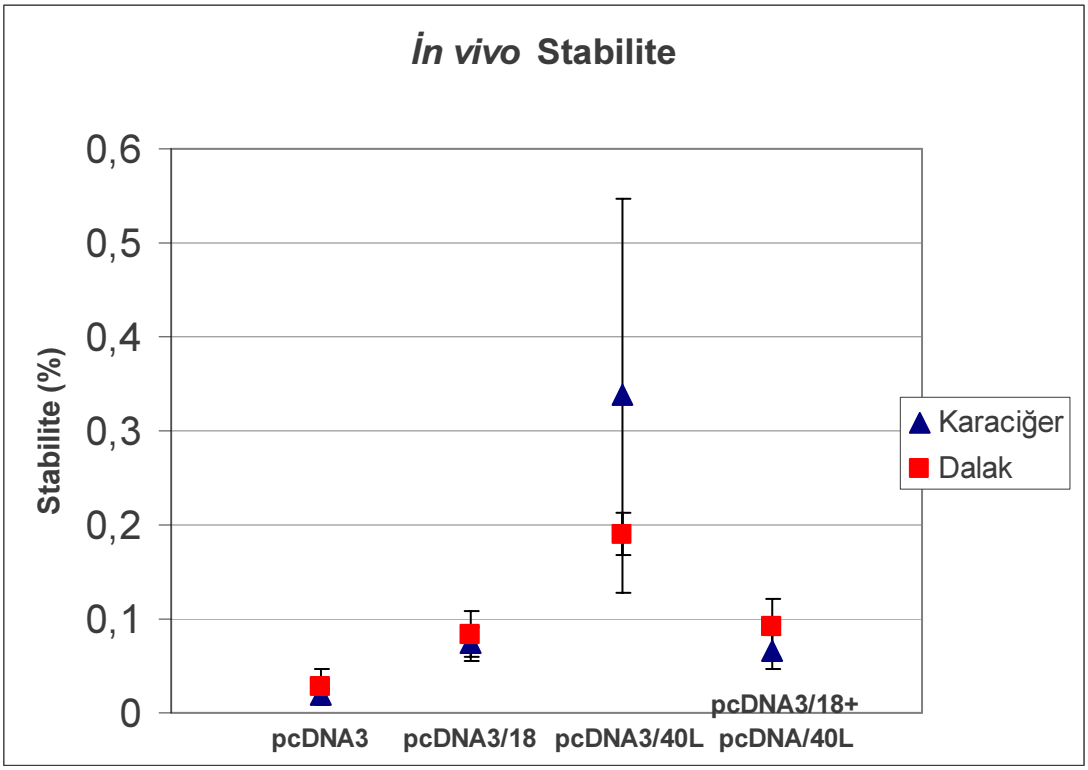
***STaroB*-pcDNA3/sadece vektör**				
Fare	Organ	Toplam cfu/organ	Plazmid (+) cfu/organ	*İn vivo* stabilite (%)
A	Karaciğer	$3.31x10^7$	$3.5x10^3$	0.01
	Dalak	$2.9x10^6$	$1.1x10^3$	0.037
B	Karaciğer	$1.15x10^7$	$2.8x10^3$	0.024
	Dalak	$1.1x10^6$	0	0
C	Karaciğer	$1.49x10^7$	$2.8x10^3$	0.018
	Dalak	$1.8x10^6$	$5x10^2$	0.027
D	Karaciğer	$1.5x10^7$	$2.1x10^3$	0.014
	Dalak	$2.45x10^6$	$1.3x10^3$	0.053
E	Karaciğer	$1.61x10^7$	$4.3x10^3$	0.026
	Dalak	$2.27x10^6$	$5x10^2$	0.022
***STaroB*-pcDNA3/18**				
Fare	Organ	Toplam cfu/organ	Plazmid (+) cfu/organ	*İn vivo* stabilite (%)
A	Karaciğer	$1.95x10^8$	$1.71x10^5$	0.087
	Dalak	$7.8x10^7$	$7.8x10^4$	0.1
B	Karaciğer	$4.36x10^8$	$3.72x10^5$	0.085
	Dalak	$2.69x10^8$	$1.71x10^5$	0.063
C	Karaciğer	$3.72x10^8$	$1.73x10^5$	0.046
	Dalak	$1.49x10^8$	$8.2x10^4$	0.005
D	Karaciğer	$7.63x10^8$	$4.87x10^5$	0.063
	Dalak	$1.98x10^8$	$1.75x10^5$	0.088
E	Karaciğer	$2.51x10^8$	$2.11x10^5$	0.084
	Dalak	$9.7x10^7$	$1.08x10^5$	0.111
***STaroB*-pcDNA3/40L**				
Fare	Organ	Toplam cfu/organ	Plazmid (+) cfu/organ	*İn vivo* stabilite (%)
A	Karaciğer	$3.9x10^7$	$1.09x10^5$	0.279
	Dalak	$1.38x10^7$	$2.67x10^4$	0.193
B	Karaciğer	$2.73x10^7$	$7x10^4$	0.256
	Dalak	$1.41x10^7$	$2.44x10^4$	0.173
C	Karaciğer	$4.38x10^7$	$9x10^4$	0.205
	Dalak	$2.2x10^7$	$3.65x10^4$	0.165
D	Karaciğer	$1.89x10^7$	$1.34x10^5$	0.708
	Dalak	$1.35x10^7$	$3.03x10^4$	0.224
E	Karaciğer	$6.15x10^7$	$1.46x10^5$	0.237
	Dalak	$1.96x10^7$	$3.83x10^4$	0.195
***STaroB*-pcDNA3/18 + *STaroB*-pcDNA3/40L**				
Fare	Organ	Toplam cfu/organ	Plazmid (+) cfu/organ	*İn vivo* stabilite (%)
A	Karaciğer	$9.55x10^8$	$4.69x10^5$	0.049
	Dalak	$2.95x10^8$	$2.52x10^5$	0.085
B	Karaciğer	$7.97x10^8$	$5.01x10^5$	0.062
	Dalak	$1.9x10^8$	$1.77x10^5$	0.093
C	Karaciğer	$6.56x10^8$	$3.52x10^5$	0.053
	Dalak	$3.44x10^8$	$1.89x10^5$	0.054
D	Karaciğer	$5.20x10^8$	$4.91x10^5$	0.094
	Dalak	$2.07x10^8$	$2.91x10^5$	0.140
E	Karaciğer	$7.15x10^8$	$4.64x10^5$	0.064
	Dalak	$3.11x10^8$	$2.53x10^5$	0.081



Şekil 4.29. Rekombinant *STaroB* suşları enjekte edilen inbred Balb/*c* farelerin karaciğer ve dalaklarındaki bakteri kolonizasyonları. Her nokta, her gruptaki 5 farenin ortalama $\log_{10}$cfu değerini temsil etmektedir ve tüm ortalamalar standart sapmaları ile gösterilmektedir.

* *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör verilen grupta B faresine ait dalak homojenatının antibiyotikli agarda ekimi sonrasında koloni tespit edilememesi nedeniyle cfu sayısı 0 olarak belirlendi. Bu nedenle pcDNA3/sadece vektör grubuna ait ortalama $\log_{10}$cfu hesaplamalarına B faresinin değeri "0" olarak katıldı. B faresi dışarıda bırakılarak gruptaki diğer 4 farenin ortalama $\log_{10}$cfu değerleri, karaciğer için 7,268983 (standart sapma: 0,167), dalak için 6,365716 (standart sapma: 0,086), plazmid taşıyanlar (antibiyotikli LB-agarda çoğalanlar) değerlendirildiğinde karaciğer için 3,486728 (standart sapma: 0,133) ve dalak için 2,888319 (standart sapma: 0,22) olarak hesaplandı.

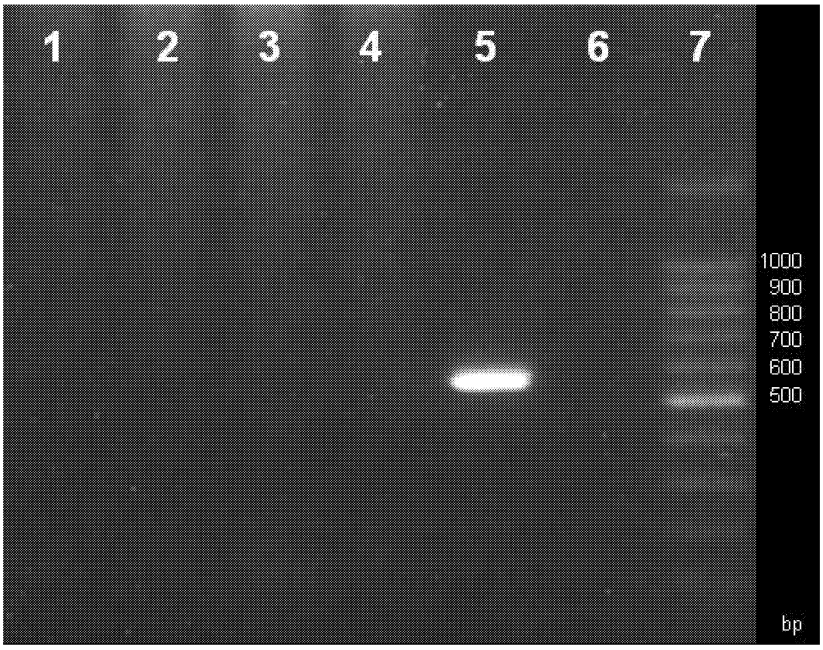
İnsert DNA taşıyan rekombinant plazmidlerin *in vivo* stabilitesi gerek karaciğer gerekse dalak için, istatistiksel olarak boş plazmide göre daha yüksek bulundu (Kruskal Wallis ANOVA, her iki organ için P=0.001 ve ikili karşılaştırmalar için Mann-Whitney U-testi, tüm *insert* DNA/organ kombinasyonları için P<0.01). Farelere enjekte edilen bakterilerin *in vitro* stabilitesine göre yapılan düzeltme sonrasında da benzer ilişkiler devam etmekteydi. Öte yandan, tüm gruplarda her organ için *in vivo* plazmid stabilite oranı %1' in altındaydı (Tablo 4.6, Şekil 4.30). Bakterilerin büyük bir kısmının plazmidi kolaylıkla kaybettiği ve plazmid taşımayanların büyüme avantajı elde ettiği söylenebilir.



Şekil 4.30. Rekombinant *STaroB* suşları enjekte edilen inbred Balb/*c* farelerin karaciğer ve dalaklarındaki bakterilere ait *in vivo* plazmid stabilite yüzdeleri. Her nokta, her gruptan 5 farenin ortalama plazmid stabilite yüzdesini temsil etmekte ve tüm ortalamalar standart sapmaları ile gösterilmektedir.

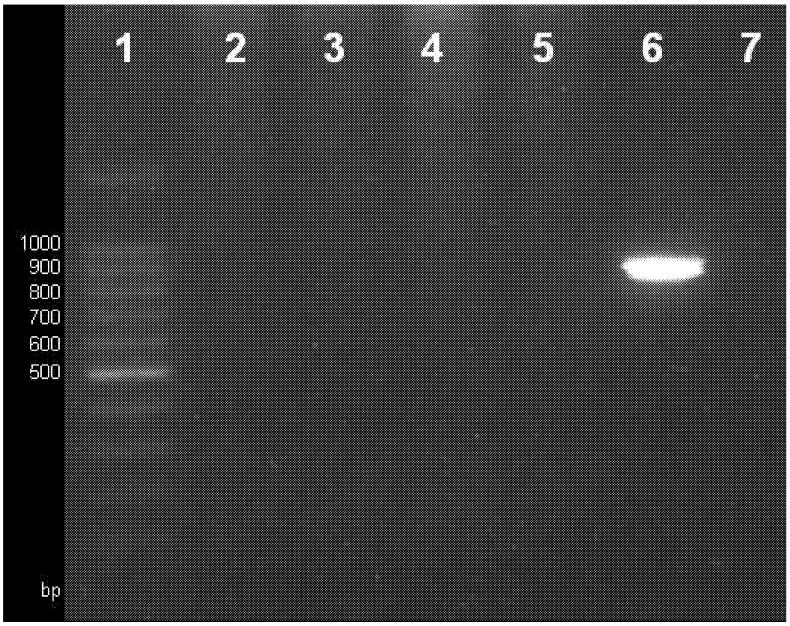
4.14. *İn Vivo* Ekspresyonun RT-PZR ile Değerlendirilmesi

Rekombinant *STaroB* suşlarının dokulara aktardıkları plazmid DNA' larından IL-18 ve CD40L ekspresyonunu araştırmak için tüm gruplardan diseke edilen karaciğer ve dalaklardan RNA izolasyonu yapıldı. Tüm RNA' lardan RT (+) ve (-) cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen tüm cDNA' lar ile IL-18, CD40L ve pozitif kontrol olarak *gapdh* primerleri kullanılarak PZR yapıldı. *STaroB*-pcDNA3/18, *STaroB*-pcDNA3/40L ve *STaroB*-pcDNA3/18+ *STaroB*-pcDNA3/40L uygulanan gruplarda hiçbir farede IL-18 veya CD40L ekspresyonu tespit edilmedi (Şekil 4.31, 4.32, 4.33, 4.34). Öte yandan, tüm organlarda *gapdh* ekspresyonu gösterildi ve RT(-) sentez reaksiyonları kalıp olarak kullanılarak *gapdh* ekspresyonu araştırıldığında PZR ile amplifikasyon görülmedi (Şekil 4.35, 4.36, 4.37, 4.38). Böylece tüm örneklerde RNA varlığı ispatlandı ve DNA kontaminasyonu olmadığı gösterildi.



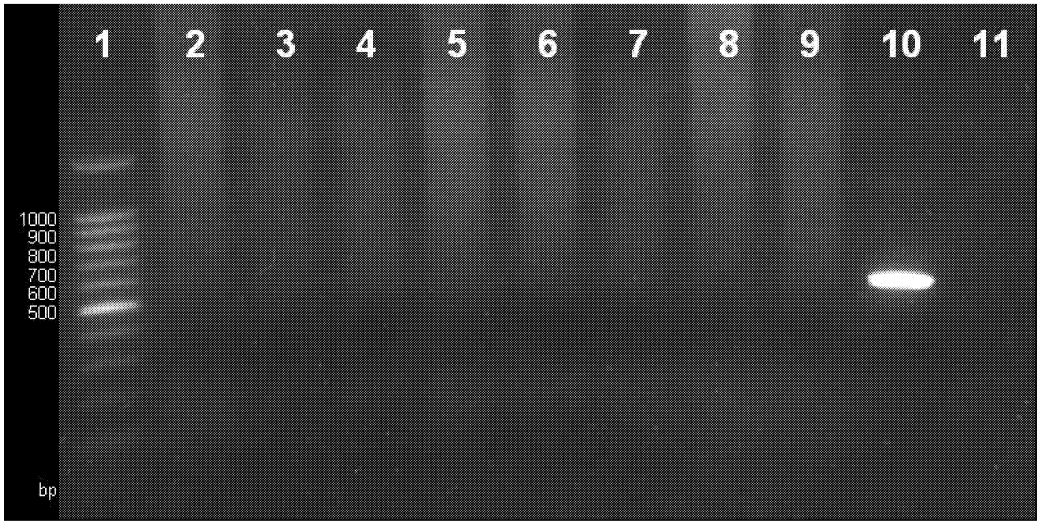
Şekil 4.31. *STaroB*-pcDNA3/18 uygulanan gruptan bir farenin (A) karaciğer ve dalağında RT-PZR ile plazmidden IL-18 mRNA ekspresyonunun araştırılması. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, 1-6 no' lu kuyularda IL-18 primerleri kullanılarak yapılmış PZR ürünleri görülmektedir. Temsili olarak *STaroB*-pcDNA3/18 uygulanan gruptan bir fareye (A) ve *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanan gruptan bir fareye (A) ait sonuçlardır. Kuyular:

1. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18 uygulanmış bir fareden (A) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.
2. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (A) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.
3. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18 uygulanmış bir fareden (A) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.
4. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden(A) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.
5. Pozitif kontrol PZR: PZR kalıbı, pozitif kontrol cDNA' dır. 564 bp' lik IL-18' e ait band görülmektedir.
6. Negatif kontrol PZR: PZR kalıbı, ddH_2O' dur.
7. 100 bp DNA *Ladder.*



Şekil 4.32. *STaroB*-pcDNA3/40L uygulanan gruptan bir farenin (A) karaciğer ve dalağında RT-PZR ile plazmidden CD40L mRNA ekspresyonunun araştırılması. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, 1-6 no' lu kuyularda CD40L primerleri kullanılarak yapılmış PZR ürünleri görülmektedir. Temsili olarak *STaroB*-pcDNA3/40L uygulanan gruptan bir fareye (A) ve *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanan gruptan bir fareye (A) ait sonuçlardır. Kuyular:

1. 100 bp DNA *Ladder.*
2. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (A) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.
3. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (A) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.
4. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (A) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.
5. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden(A) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.
6. Pozitif kontrol PZR: PZR kalıbı, pozitif kontrol cDNA' dır. 841 bp' lik CD40L' a ait band görülmektedir.
7. Negatif kontrol PZR: PZR kalıbı, ddH_2O' dur.



Şekil 4.33. *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanan gruptan iki farenin (C ve D) karaciğer ve dalaklarında RT-PZR ile plazmidden IL-18 mRNA ekspresyonunun araştırılması. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, 2-11 no' lu kuyularda IL-18 primerleri kullanılarak yapılmış PZR ürünleri görülmektedir. Temsili olarak *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanan gruptan iki fareye (C ve D) ve *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanan gruptan iki fareye (C ve D) ait sonuçlardır. Kuyular:

1. 100 bp DNA *Ladder.*
2. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (C) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.
3. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (C) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.
4. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (C) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.
5. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (C) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.

6. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (D) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.

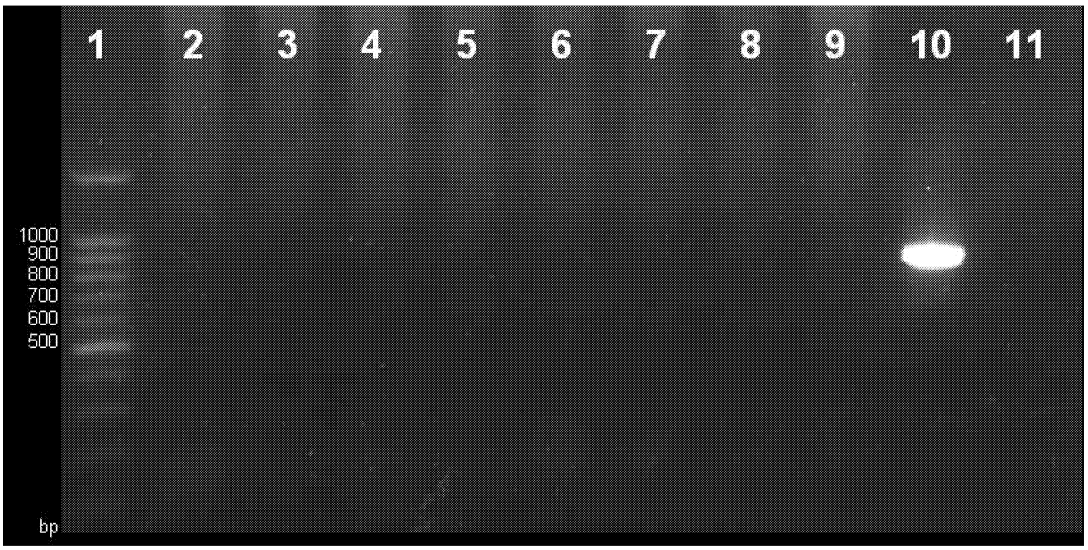
7. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (D) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.

8. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (D) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.

9. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (D) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.

10. Pozitif kontrol PZR: PZR kalıbı, pozitif kontrol cDNA' dır. 564 bp' lik IL-18' e ait band görülmektedir.

11. Negatif kontrol PZR: PZR kalıbı, ddH_2O' dur.



Şekil 4.34. *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanan gruptan iki farenin (C ve D) karaciğer ve dalaklarında RT-PZR ile plazmidden CD40L mRNA ekspresyonunun araştırılması. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, 2-11 no' lu kuyularda CD40L primerleri kullanılarak yapılmış PZR ürünleri görülmektedir. Temsili olarak *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanan gruptan iki fareye (C ve D) ve *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanan gruptan iki fareye (C ve D) ait sonuçlardır. Kuyular:

1. 100 bp DNA *Ladder.*
2. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (C) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.
3. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (C) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.
4. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (C) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.
5. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (C) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.

6. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (D) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.

