

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARE LİZOZİM ve İNTERLÖKİN-2 GENLERİNİN KLONLANMASI
ve MALİGN MELANOMADA ANTI-TÜMÖRAL DNA AŞISI
OLARAK KULLANILMASI**

Bil. Uz. Ali İrfan GÜZEL

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Halil KASAP

**Bu tez, Çukurova üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TF.2003.D2 nolu proje olarak desteklenmiştir.**

Tez No:.....

ADANA – 2006

KABUL ve ONAY FORMU

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora/Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan **FARE LİZOZİM ve İNTERLÖKİN-2 GENLERİNİN KLONLANMASI ve MALİGN MELANOMADA ANTI-TÜMÖRAL DNA AŞISI OLARAK KULLANILMASI** adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora/Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: **25/07/2006**

İmza

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Halil KASAP
Çukurova Üniversitesi

İmza

Prof. Dr. İlhan TUNCER
Çukurova Üniversitesi

İmza

Prof. Dr. Mülkiye KASAP
Çukurova Üniversitesi

İmza

Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL
Mersin Üniversitesi

İmza

Prof. Dr. Numan ÖZCAN
Çukurova Üniversitesi

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulunun **7.8.2006** tarih ve **18/5-3** sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sait POLAT
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim ve çalışmalarımız süresince beni isabetli bir şekilde yönlendiren ve motive eden, sorunların çözümlenmesinde çok önemli katkılar sağlayan ve destekleyen saygıdeğer hocam sayın Prof. Dr. Halil KASAP'a sonsuz saygı ve şükranlarımı yürekten arz ediyor ve kendileriyle çalışmanın benim için büyük bir şans ve onur verici olduğunu belirtmek istiyorum.

Tez izleme jürisinde yer alan ve bu vesileyle de hem çalışmanın şekillenmesinde hem de karşılaşılan sorunların giderilmesindeki katkılarından dolayı saygıdeğer hocalarım sayın Prof. Dr. İlhan TUNCER'e ve aynı zamanda Anabilim Dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Mülkiye KASAP'a, yüksek lisans ikinci tez danışmanlığımı da yapmış olan ve laboratuvar deneyimi kazanmama fırsat veren ve çalışmalarımızı her zaman destekleyen sayın Prof. Dr. Numan ÖZCAN'a ve Anabilim Dalımızdaki değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Ali MATUR, Prof. Dr. Osman DEMİRHAN, Doç. Dr. Davut Alptekin, Doç. Dr. Ümit Lüleyap ve Yrd. Doç. Dr. Dilara Süleymanova Karahan ve B16-FO fare melanoma hücrelerini verme nezaketinde bulunan Gazi Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalı başkanı sayın Prof. Dr. Cemalettin AYBAY'a da saygı ve şükranlarımı arz ediyorum.

Çalışmada kullanılan farelerin sağlanmasında ve uygulama aşamasında büyük bir titizlikle yardımcı olan değerli arkadaşım Öğr. Gör. Dr. Kerem Tuncay ÖZGÜNEN'e ve farelerin bakımını yapan ve kontrollerde büyük bir sabırla yardımcı olan sayın Mustafa ÇAPAR'a, istatistiksel analizlerdeki yardımlarından dolayı sayın Araş.Gör. Yaşar SERTDEMİR'e, laboratuvar çalışmalarındaki yardım ve desteklerinden dolayı, arkadaşlarım sayın Dr. Ayfer PAZARBAŞI, Araş. Gör. M. Bertan YILMAZ ve Dr. Adem ALTINALAN'a ve bölümümüz lisansüstü öğrencilerinden sayın Sabriye KOCATÜRK SEL, Hülya ARIKAN, Evrim GÜRTUNÇ, Müzeyyen İZMİRLİ, Araş. Gör. Deniz TAŞTEMİR ve Erdal TUNÇ'a ve bölümümüzde çalışan ve çeşitli vesilelerle çalışmalarımıza katkıda

bulunmuş olan sayın Ömer DEMİR, Nadir BUDAK ve Mustafa BAŞDİNÇ'e de teşekkür ediyorum.

Her zaman için manevi destekçilerim olan aileme, eşim Mediha'ya ve çocuklarım F. Nur, S. Burak ve M. Emin'e de sonsuz sevgilerimi iletiyor ve onları kucaklıyorum.

Ayrıca, bu tez çalışmasını Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi kanalıyla TF.2003.D2 nolu proje olarak destekleyen Çukurova Üniversitesi Rektörlüğüne ve lisansüstü eğitimi koordine eden Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne de teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	6
2.1. Kanser; Tanımı, Moleküler Biyolojisi ve İmmünolojisi	6
2.2. DNA Aşıları ile İmmünotedavi	10
3. GEREÇ ve YÖNTEM	13
3.1. Gereç	13
3.1.1. Gereçlerden Bazılarının Genel Özellikleri ve Kullanım Amaçları	14
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Gen Klonlama	23
3.2.1.1. Total cDNA elde edilmesi	23
3.2.1.2. RT-PCR/PCR Amplifikasyonları	25
3.2.1.3. Plazmitlerin <i>E. coli</i> 'ye Transformasyonu	31
3.2.1.4. pBlueScript'e Klonlama	36
3.2.1.5. Hızlı İnsört Tarama	39
3.2.1.6. pHM6'ya Klonlama	40
3.2.1.7. RFLP ve Dizi Analizi	42
3.2.1.8. Endotoksinsiz Plazmit İzolasyonu	43
3.2.2. Hücre Kültürü	44
3.2.2.1. Pasajlama	46
3.2.2.2. Kriyoprezervasyon (dondurarak saklama)	46
3.2.3. Lipozomal Transfeksiyon	48
3.2.3.1. Beta Galaktozidaz Aktivite Analizi	60
3.2.3.2. Transfekte Hücre Hatlarının Geliştirilmesi	51
3.2.4. Fare Denemeleri	51
3.2.4.1. Tümör Oluşturma	52
3.2.4.2. Farelerin Diseksiyonu ve Patolojik İncelemeler	54
3.2.4.3. Denemeler ve Gruplarının Oluşturulması	54
3.2.4.4. Hücrelerinin Hazırlanması ve Farelere Enjeksiyon	57
3.2.4.5. Tümör Kitleleri İçine Plazmit Enjeksiyonu	58
3.2.5. Verilerin Alınması ve Analizi	59
4. BULGULAR	61
4.1. Gen Klonlama	61
4.1.1. Total cDNA Eldesi ve RT-PCR/PCR Amplifikasyonları	61
4.1.2. Plazmitlerin <i>E. coli</i> 'ye Transformasyonu	61
4.1.3. pBluescrit (pBS) Vektörüne Klonlama	62
4.1.4. pHM6 Vektörüne Klonlama	64

4.1.5. RFLP ve Dizi Analizi	65
4.1.6. Endotoksinsiz Plazmit DNA İzolasyonu	67
4.2. Hücre Kültürü	68
4.3. Lipozomal Transfeksiyon	68
4.3.1. β -galaktozidaz ve Lizozim Aktivite Analizleri	68
4.3.2. Transfekte Hücre Hatlarının Geliştirilmesi	70
4.4. Fare Denemeleri	70
4.4.1. Tümör Oluşturma	70
4.4.2. Farelerin Diseksiyonu ve Patolojik İncelemeler	72
4.4.3. Planlanan Denemeler ve Grupları	74
4.5. Elde Edilen Veriler ve Analizleri	75
5. TARTIŞMA	94
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	101
7. KAYNAKLAR	105
EKLER	111
EK-1	111
EK-2	120
ÖZGEÇMİŞ	124

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	PHM6 memeli ekspresyon vektörü	15
Şekil 3.2.	PHM6 vektörü çoklu klonlama bölgesi (MCS) ve epitop etiketleri	15
Şekil 3.3.	PBluescript II vektörü (pBS)	17
Şekil 3.4.	DOTAP'ın Moleküler yapısı	17
Şekil 3.5.	PBS'e klonlamada izlenen genel strateji.	37
Şekil 3.6.	PBS'den pHM6'ya klonlamada izlenen genel strateji	40
Şekil 3.7.	Üreme ve deneme kafeslerinden görüntüler.	57
Şekil 3.8.	Laboratuar çalışmalarından görüntüler.	58
Şekil 3.9.	Tümör ölçümlerinden görüntüler.	59
Şekil 4.1.	IL-2 ve Lizozim genleri (ORF) amplifikasyonlarına ait jel görüntüsü.	61
Şekil 4.2.	PHM6 plazmit DNA'sına ait jel görüntüsü.	62
Şekil 4.3.	PBS vektörüne klonlama.	63
Şekil 4.4.	PBSmIL-2 ve pBSmLys vektörlerine ait diyagramlar.	63
Şekil 4.5.	PHM6 vektörüne klonlama.	64
Şekil 4.6.	PHM6mIL-2 ve pHM6mLys vektörleri ile yapılan PCR ürününün 5 ayrı enzimle kesim profili.	65
Şekil 4.7.	Rekombinant pHM6 plazmit DNA'ların dizi analiz kromatogramlarına ait bazı bölümler.	66
Şekil 4.8.	PHM6mIL-2 ve pHM6mLys rekombinant vektörlerine ait diyagramlar.	67
Şekil 4.9.	Rutin protokol ve Kitle izole edilen plazmitlere (ve formlarına) ait jel görüntüleri.	68
Şekil 4.10.	β -galaktozidaz enzim aktivitesinin tespiti için yapılan histokimyasal boyama.	68
Şekil 4.11.	B-16V ve plazmitlerle (pHM6 ve PHM6mLys) transfekte B-16V hücrelerine ait kültür sıvılarının lizozim aktivitesi açısından kontrolü.	70
Şekil 4.12.	B16-F0 hücre hattı enjeksiyonu ile balb/c'de gelişmiş olan tümör kitlesi.	71
Şekil 4.13.	B-16V hücre hattı enjeksiyonu ile C57BL/6'de gelişmiş olan tümör kitlesi.	71
Şekil 4.14.	Disekte edilmiş fareler.	72
Şekil 4.15.	Tümör kitlesi, asit sıvısı ve iki organa ait ışık mikroskobu görüntüleri.	73
Şekil 4.16.	B-16V enjekte edilen farelerdeki tümör gelişim grafiği.	76

Şekil 4.17.	Tümör kitlesi içine pHM6 enjekte edilen farelerdeki tümör gelişim grafiği.	76
Şekil 4.18.	Tümör kitlesi içine PBS-DOTAP enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi.	77
Şekil 4.19.	Tümör kitlesi içine pHM6mIL-2 enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi.	77
Şekil 4.20.	Tümör kitlesi içine pHM6mLys enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi.	78
Şekil 4.21.	Tümör kitlesi içine pHM6mIL-2+pHM6mLys enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi.	78
Şekil 4.22.	Deneme 1'deki grupların karşılaştırması	79
Şekil 4.23.	Deneme 1'deki grupların karşılaştırması (box plot).	79
Şekil 4.24.	B-16V enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi (kontrol grubu).	81
Şekil 4.25.	PHM6 enjeksiyonundan 2 gün sonra B-16V enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi.	81
Şekil 4.26.	PBS-DOTAP enjeksiyonundan 2 gün sonra B-16V enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi.	82
Şekil 4.27.	PHM6mIL-2 enjeksiyonundan 2 gün sonra B-16V enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi.	82
Şekil 4.28.	PHM6mLys enjeksiyonundan 2 gün sonra B-16V enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi.	83
Şekil 4.29.	PHM6mIL-2 + pHM6mLys enjeksiyonundan 2 gün sonra B-16V enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi.	83
Şekil 4.30.	Deneme 2'deki grupların karşılaştırması.	84
Şekil 4.31.	Deneme 2'in grup karşılaştırması (box plot).	84
Şekil 4.32.	B-16V enjekte edilen farelerdeki tümör gelişim grafiği (kontrol grubu)	86
Şekil 4.33.	B-16VpHM6 enjekte edilen farelerdeki tümör gelişim grafiği.	87
Şekil 4.34.	B-16VpHM6mIL-2 enjekte edilen farelerdeki tümör gelişim grafiği.	87
Şekil 4.35.	B-16VpHM6mLys enjekte edilen farelerdeki tümör gelişim grafiği.	88
Şekil 4.36.	B-16VpHM6mIL-2+B-16VpHM6mLys enjekte edilen farelerdeki tümör gelişim grafiği.	88
Şekil 4.37.	Deneme 3'ün grup karşılaştırmalarına ait grafik.	89
Şekil 4.38.	Deneme 3'ün grup karşılaştırmaları (box plot).	89
Şekil 4.39.	Deneme 1'deki grupların yaşam-fonksiyon grafiği.	90
Şekil 4.40.	Deneme 2'deki grupların yaşam-fonksiyon grafiği.	91
Şekil 4.41.	Deneme 3'deki grupların yaşam-fonksiyon grafiği.	92
Şekil 4.42.	Deneme 4'e alınan (challenge) Deneme 3 gruplarının yaşam-fonksiyon grafiği.	93

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	PHM6 memeli ekspresyon vektörünün özellikleri.	15
Çizelge 3.2.	IL-2 ve Lys genleri amplifikasyonu için PCR karışımı.	28
Çizelge 3.3.	IL-2 ve Lys genleri amplifikasyonu için PCR döngüleri.	28
Çizelge 3.4.	Klonlama ve RFLP analizinde kullanılan restriksiyon endonükleazlar ve tanıma dizileri.	29
Çizelge 3.5	Kesim ve ligasyon reaksiyonlarında kullanılan standart protokoller.	38
Çizelge 3.6.	Planlanan denemeler ve grupları.	56
Çizelge 3.7.	Deneler ve gruplarında kullanılan fare sayıları (Kontrolle birlikte 230 fare).	56
Çizelge 4.1.	Hücre enjekte edilen fareler ve 4 hafta süreyle yapılan tartım değerleri.	71
Çizelge 4.2.	Deneme 1'den elde edilen veriler ve analizleri.	75
Çizelge 4.3.	Deneme 2'den elde edilen veriler ve analizleri.	80
Çizelge 4.4.	Deneme 3'den elde edilen veriler ve analizleri.	85
Çizelge 4.5.	Deneme 3'deki grupların tümör geliştirme oranları.	86
Çizelge 4.6.	Deneme 1'in yaşam analizine ait p değerleri tablosu.	90
Çizelge 4.7.	Deneme 2'in yaşam analizine ait p değerleri tablosu.	91
Çizelge 4.8.	Deneme 3'in yaşam analizine ait p değerleri tablosu.	92

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Amp	Ampisilin
APC	Antijen Sunucu Hücre (Antigen Presenting Cell)
bp	Baz çifti (base pair)
cccDNA	Kovalent olarak kapalı halkasal DNA (covalently closed circular DNA)
cDNA	Koplementer DNA (complementary DNA)
CMV	Cytomegalovirus
CTL	Sitotoksik T Lenfositleri (Cytotoxic T Lymphocytes)
DMSO	Dimetilsulfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Asetik Asit
EtBr	Etidyum Bromit (Ethidium Bromide)
FBS	Fötal Dana Serumu (Fetal Bovine Serum)
FCS	Fötal Buzağı Serumu (Fetal Calf Serum)
G418	Genetisin
gen	Gentamisin
GM-GCF	Granülosit Makrofaj-Koloni Uyarıcı Faktör (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor)
IFN	Interferon
IL	İnterlökin
kb	Kilo baz (kilo base)
Lys	Lizozim
M	Molar
MCS	Çoklu Klonlama Bölgesi (Multiple Cloning Site)
mg	Miligram (1/1000 gr)
MHC	Majör Doku uyumluluk Kompleksi (Major Histocompatibility Complex)
ml	Mililitre
mRNA	Mesajcı RNA

µg	Mikrogram (1/1000 mg)
µl	Mikrolitre (1/1000 ml)
neo	Neomisin
ng	Nanogram (1/1000 µg)
NK Cell	Doğal Öldürücü Hücre (Natural Killer Cell)
ocDNA	Açık halkasal DNA (open-circular DNA)
OD	Optik Yoğunluk (Optical Density)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Poly Ethylene Glycole
pmol	Pikomol
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	Ribo Nükleik Asit
RT-PCR	Rivörs Transkriptaz-PCR (Revers Transcriptase-PCR)
s.c.	Deri altı (sub cutaneous)
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SV40	Simian Virus 40
TAA	Tümör İlişkili Antijen (Tumor Associated Antigen)
TBE	Triz-Borik asit-EDTA
TCA	TriChloro Acetic Acid
TE	Tris-EDTA
Tet	Tetrasiklin
TGF-β	Tümör Büyüme Faktörü-β (Tumor Growth Factor-β)
T_{H1}, T_{H2}	Yardımcı T Hücreleri (T Helper Cells)
TIL	Tümöre İnfiltrate olan Lenfositler (Tumor Infiltrating Lymphocytes)
TNF	Tümör Nekroz Faktör (Tumor Necrosis Factor)
TSA	Tümör Spesifik Antijen (Tumor Specific Antigen)
U	Ünite (Unit)
UV	mor ötesi (Ultra Viole)
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-Galactopyranoside

ÖZET

Fare Lizozim ve İnterlökin-2 Genlerinin Klonlanması ve Malign Melanomada Anti-tümöral DNA Aşısı Olarak Kullanılması

İmmünokompetent konakçılar potansiyel olarak anormal hücreleri tanıyabilmekte ve onları öldürerek çoğalmalarını engellemektedir. Fakat, tümör immünojenitesindeki zayıflık veya tümör tarafından indüklenen immüniteyi baskılayıcı çevreden kaynaklanan savunma sistemindeki bozukluklar anormal hücrelerin immün taramadan kurtulmasına neden olurlar. İmmünotedavinin hedeflerinden biri, konakçı immün yanıtlarını anormal hücreleri tanıyabilecek ve onları yok edecek şekilde manipüle etmektir.

Bu tez çalışmasının amacı: fare interlökin-2 (IL-2) ve lizozim genlerini pHM6 memeli ekspresyon vektörüne klonlamak ve B-16V melanoma hücrelerinde immünotedavi maksadıyla kullanmaktır. Daha önce yapılan değişik çalışmalarda, IL-2 hem protein hem de DNA aşısı formunda, lizozim ise yalnızca protein formunda kullanılmıştır. Anti-bakteriyel aktivite yanında anti-tümör ve immünomodülatör etkilere de sahip olduğu bilinen lizozim ilk defa bu çalışmada DNA aşısı formunda kullanılmıştır.

Lizozim ve IL-2 genlerinin DNA aşısı formunda kullanılmaları durumunda oluşturacakları anti-tümörjenik etkiyi değerlendirmek için dört değişik deneme yapılmıştır; 1) farelerin (inbred C57BL/6) deri altında B-16V melanoma hücreleriyle oluşturulmuş olan tümör kitleleri içine, IL-2 ve Lys genleri klonlanmış olan rekombinant pHM6 plazmitleri (pHM6mIL-2 ve pHM6mLys) lipozomla kompleks oluşturularak enjekte edilmiştir. 2) B-16V hücrelerinin enjeksiyonundan iki gün önce aynı bölgeye, rekombinant plazmit-lipozom kompleksleri farelerin deri altına enjekte edilmiştir. 3) Rekombinant plazmit vektörlerin B-16V hücrelerine *in vitro* transfeksiyonu sonucu geliştirilmiş olan transfekte tümör hücreleri (B-16VpHM6mIL-2 ve B-16VpHM6mLys) farelerin deri altına enjekte edilmiştir. 4) Deneme 3'ün tümör geliştirmeyen farelerine B-16V hücreleri tekrar enjekte edilmiştir.

Dört denemenin 15 grubunda toplam 277 fare kullanılmıştır. deneme 1 ve 2'nin sonuçları göstermiştir ki tümör oluşmadan önce veya sonra IL-2 ve lizozim genlerini taşıyan plazmitlerin enjeksiyonu tümör büyümesini önemli derecede yavaşlatamamıştır. Fakat, deneme 3'de, fareler B-16VpHM6mIL-2 için %32, B-16VpHM6mLys için %51.7, B-16VpHM6mLys + B-16VpHM6mIL-2 için ise %49.2 oranında tümör geliştirmemiştir. Deneme 3'deki uygulamadan sonra yaşayan farelere tekrar B-16V hücreleri enjekte edildiğinde (4. uygulama) sağ kalan farelerin hiçbirinde tümör oluşmaması koruyucu immünite geliştiğine işaret etmektedir. Bu sonuçlar, plazmit DNA gibi bir ajan aracılığı ile tümör hücrelerinde yüksek düzeyde salgılanması durumunda, lizozimin de tümör immünotedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: B-16V, C57BL/6, DNA Aşısı, IL-2, Lizozim, pHM6 plazmit vektörü, Tümör immünotedavisi

ABSTRACT

Cloning of Mouse Lysozyme and Interleukin-2 Genes and Using as Anti-tumoral DNA Vaccine in Malign Melanoma

Immunocompetent hosts can potentially recognize malignancies and impede their proliferation by killing them. However, any failure of the immune system due to the lack of tumor immunogenicity or a tumor induced immunosuppressive environment causes malignant cells to escape from the immune detection. One goal of tumor immunotherapy is to manipulate the host immune response to the malignancies to allow for the recognition and elimination of them.

The aim of this study is to clone mouse interleukin-2 (IL-2) and lysozyme genes to pHM6 mammalian expression vector and use them in B-16V melanoma cells for the purpose of immunotherapy. In different studies made previously, IL-2 has been used both in the form of DNA vaccine and peptide, but lysozyme only in the peptide form. The lysozyme, known to have anti-tumoral and immunomodulatory as well as antibacterial activities was investigated first time here in the form of DNA vaccine.

For this purpose, four experiments were made to evaluate the anti-tumorigenic effects of lysozyme and interleukin-2 genes when used in vaccine form. 1) Plasmids combined with mouse IL-2 and lysozyme genes (pHM6mIL-2 and pHM6mLys) were injected in the form of DNA - liposome complex into the tumor mass formed by the injection of B-16V melanoma cells into mice (inbred C57BL/6) subcutaneously. 2) Recombinant plasmids were injected into mice subcutaneously two days before the injection of B-16V cells to the same site. 3) B-16V tumor cells transfected with recombinant plasmids (B-16VpHM6mIL-2 and B-16VpHM6mLys) were injected subcutaneously to the mice. 4) Tumor free mice of the assay 3 were challenged with B-16V melanoma cells.

Overall 277 mice were used in 15 groups of four experiments. The results of experiments 1 and 2 showed that the injection of recombinant plasmids carrying IL-2 and lysozyme genes either before or later the tumor development did not significantly retard the progress. However, in experiment 3, the mice were remained tumor free in a ratio of %32 for B-16VpHM6mIL-2, %51.7 for B-16VpHM6mLys and %49.2 for B-16VpHM6mLys + B-16VpHM6mIL-2. There was no tumor development in the mice living after experiment 3 treatments when B-16 cells were re-injected (experiment 4) indicated that a protective immunity was arisen. These results had showed that, lysozyme can also be used in the tumor immunotherapy if it be secreted in tumor cells in a high level through an agent such as plasmid DNA.

Key Words: B-16V, C57BL/6, DNA Vaccine, IL-2, Lysozyme, pHM6 plasmid vector, Tumor immunotherapy

1. GİRİŞ

Savunma sisteminin fizyolojik görevlerinden biri, özelliği değişmiş olan hücreleri tanımak ve tümör oluşturmaya fırsat vermeden veya oluşturduktan sonra onları öldürmek ve ortadan kaldırmaktır. Savunma sisteminin bu şekilde çalışmasına ve bir çok patojen ve neoplastik hücrelere karşı koruma sağlamasına rağmen, herhangi bir antijenle karşılaştığında immün yanıt geliştirebilme özelliğindeki (immünokompetent) konakçılarda bile malignansiler ortaya çıkabilmektedir. Uzun zamandır tümör immünolojisindeki araştırmaların büyük bir bölümünün hedefinde, savunma sisteminden bir şekilde kaçmış veya ona galip gelmiş olan tümör hücrelerinin uygun immün uyarımlarla tanınip yok edilebileceği (İmmünotedavi) konusu yer almıştır. Bu konuda son zamanlarda yapılan çok sayıdaki çalışmalarla tümör hücrelerinin immün sistem elemanları tarafından tanınarak ortadan kaldırılabilirdiği gösterilmiştir¹⁻⁶.

Tümör immünotedavisindeki ana hedef, tümörlere karşı zayıf kalmış olan immün yanıtları güçlendirmek veya tümör-spesifik T-hücre yanıtları oluşturarak tümör kitlelerini yok etmek, yayılımını önlemek ve koruyucu immünite gelişimini sağlayabilmektir. İmmün yanıtlar; a) tümör hücre lizatları veya antijenleriyle aşılacak, b) tümör hücrelerinin immünojenitesini arttırmak için yüksek düzeyde sitokinler (IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-12, interferon- γ , TNF, GM-CSF gibi) veya yardımcı uyarıcılar (B7 gibi) salgılatarak (plazmit veya viral vektörlerle transfekte ederek) T hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarmak ve c) sitokinleri sistemik olarak vermek suretiyle aktifleştirilebilmektedir^{3, 5, 7}Fizyolojik immün yanıtlarda, etkin bir yanıt oluşturabilmek için sitokinler tek başına değil seri halde üretilmektedir. İmmünotedavi yaklaşımlarında da birden fazla sitokinlerin kullanılmasıyla anti-tümör etkilerin tek kullanılanlara göre önemli derecede iyileştirildiği, GM-CSF ve IFN- γ , IL-2 ve IL-4, GM-CSF ve IL-4, IFN- γ , IL-4 ve IL-6, IL-2 ve IL-12 ve IL-12, pro-IL-18 ve IL-1 β -converting enzim gibi kombinasyonların kullanıldığı çalışmalar da bildirilmektedir⁸⁻¹⁰. İnterlökinler hücreler arası çözünür mesajcı proteinler olup yüksek interaktiviteye sahiptirler ve hem otokrin hem de parakrin yolla faaliyet gösterirler. Tek başlarına

aktivitelerinin ne olduğunu tahmin etmek zordur, çünkü birinin varlığı diğerlerini de uyardığından primer fonksiyonları da etkilenmektedir^{3, 11-13}.

Tümör immünotedavisi konusundaki çalışmaların %60'dan fazlasını IL-2'nin kullanıldığı çalışmalar oluşturmaktadır. IL-2, lenfositler ve makrofajlar için önemli bir büyüme-uyarı faktörüdür. Hemopoietik hücreler üzerinde, sitotoksik T hücreleri (CTL), yardımcı T hücreleri, makrofajlar, doğal öldürücü (NK) hücreleri ve B hücrelerinin aktivasyonunu da içeren geniş bir biyolojik etki gösterir. Tümörlere karşı spesifik ve non-spesifik T hücre yanıtlarını aktive edebilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar IL-2'nin insan karsinomları üzerine doğrudan sitotoksik etki gösterdiğini de kanıtlamıştır¹⁴⁻²⁵. IL-2 ilk olarak T hücresi büyüme faktörü (TCGF) olarak isimlendirilmiş olup T lenfositlerinin G1'den S evresine geçişinden sorumlu en önemli sitokindir. IL-2 hücrel immün yanıtta, antijen bağlanmasıyla CD4⁺ T hücreleri tarafından salgılanan en kritik sitokinlerden biridir. IL-2 CD4⁺ T hücreleri ve az da olsa CD8⁺ T hücreleri tarafından üretilir. IL-2 kendisini üreten T hücreleri üzerine (bir otokrin büyüme faktörü olarak) ve aynı zamanda CD4⁺ T ve CD8⁺ T hücrelerini de içeren komşu lenfositlere etki etmesine (parakrin büyüme faktörü olarak) karşın endokrin bir büyüme faktörü olarak düşünülmemektedir. IL-2, diğer immün hücreler tarafından IL-1, IL-6, tümör nekroz faktör (TNF) ve interferonların üretimini de uyarır. Bunlara ilaveten, IL-2 T hücrelerinin ve NK hücrelerinin sitotoksik özelliklerini artırır. Normalde, IL-2 yalnızca T hücreleri tarafından antijenlerle aktivasyona bağlı olarak transkribe edilir, sentezlenir ve salgılanır. IL-2 sentezi genellikle geçicidir, aktivasyondan yaklaşık 4 saat sonra salgılanmada ilk piki verir^{5, 14-26}.

IL-2'nin T hücreleri üzerindeki etkisi, IL-2 reseptör proteinlerine bağlanmak suretiyle gerçekleştirilir. IL-2'nin lenfositler üzerindeki temel etkileri;

1. IL-2, T lenfositleri için majör otokrin büyüme faktörüdür ve aktive edilmiş CD4⁺ T hücreleri tarafından üretilen IL-2 miktarı, T hücrelerine bağlı immün yanıt derecesinin önemli bir belirleyicisidir. IL-2 aynı zamanda T hücreleri tarafından üretilen diğer sitokinlerin (IFN- γ ve limfotoksin gibi) sentezlenmesini uyarır.
2. IL-2, NK hücrelerinin gelişimini stimüle ederek sitolitik fonksiyonlarını artırır (limfokinle aktive edilmiş öldürücü hücrelerin -LAK- üretimi).

Dinlenme durumundaki T hücreleri gibi, NK hücreleri de IL-2R $\beta\gamma_c$ eksprese eder ve yüksek düzeydeki IL-2 konsantrasyonu ile uyarılabilir. Fakat, NK hücreleri IL-2R α eksprese etmediğinden aktivasyondan sonra bile IL-2 gereksinimleri azalmaz.

3. IL-2, B hücrelerini de etkileyerek (büyüme faktörü olarak) antikor üretimi için stimüle eder^{3, 6, 7}.

Sitokinlerden başka, birçok biyolojik aktivitesi yanında anti-tümör ve immünmodülatör etkilere sahip olduğu bildirilen bir diğer molekül de lizozimdir. Lizozim birçok canlının savunma mekanizmasında yer alan önemli bir anti-mikrobiyal enzim olup memeliler (dokuları ve bütün vücut salgılarında), böcekler, bitkiler, bazı bakteriler ve virüslerde de bulunmaktadır. Lizozim, tripsin, kimotripsin ve pepsinden etkilenmez. Bu özelliğinden dolayı ülser, multiple sklerozis, bazı deri hastalıkları ve ameliyat sonrası enfeksiyonların tedavisinde kullanılabileceği de tavsiye edilmektedir. Aynı zamanda gıda sanayinde bir çok ürünün korunmasında ve bebek mamalarında ve sakızda (periodontitis tedavisi ve diş çürümelerini önlemek için) da kullanılmaktadır. Anti-mikrobiyal aktivitesi yanında, birtakım virüslerin inaktivasyonu, memeli hücre zarlarının bütünlüğünün korunumu, polimorfonükleer lökositlerin, makrofajların ve monositlerin fagositik/sitotoksik aktivitelerinin artırılması, monositlerin sitimülasyonu, analjezik, anti-tümör, anti-metastatik ve anti-inflamatör aktivite, immünglobülün üretimini uyarıcı faktör, fosfolipit veziküllerin birleşmesinin indüksiyonu ve tümör hücrelerinin immünojenitesini arttırma gibi aktivitelere sahip olduğu yapılan bir çok çalışmalarla gösterilmiştir²⁷⁻⁴¹. Lizozimin; immün sistemi enfeksiyonlara, immün yanıt bozukluklarına ve depresyonlarına karşı da düzenlediği bulgusu lizozimin son derece önemli bir özelliğini ortaya koyan yeni bir gelişmedir³⁴. Lizozim için bahsedilen tedavi edici özelliklerine ilaveten, şimdilerdeki en çarpıcı eğilim, bakteriyel karsinogenezin önlenmesi ile anti-kanser ilaçların etkinliğini arttırmak veya anti-kanser tedavilerinin neden olduğu immün baskılamayı kaldırmak suretiyle kanser hastalarının tedavi edilmesi üzerine yoğunlaşmaktadır. İmmüniteyi uyarma açısından deney hayvanları ve insanlar arasındaki farksızlığa rağmen, lizozim henüz immünmodülatör bir ajan olarak klinik uygulamalarda yerini alamamış

olmasına rağmen, yakın bir gelecekte bu molekülün potansiyel faydalarının anlaşılıp avantajlarından yararlanılması umut edilmektedir^{29, 31,34}. Tümör stromasındaki granülositik-monositik infiltrasyon, yalnızca lokal değil aynı zamanda sistemik immüneyi de (serumdaki lizozim düzeyinin artışıyla) sağlayan lizozim kaynağını oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar, lizozim düzeyi ve aktivitesinin ölçülmesini, mide, özofagus ve kolorektal kanserlerin erken teşhisinde kullanılabilecek diğer bir marker olarak da göstermektedir⁴²⁻⁵⁰.