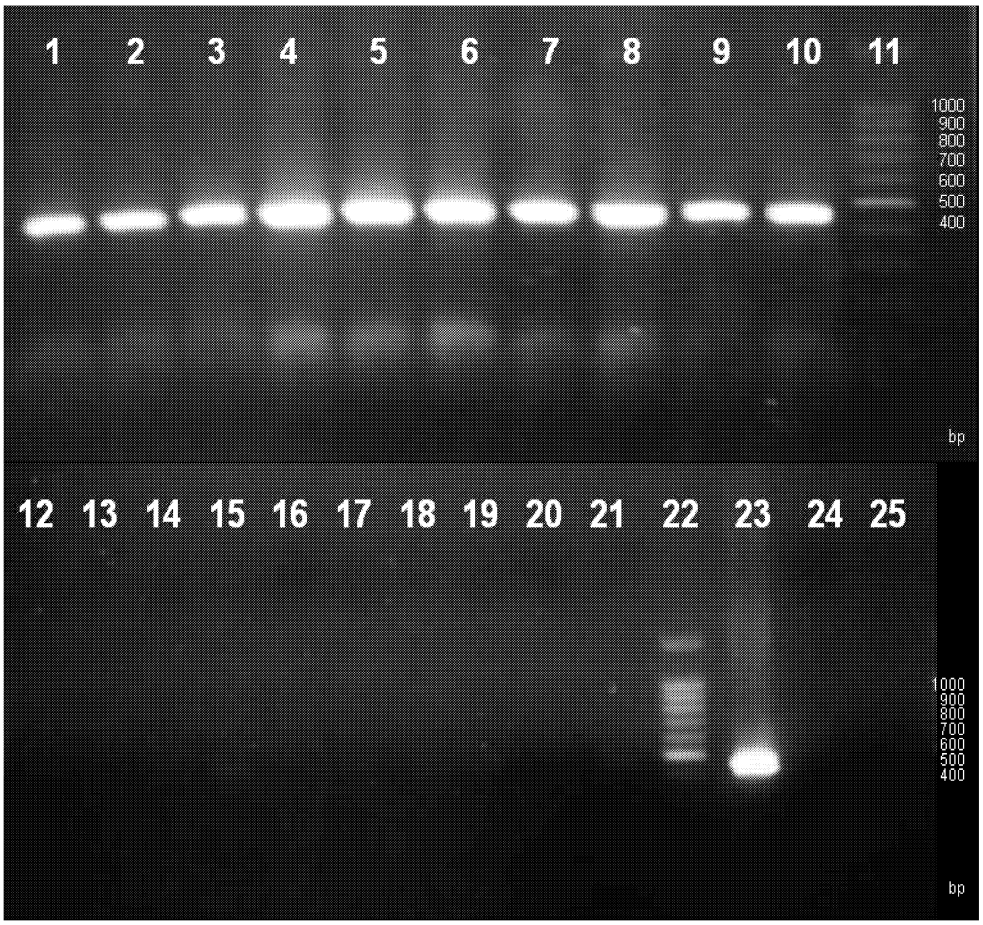
7. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (D) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.

8. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (D) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.

9. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (D) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş cDNA' dır.

10. Pozitif kontrol PZR: PZR kalıbı, pozitif kontrol cDNA' dır. 841 bp' lik CD40L' a ait band görülmektedir.

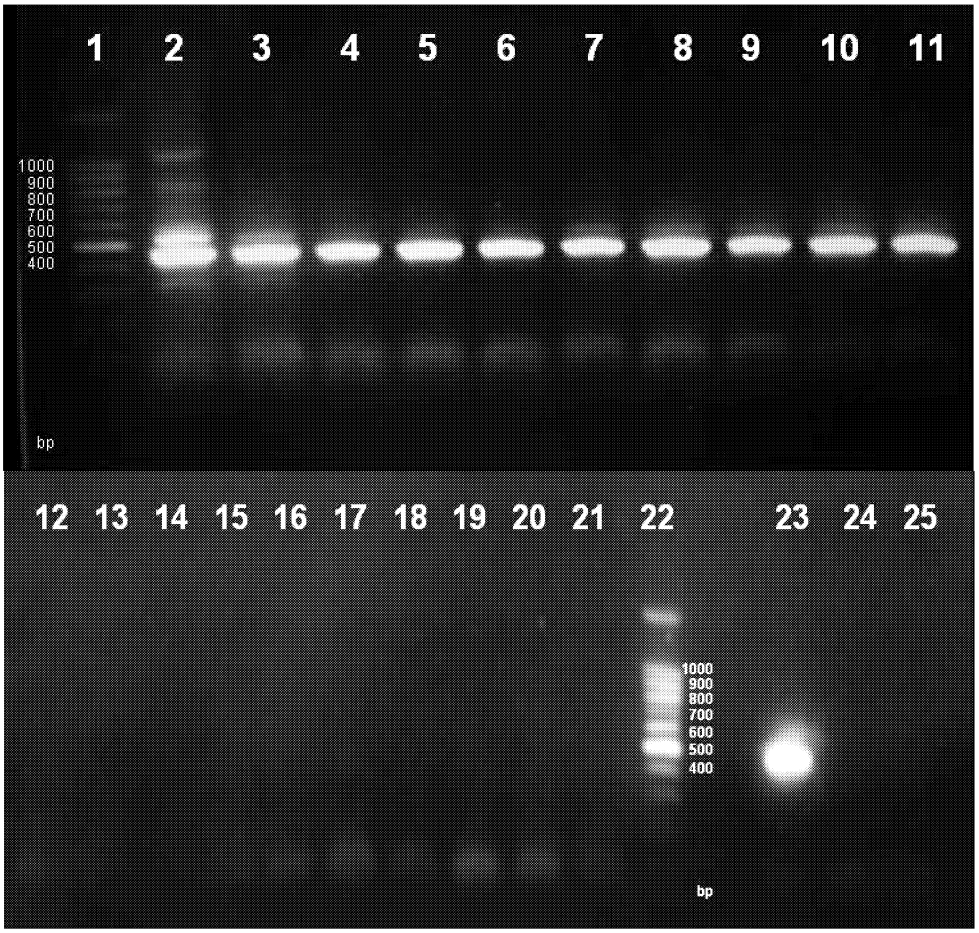
11. Negatif kontrol PZR: PZR kalıbı, ddH_2O' dur.



Şekil 4.35. *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanan gruptaki tüm farelerin (A, B, C, D, E) karaciğer ve dalaklarında RT-PZR ile *gapdh* mRNA ekspresyonunun araştırılması. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, 1-10, 12-21 ve 23-25 no' lu kuyularda *gapdh* primerleri kullanılarak yapılmış PZR ürünleri görülmektedir. Kuyular:

1. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (A) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
2. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (A) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
3. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (B) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.

4. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (B) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
5. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (C) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
6. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (C) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
7. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (D) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
8. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (D) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
9. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (E) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
10. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör uygulanmış bir fareden (E) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
11. 100 bp DNA *Ladder.*
12-21 no' lu kuyular sırasıyla 1-10 no' lu kuyulardaki örneklerin RT(-) cDNA sentez reaksiyonu PZR kalıbı olarak kullanılarak gerçekleştirilmiş PZR ürünleridir.
22. 100 bp DNA *Ladder.*
23. Pozitif kontrol PZR: PZR kalıbı, pozitif kontrol RT(+) cDNA' dır. 452 bp' lik *gapdh*' e ait band görülmektedir.
24. Negatif kontrol PZR: PZR kalıbı, negatif kontrol RT(-) cDNA' dır.
25. Negatif kontrol PZR: PZR kalıbı, ddH_2O' dur.



Şekil 4.36. *STaroB*-pcDNA3/18 uygulanan gruptaki tüm farelerin (A, B, C, D, E) karaciğer ve dalaklarında RT-PZR ile *gapdh* mRNA ekspresyonunun araştırılması. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, 2-21 ve 23-25 no' lu kuyularda *gapdh* primerleri kullanılarak yapılmış PZR ürünleri görülmektedir. Kuyular:

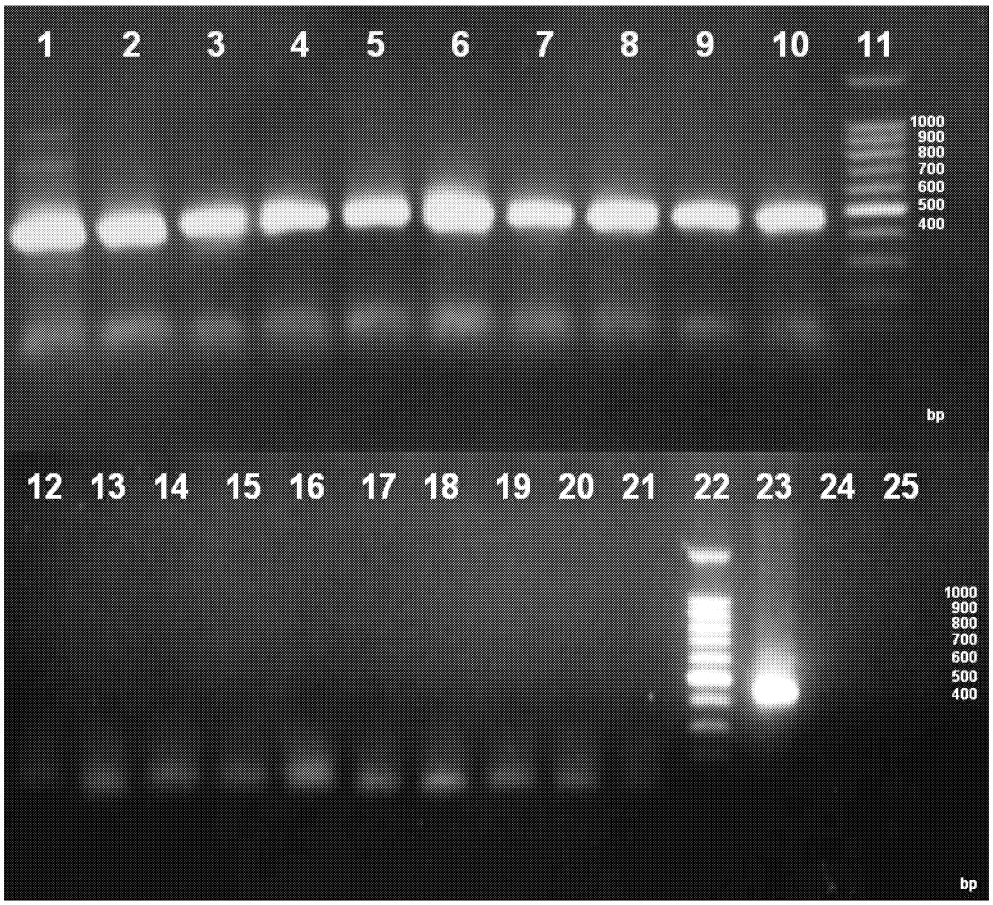
1. 100 bp DNA *Ladder.*

2. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18 uygulanmış bir fareden (A) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.

3. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18 uygulanmış bir fareden (A) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.

4. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18 uygulanmış bir fareden (B) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.

5. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18 uygulanmış bir fareden (B) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
6. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18 uygulanmış bir fareden (C) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
7. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18 uygulanmış bir fareden (C) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
8. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18 uygulanmış bir fareden (D) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
9. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18 uygulanmış bir fareden (D) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
10. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18 uygulanmış bir fareden (E) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
11. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18 uygulanmış bir fareden (E) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
12-21 no' lu kuyular sırasıyla 2-11 no' lu kuyulardaki örneklerin RT(-) cDNA sentez reaksiyonu PZR kalıbı olarak kullanılarak gerçekleştirilmiş PZR ürünleridir.
22. 100 bp DNA *Ladder.*
23. Pozitif kontrol PZR: PZR kalıbı, pozitif kontrol RT(+) cDNA' dır. 452 bp' lik *gapdh*' e ait band görülmektedir.
24. Negatif kontrol PZR: PZR kalıbı, negatif kontrol RT(-) cDNA' dır.
25. Negatif kontrol PZR: PZR kalıbı, ddH_2O' dur.



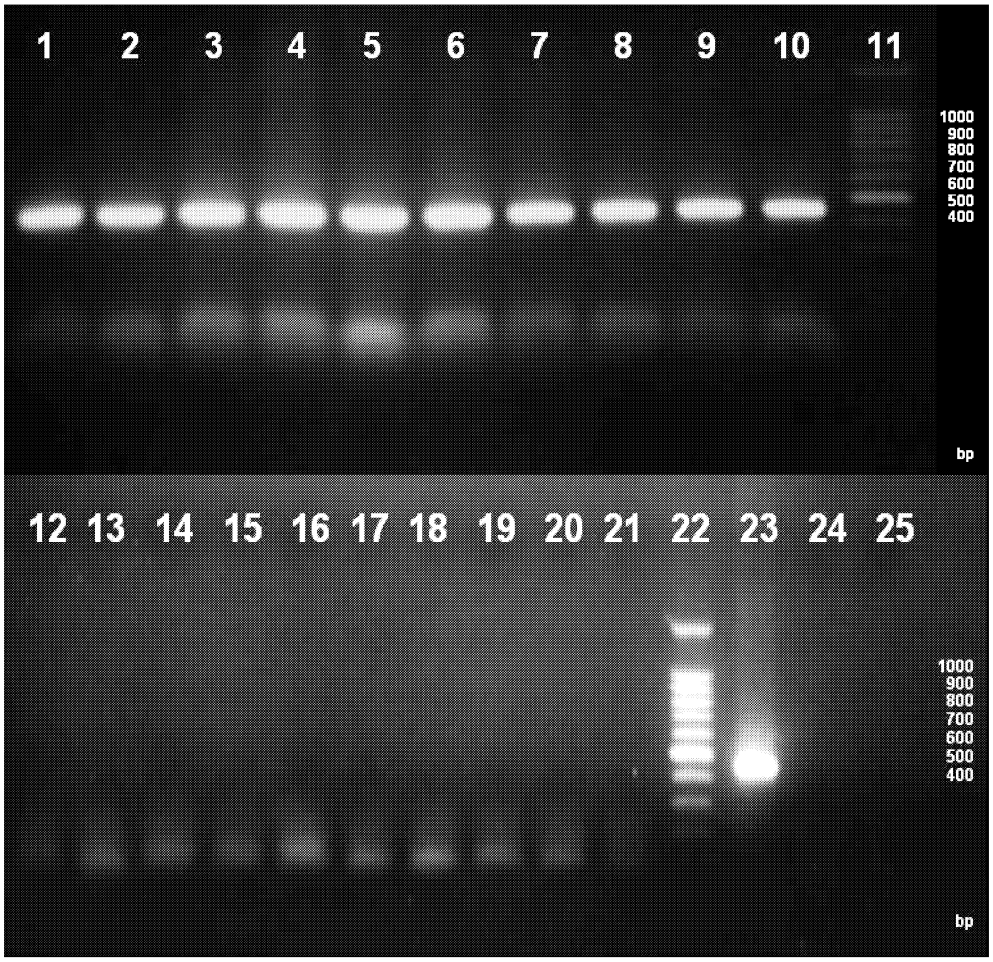
Şekil 4.37. *STaroB*-pcDNA3/40L uygulanan gruptaki tüm farelerin (A, B, C, D, E) karaciğer ve dalaklarında RT-PZR ile *gapdh* mRNA ekspresyonunun araştırılması. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, 1-10, 12-21 ve 23-25 no' lu kuyularda *gapdh* primerleri kullanılarak yapılmış PZR ürünleri görülmektedir. Kuyular:

1. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (A) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.

2. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (A) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.

3. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (B) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.

4. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (B) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
5. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (C) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
6. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (C) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
7. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (D) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
8. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (D) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
9. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (E) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
10. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (E) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
11. 100 bp DNA *Ladder.*
12-21 no' lu kuyular sırasıyla 1-10 no' lu kuyulardaki örneklerin RT(-) cDNA sentez reaksiyonu PZR kalıbı olarak kullanılarak gerçekleştirilmiş PZR ürünleridir.
22. 100 bp DNA *Ladder.*
23. Pozitif kontrol PZR: PZR kalıbı, pozitif kontrol RT(+) cDNA' dır. 452 bp' lik *gapdh*' e ait band görülmektedir.
24. Negatif kontrol PZR: PZR kalıbı, negatif kontrol RT(-) cDNA' dır.
25. Negatif kontrol PZR: PZR kalıbı, ddH_2O' dur.



Şekil 4.38. *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanan gruptaki tüm farelerin (A, B, C, D, E) karaciğer ve dalaklarında RT-PZR ile *gapdh* mRNA ekspresyonunun araştırılması. %1' lik agaroz jel elektroforezi görüntüsünde, 1-10, 12-21 ve 23-25 no' lu kuyularda *gapdh* primerleri kullanılarak yapılmış PZR ürünleri görülmektedir. Kuyular:

1. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (A) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
2. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (A) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.
3. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (B) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.

4. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (B) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.

5. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (C) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.

6. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (C) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.

7. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (D) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.

8. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (D) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.

9. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (E) elde edilen karaciğerden izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.

10. PZR kalıbı, *STaroB*-pcDNA3/18+*STaroB*-pcDNA3/40L uygulanmış bir fareden (E) elde edilen dalaktan izole edilmiş total hücresel RNA' dan sentezlenmiş RT(+) cDNA sentez reaksiyonudur.

11. 100 bp DNA *Ladder.*

12-21 no' lu kuyular sırasıyla 1-10 no' lu kuyulardaki örneklerin RT(-) cDNA sentez reaksiyonu PZR kalıbı olarak kullanılarak gerçekleştirilmiş PZR ürünleridir.

22. 100 bp DNA *Ladder.*

23. Pozitif kontrol PZR: PZR kalıbı, pozitif kontrol RT(+) cDNA' dır. 452 bp' lik *gapdh*' e ait band görülmektedir.

24. Negatif kontrol PZR: PZR kalıbı, negatif kontrol RT(-) cDNA' dır.

25. Negatif kontrol PZR: PZR kalıbı, ddH_2O' dur.

5. TARTIŞMA

Bakteri aracılı gen tedavisi veya DNA aşılaması, son yıllarda memeli hücrelerine heterolog genlerin aktarılması konusunda umut vadeden bir yaklaşım olarak araştırılmaktadır. Zayıflatılmış *ST* suşları en çok kullanılan ve araştırılan bakterilerin başında gelmektedir (26,41). Farelere uygulandığında, zayıflatılmış *ST* suşlarının etkin bir şekilde konak hücrelerini istila edebildiği ve heterolog genleri bu hücrelere aktarabildiği gösterilmiştir (33, 261). Çok çeşitli hastalıklarda uygulanabilmeleriyle birlikte tümörlere karşı gösterdikleri yönelim (29, 262), tümörlere karşı immün cevabın arttırılması amacıyla tümör antijen genlerinin veya immünmodülatör genlerin taşınmasında en cazip vektörlerden birisi olmalarına yol açmıştır.

Bu çalışmada fare IL-18 veya CD40L genlerini taşıyan *STaroB* mutant suşları oluşturuldu ve ileri kanser çalışmalarında kullanılmak üzere potansiyel gen tedavisi vektörü olarak değerlendirildi. *STaroB* suşu, *ST* suşu C5' in *aroB* geninde stabil insersiyonel mutasyon oluşturulması yoluyla geliştirilmiş ve bu suşun *aroA*, *aroC* ve *aroD* gibi diğer oksotrofik *ST* suşları kadar zayıflatılmış etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (1). Literatürden bilindiği kadarıyla, *STaroB* suşu gen tedavisi vektörü olarak ilk kez bu çalışmada değerlendirildi. *Salmonella* temelli DNA aşılama çalışmalarında en önemli unsurlar plazmidin bakteri içerisindeki stabilitesi ve *in vivo* etkinliği olduğu için, rekombinant bakterinin hastalık modelinde denenmesi aşamasından önce *in vitro* ve *in vivo* plazmid stabilitesinin ve etkinliğinin gösterilmesi gereklidir. Plazmid kaybı ve heterolog genin kararsız ekspresyonu rekombinant bakterinin aşı veya gen tedavisi etkinliğinin azalmasına ve hatta kaybolmasına yol açmaktadır. Bu nedenle, öncelikle IL-18 ve CD40L genlerini taşıyan ökaryötik ekspresyon plazmidleri oluşturuldu ve bu genlerin *in vitro* ekspresyonları gösterildi.

DNA aşılama ve gen tedavisi çalışmalarının etkinliğini belirleyen en önemli faktörlerden birisi uygun plazmid vektörün seçimidir (263). Plazmid DNA vektörünün temel elemanları ökaryötik bir promotor, klonlama bölgesi, poliadenilasyon dizisi, seleksiyon belirteci ve bakteriyel replikasyon başlangıcı dizileridir. Memeli hücrelerinde optimal ekspresyonu sağlayabilmek için güçlü bir promotor şarttır. Bu amaçla sitomegalovirüs

(CMV) ve simian virüs (SV40) promotorları en çok kullanılan promotorlardır. Özellikle CMV promotorunun diğer promotorlarla karşılaştırıldığında *in vivo* en güçlü ekspresyona yol açtığı bilinmektedir. Promotor bölgenin aşağısında bir klonlama bölgesi ve devamında mRNA transkriptlerinin stabilizasyonunu sağlamak amacıyla sığır büyüme hormonu (*Bovine Growth Hormone*, BGH) veya SV40 poliadenilasyon dizisi gibi bir poliadenilasyon dizisi yer alır. En çok kullanılan seleksiyon belirteçleri ise antibiyotik dirençlilik genleridir. DNA aşılama ve gen tedavisi çalışmalarında, saflaştırma sonrası yüksek miktarda plazmid DNA elde edebilmek amacıyla bakteride yüksek plazmid kopya numaralarına ulaşan ve en çok kullanılan pUC plazmid serisinde bulunan *E.Coli ColE1* replikasyon başlangıcı sıklıkla kullanılmaktadır.

Literatürden bilindiği kadarıyla, pTargeT vektörünün kullanıldığı bir *Salmonella* gen tedavisi çalışması yoktur. pTargeT, yüksek kopya sayısına sahip bir replikasyon başlangıcı taşımaktadır (251). Zayıflatılmış *Salmonella* suşlarına yüksek kopya sayılı ekspresyon plazmidleri aktarılarak yapılan pek çok DNA aşılama ve gen tedavisi çalışmasında başarılı sonuçlar elde edilmiştir (33, 81, 111). Ancak son dönemde, düşük kopya sayılı plazmidlerin çok daha stabil olduğu ve immün cevapları uyarma konusunda yüksek kopya sayılı plazmidlerden daha etkili olduğu gösterilmiştir (264). Bauer ve diğ. (264) yüksek kopya sayılı pCMVβ plazmidinin *in vitro* seçici olmayan koşullarda hızla kaybedildiğini, ancak seçici antibiyotik varlığında stabilitenin yaklaşık %100' e ulaştığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada pTargeT plazmidlerinin seçici antibiyotik varlığında bile *STaroB* içerisinde *in vitro* stabilitelerinin çok düşük olduğu görüldü (Bkz. Tablo 4.3). Bunun üzerine, bu bakterilerin *in vivo* uygulama için yeterli stabiliteye sahip olmadığına karar verildi.

pcDNA3 plazmidi ise *ColE1* replikasyon başlangıcına sahiptir ve *ColE1* yüksek kopya sayısından sorumludur (256). Yakın bir zamanda, Du ve Wang (2) tarafından pcDNA3 plazmidinin *in vitro* stabilitesi *ST* suşu SV4089 (*Dam*$^-$ ve *PhoP*$^-$)' da değerlendirilmiş ve %80' in üzerinde bulunmuştur. Bu çalışmada da pcDNA3 plazmidlerinin *in vitro* stabiliteleri %85' in üzerinde bulundu (Bkz. Şekil 4.26). Bunun yanında, rekombinant bakterilerin gece

boyu kültürlerinin cfu sayılarının plazmid taşımayan bakterilerinkinden yaklaşık 10 kat az bulunması plazmid yükünün bakterinin çoğalmasında yavaşlamaya neden olduğunu düşündürmektedir. Farelere enjekte edilen rekombinant bakterilerin cfu sayılarını kontrol etmek amacıyla seri dilüsyonlarının ekimi yapıldığında ise, plazmid taşıyan bakteri yüzdeleri; pcDNA3/sadece vektör için %60, pcDNA3/18 için %9.2 ve pcDNA3/40L için %16.2 bulundu (Bkz. Şekil 4.28). Daha önce *in vitro* çalışmalarda %85' in üzerinde stabilite göstermelerine rağmen, deney koşulları değiştirilmediği halde, stabilitedeki beklenmeyen bu düşme, *STaroB* suşu içerisinde plazmid yapılarının stabilitesinin ne kadar değişken olabildiğini göstermektedir. Bunun yanında rekombinant bakterilerin, gece boyu kültürlerinin gliserol stoklardan hazırlanmış petrilerden alınan bakterilerle hazırlanmış olmasının plazmid taşıma yeteneklerini etkilemiş olabileceği sorusunu akla getirmektedir. Ancak tüm kültürler uygun dozlarda ampisilin ve kanamisin varlığında yapılmıştır ve böylece plazmid taşımayan bakterilerin LB-agarda çoğalmasının önüne geçilmiştir.

pcDNA3 plazmidlerini taşıyan *STaroB* bakterileri inbred Balb/*c* farelere intravenöz olarak verildiğinde, *insert* DNA taşıyan rekombinant plazmidler istatistiksel olarak boş plazmidden daha stabil bulundu, ancak tüm plazmid yapılarının hem karaciğer hem de dalaktaki *in vivo* stabiliteleri %1' in altındaydı (Bkz. Şekil 4.30). Plazmidlerin memeli hücrelerinde *in vitro* ekspresyonu (Bkz. Şekil 4.20 ve 4.21) gösterilmesine rağmen hiçbir grupta, karaciğer ve dalakta ekspresyon tespit edilmedi. Du ve Wang (2) pcDNA3 plazmidlerini taşıyan rekombinant *Salmonella* bakterilerinin tavuklarda yüksek oranda stabil olduğunu bildirmişlerdir. Homojenize organların seri dilüsyonlarının sadece seçici antibiyotik içeren LB-agar içerisine ekildiğini, genin PZR ile tanımlanması ve restriksiyon enzimleri ile kesim için ise her defasında on koloni seçildiğini bildirmişlerdir. Ancak, *in vivo* olarak plazmid taşıyan *Salmonella* yüzdesini belirtmemişlerdir.

Proliferasyon sırasında bakteri tarafından plazmidin taşınması pek çok faktöre bağlıdır. Heterolog proteinin ekspresyon düzeyi, plazmidin kopya sayısı, büyüklüğü ve karmaşıklığı (örn. bakteri içerisinde plazmid tarafından

kodlanan protein sayısı ve miktarı) bunlar arasında en önemlileridir. *Salmonella* suşlarında plazmid instabilitesi ile kopya sayısı arasındaki ilişki daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (264, 265). Yüksek kopya sayısına sahip plazmidleri bakteri kolaylıkla kaybederken, kopya sayısında azalma plazmid yükünü hafifletmekte ve bakterinin plazmid tutma kapasitesini arttırmaktadır. Bauer ve diğ. (264) *S.typhimurium aroA*$^{-}$ suşunu kullandıklarında plazmidin replikasyon başlangıç bölgesini değişterek kopya sayısını düşürmüşler ve yüksek kopya sayılı plazmidden farklı olarak seçici antibiyotik yokluğunda bile *in vitro* ve *in vivo* yüksek stabilite oranlarına ulaşmışlardır. Tüm suşların Peyer plaklarını, mezenterik lenf nodlarını, karaciğer ve dalağı kolonize edebildiği gösterilmiştir. Ancak, iki gün içerisinde yüksek kopya sayılı plazmid kaybolmuş ve tek bir oral uygulamanın ardından 2, 7, 10, 14 ve 21. günlerde Peyer plaklarında, mezenterik lenf nodlarında ve dalakta plazmid taşıyan *Salmonella*' nın tespit edilememiştir. Antijene karşı immünizasyonu amaçlayan bu DNA aşılama çalışmasında, tek bir oral uygulama sonrasında, düşük kopya sayılı plazmidlerle daha güçlü antijene özgül CD8+ ve CD4+ T-hücre ve antikor cevapları elde edilmesine rağmen yüksek kopya sayılı plazmidler ile de immün cevap elde edilmiştir. Bauer ve diğ. (264) daha önceki çalışmalarında (33, 81) yüksek kopya sayılı plazmid ile elde ettikleri immün cevaplardaki değişkenliğin ekspresyon plazmidlerinin taşıyıcı bakteri içerisindeki instabilitesine ve dolayısıyla yüksek kopya sayılı plazmid yüküne bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada, Pereira ve diğ. (266) enterotoksijenik *E.coli'* nin flajellin geni ile mutasyona uğratılmış ısı-stabil toksin geninden oluşan hibrid flajellin genini taşıyan pcDNA3 aktarılmış *Salmonella* ile aşılanan farelerin serumunda flajelline karşı antikor cevabını tespit etmişlerdir. Bakteriyel endotoksin ve/veya doğal immün cevapları tetikleyecek diğer bakteriyel moleküller istila edilen hücrenin aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu da doğrudan antijen sunumuna ve T-hücre uyarılmasına yol açabilmektedir. Bunun yanında aktif makrofajlarda *Salmonella* tarafından uyarılan apoptozis-benzeri hücre ölümü sonucunda apoptotik cisimler komşu dendritik hücreler tarafından alınıp işlenmekte ve apoptozise uğrayan hücredeki antijenik yapılar T-hücrelerine sunulmaktadır

(267). Çapraz sunum olarak adlandırılan bu olay, *Salmonella* DNA aşılarının T-hücre cevaplarını çok etkili bir şekilde uyarmasından sorumlu olabilir. Tüm bunların ışığında, özgül bir antijen genini taşıyan yüksek kopya sayılı bir plazmid ile aşılamanın, antijenin ekspresyonu belirli düzeylerde elde edilemese bile, bu antijene karşı özgül bir immün cevap oluşturabileceği söylenebilir. Bu durum gen tedavisi stratejileri açısından çok tartışmalıdır, çünkü, genetik bir eksikliğin tamamlanması veya immün cevabı arttırmak için immünmodülatör genlerin verilmesi amacıyla yapılan tedavi edici yaklaşımlarda plazmid stabilitesi ve yeterli miktarda *in vivo* ekspresyon elde edilmesi önemlidir.

Çok düşük stabilite sonucu dokularda çok düşük miktarda plazmid bulunması ve/veya zaten az miktarda bulunan plazmidlerin fagozom içerisinde litik bakteriden serbestleştikten sonra nükleaz degradasyonuna uğraması sonucu DNA transfer etkinliğinin ve ekspresyonun azalması (25), *in vivo* ekspresyonun tespit edilememesini açıklayabilir. Aynı zamanda transforme edilen *Salmonella* suşunun kendisinin de sonucu etkilediği söylenebilir. Pek çok diğer patojende görüldüğü gibi *ST* enfeksiyonu da konak hücre ölümünü uyarmaktadır. *ST*' un enfekte ettiği makrofajlarda üç tip sitotoksisiteye yol açtığı gösterilmiştir (48). Hızlı ve *SPI-1* bağımlı hücre ölümü enfeksiyondan 40 dakika sonra gerçekleşir ve *SPI-1* efektör proteini SipB' nin konak sistein proteazı kaspaz-1 ile etkileşimi sonucu gerçekleşir (268, 269). Kaspaz-1 bağımlı hücre ölümü, güçlü pro-inflamatuar sitokinler olan IL-1 ve IL-18' in biyoaktif hallerine dönüşümünü sağlayarak aktiflenmelerine yol açar. *Salmonella*' nın indüklediği geç bir hücre ölümü tipi, kaspaz-1' den yoksun makrofajlarda enfeksiyondan 4-6 saat sonra tanımlanmıştır. Bu ölüm mekanizması kaspaz-2, -3, -6 ve -8 aktivasyonunu içerir, mitokondriden sitokrom-c salınımı ile ilişkilidir ve sitotoksik cevabın oluşması için *SPI-1* ve *SipB* gereklidir (270). Üçüncü sitotoksisite mekanizmasi ise yine geç dönemdedir, ancak *SPI-1*' den bağımsızdır. Enfeksiyondan 12-14 saat sonra morfolojik olarak belirginleşir. Geç sitotoksisitenin uyarılması için *ompR* ve *SPI-2* sisteminin gerekli olduğu gösterilmiştir (271, 272). Hızlı mekanizmada olduğu gibi, *SPI-2* bağımlı geç

mekanizmada da kısmen kaspaz-1 aktivasyonu yer almaktadır ve pro-inflamatuar IL-1β ve IL-18 sitokinlerinin olgunlaşması ve salınımına yol açmaktadır (272). Farklı sitotoksisite mekanizmalarının enfeksiyonun farklı dönemlerinde etkili olduğu görülmektedir (48). Örneğin, Peyer plaklarında hızlı makrofaj ölümü ve ardından pro-inflamatuar sitokin sentezi, *Salmonella*' nın başka fagositik hücrelere saldırması ve sistemik yayılması için avantaj sağlıyor olabilir. Sistemik enfeksiyon bölgelerindeki geç hücre ölümü ise apoptotik cisimler içerisindeki bakterinin hücreler arası yayılmasını sağlıyor gibi görünmektedir. Bunun yanında *SPI-2* bağımlı hücre ölümü, hücre içinde *Salmonella*' nın replikasyonu ve normal konak hücre işleyişinin bozulması sonucu ortaya çıkıyor olabilir. *STaroB* suşu da enfekte ettiği hücrelerde programlı hücre ölümünü çok etkin bir şekilde uyarmış olabilir ve hücrelerin ölümü sonucu transgen ekspresyonu gerçekleşememiş ve/veya tespit edilememiş olabilir.

Ökaryötik promotorların prokaryotlar içerisinde aktif olabildiği bilinmektedir (79). Böyle bir durumda bakteri içerisinde sentezi gerçekleşen proteinin bakteriye zararlı etkileri söz konusu olabilir ve plazmid taşıyan bakterilerin oranının azalmasını açıklayabilir. Ancak belki de en önemlisi en çok kullanılan viral ökaryötik promotorların ekspresyonunun çeşitli sitokinlerle engellenebilmesidir. CMV promotorunun da dahil olduğu güçlü viral promotorların transgen ekspresyonunun IFNγ ve TNFα ile engellendiği gösterilmiştir (273). *Salmonella*' nın IFNγ, TNFα, IL-12, IL-18 ve IL-15 gibi inflamatuar sitokin salınımını arttırdığı bilinmektedir (40). Ayrıca IL-18 ve CD40L molekülleri de IFNγ gibi immün uyarıcı moleküllerin sentezine yol açmaktadır. Düşük plazmid stabilitesine rağmen dokularda tespit edilen plazmid taşıyan bakteriler, plazmidi karaciğer ve dalak hücrelerine aktarmış olabilir, ancak pcDNA3 plazmidinin CMV promotoru rekombinant bakterinin ve eksprese olan IL-18 ve CD40L moleküllerinin immün sistemi uyarıcı etkisiyle engellenmiş olabilir. Böyle bir durumda güçlü viral promotorlar haricindeki promotorların (dokuya özgül dezmin veya MHC sınıf I promotoru gibi) kullanılması, genetik aşılama ve kanser immüngen tedavisi çalışmaları için daha uygun görünmektedir (263, 274).

Tüm bunların yanında, kullanılan *STaroB* suşunun stabilite veya ekspresyona etkisinin olup olmadığı sorusu da akla gelmektedir. *STaroB* suşu gen tedavisi olarak ilk kez bu çalışmada değerlendirilmiştir. Bilindiği kadarıyla pTargeT vektörü kullanılarak yapılan başka bir *Salmonella* gen tedavisi çalışması da yoktur. pcDNA3 vektörü kullanılarak yapılan çalışmalarda ise zayıflatılmış farklı *Salmonella* suşları kullanılmıştır. Bunlara örnek olarak Du ve Wang (2) tarafından kullanılan *Dam*$^{-}$ ve *PhoP*$^{-}$ SV4089 suşu ve Pereira ve diğ. (266) tarafından kullanılan *aroA*$^{-}$ SL3261 suşu verilebilir. İki çalışmada da aktarılan antijen gen ürününe karşı immün cevap elde edilmesine karşılık, plazmidden gen ekspresyonunu belirlemek amaçlı bir araştırmadan söz edilmemektedir.

Bu çalışmada, *STaroB* bakterisi gen tedavisi vektörü olarak ilk defa incelendi. İki farklı memeli ekspresyon plazmidi taşıyan *STaroB* suşları oluşturularak, bir kanser modelinde IL-18 ve CD40L gen tedavisi amacıyla potansiyel kullanımları araştırıldı. Yüksek kopya sayılı plazmid yapılarını taşıyan *STaroB* suşunun şimdiye kadar en çok kullanılan suş olan *STaroA* için bildirildiği gibi (275) stabil olmadığı gösterildi. pcDNA3 ile *in vitro* stabil rekombinant *Salmonella* elde edilmesine rağmen, *in vivo* stabilite oranları çok düşük bulundu. Rekombinant bakteri enjekte edilen farelerin karaciğer ve dalaklarında IL-18 ve CD40L mRNA ekspresyonları tespit edilmedi. Sonuç olarak, IL-18 veya CD40L genlerini taşıyan pTargeT ve pcDNA3 plazmidleri ile transforme edilmiş *STaroB* suşları bir hastalık modelinde bu immünmodülatör moleküllerin etkilerini araştırmak için yeterli kararlılığa sahip değildir ve plazmid vektörlerin daha kararlı hale getirilmesi gereklidir. Bu çalışma, *Salmonella* gen tedavisi çalışmalarında plazmid vektör stabilitesi ve ekspresyonunun önemini ve sorunlarını ortaya koyarak gelecekteki gen tedavisi çalışmalarına ışık tutmaktadır.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuçlar

1. Lipopolisakkaridle *in vitro* uyarılan Balb/*c* fare periferik kan mononükleer hücrelerinden total hücresel RNA izole edildi ve *reverse* transkripsiyon ile cDNA sentezi yapıldı.
2. IL-18 olgun ve IFNβ sinyal dizileri PZR ile çoğaltıldı. *Overlap extension* yöntemi ile IL-18 olgun cDNA' sının başına IFNβ sinyal dizisi eklenerek salınabilme özelliğine sahip hibrid IL-18 DNA' sı elde edildi.
3. Hibrid IL-18 DNA' sı pTargeT memeli ekspresyon vektörüne T-A klonlama yöntemiyle klonlandı.
4. Fare CD40L *insert* DNA' sı restriksiyon klonlama yöntemiyle pTargeT vektörüne klonlandı.
5. pTargeT/18 ve pTargeT/40L vektörlerinin *insert* DNA dizi analizi dideoksi zincir sonlanma yöntemi ile yapıldı. Otomatik DNA dizi analizi sonucunda hibrid IL-18 DNA' sının yönünün ve dizisinin doğruluğu gösterildi. CD40L DNA' sının ise 507. pozisyonunda A (adenin)→G (guanin) sessiz nokta mutasyonu tespit edildi.
6. pTargeT vektörlerine klonlanmış olan IL-18 ve CD40L *insert* DNA' ları pcDNA3 memeli ekspresyon vektörüne restriksiyon klonlama ile subklonlandı.
7. pTargeT/18 ve pTargeT/40L vektörleri katyonik bir lipozom olan TransFast Transfeksiyon Reaktifi kullanılarak NIH/3T3 fare fibroblastlarına aktarıldı.
8. pTargeT/18 transfekte edilmiş NIH/3T3 hücrelerinin kültür süpernatanları ile anti-CD3 monoklonal antikorla uyarılmış fare dalak lenfositlerinin kültürü yapılarak IL-18 etkisiyle 18, 24 ve 48. saatlerde artmış IFNγ ekspresyonu ELISA ile gösterildi.
9. pTargeT/40L transfekte edilmiş NIH/3T3 hücrelerinin yüzeyindeki CD40L ekspresyonu immünfloresan boyama ile gösterildi.

10. pcDNA3/18 ve pcDNA3/40L vektörleri katyonik bir polimer olan PolyFect Transfeksiyon Reaktifi kullanılarak HEK293 insan embriyonik böbrek epitelyal hücre hattına aktarıldı.
11. HEK293 hücrelerinde pcDNA3 plazmidlerinden IL-18 ve CD40L ekspresyonları RT-PZR ile gösterildi.
12. IL-18 ve CD40L genlerini taşıyan pTargeT ve pcDNA3 plazmidleri *STaroB* mutant suşuna elektroporasyonla aktarılarak gen tedavisi vektörleri oluşturuldu.
13. Rekombinant *STaroB* suşlarının içerisinde plazmidlerin *in vitro* stabiliteleri belirlendi. pTargeT taşıyan suşların *in vitro* stabilitesi çok düşük bulunurken, pcDNA3 plazmidlerinin *in vitro* stabiliteleri %85' in üzerinde bulundu ve *in vivo* deneylerin pcDNA3 plazmidi taşıyan suşlarla yapılmasına karar verildi.
14. 6-8 haftalık inbred dişi Balb/*c* farelere pcDNA3/18 veya pcDNA3/40L taşıyan *STaroB* suşları tek tek ve bir arada intravenöz yoldan enjekte edildi. Steril PBS çözeltisi ve pcDNA3/sadece vektör taşıyan *STaroB* enjekte edilen gruplar olmak üzere iki kontrol grubu oluşturuldu. Farelere enjekte edilen bakterilerin koloni sayılarını kontrol etmek üzere seri dilüsyonlarının antibiyotikli ve antibiyotiksiz LB-agarda ekimleri yapıldığında plazmid DNA taşıyan bakteri yüzdesinin (*in vitro* stabilite) *STaroB*-pcDNA3/sadece vektör için %60, *STaroB*-pcDNA3/18 için %9.2, *STaroB*-pcDNA3/40L için %16.2 olduğu tespit edildi. Daha önce *in vitro* stabiliteleri %85' in üzerinde bulunan bakterilerin stabilitelerindeki beklenmeyen bu düşme, *STaroB* suşu içerisinde plazmid yapılarının stabilitesinin ne kadar değişken olabildiğini göstermekteydi.
15. Rekombinant *STaroB* uygulamasının ardından 4. günde tüm fareler sakrifiye edildi. Karaciğer ve dalakları homojenize edilerek seri dilüsyonlarının antibiyokli ve antibiyotiksiz LB-agarda ekimleri yapılarak bakteri kolonizasyonları ve *in vivo* plazmid stabiliteleri değerlendirildi. Tüm suşların karaciğer ve dalağı kolonize ettiği gösterildi. *İnsert* DNA taşıyan rekombinant plazmidlerin *in vivo* stabilitesi gerek karaciğer gerekse dalak

için, istatistiksel olarak boş plazmide göre daha yüksek bulundu (Kruskal Wallis ANOVA, her iki organ için P=0.001 ve ikili karşılaştımalar için Mann-Whitney U-testi, tüm *insert* DNA/organ kombinasyonları için P<0.01). Farelere enjekte edilen bakterilerin *in vitro* stabilitesine göre yapılan düzeltme sonrasında da benzer ilişkiler devam etmekteydi. Bunun yanında tüm gruplarda her organ için *in vivo* plazmid stabilite oranı %1' in altındaydı.

16. Tüm grupların karaciğer ve dalaklarından RNA izolasyonu yapılarak RT-PZR ile IL-18 ve CD40L ekspresyonu araştırıldı. Hiçbirinde ekspresyon gözlenmedi.

17. IL-18 veya CD40L genlerini taşıyan pTargeT ve pcDNA3 plazmidleri ile transforme edilmiş *STaroB* suşları, bir hastalık modelinde bu immünmodülatör moleküllerin etkilerini araştırmak için yeterli stabiliteye sahip değildir.