Bu tez çalışmasında IL-2 ve lizozimin deneysel tümör modeli üzerindeki anti-tümöral etkilerini (DNA aşısı formunda) tek tek ve birlikte değerlendirmek amaçlanmıştır. Yukarıda da belirtildiği gibi IL-2 bu konuda yapılmış olan çalışmaların büyük bir bölümünde hem protein formunda (sistemik olarak vermek suretiyle) hem de DNA aşısı formunda (değişik vektör sistemlerine klonlanarak) kullanılmış bir moleküldür. Lizozim ise yapılan bazı anti-tümöral çalışmalarda yalnızca protein formunda (sistemik veya oral yolla verilmek suretiyle) kullanılmış fakat aşı formunda kullanılmamış bir moleküldür. Bu çalışmada lizozimin yanında IL-2'nin hem daha önceki çalışmalarda IL-2 ile olumlu sonuçlar alındığı için bu çalışmada da en azından yakın bir sonuç elde edebilmek (kontrol amaçlı) hem de lizozimle birlikte kullanılması durumunda ortaya çıkacak anti-tümöral etkiyi değerlendirmek amacı ile kullanılması düşünülmüştür.

Bilindiği gibi, kanser günümüzde kalp-damar hastalıklarından sonra en sık ölüm nedeni olan 2. hastalıktır. Dünya genelinde kansere yakalanma ve kanser nedeniyle ölümler milyonlarla ifade edilmektedir. Kanser bir hücre hastalığı olduğundan hemen her hücre tipinden köken alabilmekte ve oluşum nedenleri ve tedaviye olan yanıtlar açısından da oldukça heterojenite göstermektedir. Kanser tedavisindeki en etkin ve diğer hücrelere zararsız olan tedavi yaklaşımı, kanserin immün sistem tarafından kontrollü ve seçici bir şekilde ortadan kaldırılmasının hedeflendiği immünotedavi girişimleridir. Bu çalışmada da immünotedavi yaklaşımlarına katkıda bulunabilecek yada tedavilerin etkinliğini arttırabileceği düşünülen faktörlerden biri olarak lizozim seçilmiş ve bu molekülün anti-tümöral etkileri daha önceki çalışmalardan kısmen farklı bir şekilde (DNA aşısı formunda) değerlendirilmiştir.

Bu amacı gerçekleştirebilmek için dört değişik uygulama planlanmıştır:

1. B-16V melanoma hücreleri ile C57BL/6 inbred farelerinin deri altında geliştirilecek olan tümör kitleleri içine, IL-2 ve lizozim klonlu rekombinant pHM6 plazmitlerinin (pHM6mIL-2 ve pHM6mLys) lipozomla kompleks oluşturularak ayrı ayrı ve birlikte enjekte edilmesi halinde tümör gelişiminin değerlendirilmesi.
2. Plazmit DNA-lipozom komplekslerinin C57BL/6 farelerinin deri altına enjeksiyonundan iki gün sonra aynı bölgeye B-16V hücreleri enjekte edilmesi durumunda tümör oluşum ve gelişiminin değerlendirilmesi.
3. Oluşturulacak rekombinant plazmit vektörlerin (pHM6mIL-2 ve pHM6mLys) B-16V hücrelerine *in vitro* transfeksiyonu sonucu geliştirilecek olan transfekte tümör hücrelerini inbred C57BL/6 farelerinin deri altına enjekte ederek tümörijenitelerinin değerlendirilmesi.
4. Tümör geliştirmeden sağ kalmış olan farelere tekrar B-16V hücresi enjekte edilerek koruyucu immünite oluşup oluşmadığının belirlenmesi (challenge).

Konuyla ilgili moleküler ve hücre kültür çalışmalarının tamamı Ç.Ü Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında, farelerin üretimi ve uygulamalar Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında, patolojik incelemeler ise Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Kanser; Tanımı, Moleküler Biyolojisi ve İmmünolojisi

Kanser, normal hücre sel davranışları kontrol eden mekanizmaların bozulması sonucu oluşur. Çok hücreli organizmalarda hücre çoğalması, farklılaşması ve bir hücrenin canlılığının devamı organizmanın bütünü gözetilerek hassas bir şekilde düzenlenir. Kanseri hücrelerinde bu düzenlemenin kaybı doku ve organların fonksiyonlarına engel olur. Kanseri, temel kontrol mekanizmalarındaki kusurlar sonucu oluştuğu için moleküler ve hücre sel düzeyde anlaşılması gereken bir hastalıktır. Kanseri hücrelerinin büyüme- çoğalma kontrollerindeki kayıp, çoklu hücre kontrol sistemlerindeki birikmiş anormalliklerin sonucudur⁵¹.

Kanseri, vücuttaki çok çeşitli hücrelerin anormal çoğalmalarıyla oluşabilir, ve bu nedenle de, davranış ve tedaviye olan cevaplarında önemli derecede farklılıklar gösteren, yüzlerce farklı kanseri tipi vardır. Kontrolsüz bir şekilde çoğalarak oluşan hücre kümeleri tümör olarak adlandırılır. İyi huylu (benign) tümör (örneğin bir deri siğili) orijin aldığı yerde hapsedilmiş (kuşatılmış) olup ne çevre dokuya ne de vücudun diğer taraflarına yayılmaz. Fakat kötü huylu (malign) tümör hem çevre dokuya hem de dolaşım veya lenf sistemi ile vücudun diğer bölgelerine yayılır (metastaz). Genelde yalnızca kötü huylu tümörler kanseri olarak tanımlanır. Kötü ve iyi huylu tümörler orijin aldıkları hücre tipine göre sınıflandırılırlar. İnsan kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturan karsinomalar, epitel hücrelerin malignansileridir. Sarkomalar bağ doku (kas, kemik ve kıkırdak gibi), yağ ve fibröz dokulardaki solid tümörlerdir. Lösemiler kan yapan hücrelerin, miyelomalar plazma hücrelerinin, lenfomalar ise immün sistem hücrelerinin malignansileridir⁵¹. Karsinomalar, sarkomalar, lenfomalar ve miyelomalar; kanseri hücrelerinin oluşturduğu bir kitle, stromal hücreler ve damarlardan oluşan solid tümörleri oluştururlar. Bu nedenle de solid tümörlerin oluşumu angiogenezis olarak adlandırılan yeni kan damarlarının oluşumunu gerektirir.

Kanser hücrelerinin yüzeyindeki antijenlerin çoğu normal doku antijenleri olmasına rağmen kalitatif ve kantitatif farklılıklar gösterirler. Kalitatif farklılıklar yalnızca kanser hücrelerine özgün olduğundan tümör spesifik antijenler (TSA) olarak adlandırılır. TSA'lar şunları içerebilir;

- Onkogen ürünleri,
- Normalde eksprese olmayan gen ürünleri,
- Aynı genin alternatif okuma çerçevesinden transle olmuş bir protein,
- Translasyon sonrasında farklı modifikasyonlara uğramış olan proteinler,
- Farklı glikozil transferaz grupları ile farklı şekillerde glikolize olmuş proteinler.

Bazı gen ürünlerindeki normal hücreler ve kanser hücreleri arasında 1000 kata varan kantitatif farklılıklar, tümör-ilişkili antijenler (TAA) olarak adlandırılır. Amplifiye gen ürünleri; onkogenler ve büyüme-faktörü reseptörleri gibi hücre yüzey moleküllerini içerir. TAA'lar normalde fetal evrede eksprese olan fakat kanser hücrelerinde yeniden aktive olan gen ürünlerini (onkofetal proteinler) de içerebilir (Karsinoembriyonik antijen –CEA- ve α -fetoprotein – AFP- gibi). Dikkat edileceği gibi TSA' lar ve TAA'lar hücre içi ve hücre zarı antijenleri olup, hem onkojenik hem de non-onkojenik ürünleri içermektedir. Hücre içi antijenler majör histokompatibilite kompleks I (MHC I) molekülleri tarafından hücre yüzeyine sunulur. Bazı TSA ve TAA'lar bir çok kanser tipinde, bazıları tercihen belli bir kanser tipinde (kansere spesifik), bazıları da yalnızca bazı bireylerde (hasta spesifik) eksprese edilebilir²⁶.

Malign hücreler konakçı tarafından yabancı olarak tanınan protein antijenleri salgırlar ve İmmün sistem ise bazı tümörlerin kontrolsüz büyümesini sınırlayabilir. Buna rağmen, malign hücreler çeşitli mekanizmalarla immün denetimden kaçarlara veya bu hücrelerin etkisiyle immün denetim zayıflatılır ve kanser gelişimi gerçekleşir. Tümör immünolojisindeki en önemli çalışmalar, tümör hücrelerinin immün yıkımdan nasıl kurtulduğunu anlamak ve bu hücrelerin immünojenitesini ve konakçının tepkilerini artırma yollarını aramak üzerine yoğunlaşmıştır. Tümör hücrelerinin immün denetimden kurtulmasına neden olabilen mekanizmalar aşağıda kısaca açıklanmıştır;

1. Tümör hücrelerinde Klas I MHC (endojen antijenleri sunar) ekspresyonu azalabilir, buna bağlı olarak da tümör antijenlerinin sunulumu ve Sitotoksik T Lenfositleri (CTL) tarafından tanınması engellenebilir. Yapılan çalışmalarda, klas I MHC ekspresyonunun artırılması durumunda tümör hücrelerinin *in vitro* koşullarda CTL'lere olan hassasiyetlerinin arttığı ve *in vivo* tümörjenik özelliklerinin azaldığı gözlenmiştir.
2. Klas I MHC eksprese eden ve CTL'ler tarafından tanınan tümör hücreleri iki yolla CTL'lerin aktivasyonunu engelleyebilir.
Birinci olarak, çoğu tümör hücreleri klas II MHC (eksojen antijenleri sunar) eksprese etmediğinden tümör-spesifik CD4⁺ yardımcı T hücrelerini doğrudan aktive edemezler. Anti-tümör CTL aktivitesi kısmen yardımcı T hücreleri tarafından sağlanan sinyallere bağlıdır. Eğer profesyonel Antijen-Sunucu Hücreler (APC) bu tümörlere yeteri kadar infiltre olmaz, içine almaz, tümör antijenlerini sunamaz ve bu nedenle de T hücrelerini aktive edemezse maksimal anti-tümör CTL diferensiasyonu gerçekleşemeyecektir.
İkinci olarak, tümör hücreleri üzerinde ko-stimülatörlerin yokluğu T hücre aktivasyonunu engelleyebilir. Çoğu tümörler, yardımcı T hücreleri için ikinci sinyalleri sağlayan ko-stimülatörleri eksprese etmeyen dokulardan oluşur. Ayrıca, CTL aktivasyonu tümör hücreleri yüzeyinde olmayan B7-1 veya B7-2 gibi hücre yüzey molekülleriyle ko-stimülasyona ihtiyaç duyar.
3. Tümör ürünleri anti-tümör immün yanıtları bastırabilir. İmmün yanıtı baskılayıcı tümör ürününün bir örneği bir çok tümör tarafından çok miktarda salgılanan ve çok miktardaki lenfosit ve makrofaj fonksiyonlarını inhibe eden transforming growth factor- β (TGF- β)'dir. Bazı tümörler makrofaj fonksiyonlarını azaltan IL-10' da salgılar.
4. Konakçı, bazı tümör antijenlerine toleranslı olabilir. Bu tolerans, muhtemelen neonatal dönemde antijenlerle karşılaşılması veya tümör hücrelerinin bu antijenleri tolere edilebilir bir formda sunmalarından ileri gelebilir.

5. Anti-tümör immünite, immünojenik peptit-MHC'leri eksprese etmeyen mutant tümör hücrelerinin seçilimi ile sonuçlanabilir. Mutant hücreler tümör antijenlerini kodlayan genlerdeki (özellikle de bu gen ürünleri tümörlerin malign fenotipleri için kritik değilse) mutasyon veya delesyonlar sonucu oluşabilir. Alternatif olarak, antijenik peptitlerin sunulumu için gereken MHC genlerindeki mutasyon veya delesyonlar immün seçilimi teşvik edebilir.
6. Tümör antijenlerinin antikor bağlanması sonucu 'antijenik modülasyon' olarak adlandırılan yüzey ekspresyonlarının kaybı, immün efektör mekanizmalara karşı direnç kazanılmasına neden olur. Antijenik modülasyon endositoz veya antijen-antikor komplekslerinin kaybolması nedeniyle olur. Antijenik modülasyon, kompleman bağlamayan bir anti-tümör antikor tarafından oluşturulursa, tümör hücrelerini diğer kompleman aktive edici antikorlardan koruyabilir. Antijenik modülasyon, anti-tümör antikorlarla pasif immünotedavi girişimlerinde karşılaşılan en önemli problemlerden biridir.
7. Tümör büyüme kinetiği, etkin bir immün yanıt gelişmeden önce immünolojik olarak dirençli tümörlerin oluşmasına neden olabilir. 'Gizlice yayılım' olarak adlandırılan bu olay transplantasyon çalışmalarıyla deneysel olarak da modellenenmektedir. Az sayıdaki tümör hücrelerinin transplantasyonu, öldürücü tümörlerin oluşmasına neden olurken, aynı tümörün büyük miktardaki transplantasyonu reddedilir. Bu tezdin tahmin edilen bir nedeni küçük dozlardaki tümör antijenlerinin immün sistemi uyarmaya yetmemesi ve zamanla alıcıda bir çok tümör hücrelerinin gelişmesindedir. Tümör antijen genlerinde oluşan mutasyonlar da immün tanınım şansını azaltmaktadır.
8. Tümör hücresi yüzey antijenleri, mukopolisakkarit içeren sialik asit gibi glikokaliks molekülleri sayesinde immün sistemden gizlenebilir. Bu işlem 'antijen maskeleyme' olarak adlandırılır. Bu gerçeğin bir sonucu olacak ki, tümör hücreleri normal hücrelerden daha fazla

glikokaliks molekülleri eksprese eder. Benzer şekilde, bir takım tümörler pıhtılaşma sistemini aktive edip kendilerini fibrin kozası içine alarak immün sistemden gizlenirler⁵.

Bunlara ilaveten, tümör hücreleri tarafından salgılanan transforming growth factor-beta (TGF- β), IL-10 ve prostaglandin E2 (PE2)' yi de içeren çok sayıdaki sitokinler, hormonlar ve diğer moleküller immüniteyi baskılayıcı özelliklere sahiptirler. TGF- β şimdiye kadar tanımlanan en etkili immünosupresör moleküldür ve tümör hücreleri tarafından salgılanan TGF- β düzeyi metastatik potansiyel ile doğru orantılıdır. Hayvan modellerinde bu molekülün nötralizasyonu veya inhibisyonunun, meme kanseri, melanoma ve malign gliosarkoma'yı da içeren bir çok tümörlerde metastaz gelişimini ve büyümeyi engellediği gösterilmiştir. Birkaç farklı tümör hücrelerinin de tümör antijenlerine duyarlı olan lenfositleri apoptozise teşvik eden Fas Ligand (FasL) eksprese ettiği gösterilmiştir. Tümör hücreleri aynı zamanda Dentritik hücreleri (DC) de içeren antijen sunucu hücreler (APC) tarafından antijen işlenmesi ve sunumunu da negatif yönde etkileyerek konakçının savunma sisteminden kaçır. Bunların yanında, ortaya çıkan kanserlere karşı oluşan immün yanıtın zayıf olması, kanser hücrelerinin yüzeylerindeki antijenlerin çoğunun organizmanın tolere ettiği, kendine ait antijenler olmasındandır^{5, 26-51}.

Yukarıda da belirtildiği gibi, tümör hücreleri bir şekilde; immünosüpresör moleküller salgılamaları ve zayıf immünöjeniteleri nedeniyle, immün sistemden kaçabilmekte ve/veya tolere edilebilmekte, yani immün sistemin anormal hücrelere karşı olan sorumluluğu zayıflatılmaktadır. Fakat, değişik genler (TSA ve sitokinler gibi) kullanılarak gerçekleştirilen immünotedavi sayesinde immünitenin güçlendirilmesiyle, oluşan tümör kitleleri immün sistem tarafından ortadan kaldırılabilen ve yayılması önlenmektedir.