18. Bu çalışma kapsamında Hacettepe Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuarları' nda moleküler klonlama ve lipozomal hücre transfeksiyon deneyleri ilk kez gerçekleştirilmiştir. Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuarı' nda moleküler klonlama ve elektroporasyon deneyleri ilk kez gerçekleştirilmiştir. Kullanılan yöntemler, adı geçen laboratuarlarda yapılacak araştırma projelerine ve yüksek lisans, doktora çalışmalarına katkıda bulunacaktır.

19. Bu çalışma ile *STaroB* bakterisi ilk defa gen tedavisi vektörü olarak geliştirilmiş ve değerlendirilmiştir. pTargeT plazmidi ilk kez bir *Salmonella* suşu içerisine aktarılarak gen tedavisi amacıyla araştırılmıştır. pcDNA3 plazmidinin ise *Salmonella* suşlarına aktarıldığı sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışma literatürde bu konudaki eksikliği gidermektedir ve sonuçları yeni soru ve sorunları ortaya koyarak ileride yapılacak gen tedavisi çalışmalarına ışık tutmaktadır.

Öneriler

1. İmmün cevapları uyarmak için çok yüksek ekspresyona ihtiyaç duymadığı düşünülen çeşitli antijen genleri, pTarget ve pcDNA3 plazmidlerine yüklenerek immün cevap oluşturma kapasiteleri değerlendirilebilir.
2. *STaroB* bakterisinin gen tedavisi amacıyla kullanılabilmesi için düşük kopya sayısına sahip stabil bir plazmid vektör kullanılması veya pTargeT ve pcDNA3 plazmidlerinin stabilitesinin arttırılması önerilmektedir. Bu amaçla plazmidlerin replikasyon başlangıçları değiştirilerek elde edilen düşük kopya sayısına sahip plazmidlerin *in vitro* ve *in vivo* stabiliteleri tekrar değerlendirilebilir.
3. *STaroB* suşunun stabiliteye ve ekspresyona olan etkisi başka *Salmonella* suşları ile karşılaştırılarak değerlendirilebilir.
4. pTargeT ve pcDNA3 memeli ekspresyon plazmidlerinin *STaroB* suşu ve/veya başka *Salmonella* suşları içerisinde ekspresyonunun varlığı ve eğer tespit edilirse bakteriye olan etkileri araştırılabilir.
5. pTargeT ve pcDNA3 memeli ekspresyon plazmidleri ökaryötik hücrede güçlü ekspresyon sağlayan CMV promotoruna sahiptirler. Çeşitli sitokinlerle CMV promotorunun ekspresyonunun engellenebildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada da *Salmonella* bakterisinin ve/veya IL-18 ve CD40L moleküllerinin etkisiyle dokuda ortaya çıkan inflamatuar sitokinler tarafından pcDNA3 plazmidinin CMV promotoru engellenmiş olabilir. Bu nedenle plazmidlerin ökaryötik promotorları değiştirilerek veya farklı ökaryötik promotorlar taşıyan farklı plazmidler kullanılarak *in vivo* ekspresyon varlığı tekrar araştırılabilir.

KAYNAKLAR

1. Gunel-Ozcan A, Brown KA, Allen AG, Maskell DJ, *Salmonella typhimurium aroB* mutants are attentuated in BALB/*c* mice, Microb Pathog, 23(5):311-6, 1997.

2. Du A, Wang S, Efficacy of a DNA vaccine delivered in attenuated *Salmonella typhimurium* against *Eimeria tenella* infection in chickens, Int J Parasitol, 35(7):777-85, 2005.

3. Lyngstadaas A, Status and potential of gene therapy in clinical medicine. Assessment of an emerging health technology through systematic survey of clinical gene therapy protocols and published results., Int J Technol Assess Health Care, 18(3):645-74, 2002.

4. Strachan T, Read AP, Human Molecular Genetics, 2. Baskı, BIOS Scientific Publishers Ltd, UK, 1999.

5. Ocak.2006, Gene Therapy Clinical Trials Worldwide [online]. John Wiley and Sons Ltd. http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/ [03/04/2006].

6. Editorial, Gene therapy: when, and for what?, Lancet, 345(8952):739-40, 1995.

7. Smith KR, Gene therapy: theoretical and bioethical concepts, Arch Med Res, 34(4):247-68, 2003.

8. Liu CM, Liu DP, Liang CC, Oligonucleotide-mediated gene repair at DNA level: the potential applications for gene therapy, J Mol Med, 80(10):620-8, 2002.

9. Kren BT, Steer CJ, The application of DNA repair vectors to gene therapy, Curr Opin Biotechnol, 13(5), 473-81, 2002.

10. Urban E, Noe CR, Structural modifications of antisense oligonucleotides, Farmaco, 58(3):243-58, 2003.

11. Sazani P, Vacek MM, Kole R, Short-term and long-term modulation of gene expression by antisense therapeutics, Curr Opin Biotechnol, 13(5):468-72., 2002.

12. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L, Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics, Nat Med, 7(1):33-40, 2001.

13. Corbel SY, Rossi FM, Latest developments and in vivo use of the Tet system: *ex vivo* and *in vivo* delivery of tetracycline-regulated genes, Curr Opin Biotechnol, 13(5):448-52, 2002.

14. Lundstrom K, Latest development in viral vectors for gene therapy, Trends Biotechnol, 21(3):117-22, 2003.

15. Cavazzana-Calvo M, Lagresle C, Hacein-Bey-Abina S, Fischer A, Gene therapy for severe combined immunodeficiency, Annu Rev Med, 56:585-602, 2005.

16. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1, Science, 17;302(5644):415-9, 2003.

17. Young LS, Searle PF, Onion D, Mautner V, Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application, J Pathol, 208(2):299-318, 2006.

18. Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM, Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration, Science, 300(5626):1749-51, 2003.

19. Schmidt-Wolf GD, Schmidt-Wolf IG, Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update, Trends Mol Med, 9(2):67-72, 2003.

20. Schaffner W, Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells, Proc Natl Acad Sci U S A, 77(4):2163-7, 1980.

21. Trieu-Cuot P, Derlot E, Courvalin P, Enhanced conjugative transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, FEMS Microbiol Lett, 109(1):19-23, 1993.

22. Charpentier E, Gerbaud G, Courvalin P, Conjugative mobilization of the rolling-circle plasmid pIP823 from *Listeria monocytogenes* BM4293 among gram-positive and gram-negative bacteria, J Bacteriol, 181(11):3368-74, 1999.

23. Heinemann JA, Sprague GF Jr, Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast, Nature, 340(6230):205-9, 1989.

24. Lessl M, Lanka E, Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells, Cell, 77(3):321-4, 1994.

25. Loessner H, Weiss S, Bacteria-mediated DNA transfer in gene therapy and vaccination, Expert Opin Biol Ther, 4(2):157-68, 2004.

26. Weiss S, Chakraborty T, Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian host cells by bacterial carriers, Curr Opin Biotechnol, 12(5):467-72, 2001.

27. Richter-Dahlfors A, Buchan AM, Finlay BB, Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo, J Exp Med, 186(4):569-80, 1997.

28. Hopkins SA, Niedergang F, Corthesy-Theulaz IE, Kraehenbuhl JP, A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells, Cell Microbiol, 2(1):59-68, 2000.

29. Pawelek JM, Low KB, Bermudes D, Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector, Cancer Res, 57(20):4537-44, 1997.

30. Huggins ML, Huang FP, Xu D, Lindop G, Stott DI, Modulation of autoimmune disease in the MRL-lpr/lpr mouse by IL-2 and TGF-beta1 gene therapy using attenuated *Salmonella typhimurium* as gene carrier, Lupus, 8(1):29-38, 1999.

31. Sizemore DR, Branstrom AA, Sadoff JC, Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization, Science, 270(5234):299-302, 1995.

32. Courvalin P, Goussard S, Grillot-Courvalin C, Gene transfer from bacteria to mammalian cells, C R Acad Sci III, 318(12):1207-12, 1995.

33. Darji A, Guzman CA, Gerstel B, Wachholz P, Timmis KN, Wehland J, Chakraborty T, Weiss S, Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*, Cell, 91(6):765-75, 1997.

34. Vassaux G, Nitcheu J, Jezzard S, Lemoine NR, Bacterial gene therapy strategies, J Pathol, 208(2):290-8, 2006.

35. Marra A, Isberg RR, Common entry mechanisms, Bacterial pathogenesis, Curr Biol, 6(9):1084-6, 1996.

36. Lecuit M, Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers, Clin Microbiol Infect, 11(6):430-6, 2005.

37. Hense M, Domann E, Krusch S, Wachholz P, Dittmar KE, Rohde M, Wehland J, Chakraborty T, Weiss S, Eukaryotic expression plasmid transfer from the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* to host cells, Cell Microbiol, 3(9):599-609, 2001.

38. Pizarro-Cerda J, Cossart P, Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*, J Pathol. 208(2):215-23, 2006.

39. Lilic M, Stebbins CE, Re-structuring the host cell: up close with *Salmonella*' s molecular machinery, Microbes Infect, 6(13):1205-11, 2004.

40. Mastroeni P, Immunity to systemic *Salmonella* infections, Curr Mol Med, 2(4):393-406, 2002.

41. Mastroeni P, Chabalgoity JA, Dunstan SJ, Maskell DJ, Dougan G. *Salmonella*: immune responses and vaccines, Vet J, 161(2):132-64, 2001.

42. Santos RL, Zhang S, Tsolis RM, Kingsley RA, Adams LG, Baumler AJ, Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever, Microbes Infect, 3(14-15):1335-44, 2001.

43. Lam-Yuk-Tseung S, Gros P, Genetic control of susceptibility to bacterial infections in mouse models, Cell Microbiol, 5(5):299-313, 2003.

44. Carter PB, Collins FM, The route of enteric infection in normal mice, J Exp Med, 139(5):1189-203, 1974.

45. Clark MA, Jepson MA, Intestinal M cells and their role in bacterial infection, Int J Med Microbiol, 293(1):17-39, 2003.

46. Jones BD, Ghori N, Falkow S, *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches, J Exp Med, 180(1):15-23, 1994.

47. Ehrbar K, Hardt WD, Bacteriophage-encoded type III effectors in *Salmonella enterica subspecies 1 serovar Typhimurium*, Infect Genet Evol, 5(1):1-9, 2005.

48. Kuhle V, Hensel M, Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella pathogenicity island 2*, Cell Mol Life Sci, 61(22):2812-26, 2004.

49. Hapfelmeier S, Hardt WD, A mouse model for *S. typhimurium*-induced enterocolitis, Trends Microbiol, 13(10):497-503, 2005.

50. Lostroh CP, Lee CA, The *Salmonella pathogenicity island-1* type III secretion system, Microbes Infect, 3(14-15):1281-91, 2001.

51. Monack DM, Hersh D, Ghori N, Bouley D, Zychlinsky A, Falkow S, *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer' s patches in a murine typhoid model, J Exp Med, 192(2):249-58, 2000.

52. Bajaj V, Lucas RL, Hwang C, Lee CA, Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of hilA expression, Mol Microbiol, 22(4):703-14, 1996.

53. Nnalue NA, Shnyra A, Hultenby K, Lindberg AA, *Salmonella choleraesuis* and *Salmonella typhimurium* associated with liver cells after intravenous inoculation of rats are localized mainly in Kupffer cells and multiply intracellularly, Infect Immun, 60(7):2758-68, 1992.

54. Francis CL, Ryan TA, Jones BD, Smith SJ, Falkow S, Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria, Nature, 364(6438):639-42, 1993.

55. Santos RL, Baumler AJ, Cell tropism of *Salmonella enterica*, Int J Med Microbiol, 294(4):225-33, 2004.

56. Parry CM, Hien TT, Dougan G, White NJ, Farrar JJ, Typhoid fever, N Engl J Med, 347(22):1770-82, 2002.

57. Warren J, Mastroeni P, Dougan G, Noursadeghi M, Cohen J, Walport MJ, Botto M, Increased susceptibility of C1q-deficient mice to *Salmonella enterica serovar Typhimurium* infection, Infect Immun, 70(2):551-7, 2002.

58. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Baumler AJ, Falkow S, Valdivia R, Brown W, Le M, Berggren R, Parks WT, Fang FC, Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes, Nature, 401(6755):804-8, 1999.

59. Rescigno M, Rotta G, Valzasina B, Ricciardi-Castagnoli P, Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers, Immunobiology, 204(5):572-81, 2001.

60. Yrlid U, Svensson M, Hakansson A, Chambers BJ, Ljunggren HG, Wick MJ, *In vivo* activation of dendritic cells and T cells during *Salmonella enterica serovar Typhimurium* infection, Infect Immun, 69(9):5726-35, 2001.

61. Salcedo SP, Noursadeghi M, Cohen J, Holden DW, Intracellular replication of *Salmonella typhimurium* strains in specific subsets of splenic macrophages in vivo, Cell Microbiol, 3(9):587-97, 2001.

62. Bonina L, Costa GB, Mastroeni P, Comparative effect of gentamicin and pefloxacin treatment on the late stages of mouse typhoid, New Microbiol, 21(1):9-14, 1998.

63. Hsu HS, Pathogenesis and immunity in murine salmonellosis, Microbiol Rev, 53(4):390-409, 1989.

64. Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S, Phagosome maturation: aging gracefully, Biochem J, 366(Pt 3):689-704, 2002.

65. Mastroeni P, Vazquez-Torres A, Fang FC, Xu Y, Khan S, Hormaeche CE, Dougan G, Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival in vivo, J Exp Med, 192(2):237-48, 2000.

66. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC, Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro, J Exp Med, 192(2):227-36, 2000.

67. Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Holden DW, Lucia SM, Dinauer MC, Mastroeni P, Fang FC, *Salmonella pathogenicity island*

2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase, Science, 287(5458):1655-8, 2000.

68. Chakravortty D, Hansen-Wester I, Hensel M, *Salmonella pathogenicity island 2* mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates, J Exp Med, 195(9):1155-66, 2002.

69. Curnutte JT, Scott PJ, Mayo LA, Cytosolic components of the respiratory burst oxidase: resolution of four components, two of which are missing in complementing types of chronic granulomatous disease, Proc Natl Acad Sci U S A, 86(3):825-9, 1989.

70. Monack DM, Bouley DM, Falkow S, *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nramp1+/+ mice and can be reactivated by IFNgamma neutralization, J Exp Med. 199(2):231-41, 2004.

71. Boyer E, Bergevin I, Malo D, Gros P, Cellier MF, Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, Infect Immun, 70(11):6032-42, 2002.

72. Mastroeni P, Menager N, Development of acquired immunity to *Salmonella*, J Med Microbiol, 52(Pt 6):453-9, 2003.

73. Raupach B, Kaufmann SH, Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: how to choose the appropriate *Salmonella* vaccine strain?, Microbes Infect. 3(14-15):1261-9, 2001.

74. Hawkins AR, Lamb HK, Moore JD, Charles IG, Roberts CF, The pre-chorismate (shikimate) and quinate pathways in filamentous fungi: theoretical and practical aspects, J Gen Microbiol, 139(12):2891-9, 1993.

75. Hoiseth SK, Stocker BA, Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines, Nature, 291(5812):238-9, 1981.

76. Dougan G, Chatfield S, Pickard D, Bester J, O'Callaghan D, Maskell D, Construction and characterization of vaccine strains of *Salmonella* harboring mutations in two different aro genes, J Infect Dis, 158(6):1329-35, 1988.

77. Miller IA, Chatfield S, Dougan G, Desilva L, Joysey HS, Hormaeche C, Bacteriophage P22 as a vehicle for transducing cosmid gene banks between smooth strains of *Salmonella typhimurium*: use in identifying a role for *aroD* in attenuating virulent *Salmonella* strains, Mol Gen Genet, 215(2):312-6, 1989.

78. O'Callaghan D, Maskell D, Liew FY, Easmon CS, Dougan G, Characterization of aromatic- and purine-dependent *Salmonella typhimurium*: attention, persistence, and ability to induce protective immunity in BALB/*c* mice, Infect Immun, 56(2):419-23, 1988.

79. Goussard S, Grillot-Courvalin C, Courvalin P, Eukaryotic promoters can direct protein synthesis in Gram-negative bacteria, J Mol Microbiol Biotechnol, 6(3-4):211-8, 2003.

80. Weiss S, Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian hosts by attenuated *Salmonella spp*, Int J Med Microbiol, 293(1):95-106, 2003.

81. Darji A, zur Lage S, Garbe AI, Chakraborty T, Weiss S, Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier, FEMS Immunol Med Microbiol, 27(4):341-9, 2000.

82. Brunham RC, Zhang Dj, Transgene as vaccine for *chlamydia*, Am Heart J, 138(5 Pt 2):S519-22, 1999.

83. Devico AL, Fouts TR, Shata MT, Kamin-Lewis R, Lewis GK, Hone DM, Development of an oral prime-boost strategy to elicit broadly neutralizing antibodies against HIV-1, Vaccine, 20(15):1968-74, 2002.

84. Shata MT, Reitz MS Jr, DeVico AL, Lewis GK, Hone DM, Mucosal and systemic HIV-1 Env-specific CD8(+) T-cells develop after

intragastric vaccination with a *Salmonella Env* DNA vaccine vector, Vaccine, 20(3-4):623-9, 2001.

85. Vecino WH, Morin PM, Agha R, Jacobs WR Jr, Fennelly GJ, Mucosal DNA vaccination with highly attenuated *Shigella* is superior to attenuated *Salmonella* and comparable to intramuscular DNA vaccination for T cells against HIV, Immunol Lett, 82(3):197-204, 2002.

86. Woo PC, Wong LP, Zheng BJ, Yuen KY, Unique immunogenicity of hepatitis B virus DNA vaccine presented by live-attenuated *Salmonella typhimurium*, Vaccine, 19(20-22):2945-54, 2001.

87. Zheng BJ, Ng MH, Chan KW, Tam S, Woo PC, Ng SP, Yuen KY, A single dose of oral DNA immunization delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* down-regulates transgene expression in HBsAg transgenic mice, Eur J Immunol, 32(11):3294-304, 2002.

88. Flo J, Tisminetzky S, Baralle F, Oral transgene vaccination mediated by attenuated *Salmonellae* is an effective method to prevent Herpes simplex virus-2 induced disease in mice, Vaccine, 19(13-14):1772-82, 2001.

89. Elias F, Flo J, Modulation of the immune response mediated by oral transgene administration of IL-10, Cell Immunol, 216(1-2):73-81, 2002.

90. Paglia P, Medina E, Arioli I, Guzman CA, Colombo MP, Gene transfer in dendritic cells, induced by oral DNA vaccination with *Salmonella typhimurium*, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma, Blood, 92(9):3172-6, 1998.

91. Zoller M, Christ O, Prophylactic tumor vaccination: comparison of effector mechanisms initiated by protein versus DNA vaccination, J Immunol, 166(5):3440-50, 2001.

92. Cochlovius B, Stassar MJ, Schreurs MW, Benner A, Adema GJ, Oral DNA vaccination: antigen uptake and presentation by dendritic cells elicits protective immunity, Immunol Lett, 80(2):89-96, 2002.

93. Weth R, Christ O, Stevanovic S, Zoller M, Gene delivery by attenuated *Salmonella typhimurium*: comparing the efficacy of helper versus cytotoxic T cell priming in tumor vaccination, Cancer Gene Ther, 8(8):599-611, 2001.

94. Xiang R, Lode HN, Chao TH, Ruehlmann JM, Dolman CS, Rodriguez F, Whitton JL, Overwijk WW, Restifo NP, Reisfeld RA, An autologous oral DNA vaccine protects against murine melanoma, Proc Natl Acad Sci U S A, 97(10):5492-7, 2000.

95. Lode HN, Pertl U, Xiang R, Gaedicke G, Reisfeld RA, Tyrosine hydroxylase-based DNA-vaccination is effective against murine neuroblastoma, Med Pediatr Oncol, 35(6):641-6, 2000.

96. Pertl U, Wodrich H, Ruehlmann JM, Gillies SD, Lode HN, Reisfeld RA, Immunotherapy with a posttranscriptionally modified DNA vaccine induces complete protection against metastatic neuroblastoma, Blood, 101(2):649-54, 2003.

97. Xiang R, Primus FJ, Ruehlmann JM, Niethammer AG, Silletti S, Lode HN, Dolman CS, Gillies SD, Reisfeld RA, A dual-function DNA vaccine encoding carcinoembryonic antigen and CD40 ligand trimer induces T cell-mediated protective immunity against colon cancer in carcinoembryonic antigen-transgenic mice, J Immunol, 167(8):4560-5, 2001.

98. Niethammer AG, Xiang R, Ruehlmann JM, Lode HN, Dolman CS, Gillies SD, Reisfeld RA, Targeted interleukin 2 therapy enhances protective immunity induced by an autologous oral DNA vaccine against murine melanoma, Cancer Res, 61(16):6178-84, 2001.

99. Luo Y, Zhou H, Mizutani M, Mizutani N, Reisfeld RA, Xiang R, Transcription factor Fos-related antigen 1 is an effective target for a

breast cancer vaccine, Proc Natl Acad Sci U S A, 100(15):8850-5, 2003.

100. Luo Y, Zhou H, Mizutani M, Mizutani N, Liu C, Xiang R, Reisfeld RA, A DNA vaccine targeting Fos-related antigen 1 enhanced by IL-18 induces long-lived T-cell memory against tumor recurrence, Cancer Res, 65(8):3419-27, 2005.

101. Niethammer AG, Xiang R, Becker JC, Wodrich H, Pertl U, Karsten G, Eliceiri BP, Reisfeld RA, A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth, Nat Med, 8(12):1369-75, 2002.

102. Zoller M, Unexpected induction of unresponsiveness by vaccination with transformed *Salmonella typhimurium*, J Immunother, 25(2):162-75, 2002.

103. Low KB, Ittensohn M, Le T, Platt J, Sodi S, Amoss M, Ash O, Carmichael E, Chakraborty A, Fischer J, Lin SL, Luo X, Miller SI, Zheng L, King I, Pawelek JM, Bermudes D, Lipid A mutant *Salmonella* with suppressed virulence and TNFalpha induction retain tumor-targeting in vivo, Nat Biotechnol, 17(1):37-41, 1999.

104. Luo X, Li Z, Lin S, Le T, Ittensohn M, Bermudes D, Runyab JD, Shen SY, Chen J, King IC, Zheng LM, Antitumor effect of VNP20009, an attenuated *Salmonella*, in murine tumor models, Oncol Res, 12(11-12):501-8, 2000.

105. Clairmont C, Lee KC, Pike J, Ittensohn M, Low KB, Pawelek J, Bermudes D, Brecher SM, Margitich D, Turnier J, Li Z, Luo X, King I, Zheng LM, Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of *Salmonella typhimurium*, J Infect Dis, 181(6):1996-2002, 2000.

106. Toso JF, Gill VJ, Hwu P, Marincola FM, Restifo NP, Schwartzentruber DJ, Sherry RM, Topalian SL, Yang JC, Stock F, Freezer LJ, Morton KE, Seipp C, Haworth L, Mavroukakis S, White

D, MacDonald S, Mao J, Sznol M, Rosenberg SA, Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma, J Clin Oncol, 20(1):142-52, 2002.

107. Nemunaitis J, Cunningham C, Senzer N, Kuhn J, Cramm J, Litz C, Cavagnolo R, Cahill A, Clairmont C, Sznol M, Pilot trial of genetically modified, attenuated *Salmonella* expressing the *E.coli cytosine deaminase* gene in refractory cancer patients, Cancer Gene Ther, 10(10):737-44, 2003.

108. Burke B, Sumner S, Maitland N, Lewis CE, Macrophages in gene therapy: cellular delivery vehicles and in vivo targets, J Leukoc Biol, 72(3):417-28, 2002.

109. Montosi G, Paglia P, Garuti C, Guzman CA, Bastin JM, Colombo MP, Pietrangelo A, Wild-type HFE protein normalizes transferrin iron accumulation in macrophages from subjects with hereditary hemochromatosis, Blood, 96(3):1125-9, 2000.

110. Paglia P, Terrazzini N, Schulze K, Guzman CA, Colombo MP, *In vivo* correction of genetic defects of monocyte/macrophages using attenuated *Salmonella* as oral vectors for targeted gene delivery, Gene Ther, 7(20):1725-30, 2000.

111. Urashima M, Suzuki H, Yuza Y, Akiyama M, Ohno N, Eto Y, An oral CD40 ligand gene therapy against lymphoma using attenuated *Salmonella typhimurium*, Blood, 95(4):1258-63, 2000.

112. Yuhua L, Kunyuan G, Hui C, Yongmei X, Chaoyang S, Xun T, Daming R, Oral cytokine gene therapy against murine tumor using attenuated *Salmonella typhimurium*, Int J Cancer, 94(3):438-43, 2001.

113. Rosenkranz CD, Chiara D, Agorio C, Baz A, Pasetti MF, Schreiber F, Dematteis S, Martinez M, Sztein MB, Chabalgoity JA, Towards new immunotherapies: targeting recombinant cytokines to the

immune system using live attenuated *Salmonella*, Vaccine, 21(7-8):798-801, 2003.

114. Okamura H, Nagata K, Komatsu T, Tanimoto T, Nukata Y, Tanabe F, Akita K, Torigoe K, Okura T, Fukuda S ve diğ., A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock, Infect Immun, 63(10):3966-72, 1995.

115. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K ve diğ., Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells, Nature, 378(6552):88-91, 1995.

116. Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, Tanabe F, Konishi K, Micallef M, Fujii M, Torigoe K, Tanimoto T, Fukuda S, Ikeda M, Okamura H, Kurimoto M, Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein, J Immunol, 156(11):4274-9, 1996.

117. Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Higashino K, Okamura H, Nakanishi K, Kurimoto M, Tanimoto T, Flavell RA, Sato V, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme, Science, 275(5297):206-9, 1997.

118. Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, Butler D, Herzog L, Carter A, Quintal L, Sekut L, Talanian R, Paskind M, Wong W, Kamen R, Tracey D, Allen H, Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production, Nature, 386(6625):619-23, 1997.

119. Kato Z, Jee J, Shikano H, Mishima M, Ohki I, Ohnishi H, Li A, Hashimoto K, Matsukuma E, Omoya K, Yamamoto Y, Yoneda T, Hara T, Kondo N, Shirakawa M, The structure and binding mode of interleukin-18, Nat Struct Biol, 10(11):966-71, 2003.

120. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H, Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu, Cytokine Growth Factor Rev, 12(1):53-72, 2001.

121. Tone M, Thompson SA, Tone Y, Fairchild PJ, Waldmann H, Regulation of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) gene expression, J Immunol, 159(12):6156-63, 1997.

122. Puren AJ, Fantuzzi G, Dinarello CA, Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1beta are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells, Proc Natl Acad Sci U S A, 96(5):2256-61, 1999.

123. Koyama N, Hoelzer D, Ottmann OG, Regulation of human IL-18 gene expression: interaction of PU.1 with GC-box binding protein is involved in human IL-18 expression in myeloid cells, Eur J Immunol, 34(3):817-26, 2004.

124. Kim YM, Im JY, Han SH, Kang HS, Choi I, IFN-gamma up-regulates IL-18 gene expression via IFN consensus sequence-binding protein and activator protein-1 elements in macrophages, J Immunol, 165(6):3198-205, 2000.

125. Kim YM, Kang HS, Paik SG, Pyun KH, Anderson KL, Torbett BE, Choi I, Roles of IFN consensus sequence binding protein and PU.1 in regulating IL-18 gene expression, J Immunol, 163(4):2000-7, 1999.

126. Wald D, Qin J, Zhao Z, Qian Y, Naramura M, Tian L, Towne J, Sims JE, Stark GR, Li X, SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling, Nat Immunol, 4(9):920-7, 2003.

127. Takeda N, Arima M, Tsuruoka N, Okada S, Hatano M, Sakamoto A, Kohno Y, Tokuhisa T, Bcl6 is a transcriptional repressor for the IL-18 gene, J Immunol, 171(1):426-31, 2003.

128. Hurgin V, Novick D, Rubinstein M, The promoter of IL-18 binding protein: activation by an IFN-gamma –induced complex of IFN regulatory factor 1 and CCAAT/enhancer binding protein beta, Proc Natl Acad Sci U S A, 99(26):16957-62, 2002.

129. Sugawara S, Uehara A, Nochi T, Yamaguchi T, Ueda H, Sugiyama A, Hanzawa K, Kumagai K, Okamura H, Takada H, Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells, J Immunol, 167(11):6568-75, 2001.

130. Akita K, Ohtsuki T, Nukada Y, Tanimoto T, Namba M, Okura T, Takakura-Yamamoto R, Torigoe K, Gu Y, Su MS, Fujii M, Satoh-Itoh M, Yamamoto K, Kohno K, Ikeda M, Kurimoto M, Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin 18 in monocytic THP.1 cells, J Biol Chem, 272(42):26595-603, 1997.

131. Hentze H, Lin XY, Choi MS, Porter AG, Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin, Cell Death Differ, 10(9):956-68, 2003.

132. Torigoe K, Ushio S, Okura T, Kobayashi S, Taniai M, Kunikata T, Murakami T, Sanou O, Kojima H, Fujii M, Ohta T, Ikeda M, Ikegami H, Kurimoto M, Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor, J Biol Chem, 272(41):25737-42, 1997.

133. Hoshino K, Tsutsui H, Kawai T, Takeda K, Nakanishi K, Takeda Y, Akira S, Cutting edge: generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor, J Immunol, 162(9):5041-4, 1999.

134. Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, Reynolds RS, Young JL, Schonbeck U, Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis, J Exp Med, 195(2):245-57, 2002.

135. Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, Hunter D, Canetti CA, Campbell C, Cunha F, Liew FY, McInnes IB, A role for IL-18 in neutrophil activation, J Immunol, 167(5):2879-86, 2001.

136. Sims JE, IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family, Curr Opin Immunol, 14(1):117-22, 2002.

137. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H, Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses, Annu Rev Immunol, 19:423-74, 2001.

138. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S, Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function, Immunity, 9(1):143-50, 1998.

139. Kojima H, Aizawa Y, Yanai Y, Nagaoka K, Takeuchi M, Ohta T, Ikegami H, Ikeda M, Kurimoto M, An essential role for NF-kappa B in IL-18-induced IFN-gamma expression in KG-1 cells, J Immunol, 162(9):5063-9, 1999.

140. Yu JJ, Tripp CS, Russell JH, Regulation and phenotype of an innate Th1 cell: role of cytokines and the p38 kinase pathway, J Immunol, 171(11):6112-8, 2003.

141. Yang J, Zhu H, Murphy TL, Ouyang W, Murphy KM, IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production, Nat Immunol, 2(2):157-64, 2001.

142. Sugimoto N, Nakahira M, Ahn HJ, Micallef M, Hamaoka T, Kurimoto M, Fujiwara H, Differential requirements for JAK2 and TYK2 in T cell proliferation and IFN-gamma production induced by IL-12 alone or together with IL-18, Eur J Immunol, 33(1):243-51, 2003.

143. Nakahira M, Ahn HJ, Park WR, Gao P, Tomura M, Park CS, Hamaoka T, Ohta T, Kurimoto M, Fujiwara H, Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN-gamma gene expression: IL-12-induced STAT4 contributes to IFN-gamma promoter activation by up-regulating the

binding activity of IL-18-induced activator protein 1, J Immunol, 168(3):1146-53, 2002.

144. Nakahira M, Tomura M, Iwasaki M, Ahn HJ, Bian Y, Hamaoka T, Ohta T, Kurimoto M, Fujiwara H, An absolute requirement for STAT4 and a role for IFN-gamma as an amplifying factor in IL-12 induction of the functional IL-18 receptor complex, J Immunol, 167(3):1306-12, 2001.

145. Abbas AK, Lichtman AH, Cellular and Molecular Immunology, 5. Baskı, Saunders, USA, 2003.

146. Yoshimoto T, Mizutani H, Tsutsui H, Noben-Trauth N, Yamanaka K, Tanaka M, Izumi S, Okamura H, Paul WE, Nakanishi K, IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6, Nat Immunol, 1(2):132-7, 2000.

147. Brunda MJ, Luistro L, Warrier RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, Wolf SF, Gately MK, Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors, J Exp Med, 178(4):1223-30, 1993.

148. Nastala CL, Edington HD, McKinney TG, Tahara H, Nalesnik MA, Brunda MJ, Gately MK, Wolf SF, Schreiber RD, Storkus WJ ve diğ., Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production, J Immunol, 153(4):1697-706, 1994.

149. Mu J, Zou JP, Yamamoto N, Tsutsui T, Tai XG, Kobayashi M, Herrmann S, Fujiwara H, Hamaoka T, Administration of recombinant interleukin 12 prevents outgrowth of tumor cells metastasizing spontaneously to lung and lymph nodes, Cancer Res, 55(19):4404-8, 1995.

150. Zou JP, Yamamoto N, Fujii T, Takenaka H, Kobayashi M, Herrmann SH, Wolf SF, Fujiwara H, Hamaoka T, Systemic administration of rIL-12 induces complete tumor regression and protective immunity:

response is correlated with a striking reversal of suppressed IFN-gamma production by anti-tumor T cells, Int Immunol, 7(7):1135-45, 1995.

151. Tahara H, Zeh HJ 3rd, Storkus WJ, Pappo I, Watkins SC, Gubler U, Wolf SF, Robbins PD, Lotze MT, Fibroblasts genetically engineered to secrete interleukin 12 can suppress tumor growth and induce antitumor immunity to a murine melanoma *in vivo*, Cancer Res, 54(1):182-9, 1994.

152. Martinotti A, Stoppacciaro A, Vagliani M, Melani C, Spreafico F, Wysocka M, Parmiani G, Trinchieri G, Colombo MP, CD4 T cells inhibit *in vivo* the CD8-mediated immune response against murine colon carcinoma cells transduced with interleukin-12 genes, Eur J Immunol, 25(1):137-46, 1995.

153. Micallef MJ, Yoshida K, Kawai S, Hanaya T, Kohno K, Arai S, Tanimoto T, Torigoe K, Fujii M, Ikeda M, Kurimoto M, *In vivo* antitumor effects of murine interferon-gamma-inducing factor/interleukin-18 in mice bearing syngeneic Meth A sarcoma malignant ascites, Cancer Immunol Immunother, 43(6):361-7, 1997.

154. Hashimoto W, Osaki T, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Nagata S, Lotze MT, Tahara H, Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated primarily by Fas-Fas ligand- and perforin-induced tumor apoptosis, respectively, J Immunol, 163(2):583-9, 1999.

155. Cao R, Farnebo J, Kurimoto M, Cao Y, Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor, FASEB J, 13(15):2195-202, 1999.

156. Heuer JG, Tucker-McClung C, Hock RA, Neuroblastoma cells expressing mature IL-18, but not proIL-18, induce a strong and immediate antitumor immune response, J Immunother, 22(4):324-35, 1999.

157. Coughlin CM, Salhany KE, Wysocka M, Aruga E, Kurzawa H, Chang AE, Hunter CA, Fox JC, Trinchieri G, Lee WM, Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis, J Clin Invest, 101(6):1441-52, 1998.

158. Hara S, Nagai H, Miyake H, Yamanaka K, Arakawa S, Ichihashi M, Kamidono S, Hara I, Secreted type of modified interleukin-18 gene transduced into mouse renal cell carcinoma cells induces systemic tumor immunity, J Urol, 165(6 Pt 1):2039-43, 2001.

159. Nagai H, Hara I, Horikawa T, Oka M, Kamidono S, Ichihashi M, Gene transfer of secreted-type modified interleukin-18 gene to B16F10 melanoma cells suppresses in vivo tumor growth through inhibition of tumor vessel formation, J Invest Dermatol, 119(3):541-8, 2002.

160. Jin GH, Jin SZ, Liu Y, Xu RM, Yang JZ, Pan XN, Liu SZ, Therapeutic effect of gene-therapy in combination with local X-irradiation in a mouse malignant melanoma model, Biochem Biophys Res Commun, 330(3):975-81, 2005.

161. Paulie S, Ehlin-Henriksson B, Mellstedt H, Koho H, Ben-Aissa H, Perlmann P, A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes, Cancer Immunol Immunother, 20(1):23-8, 1985.

162. Stamenkovic I, Clark EA, Seed B, A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas, EMBO J, 8(5):1403-10, 1989.

163. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CR ve diğ., Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40, Nature, 357(6373):80-2, 1992.

164. Gauchat JF, Aubry JP, Mazzei G, Life P, Jomotte T, Elson G, Bonnefoy JY, Human CD40-ligand: molecular cloning, cellular distribution and regulation of expression by factors controlling IgE production, FEBS Lett, 315(3):259-66, 1993.

165. Clark EA, Ledbetter JA, How B and T cells talk to each other, Nature, 367(6462):425-8, 1994.

166. van Kooten C, Banchereau J, Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells, Curr Opin Immunol, 9(3):330-7, 1997.

167. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ, T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions, Nature, 393(6684):480-3, 1998.

168. Tan J, Town T, Mori T, Obregon D, Wu Y, DelleDonne A, Rojiani A, Crawford F, Flavell RA, Mullan M, CD40 is expressed and functional on neuronal cells, EMBO J, 21(4):643-52, 2002.

169. Young LS, Dawson CW, Brown KW, Rickinson AB, Identification of a human epithelial cell surface protein sharing an epitope with the C3d/Epstein-Barr virus receptor molecule of B lymphocytes, Int J Cancer, 43(5):786-94, 1989.

170. Hollenbaugh D, Mischel-Petty N, Edwards CP, Simon JC, Denfeld RW, Kiener PA, Aruffo A, Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells, J Exp Med, 182(1):33-40, 1995.

171. Callard RE, Armitage RJ, Fanslow WC, Spriggs MK, CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome, Immunol Today, 14(11):559-64, 1993.

172. Hayward AR, Levy J, Facchetti F, Notarangelo L, Ochs HD, Etzioni A, Bonnefoy JY, Cosyns M, Weinberg A, Cholangiopathy and tumors of the pancreas, liver, and biliary tree in boys with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM, J Immunol, 158(2):977-83, 1997.

173. van Kooten C, Banchereau J, CD40-CD40 ligand, J Leukoc Biol, 67(1):2-17, 2000.

174. Villa A, Notarangelo LD, Di Santo JP, Macchi PP, Strina D, Frattini A, Lucchini F, Patrosso CM, Giliani S, Mantuano E ve diğ., Organization of the human CD40L gene: implications for molecular defects in X chromosome-linked hyper-IgM syndrome and prenatal diagnosis, Proc Natl Acad Sci U S A, 91(6):2110-4, 1994.

175. Renshaw BR, Fanslow WC 3rd, Armitage RJ, Campbell KA, Liggitt D, Wright B, Davison BL, Maliszewski CR, Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice, J Exp Med, 180(5):1889-900, 1994.

176. Xu J, Foy TM, Laman JD, Elliott EA, Dunn JJ, Waldschmidt TJ, Elsemore J, Noelle RJ, Flavell RA, Mice deficient for the CD40 ligand, Immunity, 1(5):423-31, 1994.

177. Hsu YM, Lucci J, Su L, Ehrenfels B, Garber E, Thomas D, Heteromultimeric complexes of CD40 ligand are present on the cell surface of human T lymphocytes, J Biol Chem, 272(2):911-5, 1997.

178. Graf D, Muller S, Korthauer U, van Kooten C, Weise C, Kroczek RA, A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation, Eur J Immunol, 25(6):1749-54, 1995.

179. Mazzei GJ, Edgerton MD, Losberger C, Lecoanet-Henchoz S, Graber P, Durandy A, Gauchat JF, Bernard A, Allet B, Bonnefoy JY, Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active, J Biol Chem, 270(13):7025-8, 1995.

180. Pietravalle F, Lecoanet-Henchoz S, Blasey H, Aubry JP, Elson G, Edgerton MD, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes, J Biol Chem, 271(11):5965-7, 1996.

181. Pietravalle F, Lecoanet-Henchoz S, Aubry JP, Elson G, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Cleavage of membrane-bound CD40 ligand is not required for inducing B cell proliferation and differentiation, Eur J Immunol, 26(3):725-8, 1996.

182. Fuleihan R, Ramesh N, Horner A, Ahern D, Belshaw PJ, Alberg DG, Stamenkovic I, Harmon W, Geha RS, Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes, J Clin Invest, 93(3):1315-20, 1994.

183. de Boer M, Kasran A, Kwekkeboom J, Walter H, Vandenberghe P, Ceuppens JL, Ligation of B7 with CD28/CTLA-4 on T cells results in CD40 ligand expression, interleukin-4 secretion and efficient help for antibody production by B cells, Eur J Immunol, 23(12):3120-5, 1993.

184. McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, Freeman GJ, Sharpe AH, ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching, Nature, 409(6816):102-5, 2001.

185. Tafuri A, Shahinian A, Bladt F, Yoshinaga SK, Jordana M, Wakeham A, Boucher LM, Bouchard D, Chan VS, Duncan G, Odermatt B, Ho A, Itie A, Horan T, Whoriskey JS, Pawson T, Penninger JM, Ohashi PS, Mak TW, ICOS is essential for effective T-helper-cell responses, Nature, 409(6816):105-9, 2001.

186. Hirohata S, Human Th1 responses driven by IL-12 are associated with enhanced expression of CD40 ligand, Clin Exp Immunol, 115(1):78-85, 1999.

187. Peng X, Remacle JE, Kasran A, Huylebroeck D, Ceuppens JL, IL-12 up-regulates CD40 ligand (CD154) expression on human T cells, J Immunol, 160(3):1166-72, 1998.

188. Skov S, Bonyhadi M, Odum N, Ledbetter JA, IL-2 and IL-15 regulate CD154 expression on activated CD4 T cells, J Immunol, 164(7):3500-5, 2000.

189. Ford GS, Barnhart B, Shone S, Covey LR, Regulation of CD154 (CD40 ligand) mRNA stability during T cell activation, J Immunol, 162(7):4037-44, 1999.

190. Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CY, Shyu AB, Muller M, Gaestel M, Resch K, Holtmann H, The p38 MAP kinase pathway

signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism, EMBO J, 18(18):4969-80, 1999.

191. Chen CY, Gherzi R, Andersen JS, Gaietta G, Jurchott K, Royer HD, Mann M, Karin M, Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation, Genes Dev, 14(10):1236-48, 2000.

192. van Kooten C, Gaillard C, Galizzi JP, Hermann P, Fossiez F, Banchereau J, Blanchard D, B cells regulate expression of CD40 ligand on activated T cells by lowering the mRNA level and through the release of soluble CD40, Eur J Immunol, 24(4):787-92, 1994.

193. Tsukamoto N, Kobayashi N, Azuma S, Yamamoto T, Inoue J, Two differently regulated nuclear factor kappaB activation pathways triggered by the cytoplasmic tail of CD40, Proc Natl Acad Sci U S A, 96(4):1234-9, 1999.

194. Eliopoulos AG, Wang CC, Dumitru CD, Tsichlis PN, Tpl2 transduces CD40 and TNF signals that activate ERK and regulates IgE induction by CD40, EMBO J, 22(15):3855-64, 2003.