2.2. DNA Aşıları ile İmmünotedavi

DNA aşıları, humoral ve hücresele immün yanıtların oluşturulmasında antijenlerin (antijen-spesifik immün tedavi) veya uyarıcı faktörlerin *in vivo* ekspresyonları için geliştirilmiş yeni bir yöntemdir. Bu yöntem aynı zamanda bir

çok hastalığın pre-klinik modellerinde koruyucu immünite geliştirilmesini de gündeme getirmiştir. DNA aşılarında proteinin kendisini, canlı bir ajanı veya bir patojenin zayıflatılmış formunu kullanmak yerine patojen veya tümörlerin proteinlerini kodlayan genler kullanılır. DNA aşılarında (ve aynı zamanda gen tedavisinde) plazmit veya viral (retrovirüs, adenovirüs veya adeno ilişkili virüs kökenli) vektörler kullanılır. Plazmit vektörler güçlü bir viral promotor, ilgili gen, poliadenilasyon/transkripsiyonel terminasyon dizileri ve bakteriyel sistemde seçici bir marker gen taşır. Plazmit vektörler bakteride (*E. coli*) çoğaltılır, saflaştırılır, bir tuz solüsyonunda çözülür ve sonra da konakçıya enjekte edilir. Plazmit DNA, (mekanizması tam olarak açıklanamayan bir yolla) enjeksiyon bölgesindeki hücreler tarafından alınır. Plazmitler ökaryotik hücrelerde fonksiyonel olan replikasyon orijinleri taşımayacak şekilde hazırlanır; bu tür plazmitler ökaryotik hücrelerde ne çoğalırlar ne de kromozoma entegre olurlar (insersiyonel mutageneze neden olmazlar). Plazmit DNA'lar zararsız olup çok zayıf bir immünojeniteye sahiptirler (bu nedenle de sık aralıklarla uygulanabilirler). Enfeksiyöz olma potansiyeli yoktur, intravenöz yolla enjekte edildiklerinde toksisiteleri de yoktur. Viral vektörlere göre daha kolay hazırlanabilirler, yüksek saflıkta izole edilebilirler, proteinlere ve diğer biyolojik polimerlere göre de son derece dayanıklıdırlar. Viral kaynaklı vektör moleküllerinin transdüksiyon verimleri yüksek olmasına karşın üretim ve saflaştırılmalarındaki zorluk ve bir takım potansiyel problemler kullanımlarını kısıtlamaktadır. Diğer taraftan, plazmit DNA'lar güvenilirlikleri açısından viral vektörlere iyi bir alternatiftir. Toksisiteleri çok düşük olduğu gibi büyük ölçekli üretimleri de oldukça kolaydır. Plazmit DNA'lar kas içine, peritona ve deri altına enjekte edilebilirler. Deri altına enjeksiyon durumunda buradaki keratinositler, fibroblastlar ve dentritik hücreler plazmitleri daha verimli bir şekilde alırlar. Plazmitler için dezavantaj ise transdüksiyon verimlerinin düşük olmasıdır. Transdüksiyon verimini yükselten uygulamalar (bir takım ligandlarla birlikte kullanım, elektroporasyon ve lipozom aracılı kullanım gibi) ile de bu sorun çözümlenebilmektedir. Lipozom aracılı gen aktarımında; plazmit DNA'lar polikasyonik lipidlerle karıştırılarak lipozom/DNA kompleksleri oluşturulur. Bu yapıların hedef hücre zarı ile birleşerek gen aktarımını sağladığı

düşünülmektedir. Bu amaçla kullanılan değişik lipid preparasyonları (DOPE, DOTMA, DOSPA, DDAB, DOGS, DOTAP, DMRIE gibi) ticari olarak mevcut olup lipozom/plazmit komplekslerinin hazırlanması da oldukça kolaydır. Bu yapılar non-immünojenik olup minimal sistemik toksisiteye sahiptir, çok sayıda hücre tipine gen aktarımı yapabilmektedir ve aynı bireye tekrar tekrar uygulanabilmektedir. Kanseri hücrelerinin immün sistem tarafından yok edilmesi (immünotedavi) amacı ile sitokin genlerinin kullanılması, kansere karşı pasif immünite ($CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerini aktive ederek) sağlamak veya aktif immüniteyi (antijenik determinantlarla immünizasyonla) uyarmak veya güçlendirmek içindir^{3-7, 52-60}.

Tümör mikro-çevresine konakçı tarafından salgılanan sitokinlerle, anti-tümör immün yanıt potansiyel olarak artırılmaya çalışılır. Teorik olarak tümör hücreleri tarafından sitokin salgılanması:

- a) tümör kitlesinde antijen sunucu hücrelere olan gereksinimi artırır.
- b) İmmün hücrelerin çoğalmasını teşvik eder.
- c) Tümör hücreleri üzerindeki immün efektörler veya antijen sunucu hücreler tarafından tanınan moleküllerin ekspresyonunu düzenler.
- d) İmmün efektör hücrelerin infiltrasyonunu sağlar.

Yapılan çok sayıdaki çalışma, salgılanan sitokin miktarı ile anti-tümör immün yanıt arasında güçlü bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Dışarıdan verilen sitokinle, aynı sitokinin hücreler tarafından salgılanmasıyla oluşturulan immün yanıt mekanizması temelde farklıdır. Sitokinlerin hücreler tarafından salgılanması, aynı zamanda tümör bölgesindeki hücrelerin sitokine maruziyet derecesini de arttıracaktır^{3-7, 14}.

Tümör gelişimi sırasındaki immün modülasyonun rolünün anlaşılması önemli bir ilgi odağı olarak durmaktadır. Aynı zamanda, antijenlerin T hücreleri tarafından mükemmel bir şekilde tanınması kanser immünotedavisi için önemli bir temel oluşturmaktadır. Tümör yıkımını etkili bir şekilde yapabilmek için toksisiteyi minimuma indirmek ve tümör hücrelerini normal doku hücrelerinden ayırabilmek oldukça kritiktir. Tümör aşılı hazırlamada tümör spesifik antijenler (TSA) kullanılabildiği gibi immüniteyi güçlendirmek için sitokin genleri de kullanılmaktadır. Bu amaçla yapılan çok sayıdaki çalışmada sitokin genleri tek veya kombine şekilde, viral veya plazmit vektörlere klonlanarak immünotedavi için kullanılmış ve kayda değer sonuçlar alınmıştır^{4-6, 53-56}.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu tez çalışmasında kullanılmış olan başlıca gereçler; *biyokimyasal maddeler, canlılar, kitleler, alet-teçhizat ve sarf malzemelerinden* oluşmaktadır.

Biyokimyasal maddeler: *Pfu* DNA polimeraz, dNTP seti, T4 DNA ligaz, Calf Alkale fosfat, genlerin klonlanmasında ve analizlerinde gerekli olan restriksiyon edonükleazlar (*Sma* I, *Not* I, *Kpn* I, *Eco* RI, *Pvu* II, *Hae* III, *Hind* III, *Hinf* I ve *Mae* III), pBluescript plazmit vektörü (Fermentas)⁶¹, *Taq* DNA polimeraz (Qiagen, Sigma), lizozim ve IL-2 genlerine özgün primer dizileri (MolBio), mL-2 cDNA klonu (pUMVC3mIL-2, Aldevron), pHM6 memeli plazmit vektörü, Geneticin (G 418), Lipozom (DOTAP) (Roche)⁶², EDTA, tris baz, borik asit, sükröz, lizozim (Sigma), HCl, NaOH, SDS, agaroz, akrilamid, bisakrilamid, APS, TEMED, NaCl, Trypton, Yeast extract, Potasyum ferrosiyanit ($K_4Fe [CN]_6$), Potasyum ferrisiyanit ($K_3Fe [CN]_6$), Ampisilin, Tetrasiklin, Gentamisin, DMSO $MgCl_2$, NP-40, gluteraldehit, formaldehit, RPMI 1640, Tripsin-EDTA, FBS/FCS, L-glutamine, X-gal, Potasyum hidrojen fosfat, Sodyum hidrojen fosfat dihidrat (Sigma)⁶³.

Canlılar: B-16V (DSMZ)⁶⁴ ve B16-FO⁶⁵ (Gazi Üniv. İmmünoloji Lab) melanoma hücre hatları, *E. coli* XL1-Blue MRF', (Stratagene)⁶⁶, *Micrococcus luteus* (Sigma), C57BL/6 ve Balb/c fare ırkları (Fizyoloji Anabilim Dalı).

Kitler: Endotoxin-free Plazmit Midiprep Kit (PLED-35), mRNA izolasyon kiti (Sigma), cDNA sentez kiti, DNA Extraction Kit (Fermentas).

Alet-Teçhizat: Yatay ve dikey elektroforez tankları (Bigen, Biolab), güç kaynağı (E-C, Consort), pH metre (InoLab), vorteks, manyetik karıştırıcı, fırın (Nüve), hassas terazi (Sartorius, Shimadzu), su banyosu (Grant), mikrodalga fırın, buz dolabı (Arçelik), jel görüntüleme ve dokümantasyon sistemi (Uvitec),

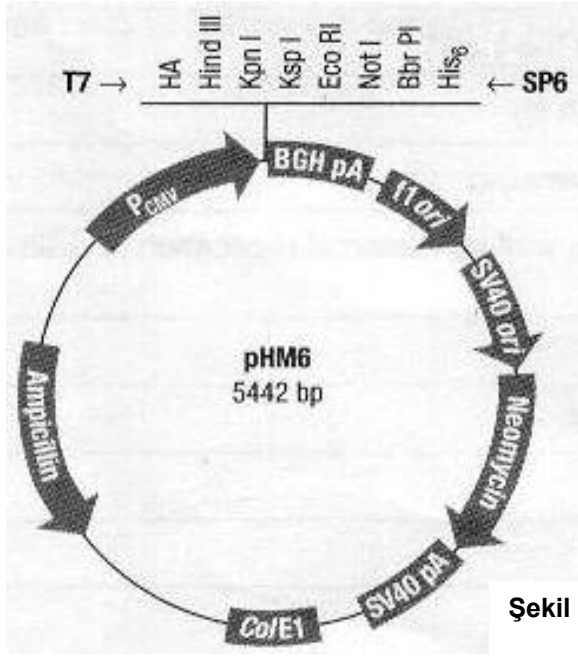
invert mikroskop (Olympus), Termal cykler (Eppendorf), mikro pipetler(Gison, Rainin, Socorex, Biohit), sallamalı etüv (Dedeoğlu), temiz hava kabini (lamin air flow) (Kojair KR-125 Safety), derin dondurucu (Siemens, Roche), CO₂ inkübatörü (Shell Lab, Sanyo), etüv (Mettler), santrifüjler (Hettich, Techne), Thoma Lamı, kumpas, spektrofotometre (Shimadzu, Pharmacia-Biotech Gene Quant), sıvı azot tankı, otoklav (Trans).

Sarf Malzemeleri: Filtreli hücre kültür flaskı (TPP), 15 ml'lik kültür tüpü, pastör pipetleri, kriyo tüpleri, insülin enjektörü, 1.5 ml'lik mikro santrifüj tüpleri, 0.2 ml'lik PCR tüpleri, pamuk, petri kutuları (6, 8 ve 10 cm çaplı), erlenmayerler (50, 100, 250, 500 ve 1000 ml'lik), filtre (0.22 µm por çaplı) (Millex), filtreli steril mikropipet uçları (200 ve 1000 µl'lik), pamuk tıkaçlı steril cam pipetler (2, 5, 10, ve 20 ml'lik), enjektörler (1, 2, 5, 10, ve 20 ml'lik), cam baget.

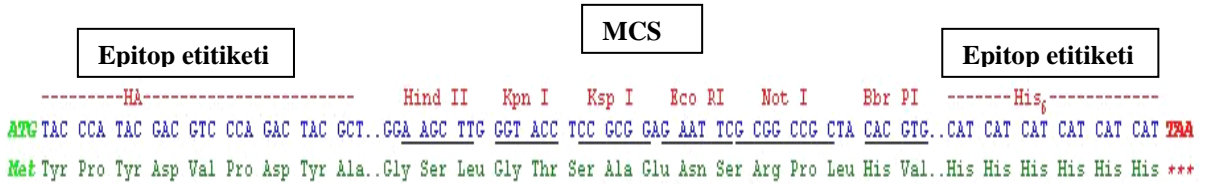
3.1.1. Gereçlerden Bazılarının Genel Özellikleri ve Kullanım Amaçları

a) pHM6 Memeli Ekspresyon Vektörü

pHM6 memeli ekspresyon vektörü 5442 bp uzunluğunda bir plazmit vektör olup birçok *E. coli* suşunda da (XL1 Blue MRF', DH5α, JM109 gibi) çoğalabilme özelliğindedir (mekik vektör). Çoklu klonlama bölgesi (MCS) bölgesine takılan bir genin memeli hücrelerinde yüksek düzeyde ekspresyonunu sağlayacak şekilde tasarlanmıştır. Vektör, SV40 ile enfekte veya SV40 large T antijeni (örn. COS7) eksprese eden hücre hatlarında epizomal (kromozomal DNA ile eş zamanlı fakat bağımsız) olarak çoğalır. Eksprese olacak proteine mümkün olduğu kadar az ekstra amino asit (aa) ilavesi için restriksiyon enzimleri tanıma dizilerinin bulunduğu çoklu klonlama bölgesi mümkün olduğu kadar kısa tutulmuştur (6 restriksiyon enzimi için toplam 45 bp). Vektörün genel haritası **Şekil 3.1.**'de, çoklu klonlama bölgesi **Şekil 3.2.**'de, sahip olduğu diziler ve özellikleri de **Çizelge 3.1.**'de görülmektedir. Vektör, Roche'dan⁶² satın alınmıştır.



Şekil 3.1. pHM6 memeli ekspresyon vektörü



Şekil 3.2. pHM6 vektörü çoklu klonlama bölgesi (MCS) ve epitop etiketleri

Çizelge 3.1. pHM6 memeli ekspresyon vektörünün özellikleri.

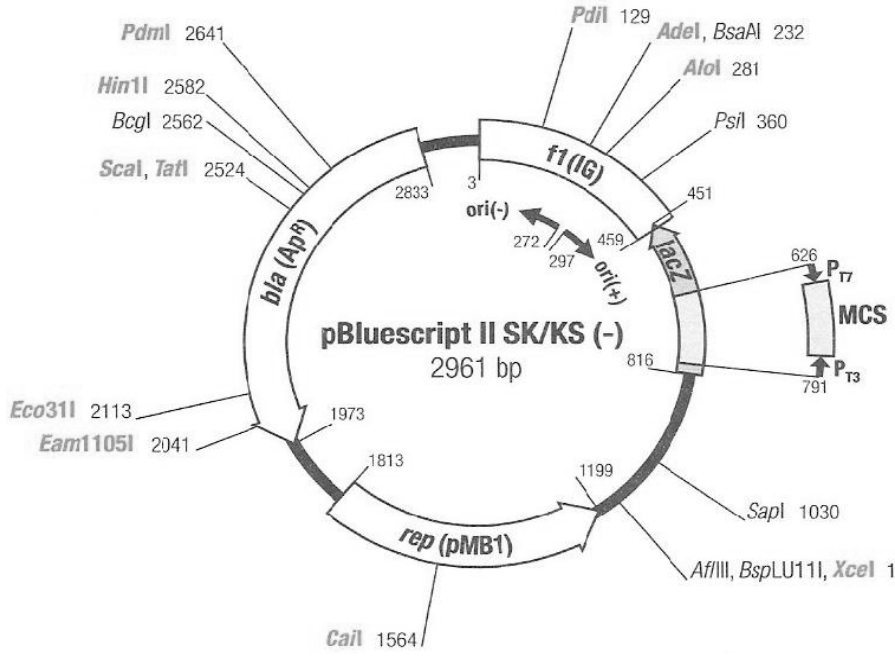
Not: pHM6 vektörü çok amaçlı olarak tasarlanmış bir vektör olduğundan bizim çalışmamızla ilgili olan diziler * ile belirtilmiştir.

Dizi	Fonksiyonu
* 1. İnsan cytomegalovirus immediate-early promotor/enhancer (pCMV) dizisi.	- Rekombinant proteinin (klonlanan protein) memeli hücrelerinde yüksek düzeyde ekspresyonunu sağlar.
2. T7 promotor/priming dizisi.	- Hem anlamlı RNA'nın <i>in vitro</i> transkripsiyonunun hem de eklenen genin dizi analizinin yapılmasını sağlar.
3. N ve C-terminal epitop etiketleme (HA ve His ₆) dizileri.	- İlgili rekombinant proteinin özel antikorlarla daha sonra kolay bir şekilde izolasyonu için N ve C-terminal uçlarına HA ve His ₆ ilave eder (Şekil 3.2).
* 4. Çoklu klonlama bölgesi.	- Klonlanacak genin epitop etiketi ile aynı okuma çerçevesine yerleştirilmesini sağlar (Şekil 3.2).
5. Sp6 promotor/priming dizisi.	- Hem <i>in vitro</i> anlamsız RNA transkripsiyonunun hem de insörtün dizi analizinin yapılmasını sağlar.
* 6. Sığır büyüme hormonu poliadenilasyon (BGHpA) sinyali.	- mRNA transkripsiyonunun etkin bir şekilde sonlandırılması ve poliadenilasyonunu sağlar.
7. f1 orijini.	- Tek iplikli dizi analizi ve mutasyon çalışmaları için

* 8. SV40 erken promotor ve orijin (SV40 ori) dizisi.	anlamli ipliğın korunmasını sağlar. - Memeli hücrelerinde neomisin direnç geninin yüksek düzeyde ekspresyonunu ve SV40 large T antijeni eksprese eden hücrelerde epizomal olarak replikasyonunu sağlar.
* 9. Neomisin direnç (G418) geni.	- Transfekte memeli hücrelerinin seçimini sağlar.
* 10.SV40 poliadenilasyon dizisi.	- mRNA transkripsiyonunun sonlandırılması ve poliadenilasyonunu sağlar.
* 11.ColE1 orijini (pUC plazmiti kaynaklı).	- Plazmitin (pHM6) <i>E. coli</i> 'de yüksek kopya replikasyonunu sağlar.
* 12.Ampisilin direnç geni.	- Vektörü taşıyan <i>E. coli</i> klonlarının seçimini sağlar.

b) pBlueScript II

pBluescript II fajmidi (pBS) 2961 baz çifti (bp) uzunluğunda bir vektördür. Bu fajmid tek bir sistemde, DNA klonlaması, dideoksi DNA dizilemesi, *in vitro* mutagenез ve *in vitro* transkripsiyon işlemlerinin yapılabilmesi için tasarlanmıştır. Önemli yapılarından bazıları; 1) *rep* (pMB1): fajmidin replikasyonundan sorumlu bölge. 2) *bla* (Ap^R)-geni: ampisiline direnç sağlayan β-laktamaz enzimini kodlar. 3) *LacZ* geni: *E. coli lac* (laktoz) operonundan β-galaktozidaz'ın α-komplementini (amino-terminal parçasını) kodlayan DNA parçasıdır. Bu gen içine açık okuma çerçevesini (open reading frame -ORF-) bozmayacak şekilde çok sayıda (pBS'de 26 adet) restriksiyon endonükleaza ait tanıma dizileri yerleştirilerek oluşturulan 'çoklu klonlama bölgesi' (MCS) enzim aktivitesine zarar vermez. Bu özellikteki vektörler β-galaktozidaz'ın karboksiterminal parçasını kodlayan konakçı hücrelerle birlikte kullanılır. Ayrı ayrı olduklarında aktivite göstermeyen bu iki parça bir araya geldiğinde aktif bir enzim oluşturur. β-galaktozidaz, kromogenik ve laktoz analogu bir madde olan X-gal'i (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) parçalayarak mavi renkli bir madde oluşumu sağlandığından, X-gal'li plaklarda bu özellikteki bakteriler mavi renkli görünürler. MCS içine yapılan klonlamada β-galaktozidaz'ın α-komplementi sentezlenemediği için (gen inaktive edildiğinden), aynı ortamda rekombinant plazmiti taşıyan bakteriler beyaz renkli koloni oluştururlar⁶⁷⁻⁶⁸. Vektörün yapısı **Şekil 3.3**'de görülmektedir. pBS bu çalışmada genlerin pHM6'ya klonlanmasında aracı vektör olarak kullanılmıştır. Fermentas'dan⁶¹ satın alınmıştır.



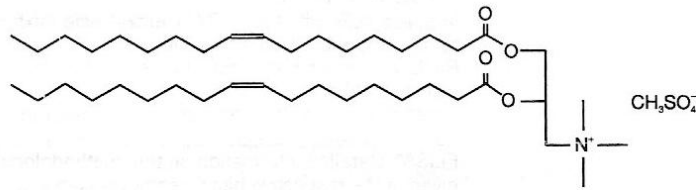
Şekil 3.3. pBluescript II vektörü (pBS)

c) DOTAP (Lipozom)

Kimyasal adı: N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate

Moleküler formülü : $C_{43}H_{83}NO_8S$

Moleküler ağırlığı : 774.21



Şekil 3.4. DOTAP'ın Moleküler yapısı

Ökaryotik hücrelerde gen regülasyonu ve ekspresyonunu çalışmak amacıyla çok çeşitli DNA aktarım (transfeksiyon) yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları kalsiyum fosfat veya diğer divalent katyonlar, polikasyonlar, retroviruslar, mikro-enjeksiyon, ve elektroporasyon gibi yöntemlerin kullanımlarıdır. Bu yöntemlerde karşılaşılan en büyük sorunlardan bazıları hücre toksisitesi, zayıf üreme ve hücrelere yeterli miktar DNA aktaramamaktır. Transfeksiyon repertuarına önemli bir ilave katyonik lipozom formülasyonlarının

kullanımı olmuştur (lipofeksiyon). DNA, RNA, ribonükleoprotein partikülleri ve proteinler DOTAP'la etkin bir şekilde hücrelere aktarılabilen ve karşılaşılan sorunları da önleyebilmektedir.

DOTAP'ın DNA ile karıştırılması pozitif yüklü bu küçük lipit kesecikleri (lipozomlar) ile negatif yüklü DNA molekülleri arasında dayanıklı kompleksler oluşumunu sağlamaktadır. Bu kompleksler serumlu yada serumsuz doku kültür ortamlarına doğrudan ilave edilebilmektedir. Lipit keseciklerinin hücrelerin zarına teması ile de kesecikler ve DNA molekülleri hücre içine aktarılmaktadır. DOTAP ile hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamlara başarılı bir şekilde DNA transferi yapılabilmekte ve 150 µg/ml'ye kadar hücreler için toksik olmadığı bildirilmektedir^{62, 63, 68, 69}.

d) Genetisin (G418)

Genetisin (G 418) aminoglikozit türü bir antibiyotiktir. Yapısı gentamisin, neomisin ve kanamisin benzemesine rağmen ökaryotik ribozomların 80S ünitesine bağlanarak protein sentezini bloke eder. Genetisin, neomisin direnç geni tarafından inaktive edilmektedir (bu çalışmada kullanılmış olan pHM6 plazmit vektörü üzerinde de neomisin direnç geni bulunduğundan bu plazmitlerle transfekte hücreler genetisin'li ortamda üreyebilmekte ve bu şekilde transfekte hücrelerin seçilimi sağlanabilmektedir). Kullanılacak Genetisin miktarı 50 – 1000 µg/ml arasında değişmekte olup her hücre tipi için optimize edilmesi gerekmektedir.

Bizim kullandığımız B-16V hücreleri için bu miktar 500 µg/ml olarak belirlenmiştir (bu miktarda Genetisin kullanıldığında B-16V hücreleri üreyememektedir, ancak plazmitlerle transfekte olanlar üremelerine normal şekilde devam etmektedir).

e) *Eschericia coli* XL1-Blue MRF'

Rutin klonlama çalışmalarında kolaylıkla kompetent hale getirilip konakçı olarak kullanılan mükemmel bir suşdur. Hiç plazmit bulundurmaması, aktarılan

plazmit DNA'nın özgün olarak taşınmasını ve tekrar elde edilebilmesini, kromozomal DNA üzerindeki F' epizomu ile taşınan tetrasiklin direnci ise kontaminasyonun önlenmesini sağlar. *recA1* ve *endA1* gibi mutant özellikleri ise rekombinasyonda parça değişiminden sorumlu enzimden yoksun olmasını (plazmitin kromozomal DNA'ya entegrasyonunu önlemek için) ve plazmitin bakteride çok sayıda bulunabilmesi ve izolasyon sonunda yüksek kalite ve verimde plazmit DNA'sı elde edilmesini sağlamaktadır^{68, 70}. Stratagene'den satın alınmıştır.

f) B-16V Melanoma hücresi

Genetik olarak aynı özelliklere sahip (syngeneic), inbred C57BL/6 fare ırkında büyüyen B16 melanoma tümöründen geliştirilmiştir. Plak yüzeyine yapışarak gelişen (adherent) epitelyal hücrelerdir, plak yüzeyini %80 oranında doldurmaktadırlar. RPMI 1640 medyumunu ile %10'luk FBS, 37 °C ve %5'lik CO₂'li ortamda kültüre edilirler. Katlanma zamanı (doubling time) 30-50 saattir, yaklaşık iki günde bir 1:5 şeklinde (bir flask 5 flaska paylaştırılarak) pasajı yapılır. Normal fare karyotipine sahiptir (20 çift kromozom). Alman Mikroorganizma ve Hücre Kùltürleri Koleksiyonundan (DSMZ)⁶⁴ satın alınmıştır.

g) B16-F0 Melanoma hücresi

B-16V ile aynı kökenli ve hemen aynı özelliklere ve kültür koşullarına sahiptir⁶⁵. Gazi Üniversitesi Tıp Fakùltesi İmmünoloji Anabilim Dalı başkanı, sayın Prof. Dr. Cemalettin AYBAY'dan alınmıştır.

h) Fare Irkı (C57BL/6)

Kullanılan C57BL/6 ırkı fareler *Mus musculus* orijinli inbred farelerdir. Ç. Ü. Tıp Fakùltesi Fizyoloji Anabilim Dalı tarafından sağlanmış olup, bakım ve takipleri de buradaki fare laboratuvarında yapılmıştır.

i) mRNA izolasyon kiti (Sigma)

Kit içeriği;

- Stock Buffer,
- Rnase/protein Degrader,
- Sodium Chloride (5 M),
- Oligo(dT) Cellulose,
- Low Salt Wash Buffer,
- Binding Buffer,
- Sodium Acetate (2 M),
- Elution Buffer,
- Glycogen Carrier,
- Disposable Spin Columns/2 ml Microcentrifuge Tubes,
- 1.5 ml Microcentrifuge Tubes.

Hücreler RNaz inhibitörü varlığında lizis tamponla parçalanır ve ortama geçen mRNA molekülleri ilave edilen selüloz desteklere bağlı Oligo(dT) molekülleri tarafından tutulur. Mini kolanlara aktarılan lizat, yıkama tamponu ile birkaç kez muamele edilerek her türlü hücre sel artıklardan temizlenir ve elüsyon tamponu ilavesiyle de mRNA molekülleri destek ortamdan tekrar ayrılır ve toplama tüpüne geçer. Saf olarak elde edilen total mRNA kullanıma hazır duruma gelir.

i) DNA Extraction Kit (Fermentas)

Kit içeriği;

- Silica Powder Suspension,
- Binding Buffer,
- Concentrated Washing Buffer,
- TBE Conversion Buffer.

Agaroz jel elektroforezinden sonra istenen DNA bandının jelden kesilip alınarak agarozdan arıtılmasını sağlayan bir kit dir. Genel prensip; agarozun özel bir tampon ve ısı uygulamasıyla (su banyosunda 55 °C) eritilerek DNA moleküllerin pozitif yüklü silika partiküllerine geçici olarak bağlanmasını ve çöktürölüp yıkandıktan sonra da su/TE ile elüsyonunu sağlamaktır. 120 baz çifti ve üzerindeki nükleik asit moleküllerini yaklaşık olarak %80 verimle arıtmaktadır. Bu şekilde proteinler, kullanılmayan primer ve nükleotitler, kalıntı fenol, kloroform, tuzlar ve etidyum bromid DNA'dan uzaklaştırılmaktadır.

j) cDNA sentez kiti (Fermentas)

Kit içeriği;

- RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase,
- Ribonuclease Inhibitor,
- 5X Reaction Buffer,
- 10 mM dNTP Mix,
- Oligo(dT)₁₈ PrimerRandom Hexamer primer,
- Control Primer,
- Control RNA,
- Deionized Water, nuclease free

Kit, Oligo(dT)₁₈ primerinin mRNA'ların poly A kuyruğuna yapışması ve M-MuLV Reverse Transkriptaz enziminin ortamdaki total mRNA'yı DNA'ya (total cDNA) dönüştürmesi prensibi ile çalışmaktadır. Elde edilen ürün RNA/DNA hibridi şeklindedir ve PCR reaksiyonlarında doğrudan kullanılabilir^{68,70-72}.

k) Endotoxin-free Plazmit Midiprep Kit [PLED-35 (Sigma)]

Kit içeriği;

- Resuspension Solution,
- RNase A Solution,
- Lysis Solution,
- Neutralization Solution,
- Endotoxin Removal Solution,
- DNA Binding Solution,
- Column Preparation Solution,
- Optional Wash Solution,
- Wash Solution Concentrate,
- Endotoxin Free Water,
- GenElute Midiprep Binding Columns in Tubes,
- Collection Tubes

Bu kitin kullanım amacı bakteriyel endotoksin içermeyen ve transfeksiyon işlemlerinde kullanılacak kalitede plazmit DNA izole etmektir. Kitde rutin olarak kullanılmakta olan alkalın denatürasyon prensibi esas alınmış olmakla birlikte ilaveten endotoksinden arıtıcı tampon ve DNA'nın tutulduğu midi kolonlar bulunmaktadır. İzolasyon basamakları kısaca şöyledir; kullanılacak plazmiti (pHM6, pHM6mLys veya pHM6mIL-2) taşıyan bakteri 50 µg/ml ampisilin içeren LB besi ortamında bir gece üretilir. Üreme ortamı santrifüjlenerek bakteri peleti

elde edilir. Pelet süspansiyon edilir ve lizis tampon ilavesiyle de nazik bir şekilde parçalanır. Nötralizasyon tamponu ilavesiyle ortam pH'sı aniden düşürülür ve yoğun bir presipitat oluşturulur. Oluşan çökelti santrifüj yapılarak uzaklaştırılır ve süpernatant midi kolonların bulunduğu tüplere aktarılır. Plazmit DNA kolondaki destek ortam tarafından tutulur, yıkama tamponu ile her türlü hücresel artıklar temizlenir. Elüsyon tamponu (saf su) ilave edildiğinde ise DNA destekten ayrılır ve toplama tüpüne geçer.

Elde edilen plazmit DNA oldukça saf ve süper sarmal oranı yüksektir, ökaryotik hücrelere zarar veren bakteriyel endotoksinlerden de arıtılmış durumdadır.

3.2. Yöntem

Giriş bölümünde bahsedildiği gibi, bu tez çalışmasının amacını fare lizozim ve interleükin-2 genlerinin pHM6 memeli ekspresyon vektörüne klonlanması, ve daha sonra da B-16V melanoma hücreleri üzerinde anti-tümöral etkilerinin değerlendirilmesi oluşturmaktadır. Bu amaca yönelik olarak yapılan uygulama ve kullanılan yöntemler;

- **Gen Klonlama,**
- **Hücre Kültürü,**
- **Lipozomal Transfeksiyon,**
- **Fare Denemeleri,**
- **Verilerin Alınması ve Analizi,**

olmak üzere 5 ana başlıkta toplanmıştır. Yapılan bütün uygulamalar ve kullanılan yöntemlerde konuyla ilgili daha önce yapılmış çalışmalardan ve standart protokol ve uygulamalardan yararlanılmış olup faydalanılan kaynak/kaynaklar belirtilmiştir. Yöntemlerin uygulaması sırasında kısmen farklı uyarlamalar da yapılmıştır.

Ayrıca, çalışmalar temel mikrobiyoloji, hücre kültür teknikleri ve moleküler biyoloji laboratuvar çalışma ilkelerine (**Ek 2.1**) uygun bir şekilde, gereken her türlü dikkat ve özen gösterilerek ve önlemler alınarak yapılmıştır.

3.2.1. Gen Klonlama

Bir gen klonlama çalışmasında klonlanacak gene ait DNA parçası, vektör DNA, ilgili restriksiyon ve ligasyon enzimleri ve vektör DNA'ya uygun konakçı bakteri gerekmektedir. Aşağıda, bu çalışmada kullanılan genlerin klonlanması sırasında uygulanan bir takım yöntem ve stratejilerden genel olarak bahsedilmiştir. Ticari olarak sağlanan kitlerin genel çalışma prensibi verilmiş ve protoklleri özetlenmiştir.

3.2.1.1. Total cDNA elde edilmesi

Kullanılan pHM6 memeli ekspresyon vektörü, açık okuma çerçevesi (ORF) çoklu klonlama bölgesine bağlanan bir geni transkribe edecek şekilde tasarlanmıştır (**Şekil 3.2**). Ökaryotik genler intron içerdiğinden bu hücrelere ait bir gen fonksiyonel amaçla klonlanacağı zaman, intron içermeyen mRNA molekülleri hedef alınmaktadır. Bu amaçla hücrelerden elde edilen mRNA molekülleri izolasyonu takiben daha stabil bir molekül olan cDNA'ya dönüştürülerek PCR'la (RT-PCR) çoğaltılmaktadır.

Çalışmada, C57BL/6 fare ırkının kan, dalak ve timüs dokularından Sigma mRNA mikro izolasyon kiti kullanılarak total mRNA elde edilmiş ve Fermentas First Strand cDNA sentez kiti kullanılarak da buradan elde edilen mRNA total cDNA'ya dönüştürülmüştür. Bu işlemler sırasında kit protokolleri uygulanmış ve üretici firmaların önerileri dikkate alınmıştır.

mRNA izolasyonunda, materyalin kan veya doku olmasına göre hücrelerin hazırlanması aşağıda verildiği şekilde yapılmış ve daha sonra da kit protokolü aynen uygulanmıştır.