195. Hanissian SH, Geha RS, Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells, Immunity, 6(4):379-87, 1997.

196. Davies CC, Mason J, Wakelam MJ, Young LS, Eliopoulos AG, Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase- and ERK MAPK-regulated protein synthesis reveals the pro-apoptotic properties of CD40 ligation in carcinoma cells, J Biol Chem, 279(2):1010-9, 2004.

197. Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS, CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression, Proc Natl Acad Sci U S A, 92(10):4342-6, 1995.

198. Young LS, Eliopoulos AG, Gallagher NJ, Dawson CW, CD40 and epithelial cells: across the great divide, Immunol Today, 19(11):502-6, 1998.

199. Kato K, Cantwell MJ, Sharma S, Kipps TJ, Gene transfer of CD40-ligand induces autologous immune recognition of chronic lymphocytic leukemia B cells, J Clin Invest, 101(5):1133-41, 1998.

200. Pellat-Deceunynck C, Amiot M, Robillard N, Wijdenes J, Bataille R, CD11a-CD18 and CD102 interactions mediate human myeloma cell growth arrest induced by CD40 stimulation, Cancer Res, 56(8):1909-16, 1996.

201. Teoh G, Tai YT, Urashima M, Shirahama S, Matsuzaki M, Chauhan D, Treon SP, Raje N, Hideshima T, Shima Y, Anderson KC, CD40 activation mediates p53-dependent cell cycle regulation in human multiple myeloma cell lines, Blood, 95(3):1039-46, 2000.

202. Aldinucci D, Poletto D, Nanni P, Degan M, Rupolo M, Pinto A, Gattei V, CD40L induces proliferation, self-renewal, rescue from apoptosis, and production of cytokines by CD40-expressing AML blasts, Exp Hematol, 30(11):1283-92, 2002.

203. von Leoprechting A, van der Bruggen P, Pahl HL, Aruffo A, Simon JC, Stimulation of CD40 on immunogenic human malignant melanomas augments their cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis and induces apoptosis, Cancer Res, 59(6):1287-94, 1999.

204. Kennedy MM, Biddolph S, Lucas SB, Howells DD, Picton S, McGee JO, O'Leary JJ, CD40 upregulation is independent of HHV-8 in the pathogenesis of Kaposi's sarcoma, Mol Pathol, 52(1):32-6, 1999.

205. Ottaiano A, Pisano C, De Chiara A, Barletta E, Ascierto AP, Botti G, Napolitano M, Apice G, Iaffaioli RV, Expression of CD40 has no predictive value in soft tissue sarcomas, Anticancer Res, 23(2B):1597-604, 2003.

206. Cooke PW, James ND, Ganesan R, Wallace M, Burton A, Young LS, CD40 expression in bladder cancer, J Pathol, 188(1):38-43, 1999.

207. Altenburg A, Baldus SE, Smola H, Pfister H, Hess S, CD40 ligand-CD40 interaction induces chemokines in cervical carcinoma cells in synergism with IFN-gamma, J Immunol, 162(7):4140-7, 1999.

208. Gallagher NJ, Eliopoulos AG, Agathangelo A, Oates J, Crocker J, Young LS, CD40 activation in epithelial ovarian carcinoma cells modulates growth, apoptosis, and cytokine secretion, Mol Pathol, 55(2):110-20, 2002.

209. Agathanggelou A, Niedobitek G, Chen R, Nicholls J, Yin W, Young LS, Expression of immune regulatory molecules in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinomas with prominent lymphoid stroma. Evidence for a functional interaction between epithelial tumor cells and infiltrating lymphoid cells, Am J Pathol, 147(4):1152-60, 1995.

210. Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lo P, Terry N, Reid PS, Ford RJ, A CD40 Signalosome anchored in lipid rafts leads to constitutive activation of NF-kappaB and autonomous cell growth in B cell lymphomas, Immunity, 16(1):37-50, 2002.

211. Challa A, Eliopoulos AG, Holder MJ, Burguete AS, Pound JD, Chamba A, Grafton G, Armitage RJ, Gregory CD, Martinez-Valdez H, Young L, Gordon J, Population depletion activates autonomous CD154-dependent survival in biopsylike Burkitt lymphoma cells, Blood, 99(9):3411-8, 2002.

212. Furman RR, Asgary Z, Mascarenhas JO, Liou HC, Schattner EJ, Modulation of NF-kappa B activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells, J Immunol, 164(4):2200-6, 2000.

213. Funakoshi S, Longo DL, Beckwith M, Conley DK, Tsarfaty G, Tsarfaty I, Armitage RJ, Fanslow WC, Spriggs MK, Murphy WJ,

Inhibition of human B-cell lymphoma growth by CD40 stimulation, Blood, 83(10):2787-94, 1994.

214. Planken EV, Dijkstra NH, Willemze R, Kluin-Nelemans JC, Proliferation of B cell malignancies in all stages of differentiation upon stimulation in the 'CD40 system', Leukemia, 10(3):488-93, 1996.

215. Lee HH, Dadgostar H, Cheng Q, Shu J, Cheng G, NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes, Proc Natl Acad Sci U S A, 96(16):9136-41, 1999.

216. Hennino A, Berard M, Krammer PH, Defrance T, FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis, J Exp Med, 193(4):447-58, 2001.

217. Wang D, Freeman GJ, Levine H, Ritz J, Robertson MJ, Role of the CD40 and CD95 (APO-1/Fas) antigens in the apoptosis of human B-cell malignancies, Br J Haematol, 97(2):409-17, 1997.

218. Chu P, Deforce D, Pedersen IM, Kim Y, Kitada S, Reed JC, Kipps TJ, Latent sensitivity to Fas-mediated apoptosis after CD40 ligation may explain activity of CD154 gene therapy in chronic lymphocytic leukemia, Proc Natl Acad Sci U S A, 99(6):3854-9, 2002.

219. Eliopoulos AG, Dawson CW, Mosialos G, Floettmann JE, Rowe M, Armitage RJ, Dawson J, Zapata JM, Kerr DJ, Wakelam MJ, Reed JC, Kieff E, Young LS, CD40-induced growth inhibition in epithelial cells is mimicked by Epstein-Barr Virus-encoded LMP1: involvement of TRAF3 as a common mediator, Oncogene, 13(10):2243-54, 1996.

220. Hirano A, Longo DL, Taub DD, Ferris DK, Young LS, Eliopoulos AG, Agathanggelou A, Cullen N, Macartney J, Fanslow WC, Murphy WJ, Inhibition of human breast carcinoma growth by a soluble recombinant human CD40 ligand, Blood, 93(9):2999-3007, 1999.

221. Tong AW, Papayoti MH, Netto G, Armstrong DT, Ordonez G, Lawson JM, Stone MJ, Growth-inhibitory effects of CD40 ligand (CD154) and its endogenous expression in human breast cancer, Clin Cancer Res, 7(3):691-703, 2001.

222. Ghamande S, Hylander BL, Oflazoglu E, Lele S, Fanslow W, Repasky EA, Recombinant CD40 ligand therapy has significant antitumor effects on CD40-positive ovarian tumor xenografts grown in SCID mice and demonstrates an augmented effect with cisplatin, Cancer Res, 61(20):7556-62, 2001.

223. Eliopoulos AG, Davies C, Knox PG, Gallagher NJ, Afford SC, Adams DH, Young LS, CD40 induces apoptosis in carcinoma cells through activation of cytotoxic ligands of the tumor necrosis factor superfamily, Mol Cell Biol, 20(15):5503-15, 2000.

224. Hess S, Engelmann H, A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells, J Exp Med, 183(1):159-67, 1996.

225. Afford SC, Randhawa S, Eliopoulos AG, Hubscher SG, Young LS, Adams DH, CD40 activation induces apoptosis in cultured human hepatocytes via induction of cell surface fas ligand expression and amplifies fas-mediated hepatocyte death during allograft rejection, J Exp Med, 189(2):441-6, 1999.

226. Grell M, Zimmermann G, Gottfried E, Chen CM, Grunwald U, Huang DC, Wu Lee, YH, Durkop H, Engelmann H, Scheurich P, Wajant H, Strasser A, Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF, EMBO J, 18(11):3034-43, 1999.

227. Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P, A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell, Nature, 393(6684):474-8, 1998.

228. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR, Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling, Nature, 393(6684):478-80, 1998.

229. Mackey MF, Gunn JR, Ting PP, Kikutani H, Dranoff G, Noelle RJ, Barth RJ Jr, Protective immunity induced by tumor vaccines requires interaction between CD40 and its ligand, CD154, Cancer Res, 57(13):2569-74, 1997.

230. van Mierlo GJ, den Boer AT, Medema JP, van der Voort EI, Fransen MF, Offringa R, Melief CJ, Toes RE, CD40 stimulation leads to effective therapy of CD40(-) tumors through induction of strong systemic cytotoxic T lymphocyte immunity, Proc Natl Acad Sci U S A, 99(8):5561-6, 2002.

231. Khanna R, Cooper L, Kienzle N, Moss DJ, Burrows SR, Khanna KK, Engagement of CD40 antigen with soluble CD40 ligand up-regulates peptide transporter expression and restores endogenous processing function in Burkitt's lymphoma cells, J Immunol, 159(12):5782-5, 1997.

232. Carbone E, Ruggiero G, Terrazzano G, Palomba C, Manzo C, Fontana S, Spits H, Karre K, Zappacosta S, A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction, J Exp Med, 185(12):2053-60, 1997.

233. Grossmann ME, Brown MP, Brenner MK, Antitumor responses induced by transgenic expression of CD40 ligand, Hum Gene Ther, 8(16):1935-43, 1997.

234. Kikuchi T, Crystal RG, Anti-tumor immunity induced by *in vivo* adenovirus vector-mediated expression of CD40 ligand in tumor cells, Hum Gene Ther, 10(8):1375-87, 1999.

235. Kikuchi T, Moore MA, Crystal RG, Dendritic cells modified to express CD40 ligand elicit therapeutic immunity against preexisting murine tumors, Blood, 96(1):91-9, 2000.

236. Sun Y, Peng D, Lecanda J, Schmitz V, Barajas M, Qian C, Prieto J, In vivo gene transfer of CD40 ligand into colon cancer cells induces local production of cytokines and chemokines, tumor eradication and protective antitumor immunity, Gene Ther, 7(17):1467-76, 2000.

237. Noguchi M, Imaizumi K, Kawabe T, Wakayama H, Horio Y, Sekido Y, Hara T, Hashimoto N, Takahashi M, Shimokata K, Hasegawa Y, Induction of antitumor immunity by transduction of CD40 ligand gene and interferon-gamma gene into lung cancer, Cancer Gene Ther, 8(6):421-9, 2001.

238. Vonderheide RH, Dutcher JP, Anderson JE, Eckhardt SG, Stephans KF, Razvillas B, Garl S, Butine MD, Perry VP, Armitage RJ, Ghalie R, Caron DA, Gribben JG, Phase I study of recombinant human CD40 ligand in cancer patients, J Clin Oncol, 19(13):3280-7, 2001.

239. Wierda WG, Cantwell MJ, Woods SJ, Rassenti LZ, Prussak CE, Kipps TJ, CD40-ligand (CD154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia, Blood, 96(9):2917-24, 2000.

240. Gurunathan S, Irvine KR, Wu CY, Cohen JI, Thomas E, Prussin C, Restifo NP, Seder RA, CD40 ligand/trimer DNA enhances both humoral and cellular immune responses and induces protective immunity to infectious and tumor challenge, J Immunol, 161(9):4563-71, 1998.

241. Zhang L, Tang Y, Akbulut H, Zelterman D, Linton PJ, Deisseroth AB, An adenoviral vector cancer vaccine that delivers a tumor-associated antigen/CD40-ligand fusion protein to dendritic cells, Proc Natl Acad Sci U S A, 100(25):15101-6, 2003.

242. Cignetti A, Vallario A, Follenzi A, Circosta P, Capaldi A, Gottardi D, Naldini L, Caligaris-Cappio F, Lentiviral transduction of primary myeloma cells with CD80 and CD154 generates antimyeloma effector T cells, Hum Gene Ther, 16(4):445-56, 2005.

243. Yurkovetsky ZR, Shurin GV, Barry DA, Schuh AC, Shurin MR, Robbins PD, Comparative analysis of antitumor activity of CD40L, RANKL, and 4-1BBL *in vivo* following intratumoral administration of viral vectors or transduced dendritic cells, J Gene Med, 8(2):129-37, 2006.

244. Loskog AS, Fransson ME, Totterman TT, AdCD40L gene therapy counteracts T regulatory cells and cures aggressive tumors in an orthotopic bladder cancer model, Clin Cancer Res, 11(24 Pt 1):8816-21, 2005.

245. Gillespie MT, Horwood NJ, Interleukin-18: perspectives on the newest interleukin, Cytokine Growth Factor Rev, 9(2):109-16, 1998.

246. Golab J, Interleukin 18--interferon gamma inducing factor--a novel player in tumour immunotherapy?, Cytokine, 12(4):332-8, 2000.

247. Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB, Interleukin-18, J Leukoc Biol, 73(2):213-24, 2003.

248. Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR, Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension, Gene, 77(1):61-8, 1989.

249. Chomczynski P, Sacchi N, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, Anal Biochem, 162(1):156-9, 1987.

250. Mullis KB, Faloona FA, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, Methods Enzymol, 155:335-50, 1987.

251. Brondyk B, pTargeT^{TM} Vector: A New Mammalian Expression T-Vector, Promega Notes Magazine, 58:2-6, 1996.

252. Esendağlı G, CD40 Ligand (CD154) Geninin Ökaryotik Ekspresyon Vektörüne Klonlanması, Temel İmmünoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2003.

253. Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ, Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells, J Virol, 4(5):549-53, 1969.

254. Bennett MJ, Aberle AM, Balasubramaniam RP, Malone JG, Malone RW, Nantz MH, Cationic lipid-mediated gene delivery to murine lung: correlation of lipid hydration with *in vivo* transfection activity, J Med Chem, 40(25):4069-78, 1997.

255. Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T, Suemoto Y, Okamoto I, Usui M, Ikeda M, Kurimoto M, IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12, J Immunol, 158(4):1541-50, 1997.

256. Scott JR, Regulation of plasmid replication, Microbiol Rev, 48(1):1-23, 1984.

257. Bullas LR, Ryu JI, *Salmonella typhimurium* LT2 strains which are r-m+ for all three chromosomally located systems of DNA restriction and modification, J Bacteriol, 156(1):471-4, 1983.

258. O'Callaghan D, Charbit A, High efficiency transformation of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* by electroporation, Mol Gen Genet, 223(1):156-8, 1990.

259. Sheppard M, Webb C, Heath F, Mallows V, Emilianus R, Maskell D, Mastroeni P, Dynamics of bacterial growth and distribution within the liver during *Salmonella* infection, Cell Microbiol, 5(9):593-600, 2003.

260. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, Molecular Cloning, 2. Baskı, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.

261. Gentschev I, Dietrich G, Spreng S, Kolb-Maurer A, Brinkmann V, Grode L, Hess J, Kaufmann SH, Goebel W, Recombinant attenuated bacteria for the delivery of subunit vaccines, Vaccine, 19(17-19):2621-8, 2001.

262. Bermudes D, Low B, Pawelek J, Tumor-targeted *Salmonella*. Highly selective delivery vectors, Adv Exp Med Biol, 465:57-63, 2000.

263. Garmory HS, Brown KA, Titball RW, DNA vaccines: improving expression of antigens, Genet Vaccines Ther, 1(1):2, 2003.

264. Bauer H, Darji A, Chakraborty T, Weiss S, *Salmonell*a-mediated oral DNA vaccination using stabilized eukaryotic expression plasmids, Gene Ther, 12(4):364-72, 2005.

265. Coulson NM, Fulop M, Titball RW, Effect of different plasmids on colonization of mouse tissues by the aromatic amino acid dependent *Salmonella typhimurium* SL 3261, Microb Pathog, 16(4):305-11, 1994.

266. Pereira CM, Guth BE, Sbrogio-Almeida ME, Castilho BA, Antibody response against *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin expressed as fusions to flagellin, Microbiology, 147(Pt 4):861-7, 2001.

267. Yrlid U, Wick MJ, *Salmonella*-induced apoptosis of infected macrophages results in presentation of a bacteria-encoded antigen after uptake by bystander dendritic cells, J Exp Med, 191(4):613-24, 2000.

268. Monack DM, Navarre WW, Falkow S, *Salmonella*-induced macrophage death: the role of caspase-1 in death and inflammation, Microbes Infect, 3(14-15):1201-12, 2001.

269. Knodler LA, Finlay BB, *Salmonella* and apoptosis: to live or let die?, Microbes Infect, 3(14-15):1321-6, 2001.

270. Jesenberger V, Procyk KJ, Yuan J, Reipert S, Baccarini M, *Salmonella*-induced caspase-2 activation in macrophages: a novel mechanism in pathogen-mediated apoptosis, J Exp Med, 192(7):1035-46, 2000.

271. van der Velden AW, Lindgren SW, Worley MJ, Heffron F, *Salmonella pathogenicity island 1*-independent induction of apoptosis in infected

macrophages by *Salmonella enterica serotype typhimurium*, Infect Immun, 68(10):5702-9, 2000.

272. Monack DM, Detweiler CS, Falkow S, *Salmonella pathogenicity island 2*-dependent macrophage death is mediated in part by the host cysteine protease caspase-1, Cell Microbiol, 3(12):825-37, 2001.

273. Qin L, Ding Y, Pahud DR, Chang E, Imperiale MJ, Bromberg JS, Promoter attenuation in gene therapy: interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression, Hum Gene Ther, 8(17):2019-29, 1997.

274. Harms JS, Oliveira SC, Splitter GA, Regulation of transgene expression in genetic immunization, Braz J Med Biol Res, 32(2):155-62, 1999.

275. Garmory HS, Titball RW, Brown KA, Bennett AM, Construction and evaluation of a eukaryotic expression plasmid for stable delivery using attenuated *Salmonella*, Microb Pathog, 34(3):115-9, 2003.

EKLER

EK 1. Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Kararı

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU

Hacettepe 06100, ANKARA

Sayı : B.30.2.HAC.0.01.00.05/ 57 22.08.2001

DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 22.08.2001
TOPLANTI NO : 2001/12
DOSYA NO : 2001/50
KARAR NO : 2001/50-1

Fakültemiz İç Hastalıkları Anabilim Dalı Onkoloji Ünitesi öğretim üyelerinden Doç.Dr. Dicle Güç'ün araştırma yürütücüsü olduğu, Prof.Dr. M. Oğuz Güç, Yrd.Doç.DR. Ayşen Özcan ile Dr. Didem Bek'in ortak çalışmaları olan ***"B Lenfoma'da Attenüe Salmonella Typhimurium ile Oral CD40 ve IL-18 Kombine Gen Tedavisi"*** konulu laboratuvar araştırma protokolü başlıklı çalışma Hayvan Etik Kurulu'nda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışma Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne uygun bulunarak onaylanmasına katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Atilla Dağdeviren (Başkan)

Prof. Dr. Sevim Dalkara (Üye)

Prof. Dr. Saime Şahin (Üye)

Doç. Dr. Hakan Orer (Üye)

KATILMADI
Doç.Dr. Tunç Şafak (Üye)

Doç.Dr. Erdem Aydın (Üye)

Doç.Dr. Sema Çalış (Üye)

KATILMADI
Doç.Dr. Ömer Gürduysus (Üye)

Yrd.Doç.Dr. Mehmet Ali Onur (Üye)

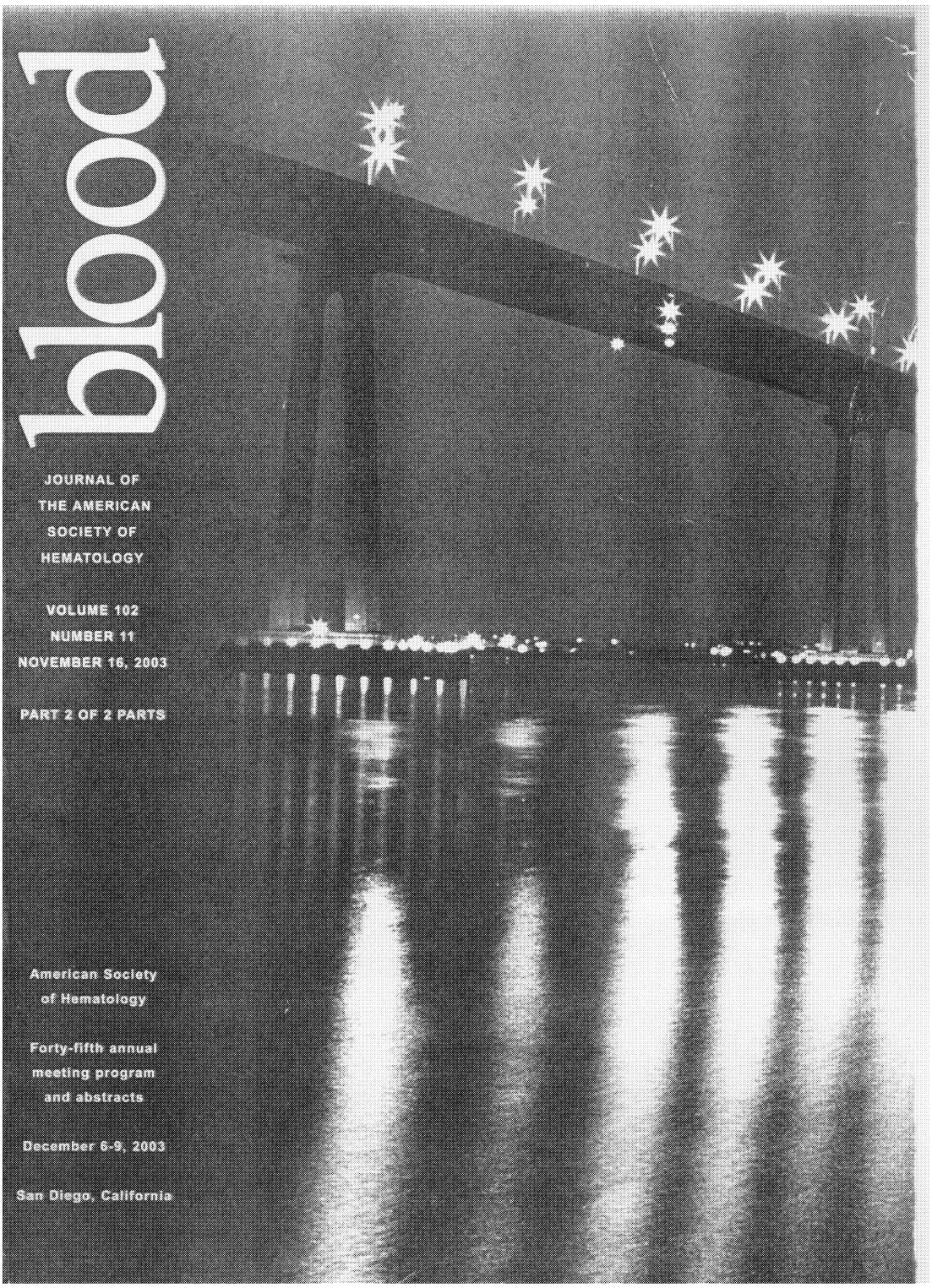
Vet. Hekim Ilyas Onbaşılar (Üye)