Materyal kan ise:

- Fare eterle bayılarak kalbinden 0.5 ml kan alınır ve 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılır,
- Üzerine 1 ml eritrosit lizis tampon (**Ek 1.1**) ilave edilerek karıştırılır ve oda ısısında 3-5 dakika beklenir,
- 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir,
- süpernatant atılır ve üzerine 0.5 ml eritrosit lizis tampon ilave edilir,

- Pelet çözülür ve aynı şekilde tekrar santrifüjlenir ve süpernatant atılır,
- Pelet 1 ml fizyolojik tamponla çözülür ve 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir ve süpernatant atılır.

Materyal doku ise:

- Yaklaşık 100 mg doku alınır ve steril bir havanda sıvı azot ile muamele edilerek kurutulur ve öğütülür,
- Hücreler fizyolojik tampon ile yıkanır ve 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek süpernatant atılır,

Bu şekilde elde edilmiş olan hücre peletine kit protokolündeki işlemler uygulanmıştır. Takip edilen basamaklar ana hatlarıyla şu şekildedir:

- Hücreler lizis tampon ile parçalanır,
- Oligo (dT) selüloz ilave edilerek mRNA'lar yakalanır,
- Protein, kaba hücresel artıklar, kromozomal DNA ve diğer RNA molekülleri yıkanarak uzaklaştırılır,
- Elüsyon tamponu ilavesiyle mRNA selüloz destekten ayrılır ve santrifüjlenerek temiz bir tüpte toplanır.

Elde edilen mRNA'dan 2 µl (~ 200 ng) alınarak aşağıdaki uygulamayla cDNA'ya dönüştürülür, geriye kalan miktar -20 °C'de saklanır.

Tek iplikli total cDNA sentezi: Yukarıdaki işlemlerle elde edilen total mRNA'nın ~ 200 ng'ı 'Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit' kullanılarak bire bir cDNA'ya dönüştürülür. Reaksiyon bileşimi şu şekildedir;

Poly(A) RNA	2 µl (~ 200 ng)
Oligo(dT) ₁₈ primer	1 µl (0.5 µg)
Deiyonize su (RNaz free)	6 µl
	↓ 70 °C'de 5 dak (annealing)
5x reaksiyon tamponu	4 µl
Ribonükleaz inhibitörü	1 µl (20 U)
10 mM dNTP mix	2 µl
	↓ 37 °C'de 5 dak (enzimatik aktivite)
RevertAid™M-MuLV (reverse transkriptaz)	1 µl (200 U)
	+ _____
	20 µl
	↓ 42 °C'de 60 dak (sentez)
	↓ 70 °C'de 10 dak (reaksiyon durdurulur)

3.2.1.2. RT-PCR/PCR Amplifikasyonları

Revers Transkriptaz-PCR (RT-PCR), mRNA'nın Avian Myeloblastosis Virus (AMV) veya Molony Murine Leukemia Virus (M-MLV)'den elde edilen ve RNA bağımlı DNA polimeraz aktivitesine sahip olan Revers Transkriptaz enzimi ile mRNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesi ve PCR reaksiyonlarında kalıp DNA olarak kullanılmasını sağlayan bir PCR yöntemidir^{67, 68}.

Öncelikle, elde edilen total cDNA içinden fare lizozim ve IL-2 genlerinin çoğaltılıp izole edilmesi ve pHM6 vektörüne klonlamada kullanılabilmesi için bu genlere özgün primer dizilerinin hazırlanması gerekmektedir. Bu amaçla, fare lizozim ve interlökin-2 genlerine ait cDNA nükleotit dizileri ncbi⁷³ veri tabanlarından elde edilerek genlerin ORF dizisini (proteine dönüşen dizi) özgün bir şekilde amplifiye edecek olan primer dizileri belirlenmiştir. Primer dizilerinin belirlenmesinde ve genlere ait nükleotit dizilerinin içten kesim yapan restriksiyon endonükleaz enzimleri açısından analizinde GeneRunner⁷⁴ programı kullanılmıştır. Aynı zamanda, pHM6 plazmit vektörünün çoklu klonlama bölgesinde yer alan ve analizlerde gen dizileri içinde kesim yapmadığı tespit edilen iki enzime (*Kpn* I ve *Eco* RI) ait tanıma dizileri (GGTAC/C ve G/AATTC), belirlenen primer dizilerinin 5' uçlarına genlerin okuma çerçevesini bozmayacak şekilde ilave edilmiştir. Hazırlanan primer dizileri yine aynı programla analiz edilerek hem kendisiyle hem de diğer primerle dimer oluşturmaları açısından değerlendirilmiş ve gerekli düzenlemeler yapılmıştır. Genlere ait mRNA sekansları ve yukarıda bahsedildiği şekilde hazırlanarak PCR reaksiyonlarında kullanılmış olan primer dizileri aşağıda verilmiştir:

A) FARE İNTERLÖKİN-2 GENİ (mIL-2)

LOCUS NM_008366 939 bp mRNA linear ROD 22-DEC-2003
DEFINITION Mus musculus **interleukin 2 (IL2), mRNA.**
ACCESSION NM_008366 XM_109393 XM_207774
VERSION NM_008366.2 GI:31982837
SOURCE Mus musculus (house mouse)
ORGANISM Mus musculus Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.

CDS 48..557
/gene="Il2"

```

/product="interleukin 2"
/protein_id="NP_032392.1"
/db_xref="GI:7110653"
/db_xref="GeneID:16183"
/db_xref="LocusID:16183"
/db_xref="MGI:96548"

/translation= (169 aa)
MYSQLASCV TLTLVLLVNS APTSSSTSS TAEAQQQQQ QQQQQQHLEQ LLMDLQELLS
RMENYRNLKL PRMLTFKFYL PKQATELKDL QCLEDELGPL RHVLDLTQSK SFQLEDAENF
ISNIRVTVVK LKGSNDTFEC QFDDESATVV DFLRRWIAFC QSIISTSPQ

sig peptide 48..107
/gene="Il2"
/product="signal peptide (aa-21 to-1)"
mat peptide 108..554
/gene="Il2"
/product="interleukin-2 (aa 1-133)"

```

ORIGIN

```

1   atcacccttg ctaatcactc ctcacagtga cctcaagtcc tgcaggcatg tacagcatgc
61  agctcgcata ctgtgtcaca ttgacacttg tgctccttgt caacagcgca cccacttcaa
121 gctccacttc aagctctaca gcggaagcac agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc
181 agcagcacct ggagcagctg ttgatggacc tacaggagct cctgagcagg atggagaatt
241 acaggaacct gaaactcccc aggatgctca ccttcaaatt ttacttgccc aagcaggcca
301 cagaattgaa agatcttcag tgcctagaag atgaacttgg acctctgogg catgttctgg
361 atttgactca aagcaaaagc tttcaattgg aagatgctga gaatttcata agcaatatca
421 gagtaactgt tgtaaaacta aagggctctg acaacacatt tgagtgccaa ttogatgatg
481 agtcagcaac tgtggtggac tttctgagga gatggatagc cttctgtcaa agcatcatct
541 caacaagccc tcaattaacta tgtacctcct gcttacaaca cataaggctc tctatttatt
601 taaatattta actttaattt atttttggat gtattgttta ctatcttttg taactactag
661 tcttcagatg ataaatatgg atcttttaag attctttttg taagcccaaa gggctcaaaa

```

Not: Primerler; öne doğru (Forward, F), DNA molekülünün (5'→3') tek iplik dizisi üzerinde aynı yönde ve başlama kodonunu (ATG) kapsayacak şekilde, geriye doğru (Reverse, R) ise yine 5'→3 yönünde ama dizinin komplementeri (antipareleli) olacak ve stop kodonu (TAA - IL-2 için - /TGA - lizozim için -) kapsayacak şekilde seçilmiştir. Böylece, primerlerle baştan ve sondan sınırlandırılmış olan ilgili gen bölgesi PCR'la amplifiye edilebilmektedir. Orijinal dizide olmayan kısımlar (restriksiyon kesim bölgeleri ve ilave nükleotitler) *italik* olarak yazılmıştır.

Primerler (IL-2 F ve IL-2 R)

Tanıma dizisi ilave edilen Enzimler: Kpn I (GGTAC/C), Eco RI (G/AATTC)

ATG : genin başlangıcı

TAA : genin sonu

İtalik kısımlar: primerlere fazladan ilave edilmiş olan nükleotitler.

5'..C TCA AGT CCT GCA GGC **ATG** TAC AGC ATG CAG CTC GCA TCC TGT GTC ..3'

5' **ATTAAgggTACC** **ATg TAC AgC ATg CAg CTC gCA** 3' ← IL-2 F

..GC ATC ATC TCA ACA AGC CCT CAA **TAA** CTA TGT ACC TCC TGC TTA CAA ..3'

3' **TAg AgT TgT TCg ggA gTT ATT gAT** **CTTAAgTTTA** 5' ← IL-2 R

B) FARE LİZOZİM GENİ (mLys)

LOCUS BC002069 1271 bp mRNA linear ROD 12-NOV-2003

DEFINITION Mus musculus lysozyme, mRNA (cDNA clone MGC:6186

IMAGE 3593360), complete cds.

ACCESSION BC002069

VERSION BC002069.1 GI:12805218

KEYWORDS MGC.

SOURCE Mus musculus (house mouse)

ORGANISM Mus musculus Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.

gene 1..1271

/gene="Lyzs"

/note="synonyms: Lzm, Lzp, Lys"

/db_xref="LocusID:17105"

/db_xref="MGI:96897"

CDS 23..469

/product="lysozyme"

/translation= (148 aa)

MKTLTLGLL LLSVTAQAKV YERCEFARTL KRNGMAGYYG VSLADWVCLA QHESNYNTRA

TNYNRGDQST DYGFQINSR YWCNDGKTPR AVNACGINCS ALLQDDITAA IQCAKRVVRD

PQGIRAWVAW RAHCQNRDLS QYIRNCGV

ORIGIN

1 gctgaccag cctccagtea cc**atgaagac** tctcctgact ctgggactcc tcttgctttc

61 **tg**tca**ctgct** caggccaagg tctatgaacg ttgtgagttt gccagaactc tgaaaaggaa

121 **tg**aatggct ggctactatg gagtcagcct ggccgactgg gtgtgttttag ctcagcacga

181 **gag**caattat aacacacgag ctacaaacta caaccgtgga gaccaaagca ctgactatgg

241 **gat**at**ttcag** atcaatagcc gatactggtg taatgatggc aaaaccccaa gagctgtgaa

301 **tg**cctgtggg atcaattgca gtgctctgct gcaggatgac atcactgcag ccatacaatg

361 **tg**caaagagg gtggtgagag atccccaagg cattcgagca tgggtggcat ggcgagcaca

421 **ctgt**caaaac cgagatctgt cccagtatat t**cg**gaactgc **ggagctga**c cgcgggtgtgc

481 ttctactgca gctcattcgg tctctttctc actgtaggag tagatatgag agaggtcaca

541 ttccctcgat ttccctccta agtcacagga cttcagcaga aacagggcaa aacagagact

Pimerler (Lys F ve Lys R)

Tanıma dizisi ilave edilen Enzimler: Kpn I (GGTAC/C), Eco RI (G/AATTC)

ATG : genin başlangıcı

TAA : genin sonu

İtalik kısımlar: primerlere fazladan ilave edilmiş olan nükleotitler.
5' G CTG ACC CAG CCT CCA GTC ACC **ATG** AAG ACT CTC CTG ACT CTG GGA ...3'

5' **TgATTTggT** ACC **ATg** **AAg** **ACT** **CTC** **CTg** **ACT** 3' ← Lys F
5' CAG TAT ATT CGG AAC TGC GGA GTC **TGA** CCG CGG TGT GC 3'
3' **C** **TTg** **ACg** **CCT** **CAg** **ACT** **ggC** **TTAAgTAAAT** 5' ← Lys R

Genlere özgün amplifikasyonlar için yukarıdaki işlemlerle elde edilen mRNA/cDNA hibridi, primer dizileri (IL-2 F, IL-2 R/Lys F, Lys R) ve *Pfu* DNA polimeraz enzimi kullanılarak hazırlanmış olan PCR karışımı **Çizelge 3.2**'de, reaksiyon döngüleri ise **Çizelge 3.3**'de verilmiştir (*Pfu* DNA polimeraz proofreading aktivitesine de sahip olup oluşturduğu PCR ürünü küt uçludur).

Çizelge 3.2. IL-2 ve Lys genleri amplifikasyonu için PCR karışımı.

Bileşenler	Alınan hacimler (µl)	50 µl içindeki Miktar
Su (bidistile, steril)	: 38.1/42.1 µl	
Tampon (10X, 2mM MgSO ₄ 'lı)	: 5 µl	
cDNA/pUMVC3mIL-2*	: 5/1 µl	~ 50 ng
Primerler (50 pmol/µl)	: 0.5'er µl	Her biri 25'er pmol
dNTP mix (her biri 25 mM)	: 0.4 µl	200 µM
<i>Pfu</i> DNA polimeraz (2.5 U/µl)	: 0.5 µl	1.25 U
Toplam	: 50 µl	

*Bulgular da bahsedileceği gibi, reaksiyon sonunda lizozim geni için beklenen büyüklükte (472 bp) ürün elde edildiği halde IL-2 geni için [cDNA hazırlama işlemi birkaç defa (kan, dalak ve timus dokularından) tekrar edilmesine rağmen] amplifikasyon sağlanamamıştır. Nedenini araştırıldığında; IL-2 geninin her zaman eksprese olmadığı, ekspresyon için farenin immünize edilmesi gerektiği veya fetal dönemin 14-20. günlerinde fetal timus dokusunda eksprese olduğu^{39,40,41} anlaşılmıştır. IL-2 geni için yeniden bir çalışma protokolü izlemek yerine alternatif olarak, mIL-2 cDNA klonu (pUMVC3mIL-2)^{Ref} temin etme olanağı bulunduğundan PCR'da kalıp olarak bu klon kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. IL-2 ve Lys genleri amplifikasyonu için PCR döngüleri.

İşlem	Isı ve süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95 °C'de 5 dakika	1
Denatürasyon	94 °C'de 45 sn	} 30
Annealing(yapışma)	62 °C'de 45 sn	
Sentez	72 °C'de 1 dakika	
Son sentez	72 °C'de 10 dak	1

PCR ürünü DNA markerla birlikte %0.8'lik agaroz jele (**Ek 1.2**) yüklenmiş ve 100 V 80 mA'de 1 saat elektroforezi yapılarak değerlendirilmiştir. Sonucun beklenen şekilde olması durumunda, aynı koşullarda 2 ayrı tüpte reaksiyon hazırlanmış, ürünün tamamı agaroz jele yüklenerek elektroforezi yapılmış ve genlere ait DNA bantları (535 ve 472 bp'lik bantlar) bistüri ile jelden kesilip alınmıştır (bu işlemin amacı muhtemel nonspesifik amplifikasyonları elimine etmektir). Alınan bantlardaki DNA molekülleri 'DNA Extraction Kit' (Fermentas) ile agaroz jelden arıtılarak kesim ve ligasyon reaksiyonlarında kullanılmıştır.

Ayrıca, IL-2 ve lizozim genlerine ait cDNA dizileri GeneRunner programı ile taranarak ve genler içinde kesim yapan ve RFLP analizinde kullanılacak olan restriksiyon endonükleazlar belirlenmiştir (**Çizelge 3.4**). Buradaki amaç doğru gen dizileri ile devam edildiğinden emin olmaktır ve bundan sonraki bölümlerde de görüleceği gibi bu analiz zaman zaman tekrarlanmıştır. Bu amaçla kullanılan restriksiyon endonükleazlar ve genler içindeki kesim yerleri ve teorik olarak oluşturmaları beklenen parça uzunlukları aşağıda verilmiştir. Kesim reaksiyonları her bir enzim için ayrı ayrı tüplerde hazırlanmış ve üretici firma tarafından önerilen koşullarda yapılmıştır (**Çizelge 3.5A**'da hemen her enzim için standart olan bir kesim reaksiyon protokolü verilmiştir).

Çizelge 3.4. Klonlama ve RFLP analizinde kullanılan restriksiyon endonükleazlar ve tanıma dizileri.

Klonlama için;	RFLP Analizi için
<i>Kpn I</i> : ggtac/c	<i>Hae III</i> : GG/CC
<i>Eco RI</i> : g/aattc	<i>Hind III</i> : A/AGCTT
	<i>Hinf I</i> : G/ANTC
	<i>Mae III</i> : /GTNAC
	<i>Pvu II</i> : CAG/CTG

A) Fare İnterlökin-2 (mIL-2) geni PCR ürünü (535 bp) (5'→3').

Forwed Primer : 5' attaagggta ccatgtacag catgcagctc gca 3'

Reverse Primer: 5' atttgaattc tagttattga gggcttggtg agat 3'

1 *attaag***ggta cc**atgtacag catgcagctc gcaTCCTGTG **TCAC**ATTGAC ACTTGTGCTC
60 CTTGTCAACA GCGCACCCAC TTCAAGCTCC ACTTCAAGCT CTACAGCGGA AGCACAGCAG
120 CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CACCTGGAGC **AGCTG**TTGAT GGACCTACAG
180 GAGCTCCTGA GCAGGATGGA GAATTACAGG AACCTGAAAC TCCCCAGGAT GCTCACCTTC
240 AAATTTTACT TGCCCAAGCA **GGCC**ACAGAA TTGAAAGATC TTCAGTGCCT AGAAGATGAA
300 CTTGGACCTC TGCGGCATGT TCTGGATTT **G ACTC**AAAGCA **AAAGCTT**TCA ATTGGAAGAT
360 GCTGAGAATT TCATCAGCAA TATCAGAGTA **ACTG**TTGTAA AACTAAAGGG CTCTGACAAC
420 ACATTTGAGT GCCAATTCTGA TGAT **GAGTCA** GCAACTGTGG TGGACTTTCT GAGGAGATGG
480 ATAGCCTTCT GTCAAAGCat catctcaaca agccctcaat aacta**gaatt caaat**

Teorikte oluşturmaları beklenen parçalar (bp) :

Hae III : **GG/CC** :262 ve 273
Hind III : **A/AGCTT** :193 ve 342
Hinf I : **G/ANTC** :80, 115 ve 330
Mae III : **/GTNAC** :39, 148 ve 348
Pvu II : **CAG/CTG** :162 ve 373

B) Fare Lizozim (mLys) geni PCR ürünü (472 bp) (5'→3').

Forwed Primer : 5' tgattt**ggta cc**atgaaga ctctcctgac t 3'

Reverse Primer: 5' taaat**gaatt** cggtcagact ccgcagttc 3'

1 *tgattt***ggta cc**atgaagac tctcctgact ctGG**GACTCC** TCCTGCTTTC **TGTCAC**TGCT
60 CA**GGCC**AAGG TCTATGAACG TTGTGAGTTT GCCAGAAGTC TGAAAAGGAA TGGAAATGGCT
120 GGCTACTATG **GAGTC**AGCCT **GGCC**GACTGG GTGTGTTTAG CTCAGCACGA GAGCAATTAT
180 AACACACGAG CTACAACTA CAACCGTGGA GACCAAAGCA CTGACTATGG GATATTTTCTAG
240 ATCAATAGCC GATACTGGTG TAATGATGGC AAAACCCCAA GAGCTGTGAA TGCCTGTGGG
300 ATCAATTGCA GTGCTCTGCT GCAGGATGAC ATCACTGCAG CCATACAATG TGCAAAGAGG
360 GTGGTGAGAG ATCCCAAGG CATTTCAGCA TGGGTGGCAT GGCGAGCACA CTGTCAAAAC
420 CGAGATCTGT CCCAGTATAT TCggaactgc **ggagtc**gac **gaattc**att ta

Teorikte oluşturmaları beklenen parçalar (bp) :

Hae III : **GG/CC** :64, 78 ve 330
Hind III : **A/AGCTT** :472 (kesim yok)
Hinf I : **G/ANTC** : 8, 11, 18, 20, 86 ve 320
Mae III : **/GTNAC** :51 ve 423
Pvu II : **CAG/CTG** :472 (kesim yok)

3.2.1.3. Plazmitlerin *E. coli*'ye Transformasyonu

Mevcut pHM6, pHM6LacZ, pBlueScript ve pUC18 plazmit vektörlere ait DNA molekülleri sınırlı miktarda olduğu için öncelikle *E. Coli*'ye aktarılarak bu vektörlerle transforme rekombinant bakteri stoklarının oluşturulması gerekmektedir. Bu sayede plazmit ihtiyacı duyulduğu zaman ilgili bakteri kültüre alınarak plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. pHM6 ve pBlueScript vektörleri genlerin klonlanmasında, pHM6LacZ kontrol transfeksiyonunda, pUC18 ise *Hae* III restriksiyon endonükleazla kesilerek DNA marker oluşturmada kullanılmıştır. Bu vektörler için konakçı olarak kullanılan *E. coli* XL1-Blue MRF' suşu bakterinin kültür, kompetent hale getirme ve plazmit DNA molekülleri ile transformasyon işlemleri aşağıda verilmiştir. Çalışmanın diğer aşamalarında farklı plazmitlerle yapılan transformasyonlarda da aynı protokol kullanılmıştır.

Bakteri kültürü için gerekli malzemelerden bazıları;

- Petri kutuları (6, 8 ve 10 cm çaplı),
- Erlenmayerler (50, 100, 250, 500 ve 1000 ml'lik),
- Filtre (0.22 µm por çaplı)
- Filtreli steril mikropipet uçları (200 ve 1000 µl'lik) ve Mikropipetler.
- Pamuk tıkaçlı steril cam pipetler ve pompa
- 1, 2, 5, 10, ve 20 ml'lik enjektörler
- Platin uçlu öze ve cam bagetler,
- Sterile edilmiş gliserol (%50'lik),
- LB ve LB-Agar besi ortamları (antibiyotikli ve ve X-gal'li)
- Antibiyotikler (ampisilin ve tetrasiklin)
- Steril kültür tüpleri (15 ml'lik), mikrosantrifüj tüpleri (1.5 ml'lik) ve 2 ml'lik vida kapaklı stok tüpleri (bakteri stokları için).
- Pamuk, alüminyum folyo ve streç film,
- Solüsyonların saklanması için cam şişeler (100 ve 250 ml'lik)

***Kompetent bakteri oluşturma*⁷⁵**

Bakteri gliserol stoku olarak saklanıyorsa;

- Stoktan (-20 °C) alınan tüp 37 °C'de yaklaşık 30 sn tutularak çözülür,

- 5000 rpm'de 3-5 dakika santrifüjlenir ve %70'lik alkolle silinerek kabin içine alınır,
- Tüp kapağı açılarak alevden geçirilir,
- Bakteri pelleti ile 200-300 µl sıvı bırakılarak süpernatant atılır,
- Pellet kalıntı sıvı ile dikkatli bir şekilde çözülür ve tamamı 10 ml LB (**Ek 1.3**) besi ortamı içeren erlene aktarılarak sallamalı etüvde (37 °C'de) üremeye bırakılır,

Bakteri LB-Agar (**Ek 1.4**) plaklarında ise;

- Kabin içine alınan plak alkol alevi önünde açılır,
- Ucu yakılıp soğutulmuş olan öze ile bir koloni alınarak 10 ml LB besi ortamı içeren erlene dikkatli bir şekilde aktarılır ve sallamalı etüvde (37 °C'de) üremeye bırakılır,

Protokol 1: Kompetent bakteri oluşturma ve transformasyon

1. Yukarıdaki ekimlerle üretilmiş olan kültürden tetrasiklin (12.5 µg/ml) (**Ek 1.5a**) ve ampisilin (12.5 µg/ml) (**Ek 1.5b**) içeren iki ayrı erlendeki LB besi ortamına aşılama yapılır (XL1 MRF tetrasikline dirençli, ampisiline hassastır). Bu kültür kontrol amaçlıdır çünkü bakteriyolojik çalışmalardaki en büyük sorunlardan biri kontaminasyondur.
2. Tetrasiklinli ortamda üreme var ampisilinde yoksa, tetrasiklinli ortamdan 10 ml'lik yeni besi ortamına %1 oranında inokülasyon yapılır ve 37°C'de $OD_{500nm} \cong 0.4$ oluncaya kadar (3-4 saat) üretilir (erken log evresine gelene kadar).
3. Etüvden alınan bakteri kültürü buz üzerine konarak soğutulur ve yine buz üzerinde bulunan iki kültür tüpüne 5'er ml paylaşılır.
4. Tüpler soğutmalı santrifüje (+4 °C) alınarak 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir.
5. Süpernatant dökülür ve pellet 5 ml soğuk $MgCl_2$ (0.1 M) ile nazik bir şekilde pipetlenerek çözülür.
6. 5000 rpm'de 10 dakika (+4 °C'de) santrifüjlenir.

7. Süpernatant dökülür ve pellet 3 ml soğuk CaCl₂ (0.1 M) ilave edilerek nazik bir şekilde pipetlenerek çözülür.
8. Buz üzerinde en az 20 dakika inkübe edilir.
9. 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir.
10. Süpernatant dökülür ve pellet 1ml soğuk CaCl₂ (0.1 M) ile tekrar çözülür.
11. Tüplerdeki sıvılar birleştirilir ve nazikçe pipetlenir.
12. Bakteri transformasyona hazırdır. Kaç farklı plazmitle transformasyon yapılacaksa o kadar mikro santrifüj tüpüne (1 adet de kontrol amaçlı) 100'er µl paylaşılır geriye kalan miktar ise %20'lik gliserol stoku oluşturularak saklanır.
13. Hazırlanan kompetent bakterinin kontrolü amacıyla yine aynı miktarlarda (100 µl) bakteri 5'er ml LB içeren üç ayrı erlene (normal, tetrasiklinli ve ampisilinli) inoküle edilerek etüve alınır.

Transformasyon

Yukarıdaki işlemler sonunda bakteri, ortamdaki DNA moleküllerini hücre içine alabilecek duruma getirilmiştir. Daha sonra:

1. Kompetent bakteri bulunduran ependorf tüp(ler) buz üzerine konur. Bu işlemler yapılırken yine tüplerden biri kontrol olarak kullanılır ve bu tüpe de (plazmit ilave edilmeksizin) bütün işlemler uygulanır.
2. Her tüpe pHM6 ve pBlueScript plazmitlerinden yaklaşık olarak 50 ng (10 ng/µl stoktan 5 µl) ilave edilerek dikkatli bir şekilde pipetlenir, parmak darbeleriyle vurularak karıştırılır.
3. Buz üzerinde en az 30 dakika bekletilir.
4. 42 °C' de 90 saniye tutulur ve süre sonunda tekrar buz üzerine alınır.
5. Tüplerdeki sıvıların üzerine 0.5 ml LB besi ilave edilir ve 37°C'de 1 saat inkübe edilir.
6. Her bir tüpten 100 µl alınarak LB-agar katı besi yerlerine [ampisilin ve X-gal (**Ek 1.6**) içeren] cam bagetle iyice yayılır (bu işlemler steril kabinde ve alkol alevi önünde yapılır) ve 37°C'de bir gece inkübe edilir.

İnkübasyon sonunda beklenen yalnızca plazmiti alan bakterilerin koloni oluşturmalarıdır (pHM6 beyaz, pBlueScript mavi koloni). Plaklar üzerindeki iyi gelişmiş ve diğerlerinden ayrı olan birer koloni alınarak ampisilinli (50 µg/ml) LB besi ortamında üretilir ve Birnboim-Doly⁷⁶'nin aşağıda verilen küçük ölçekli plazmit DNA izolasyon protokolü ile plazmit DNA izolasyonları yapılır.

Protokol 2: Plazmit DNA izolasyonu (rutin yöntem)

Küçük ölçekli Plazmit DNA İzolasyonu. Transfeksiyon dışındaki rutin uygulamalarda bu protokolle elde edilen plazmit DNA'lar kullanılmıştır.

1. Bakteri kültürü etüvden alınarak +4 °C'ye (buz dolabına) konur ve yaklaşık 30 dakika bekletilerek soğuması sağlanır.
2. Kültür ortamı 5 ml'lik steril tüplere paylaştırılır ve 4500 rpm'de 10 dakika (+4 °C'de) santrifüjlenir.
3. Süpernatant atılır ve pelet 5 ml soğuk TNE tamponu (**Ek 1.7.**) ile çözülür ve 4500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir.
4. Süpernatant dökülür ve pelet 200 µl lizozim solüsyonu (**Ek 1.8**) ile çözülerek ependorf tüplere aktarılır ve buz üzerinde 30 dakika bekletilir. Karışım üzerine 400 µl taze hazırlanmış SDS solüsyonu (**Ek 1.9.**) ilave edilir, parmak darbeleriyle karışması sağlanır ve buz üzerinde 5 dakika bekletilir.
5. Karışım üzerine 300 µl 3M sodyum asetat (pH 4.8) (**Ek 1.10**) ilave edilir, karıştırılır ve buz üzerine alınarak 30 dakika bekletilir.
6. 14000 rpm'de 10 dakika (+4 °C'de) santrifüjlenir ve süpernatant yeni bir ependorfa aktarılır.
7. 1 hacim fenol (**Ek 1.11**):kloroform:izoamil alkol (25:24:1) ilave edilir ve emülsifiye oluncaya dek yavaş yavaş (3-5 dak.) karıştırılır.
8. 14000 rpm'de 5 dakika (+4 °C'de) santrifüjlenir ve üst faz aradaki protein tabakasına dokunulmadan dikkatli bir şekilde alınır ve yeni bir tüpe aktarılır.

Not: DNA kaybını önlemek için gerekirse kalan sıvı üzerine 200 µl TE (**Ek 1.12**) ilave edilir, karıştırılır, tekrar çöktürülür ve üst faz alınır.

9. 1 hacim kloroform/izoamil alkol (24:1) ilave edilir, dikkatlice karıştırılır ve yukarıdaki gibi santrifüjlenir.
10. Üst faz dikkatli bir şekilde alınır ve yeni bir ependorfa (fazla ise iki ependorfa) aktarılır. 2-2.5 hacim soğuk etanol (%100'lük) ilave edilir, vortekslenir ve -20 °C'de en az 1 saat bekletilir.
11. Karışım kısaca vortekslenir ve 15000 rpm'de (oda sıcaklığında)15 dakika santrifüjlenir (4°C'de yapılan santrifüjde tuz çökebilir!).
12. DNA pelletine dikkat edilerek alkol dökülür, pellet 5-10 dakika kurutulur ve 100 µl TE ilave edilerek çözünmesi beklenir (tercihen +4 °C'de 1 gece).
13. Son konsantrasyon 100 µg/ml olacak şekilde RNaz (**Ek 1.13**) ilave edilir (tüp birden fazla ise bir tüpte toplanabilir) ve 37 °C'ye ayarlanmış olan su banyosunda 1 saat bekletilir.
14. Hacmin 1/10'u oranında sodyum asetat (pH 4.8) ilave edilir ve üzerine 1 hacim fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) konarak 3-5 dak süreyle hafifçe karıştırılır.
15. 14000 rpm'de (+4 °C'de) 5 dakika santrifüjlenir.
16. Üst faz dikkatli bir şekilde alınarak yeni bir tüpe aktarılır, üzerine 1 hacim kloroform/izoamil alkol (24:1) ilave edilir, karıştırılır ve yukarıdaki gibi santrifüjlenir.
17. Üst faz dikkatli bir şekilde alınıp yeni bir tüpe aktarılarak üzerine 2-2.5 hacim soğuk etanol ilave edilir, vortekslenir ve -20 °C'de en az bir saat bekletilir.
18. Karışım vortekslenir ve 15000 rpm'de (oda ısısında) 15 dakika santrifüjlenir.
19. Süpernatant dökülür, pelet 1 ml soğuk %70'lik alkolle yıkanır ve yukarıdaki gibi santrifüjlenir (pelet yerinden kalkmamışsa santrifüjlemeye gerek yoktur).
20. Alkol dökülür ve alkol kalıntısı olmaması için tüp kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek 15-20 dakika kurutulur.
21. Peletin büyüklüğüne bağlı olarak 100-300 µl TE ilave edilir ve olası DNaz kontaminasyonuna karşı 70 °C'de 15-20 dakika bekletilir.