Avukat Oya Soyuer (Üye)

Tel : (312) 305 10 82 Fax : (312) 310 05 80

EK 2. Bildiri Özetleri

1. **Bek D**, Esendagli G, Gunel-Ozcan A, Guc D, Guc MO, Kansu E, pTARGET Vector Carrying IL-18 or CD40L Gene for Attenuated *Salmonella typhimurium* Mediated Gene Therapy**,** Blood, 2003, 102(11):5695.
2. **Bek D**, Esendağlı G, Günel-Özcan A, Güç MO, Güç D, İnterlökin-18 Geninin Gen Tedavisinde Kullanılmak Üzere pTARGET Memeli Ekspresyon Vektörüne Klonlanması, XVII. Ulusal İmmünoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 8-11.Ekim.2003, Sözlü Bildiri, S:12, s:196-197.
3. **Bek D**, Günel-Özcan A, Esendağlı G, Güç MO, Güç D, Fare IL-18 ve CD40L Genlerinin Deneysel Gen Tedavisinde Kullanılmak Üzere Memeli Ekspresyon Vektörüne Klonlanması, VI. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, 21-24.Nisan.2004, Poster, MP22, s:95.
4. **Bek D**, Günel-Özcan A, Esendağlı G, Güç MO, Güç D, Cloning of Murine IL-18 or CD40L Genes into Mammalian Expression Vector for Attenuated *Salmonella Typhimurium* Mediated Gene Therapy, 4th Balkan Congress of Immunology, 5-8.Eylül.2004, Sözlü Bildiri, Turk J Immunol, 9-2 Supplement 2004:99.
5. **Aydın D**, Günel-Özcan A, Menager N, Esendağlı G, Güç MO, Güç D, Fare IL-18 veya CD40L Genlerini Taşıyan *Salmonella typhimurium aroB* Mutantlarının Gen tedavisi Vektörü Olarak Değerlendirilmesi, Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu (Uluslararası Katılımlı), 12-15.Mart.2006, Poster.
6. **Aydın D**, Günel-Özcan A, Menager N, Esendağlı G, Güç MO, Hayran M, Kansu E, Güç D, *Salmonella typhimurium aroB* Encoding Murine IL-18 or CD40L: Evaluation for Gene Therapy, 31st FEBS Congress, 24-29.Haziran.2006, Özet no: 876, Sözel bildiri olarak kabul edilmiştir, FEBS Journal' da yayınlanacaktır.


blood
JOURNAL OF
THE AMERICAN
SOCIETY OF
HEMATOLOGY
VOLUME 102
NUMBER 11
NOVEMBER 16, 2003
PART 2 OF 2 PARTS
American Society
of Hematology
Forty-fifth annual
meeting program
and abstracts
December 6-9, 2003
San Diego, California

Abstract# 5692

High Dose Therapy/ASCT Consolidated by Rituximab and or Interferon Immunotherapy for Relapsed Follicular Lymphoma Achieves Durable Molecular Remissions and Improved Progression Free Survival. Rena Buckstein,[2] J.J. Mangel,[1] K. Imrie,[1] D. Spaner*,[1] G. Piliotis,[1] M. Crump,[2] N. Pennell*,[1] A. Boudreau*,[1] M. Reis,[1] J. Robinson*,[1] R. Romans*,[1] T. Nagy*,[1] P. Richardson*,[1] N. Berinstein.[1] [1]*Medical Oncology/Hematology, Toronto Sunnybrook Regional Cancer Center;* [2]*Princess Margaret Hospital, Toronto, Canada.*

Since April 1997,56 patients with higher risk relapsed but chemosensitive FL have been enrolled on 1/3 consecutive phase II prospective clinical trials of autologous stem cell transplant(ASCT) consolidated with immunotherapy in the form of: A alpha interferon 3MU/m^2 tiw for 2 years post ASCT **(IFN)** (n=14); B 4 weekly courses at 2 and 6 months post ASCT **(Ritux)** (n=23) or C rituximab x 6 weekly infusions commencing 3-4 months post ASCT primed with alpha interferon 3MU/m^2 tiw and continued for 2 years **(Ritux-IFN)**(n=13). In vivo purging with rituximab 375 mg /m2 occurred in trials **B** (single infusion) and **C** (3 infusions+chemo) prior to stem cell collection. Salvage chemotherapy was primarily either DHAP or CHOP(median of 5-6 cycles) and patients had to achieve a minimum of 75% reduction in tumor bulk to be eligible for CBV conditioning and transplant. All studies had identical inclusion criteria and patients had similar baseline characteristics. Molecular detection by PCR of minimal residual disease (MRD) in blood, stem cells and bone marrow has been performed serially in all patients with detectable disease in baseline samples (n=25). **Results**: 56 patients have been enrolled and 50 transplanted. 6 patients were not transplanted because of: insufficient stem cells(2), cardiac toxicity(2), pt. refusal (1) or disease progression(1).The median age was 45 yrs. Patients enrolled were higher risk and moderately pre-treated. Patients were assessed and transplanted a median of 2.2 and 2.9 yrs from diagnosis respectively. With a median time to death or last follow up of 3.3 years overall, 7 patients have died (5 relapsed or transformed disease, 1 peri-transplant sepsis and 1 unknown cause). There have been 19 relapses **(see table for breakdown by study)**. **Toxicities:** Rituximab treated cohorts(**B+C**) had prolonged suppression of immunoglobulins post transplant with 25% patients developing bacterial pneumonia compared with 8% in cohort **A**. Interstitial pneumonitis responsive to prednisone was seen in 33% of **B+C** patients compared with 7% of **A** patients and hemolytic uremic syndrome was seen in 2 patients (**B+C**). Molecular detection of t(14;18) in stem cells by quantitative PCR was significantly improved by in-vivo purging with rituximab. Molecular remissions in marrow and blood post ASCT were achieved at some point in most patients, although molecular relapses were seen in 6/10 **(A)** and 1/9 **(B)** patients by 24 months post ASCT. MRD detection in marrow and blood immediately preceded clinical relapse in 8/10 patients. Median time to relapse or last follow-up is 3.4 yrs (+/-1.8) for study **A**, and 3.8 yrs (+/- 1.2 for study **B** (p=NS). **Conclusions**: In a series of phase II non-randomized clinical trials, high rates of clinical and molecular remissions are achievable in patients with relapsed chemosensitive FL treated with high dose therapy/ASCT and post transplant immunotherapy. Combining Rituximab with chemotherapy pre stem cell collection improves stem cell graft purging, and post-ASCT Rituximab achieves durable molecular remissions. The impact of rituximab (monotherapy or combined with IFN) on prolonging RFS/OS will require longer f/up and ultimately, a phase III randomized trial.

Trial	# patients	#relapses	#deaths	time to relapse/F'up(yrs)	time to death/F'up(yrs)	#lymphoma cells/ 1000 cells(graft)
A	14	9	4	3.4	5.5	5.9
B	23	9	3	3.8	4.1	0.07
C	13	1	0	1.2	1.4	0.0
Total	50	19	7	2.7	3.3	-

Abstract# 5693

Reciprocal Immunologic Tolerance of Allogenic Bone Marrow Transplantation Established by KIR and MHC I Gene Transfer. Kunyuan Guo*, L.X. Wu*. (Intr. by Huo Tan) *Dpartment of Hematology, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou, Guangdong, China.*

To observe the effect on graft rejection and GVHD in C_BL/6^{H-2b} to BALB/c^{H-2d} grafting model by transformer H-2D^d and Ly49A gene from receipt BALB/c^{H-2d} to bone marrow and spleen cells of donor C57BL/6^{H-2b}. In the animal model, the MST of transplanted mice with Ly49A single gene transfer group, H-2D^d single gene transfer group and Ly49A combined H-2D^d double gene transfer group were lengthened. The mice of the gene transfer had a better condition on spirit, activity, weight loss and the reduction of peripheral white blood cells. At the14th day after transplantation, the IL-2 level of H-2D^d transfer group and Ly49A+H-2D^d transfer group were lower than the control groups. The pathological observation and chimera detection of bone marrow cell made a confirmation that the gene transfer might prevent the GVHD and rejection to some extent.The genes of KIR and MHC I from receipt transferred into donor's hematopoietic immunocyte could artificially establish bidirectional inhibitive signal between donor and receipt. At the same time, the hematopoietic function of gene-transferred cells is not affected and their anti-tumor function remains. This method might build the reciprocal immunologic tolerance similar to physiological condition.

Abstract# 5694

Restriction of EGFP Expression to B-Lymphoid Progeny from Human CD34$^+$ Cells Using a Lentiviral Vector with Sequences Derived from the Human CD19 Promoter. Thomas Moreau*,[1] Florence Bardin*,[1] Jean Imbert*,[2] Christian Chabannon,[1] Cecile Tonnelle*,[1] [1]*Centre de Therapie Cellulaire et Genique, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France;* [2]*U119, Inserm, Marseille, France.*

The use of lentiviral rather than onco-retroviral vectors resulted in a significant improvement in the transduction of quiescent cells, especially of human hematopoietic stem cells. In addition, lentiviral vectors may prove to be superior when it comes to the control of transgene expression in the progeny of transduced progenitors. Several recent reports describe the use of lineage specific promoters; restriction of transgene expression to the B-cell lineage has not been reported so far. We designed new lentiviral vectors from the pTRIP backbone (Dr. Charneau, Institut Pasteur, Paris). Three different sequences derived from the human CD19 gene promoter were inserted in the place of the EF1α ubiquitous promoter, upstream of the GFP gene, in three different constructions: the S.CD19 and L.CD19 sequences are 229 and 1274 base pairs respectively, derived from the region immediately upstream of the CD19 gene translation start site; the M.CD19 fragment is a composite sequence of 464 base pairs juxtaposing two separate regions of the native CD19 promoter. When compared to the "parental" EF1α vector, these three lentiviral vectors allow for efficient transduction of a variety of hematopoietic and non-hematopoietic cell lines, as demonstrated by semi-quantitative genomic PCR. All three CD19 sequences generate high level GFP expression in cell lines of B-cell origin, but only at background level in T-lymphoid, myelo-monocytic, epithelial or endothelial cell lines; a low level of GFP expression was observed in progenitor or erythro-leukemic cell lines. GFP expression was weak in human primary T-cells and in cord blood CD34$^+$ cells transduced with the S.CD19, M.CD19 or L.CD19-GFP vectors (3 to 9% GFP$^+$ cells), although the transduction efficiency was comparable to control cells transduced with the EF1α-GFP vector (37 to 79% GFP$^+$ cells). The progeny of transduced CD34+ cells was evaluated for GFP expression. In clonogenic assays, BFU-E or CFU-GM did not express GFP, whichever the CD19 promoter. Moreover, erythroblasts obtained in liquid cultures did not express GFP. Following co-culture with the MS-5 murine stromal cell line, expression of GFP was not observed in NK (CD56$^+$) nor myeloid (CD33$^+$) cells (1 to 6% GFP$^+$ cells), when the transgene was under control of any CD19 promoter sequences. However, GFP expression was easily detected in B-cells (CD19$^+$) derived from CD34$^+$ cells transduced with the M.CD19 or L.CD19-GFP vectors (43 and 36% GFP$^+$ cells respectively); in contrast, no expression was detected when the S.CD19 sequence was used. Finally, transduced CD34$^+$ progenitors were subjected to *in vivo* differentiation in the NOD-SCID murine xenograft model. Flow cytometry analysis of the B-lymphoid (CD19$^+$) and human myeloid (CD33$^+$) compartments showed that GFP expression was higher in B-cells than in myeloid cells derived from CD34$^+$ cells transduced with the M.CD19 or L.CD19-GFP vectors (79 and 68% vs 25 and 9% GFP$^+$ cells respectively); differentiated cells obtained from progenitors transduced with the S.CD19-GFP vector weakly and non specifically expressed GFP. Our data suggest that sequences derived from the human CD19 gene promoter confer B-cell specificity for GFP expression to the progeny of human CD34$^+$ transduced cells in the context of a lentiviral vector. Such lineage specific vector provides an important tool for exploration of molecular mechanisms involved in B-lymphoid population commitment and maintenance, as well as for clinical research to treat B-lymphoid disorders.

Abstract# 5695

pTARGET Vector Carrying IL-18 or CD40L Genes for Attenuated *Salmonella typhimurium* Mediated Gene Therapy. Didem Bek*,[1] Gunes Esendagli*,[1] Aysen Gunel-Ozcan*,[2] Dicle Guc*,[1] Mustafa Oguz Guc*,[3] Emin Kansu.[1] [1]*Department of Basic Oncology, Hacettepe University, Institute of Oncology, Ankara, Turkey;* [2]*Department of Medical Biology and Genetics, Kirikkale University, School of Medicine, Kirikkale, Turkey;* [3]*Department of Pharmacology, Hacettepe University, School of Medicine, Ankara, Turkey.*

In our study IL-18 and CD40L were cloned into a mammalian expression vector (pTARGET, Promega) in order to assess the effects of the combined IL-18 and CD40L in the experimental B cell lymphoma in BALB/c mice. IL-18 is an effective antitumour cytokine. CD40L is a T cell surface molecule enhancing expression of costimulatory molecules. The total RNA isolation for IL-18 was performed from adherent or nonadherent mouse peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) upon exposure to 2 μg/ml Lipopolysaccharide (LPS) for 2hr. Meanwhile, the total RNA for CD40L was isolated from mouse splenocytes by either 5 hr stimulation with 1 μg/ml LPS and 1 μg/ml Phytohemagglutinin-L or 2 hr stimulation with 2 ng/ml Phorbol 12-Myristate 13-acetate and 0.1μg/ml Ionomycin. Both IL-18 and CD40L were amplified from corresponding total cDNAs using Taq polymerase. However, to obtain secreted form of IL-18 gene product further amplification was carried out. The precursor of the IL-18 requires processing by IL-1 converting enzyme. Therefore, we constructed a hybrid molecule composed of a mouse IFN-β signal sequence and a mature mouse IL-18 sequence by overlap extension method to enable IL-18 secretion without IL-1 converting enzyme. Obtained mCD40L and hybrid mIL-18 PCR products were cloned into pTARGET mammalian expression vector by T-A cloning method. pIL-18 was transfected into NIH3T3 mouse fibroblasts by using TransFast Transfection Reagent (Promega). Stable transfectants were incubated with murine PBMCs for 48 hours to propagate IFNγ expression by the secreted IL-18. Then the culture supernatants were checked by Quantikine M Mouse IFNγ ELISA kit (R&D Systems) for the secretion of IFNγ. Preliminary result shows that transfection of pIL-18 into NIH3T3 was successful and the transfectants increase IFNγ secretion from PBMCs. Following the confirmation of CD40L expression by flow cytometric analysis of the induced co-stimulatory molecules by CD40L, we aim to transfer the recombinant genes to nonvirulent *Salmonella typhimurium aroB* mutant strain in order to assess the effect of the oral treatment with *S. typhimurium aroB* containing recombinant CD40L and/or IL-18 genes on the B cell lymphoma of BALB/c mice.


EGE ÜNİVERSİTESİ
1955
1974
XVII. ULUSAL
İMMÜNOLOJİ KONGRESİ
(Uluslararası Katılımlı)
8-11 Ekim 2003
Kuşadası - Pine Bay Hotel
Program ve Özet Kitabı

İNTERLÖKİN-18 GENİNİN GEN TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE pTARGET MEMELİ EKSPRESYON VEKTÖRÜNE KLONLANMASI

Didem Bek1, Güneş Esendağlı1, Ayşen Günel-Özcan2, Mustafa Oğuz Güç3, Dicle Güç1
1Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Ankara; 2Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Kırıkkale; 3Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara

İnterlökin-18 (IL-18) yapısal olarak IL-1'e, işlevsel olarak ise IL-12'ye benzeyen, etkin antitümör aktivitesi gösterilmiş bir sitokindir. Bu çalışmada amacımız; fare IL-18 genini, tümörlere karşı gen tedavisinde kullanılmak üzere memeli ekspresyon vektörüne klonlamaktır. Öncelikle Balb/c fare periferik kanından mononükleer hücreler elde edildi. Hücrelerin 2 µg/ml Lipopolisakkarid varlığında, standart koşullarda kültürü yapıldı. İkinci saat sonunda yapışan ve yapışmayan mononükleer hücrelerden Trizol (Sigma) yöntemiyle total hücresel RNA izole edildi. Elde edilen total hücresel RNA'lardan Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) yöntemiyle, komplementer-DNA (cDNA) sentez kiti (Fermentas) kullanılarak cDNA elde edildi. Öncül IL-18 proteininin sinyal sekansı yoktur, bu nedenle salıverilmesi ve tam biyolojik aktivitesini gösterebilmesi için ICE (IL-1β Converting Enzyme) tarafından işlenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda biyoaktif IL-18 elde edebilmek amacıyla; fare IFNβ sinyal sekansı ile fare olgun IL-18 sekansı, cDNA'lardan uygun primerler varlığında PZR ile amplifiye edildi ve "overlap extension" yöntemi ile iki sekansın komplementer bölgelerinden birleşmesi sağlanarak sinyal sekansı içeren IL-18 hibrid DNA'sı oluşturuldu. Hibrid DNA, pTARGET memeli ekspresyon vektörüne (Promega) T-A klonlama yöntemiyle klonlandı. Ligasyon reaksiyonu 5:1 insert:vektör DNA oranı kullanılarak yapıldı. Ligasyon reaksiyonu sonucu elde edilen plasmid ürün JM109 kompetan hücrelerine ısı şoku transformasyonu ile aktarıldı. Hücreler X-Gal, IPTG ve ampisilin içeren LB-agar petrilerine yayılarak, vektörün LacZ gen aktivitesi sayesinde mavi-beyaz koloni seçimi yapıldı. İnsert DNA'yı taşıması muhtemel beyaz kolonilerden plazmid DNA izolasyon kiti (Promega) kullanılarak plazmid DNA izole edildi. EcoRI restriksiyon enzim analiziyle insert taşıyan koloniler belirlendi. M13 forward primeri

(Invitrogen) kullanılarak "ABI Prism 310 Genetic Analyzer" da otomatik sekans analizi yapılarak insert yönü ve hibrid IL-18 DNA sekansı doğrulandı. Bundan sonra, elde ettiğimiz IL-18 genini taşıyan pTARGET memeli ekspresyon vektörünün hücre transfeksiyon çalışmalarını yapmayı planlamaktayız. Daha ileri aşamada hedefimiz; elde ettiğimiz rekombinant IL-18 DNA'sını Salmonella Typhimirium AroB mutant suşuna aktararak deneysel fare B-lenfoma modelinde oral gen tedavisi etkinliğini araştırmaktır. (Bu çalışma TÜBİTAK tarafından SBAG-2493 numaralı proje kapsamında desteklenmektedir.)

VI. ULUSAL PRENATAL TANI VE TIBBİ GENETİK KONGRESİ

BİLDİRİ KİTABI

21-24 Nisan 2004
Sun Zeynep Hotel / Belek-Antalya

GATA Tıbbi Biyoloji AD & Tıbbi Genetik BD
Tıbbi Genetik Derneği

MP 21
FVL, PT20210G>A VE MTHFR677C>T MUTASYONLARININ KALITSAL TROMBOFİLİ VE GEBELİKTEKİ ÖNEMİ

B.DÖLEK 1,2 , S.ERASLAN 1, S.EROĞLU 1, B.KESİM 1,3, Y.LALELİ 1, N. GÖZÜKIRMIZI 2

İstanbul Üniversitesi ,Fen Bilimleri Enst., Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü. Düzen Laboratuvarı Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi , İSTANBUL

Trombofili, bir çok genetik ve/veya edinsel faktörün etkisi ile tromboza eğilimi arttıran patolojik bir süreçtir. Son yıllarda, tromboz patogenezi üzerinde yapılan çalışmalar, proteinC, proteinS, antitrombinIII, faktör V (faktör V Leiden), protrombin (PT20210G>A) ve MTHFR (MTHFR677C>T) genlerindeki polimorfizmlerin trombofilinin önemli kalıtsal nedenlerinden olduğunu bildirmektedir. Bu çalışmanın amacı, FVL, PT20210G>A ve MTHFR677C>T nokta mutasyonlarının tromboz ve gebelik komplikasyonları ile ilişkisini ortaya koymaktır. Genel tromboemboli grubu, Düzen laboratuarlar Grubu Genetik Hastalıklar ve Tanı Merkezi'ne klinik olarak tromboz ön tanısı ile başvuran ve aralarında akrabalık bağı bulunmayan 270 hasta birey ve 50 sağlıklı bireyden oluşturuldu. FVL, PT20210G>A ve MTHFR677C>T mutasyon analizi polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), restriksiyon enzim analizi (REA) ve tek zincir konformasyon analizi (SSCA) teknikleri uygulanarak gerçekleştirildi. Genel tromboemboli hasta grubunda FVL mutasyonu 76 bireyde (%28.15) ve kontrol grubunda 2 bireyde (%4) (p=0.0004, O.R.=9.40, %95 C.I.) belirlendi. PT20210G>A mutasyonu hasta grubunda 23 birey (% 8.52) ve kontrol grubunda 1 bireyde (%2) (p=0.03, O.R.=4.56, % 95 C.I.) tespit edildi. MTHFR677C>T mutasyonu için 132 hasta (%48.89) ve 18 (%36) (p=0.12, O.R.=1.70, %95 C.I.) kontrol birey pozitif bulundu. Veriler genel tromboemboli grubunda yeralan ve gebelik döneminde tromboz oluşumuna bağlı olduğu düşünülen ölü doğum, tekrarlı düşük hikayesi bulunan 60 kadın ile gebelik sürecini problemsiz tamamlamış 20 kadından oluşan kontrol grubunda ayrıca değerlendirildi. Buna göre, FVL mutasyonu 13 hasta bireyde (%21.67) (p=0.01) ve PT20210G>A mutasyonu hasta grubunda 3 bireyde (%5) (p=0.04) bulunurken, her iki mutasyon için kontrol grubunda pozitif birey yoktu. MTHFR677C>T 31 hasta (%51.67) ve 7 (% 35) (p=0.09) bireyde tespit edildi.Çalışmamızda istatistiksel analizler sonucuna göre, FVL mutasyonunun tromboemboli ve gebelik süresince dikkate değer bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir. Geniş prospektif seri çalışmaların yapılması, multigenik ve multifaktöriyel bir durum olan tromboz patogenezinin aydınlatılmasının yanısıra erken tanı ve tedavi için de önem taşımaktadır.

MP 22
FARE IL-18 ve CD40L GENLERİNİN DENEYSEL GEN TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE MEMELİ EKSPRESYON VEKTÖRÜNE KLONLANMASI

D.BEK 1, A.GÜNEL-ÖZCAN 2, G. ESENDAĞLI 1, M. O. GÜÇ 3, D.GÜÇ 1

1Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD, ANKARA;
2Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD KIRIKKALE
3Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD, ANKARA

IL-18 etkin antitümör aktivitesi gösterilmiş bir sitokindir. CD40L ise hücresel ve hümoral immünitede önemli rol oynayan bir kostimülatuar moleküldür. Bu çalışmada, deneysel fare B-lenfoma modelinde kombine gen tedavisi etkinliklerini araştırmak üzere IL-18 ve CD40L genleri pTARGET (Promega) vektörüne klonlanmıştır. IL-18 fare periferik kan mononükleer hücrelerinden 2 µg/ml LPS stimülasyonu sonrası 2. saat, CD40L için ise fare splenositlerinden 1 µg/ml LPS ve 1 µg/ml Fitohemaglutinin-L stimülasyonu sonrası 5. saat veya 2 ng/ml

Forbol 12-Miristat 13-Asetat ve 0.1 µg/ml İyonomisin stimülasyonu sonrası 2. saat total RNA izolasyonu ve RT-PZR ile cDNA sentezi yapıldı. Biyoaktif IL-18 elde edebilmek amacıyla; fare IFNβ sinyal sekansı içeren IL-18 hibrid DNA'sı cDNA' dan uygun primerler varlığında, "Overlap extension" PZR yöntemi ile amplifiye edildi. CD40L DNA'sı da PZR ile amplifiye edildi. Elde edilen hibrid IL-18 ve CD40L PZR ürünleri pTARGET memeli ekspresyon vektörüne klonlandı. Rekombinant IL-18 DNA'sı TransFast Transfection Reagent (Promega) kullanılarak NIH/3T3 fare fibroblastlarına transfekte edildi. Stabil transfektanların salgıladıkları IL-18'i içeren hücre kültür sıvısında, anti-CD3 monoklonal antikoru (mAb) ile aktive edilen fare splenositlerinin kültürü yapıldı. Kültür süpernatanında yapılan ELISA sonucunda, IL-18 aktarılmayan kontrol grubu splenositlerinin süpernatanına oranla daha yüksek IFNγ sekresyonu saptandı. Böylece elde edilen rekombinant IL-18'in fonksiyonel olduğu gösterilmiş oldu. Deneysel fare B-lenfoma modelinde oral gen tedavisi etkinliğini araştırmak amacıyla rekombinant IL-18 DNA'sı *Salmonella typhimirium aroB* mutant suşuna aktarıldı. Rekombinant CD40L DNA'sı ile transfeksiyon deneyleri halen devam etmektedir. Daha ileri aşamada hedefimiz; CD40L DNA'larının da deneysel fare B-lenfoma modelinde IL-18 ile birlikte kombine gen tedavisi etkinliklerini araştırmaktır. (Bu çalışma TÜBİTAK tarafından SBAG-2493 numaralı proje kapsamında desteklenmektedir.)

MP 23
HL-60 HÜCRELERİNDE SEÇİCİ COX II İNHİBİSYONU İLE İNDÜKLENEN TERMİNAL MATÜRASYON VE TELOMERAZ AKTİVİTESİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

A.KAYA 1, T.TUNCALI 2

1 Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü ,
2 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD , ANKARA

İnsanda telomeraz, çekirdekte ifadesi olan bir hücresel reverse transkriptazdır (hTERT). Ribonükleoprotein enzim kompleksi olarak telomer DNA'sının sentezini katalizler. Bu enzim, çoğu malign tümörde aktifken normal somatik hücrelerde genellikle inaktif olması nedeniyle tümörogenez ve immortalizasyondaki rolü nedeniyle bir çok çalışmaya konu olmuştur. Seçici siklooksijenaz II (COX II) enzim inhibitörleri son yıllarda malign tümörlerde çoğalmayı baskılayıcı etkileri nedeniyle dikkat çekmektedir. Bu çalışmada bu etkinin hematopoietik tümör hücrelerinde aynı yöndeki olası etkisinin ve bu etkinin telomeraz aktivitesi ile ilişkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Akut promyelositik lösemi hücre eş soyu olan HL-60 hücrelerinin retinoik asit ile terminal matürasyona indüklendiği yani diferansiye oldukları ve çoğalmalarının baskılandığı bilinmektedir. Araştırma, in vitro koşullarda, ATRA (all trans retinoic acid) etkisi altında doza ve inkübasyon süresine bağlı olarak monositer seri hücrelerine diferansiye olduğu saptanan HL-60 hücrelerinde seçici bir COX II inhibitörünün (NS-398) proliferasyon ve diferansiyasyon özellikleri ile telomeraz aktivitesindeki değişiklikleri incelemektedir.

TURKISH JOURNAL *of* IMMUNOLOGY

The Official Journal of the Turkish Society of Immunology

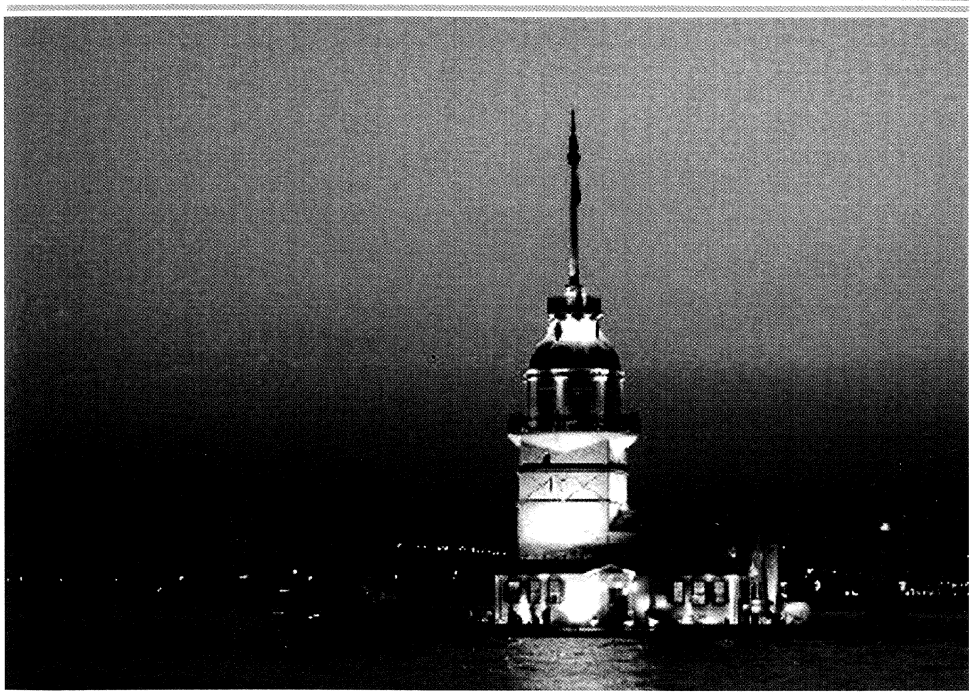
1974

Volume 9, Number 2,
Supplement (4th Balkan Congress of Immunology-Abstract Book), 2004

4th BALKAN CONGRESS of IMMUNOLOGY

BAIS 2004 İSTANBUL

5-8 September, 2004
Abstract Book



Turkish Society of Immunology

Cloning of Murine IL-18 or CD40L Genes into Mammalian Expression Vector for Attenuated *Salmonella Typhimurium* Mediated Gene Therapy

D. BEK[1], A. GÜNEL-ÖZCAN[2], G. ESENDAĞLI[1], M.O. GÜÇ[3], D. GÜÇ[1]
[1]*Department of Basic Oncology, Hacettepe University, Institute of Oncology, Ankara, TURKEY,*
[2]*Department of Medical Biology and Genetics, Kirikkale University, School of Medicine, Kirikkale, TURKEY,*
[3] *Department of Pharmacology, Hacettepe University, School of Medicine, Ankara, TURKEY*
Turk J Immunol, 9-2 Supplement 2004

In our study IL-18 and CD40L were cloned into a mammalian expression vector (pTARGET, Promega) in order to assess the effects of the combined IL-18 and CD40L in the experimental B cell lymphoma in BALB/c mice. IL-18 is an effective antitumor cytokine. CD40L is a T cell surface molecule enhancing expression of costimulatory molecules. The total RNA isolation for IL-18 was performed from adherent or nonadherent mouse peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) upon exposure to 2 g/ml Lipopolysaccharide (LPS) for 2hr. Meanwhile, the total RNA for CD40L was isolated from mouse splenocytes by either 5 hr stimulation with 1 μg/ml LPS and 1 g/ml Phytohemagglutinin-L or 2 hr stimulation with 2 ng/ml Phorbol 12-Myristate 13-acetate and 0.1μg/ml Ionomycin. Both IL-18 and CD40L were amplified from corresponding total cDNAs using Taq polymerase. However, to obtain secreted form of IL-18 gene product further amplification was carried out. The precursor of the IL-18 requires processing by IL-1 converting enzyme. Therefore, we constructed a hybrid molecule composed of a mouse IFN-γ signal sequence and a mature mouse IL-18 sequence by overlap extension method to enable IL-18 secretion without IL-1 converting enzyme. Obtained mCD40L and hybrid mIL-18 PCR products were cloned into pTARGET mammalian expression vector by T-A cloning method. pIL-18 was transfected into NIH3T3 mouse fibroblasts by using TransFast Transfection Reagent (Promega). Anti-CD3 monoclonal antibody activated murine splenocytes were incubated in culture supernatants of stable transfectants to propagate IFN-γ expression by the secreted IL-18. Then the culture supernatants were checked by Quantikine M Mouse IFN-γ ELISA kit (RD Systems) for the secretion of IFN-γ. It was shown that the transfection of pIL-18 into NIH3T3 cells was successful and the transfectants increase IFN-γ secretion from splenocytes. Following the confirmation of CD40L expression by flow cytometric analysis of the induced co-stimulatory molecules on A20 B Lymphoma cells by CD40L, we aim to transfer the recombinant genes to nonvirulent Salmonella typhimurium aroB mutant strain in order to assess the effect of the oral treatment with S. typhimurium aroB containing recombinant CD40L and/or IL-18 genes on the B cell lymphoma of BALB/c mice.

A Rat Thymic Nurse Cell Line Mediates The Expansion of Thymocytes With Suppressive Activity *In Vitro*

D. VUCEVIC, D. VUCICEVIC, S. VASILIJIC, S. GASIC, I. MAJSTOROVIC, M. COLIC
Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Belgrade, SERBIA and MONTENEGRO
Turk J Immunol, 9-2 Supplement 2004

Regulatory cells (TR) have been shown to develop in the thymus but the signals that are responsible for their generation are incompletely defined. Accumulated findings indicate that the thymic development of TR cells requires interactions with cortical thymic epithelial cells (cTEC). In our previous studies we have established and characterized a rat cTEC line (R-TNC.1) with nursing activity. In this work we demonstrated that R-TNC.1 cells support differentiation of thymocytes with


MULTİDİSİPLİNER
KANSER
ARAŞTIRMA
SEMPOZYUMU
(ULUSLAR ARASI KATILIMLI)
12 - 15 Mart 2006
Grand Yazıcı Otel, ULUDAĞ
ÖZET KİTABI

P17

FARE IL-18 VEYA CD40L GENLERİNİ T AŞIYAN *SALMONELLA TYPHIMURIUM AROB* MUTANTLARININ GEN TEDAVİSİ VEKTÖRÜ OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Didem AYDIN[a], Ayşen GÜNEL-ÖZCAN[b], Nathalie MENAGER[c], Güneş ESENDAĞLI[a], Mustafa Oğuz GÜÇ[d], Dicle GÜÇ[a]

[a] Hacettepe Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Ankara
[b] Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Kırıkkale
[c] Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SA, UK
[d] Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara

Atenüe *Salmonella typhimurium* (*ST*) suşları kanser gen tedavisi ve DNA aşılama çalışmalarında gelecek için umut vadeden vektörler olarak araştırılmaktadır. *Salmonella*, monosit-makrofaj sistemini enfekte etmesi nedeniyle, tümör antijenleri ve immün-stimülatuar moleküllerin genlerinin aktarılması için ideal bir vektördür. Ayrıca özgül olarak tümör dokusuna yerleşip tümör büyümesini ve metastazları engellediği de gösterilmiştir. İnterlökin-18 (IL-18) anti-tümör etkinliği çok iyi bilinen bir sitokindir. CD40 Ligand (CD40L, CD154) ise antijen-sunucu hücrelerin aktivasyonunda ve yardımcı T-hücrelerinin efektör fonksiyonlarını gerçekleştirmesinde kilit rol oynayan bir yüzey molekülüdür. Bu çalışmada, oksotrofik bir mutant olan *STarоB* suşuna fare IL-18 veya CD40L genleri aktarılarak, oluşturulan rekombinant *STarоB*' nin ileri kanser immün-gen tedavisi çalışmalarında kullanılmak üzere etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Literatürden bilindiği kadarıyla, *STarоB* suşu gen tedavisi vektörü olarak ilk defa araştırılmıştır.

IL-18 geninin eldesi için, *in vitro* lipopolisakkarit uyarımını takiben fare aderan periferik kan mononükleer hücrelerinden; CD40L için ise, Forbol 12-Miristat 13-Asetat ve İyonomisin ile *in vitro* uyarılmış fare splenositlerinden RNA izolasyonu yapıldı. IL-18 ve CD40L DNA' ları Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile çoğaltıldı. Salgılanabilen ve biyoaktif IL-18 molekülünün eldesi için "*overlap extension*" metodu ile İnterferon-β (IFN-β) sinyal ve matür IL-18 sekansları birleştirilerek hibrid IL-18 DNA' sı oluşturuldu. IL-18 ve CD40L genleri pTARGET (Promega) ve pcDNA3 (Invitrogen) ökaryötik ekspresyon vektörlerine T-A klonlama ve restriksiyon klonlama yöntemleriyle klonlandı. Plazmidler *STarоB* suşuna elektroporasyon ile aktarıldı. pTARGET

plazmidlerinin bakteri içinde *in vitro* stabiliteleri % 1' in altında iken, pcDNA3 plazmidlerinin *in vitro* stabiliteleri % 85' den yüksek bulundu. pcDNA3 plazmidleri HEK-293 (insan embriyonal böbrek hücre hattı) hücrelerine lipozomla transfekte edildi. Plazmidlerden IL-18 ve CD40L ekspresyonlarının HEK-293 hücrelerinde RT-PCR ile tespit edilmesinin ardından, IL-18 veya CD40L genlerini taşıyan *STaroB* bakterileri inbred Balb/c farelere intravenöz olarak enjekte edildi. Tüm rekombinant *Salmonella* suşlarının karaciğer ve dalağı etkin bir şekilde kolonize ettiği gösterildi. *İnsert* DNA taşıyan plazmidlerin *in vivo* stabiliteleri sadece-vektör kontrolden istatistik olarak daha yüksekti, ancak her üçünün de *in vivo* stabiliteleri % 1' in altında bulundu. Bütün grupların karaciğer ve dalaklarından RNA izolasyonunun ardından RT-PCR ile IL-18 ve CD40L ekspresyonu araştırıldı, ancak ekspresyon gözlenmedi.

Antijen geni ile DNA aşılama çalışmalarının aksine gen tedavisi çalışmalarında etkin gen aktarımı ve yeterli ekspresyon şarttır. *Salmonella*-aracılı gen aktarımında plazmid stabilitesinin etkinliği belirleyen önemli bir faktör olduğu ve pTARGET veya pcDNA3 plazmidlerini taşıyan *STaroB* suşunun gen tedavisinde kullanılabilmesi için plazmid stabilitesinin arttırılması gerektiği söylenebilir.

EK 3. BMC (BioMed Central) Molecular Biology Journal' da Yayınlanmak Üzere Başvurusu Yapılmış Değerlendirme Aşamasındaki Tam Araştırma Makalesinin Özeti

Suitability of *Salmonella typhimurium aroB* strain carrying high copy plasmids for immunogene therapy

Didem Aydin[1]§, Aysen Gunel-Ozcan[2], Nathalie Menager[3], Gunes Esendagli[1], Mustafa Oguz Guc[4], Mutlu Hayran[5], Emin Kansu[1] and Dicle Guc[1]

[1] Hacettepe University, Institute of Oncology, Department of Basic Oncology 06100 Sihhiye, Ankara, Turkey
[2] Kirikkale University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology and Genetics 71100 Kirikkale, Turkey
[3] Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SA, UK
[4] Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology 06100 Sihhiye, Ankara, Turkey
[5] Hacettepe University, Institute of Oncology, Department of Preventive Oncology 06100 Sihhiye, Ankara, Turkey
§ Corresponding author

Keywords: *Salmonella typhimurium aroB* mutant; gene therapy; stability; expression

Abstract

Background

Attenuated strains of *Salmonella typhimurium* (*ST*) have being widely used in DNA vaccination and gene therapy studies for cancer treatment. IL-18 and CD40L molecules were shown to be highly effective anti-tumor agents. We constructed *STaroB* strains carrying Interleukin-18 (IL-18) or CD40 Ligand

(CD40L) genes to further use in cancer immunogene therapy and evaluated the possible applicability of *STaroB* strain as a gene delivery vehicle for the first time.

Results

We constructed pTargeT and pcDNA3 vectors carrying murine IL-18 or CD40L genes to enhance immune responses of the host for further cancer therapy studies. IL-18 and CD40L genes were amplified from cDNAs synthesized from mRNAs which were obtained from lipopolysaccharide (LPS)-induced adherent peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs), and Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) and Ionomycin-induced splenocytes respectively. Since precursor IL-18 protein does not have bioactivity and requires processing by IL-1 converting enzyme (ICE), we constructed a hybrid IL-18 molecule consisting of Interferon β (IFNβ) signal and mature IL-18 sequences by overlap extension method in order to obtain bioactive form of the protein. The plasmids were transformed into *STaroB* strain by electroporation. *In vitro* stability of pTargeT constructs was below 1%, whereas pcDNA3 constructs were found highly stable. HEK293 cells (human embryonal kidney cell line) were transfected with pcDNA3 constructs using Polyfect Transfection Reagent, which is a cationic polymer. After detecting the plasmid specific mRNA transcripts in HEK293 cells by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), we administered recombinant *STaroB* strains to mice intravenously. Both pcDNA3 constructs carrying insert DNAs were found statistically more stable than vector-only control *in vivo*, however *in vivo* stability of all constructs was below 1% and mRNA expressions of IL-18 and CD40L could not be detected in livers and spleens of mice injected with recombinant *STaroB*.

Conclusions

We would like to point out the importance of obtaining stable recombinant bacteria and efficient expression in bacterial gene therapy strategies. Our results showed that *STaroB* strain carrying pTargeT or pcDNA3 may not be suitable to investigate the effects of a therapeutic heterologous gene in a disease model.