22. Bir gün sonra spektrofotometrik ölçümleri yapılarak etiketlenir.

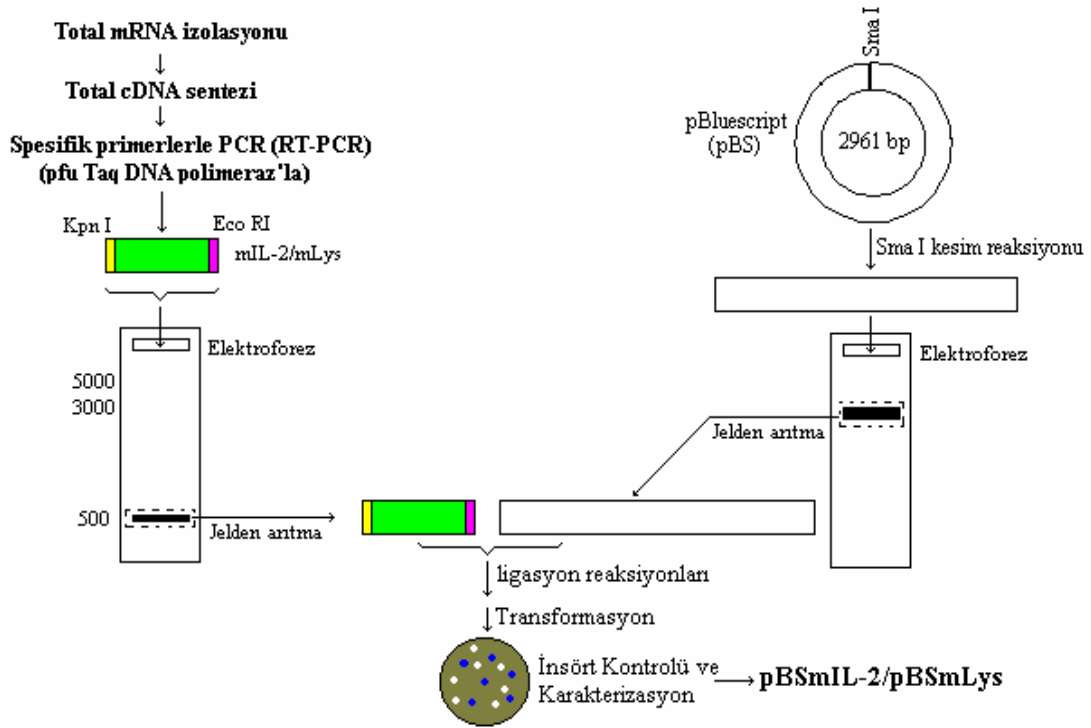
Elde edilen plazmitler, moleküler büyüklük kontrolü için MCS bölgesindeki restriksiyon enzimlerden biri ile kesilerek lineer hale getirildikten sonra, formal yapılarını görmek için de doğrudan %0.8'lik agaroz jele yüklenerek 100 V, 80 mA'de 1 saat süreyle elektroforezi yapılır, görüntülenir ve değerlendirilir⁷⁷. Sorun olmadığı belirlendiğinde plazmit kesim ve ligasyon reaksiyonları için kullanıma hazırdır.

3.2.1.4. pBlueScript'e Klonlama

IL-2 ve lizozim genlerinin asıl klonlanması hedeflenen vektör molekülü pHM6 memeli ekspresyon vektörüdür. Ancak, genleri bu vektöre klonlamak için planlanan ve aşağıda özetlenmiş olan strateji bir çok defa, değişik kesim ve ligasyon alternatifleri de (enzim miktarını arttırmak, süreyi uzatmak, DNA miktarını azaltmak vs gibi) denenerek tekrarlandığı halde sonuç alınamadığından öncelikle pBS'e klonlanma yolu tercih edilmiştir.

Klonlama stratejisi (özetle); Daha önce belirtildiği gibi genlere ait PCR amplikonları 5' ucunda Kpn I, 3' ucunda ise Eco RI restriksiyon endonükleazlara kesim bölgeleri taşımaktadır. PCR ürünleri ve pHM6 vektörü (her biri ayrı ayrı tüplerde) **Çizelge 3.5A**'daki standart kesim reaksiyonları protokolüne göre önce *Kpn I* ile kesilir ve "DNA Extraction Kit" ile arıtılır. Daha sonra da *Eco RI* restriksiyon endonükleaz ile benzer kesim reaksiyonları hazırlanarak kesilir ve aynı şekilde arıtılır (*buradaki amaç PCR ürünlerini ve vektör molekülünü her iki enzim açısından yapışkan uçlu hale getirerek ligasyon reaksiyonuna hazırlamaktır*). Arıtılan PCR ürünleri ve pHM6 vektör molekülü T4 DNA ligaz varlığında ligasyon reaksiyonuna alınır. Ligasyon ürünleri hazırlanan kompetent bakteriye transforme edilir ve plaklara yayılarak rekombinant plazmit taraması yapılır.

pBS'e klonlamadaki strateji de benzer şekilde olup **Şekil 3.5**'de özetlenmiştir.



Şekil 3.5. pBS'e klonlamada izlenen genel strateji.

pBS vektörü MCS bölgesinde yer alan ve küt kesim yapan *Sma* I restriksiyon endonükleaz ile **Çizelge 3.5A**'daki protokole göre kesilir, 'DNA extraction kit' ile arıtılır ve spektrofotometrik ölçümle de miktar tayini yapılır. Bu şekilde hazırlanmış olan plazmit vektör, bir önceki aşamada PCR reaksiyonu ile amplifiye edilip arıtılmış olan IL-2 ve Lizozim genleri ile **Çizelge 3.5B**'deki protokol uygulanarak ayrı ayrı ligasyon reaksiyonuna alınır (her bir ligasyon deneyinde kontroller de yer almaktadır):

1. T4 DNA Ligaz'ın aktivite kontrolü: Her hangi bir enzimle kesilmiş DNA molekülünün (ör, pUC18/*Msp* I kesimi) ligasyonu.
2. Vektör kontrolü: Kesilmiş olan vektör molekülünün tekrar ligasyonu
3. pBS/*Sma* I + mIL-2 (*Pfu* PCR)
4. pBS/*Sma* I + mLys (*Pfu* PCR)

Çizelge 3.5: Kesim ve ligasyon reaksiyonlarında kullanılan standart protokoller.

A) Kesimi Reaksiyonu		B) Ligasyon Reaksiyonu	
Su (bidistile, steril)	: 20µl	Su (bidistile, steril)	: .. µl
Tampon (10X)	: 2.5 µl	Tampon (10X)	: 2 µl
DNA (0.5 µg/µl)	: 2 µl	%50 PEG 4000	: 2µl (Yalnızca yapışkan uçlar için)
Enzim (10 U/µl)	: 0.5 µl	DNA -----<	: Vektör: 50-400 ng
Toplam	: 25 µl	Enzim (1 U/µl) ---<	: İnsört : 50-100 ng
		Toplam	:Yapışkan uçlar için: 1-2 U
			: Küt uçlar için: 5 U
			: 20 µl
Karışımlar hafifçe vortekslenir ve santrifüjlenir.			
Süre: Önerilen sıcaklıkta 1-1.5 saat		Süre: 22 °C'de 1 saat	

Protokol 1'deki uygulamayla kompetent hale getirilmiş olan bakteri, buz üzerindeki 6 mikrosantrifüj tüpüne 100'er µl paylaşılır ve ligasyon reaksiyonu ürünlerinin 10'ar µl'si ile **prototol 1**'deki yöntemle transforme edilir (tüpler aynı sıra ile etiketli):

1. Kontrol (1. tüp)
2. Kontrol (2. tüp)
3. pBS/Sma I + mL-2 ligasyonu (3. tüp)
4. pBS/Sma I + mLys ligasyonu (4. Tüp)

Ayrıca, kompetent bakteri her seferinde;

5. Canlılık kontrolü için LB-agar, kontaminasyon kontrolü için LB-agar/Amp plaklarına yayılır.
6. Transformasyon kontrolü (TK) için de; farklı bir plazmit (örn. pUC18) ve klonlamada kullanılan plazmit (pBS) ile transforme edilir (TK1 ve TK2).

Transformasyon işlemi sonunda tüpler üzerine 1'er ml LB medyumunu ilave edilerek 37 °C'de 1 saat üretilir ve buradan 100 µl alınıp LB-agar/Amp/X-gal plaklarına yayılarak 37 °C'de bir gece üretilir (plaklar da aynı şekilde etiketlenir). Beyaz renkli koloniler aşağıda verilen protokolle insörtler açısından hızlı bir şekilde taranır. Gen insörtlerini taşıdığı tespit edilen koloniler kültüre alınarak plazmit izolasyonları yapılır, yukarıda anlatıldığı şekilde RFLP analizi ve plazmitler *Eco* RI ve *Kpn* I restriksiyon endonükleazlarla kesilerek insört bandı jelden arıtılır ve aşağıda anlatıldığı şekliyle de pHM6'ya klonlanır.

3.2.1.5. Hızlı İnsört Tarama

Plaklarda gelişen ve rekombinant olduğu düşünülen beyaz renkli koloniler (her koloni insört taşımayabilir, küt uçlu oldukları için iki veya daha fazla plazmit molekülü birleşmiş veya ters dönmüş olabilir) numaralanır ve aşağıdaki protokolle⁷⁸ her bir koloniden bakteriyel lizatlar oluşturularak PCR'la gen insörtleri açısından kontrol edilir.

Protokol 3: Hızlı insört tarama

1. Her bir koloniden iğne uçlu öze ile örnek alınarak 50 µl TTE tamponunda (%1 Triton X-100, 20 mM Tris HCl pH 7.5, ve 2 mM EDTA pH 8.0) süspansiyon edilir,
2. 95 °C'de 10 dakika inkübe edilerek bakteri lizatı elde edilir,
3. 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek bakteriyel artıklar çöktürülür,
4. Süpernatantlar temiz tüplere aktarılır ve bunların 5'er µl'si **Çizelge 3.2'deki** PCR'da kalıp DNA yerine kullanılarak insört taşıyıp taşımadıkları kontrol edilir.

Bu yöntem kolonilerin taranması için oldukça pratik, hızlı ve malzeme israfını önleyen bir uygulamadır.

PCR'da pozitif sonuç alınan koloni/kolonilerden ampisilinli sıvı besi yerine inokülasyon yapılarak bir gece üretilir ve plazmit izolasyonu yapılarak aşağıdaki işlemlerle insörtler karakterize edilir:

- İzole edilen plazmit DNA'lar kullanılarak yine aynı şekilde (**Çizelge 3.2, 3.3'deki** koşullarla) PCR yapılır.
- PCR ürünleri 5 ayrı restriksiyon endonükleazla (bu enzimler IL-2 ve Lys gen dizilerinin GeneRunner programı ile analizi sonucu belirlenmiştir) kesim reaksiyonlarına alınır (her bir enzim için üretici firmanın hazırladığı tampon ve reaksiyon koşulları kullanılmıştır).
- Kesim reaksiyonu ürünleri %10'luk poliakrilamid jele (**Ek 1.14**)yüklenerek 1.5 saat süreyle (100 V 80 mA'de) elektroforeze tabi tutulur.
- Jel EtBr ile boyanarak görüntülenir ve oluşan bantlar UviSoft⁶² programı ile analiz edilir.

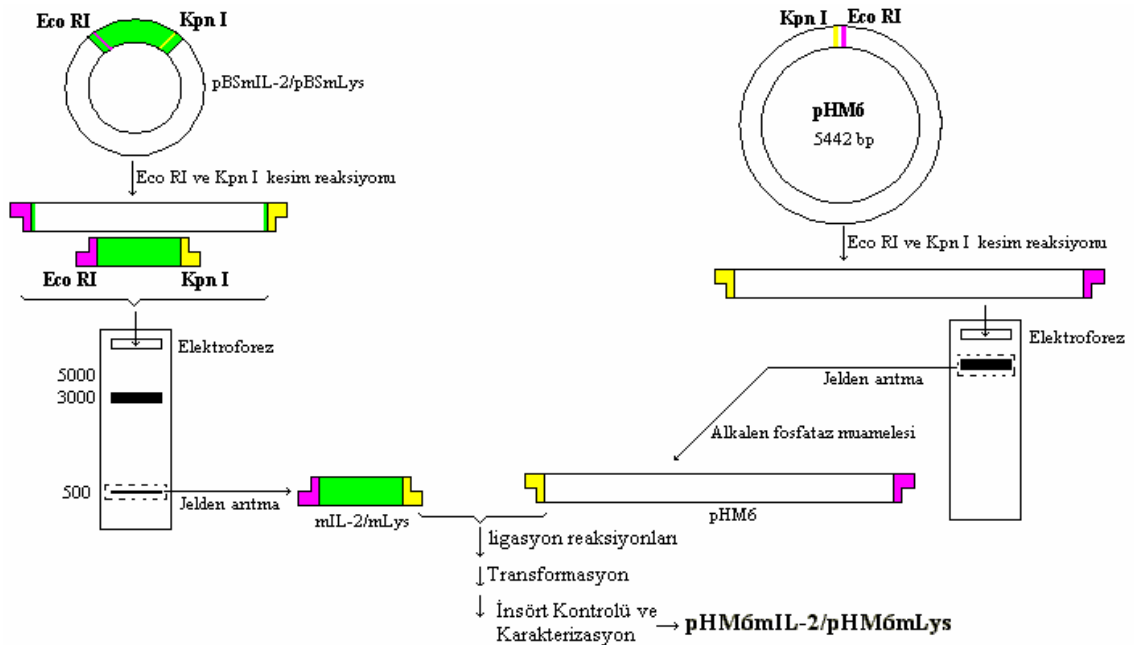
3.2.1.6. pHM6'ya Klonlama

Lizozim ve IL-2 genlerine ait cDNA dizilerine pHM6 vektörünün çoklu klonlama bölgesinde yer alan restriksiyon enzimlerinden *Eco* RI ve *Kpn* I'in uygun olduğu tespit edilmiş ve primer dizilerinin 5' uçlarına bu enzimlere ait diziler yerleştirilmiştir.

Genlerin istenen şekilde ligasyonu için pHM6 vektörü de aynı enzimlerle kesilmiş ve DNA Ekstraksiyon kiti (Fermentas) ile kesim enzimlerinden arıtılmıştır. Kesim reaksiyonları aşağıda verildiği şekilde hazırlanmış 37 °C'de ve bir saat tutulmuştur:

Su	: 16 µl
Tampon (10X)	: 2.5 µl
DNA (pHM6)	: 5 µl (2µg/µl)
<u>Enzim (<i>Kpn</i> I/<i>Eco</i> RI) (10U/µl)</u>	<u>: 1.5 µl</u>
Toplam	: 25 µl

Önce *Kpn* I ile kesilmiş 80 °C'de 20 dak. inaktive edilmiş ve takiben de *Eco* RI'la kesilerek %0.8'lik agaroz jele yüklenip elektroforezi yapılmış ve kit ile arıtılmıştır. Bu haliyle pHM6 plazmiti her iki enzime ait yapışkan uçlara sahip olmuştur ve insörtlerle ligasyon reaksiyonuna hazırdır. İzlenen genel strateji **Şekil 3.6'**da şematize edilmiştir.



Şekil 3.6. pBS'den pHM6'ya klonlamada izlenen genel strateji

Genlerin pBS'den kesilerek pHM6 vektörüne klonlanmasında uygulanan basamaklar ana hatlarıyla aşağıda sıralanmıştır:

- PCR ve insört analizi sonucu doğruluğu kanıtlanmış olan rekombinant pBS plazmitleri (pBSmIL-2 ve pBSmLys) *Kpn* I ve *Eco* RI endonüklezlar ile kesime alınır (pHM6'da olduğu gibi ayrı ayrı da kesilebilir). Hazırlanan reaksiyon karışımı şu şekildedir:

Su (bidistile, steril)	:64 μ l
Tamponlar (10X)	: 5 μ l <i>Kpn</i> I tamponu + 5 μ l <i>Eco</i> RI tamponu
Plazmit DNA (0.5 μ g/ μ l)	: 20 μ l
Enzimler (10 U/ μ l)	: 3 μ l <i>Kpn</i> I + 3 μ l <i>Eco</i> RI
Toplam	: 100 μl

- Reaksiyon karışımı hafifçe vortekslenir, santrifüjlenir ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildikten sonra 65 °C'de 15 dak. tutularak enzimler inaktive edilir.
- Reaksiyon ürünleri %0.8'lik agaroz jelde 1 saat süreyle elektroforeze tabi tutulur.
- İlgili insört bantları (451 ve 515 bp, -kesimler sonucu kısaldı-) ve vektör bandı (5432 bp) ayrı ayrı bistriler kullanılarak jelden kesilip alınır ve ayrı tüplere aktararak etiketlenir.
- 'DNA Extraction Kit' kullanılarak DNA molekülleri jelden arıtılır.
- *Kpn* I ve *Eco* RI kesim uçlarına sahip olan pHM6 vektörü, (uçlar uyumlu olmadığı için kendi içinde ligasyon yapması mümkün olmasa da reaksiyon sırasındaki olası bütün alternatiflerin önlenmesi için) Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) ile reaksiyona alınarak 5' uçları defosforile edilir (iki defosforile uca sahip molekül birbirine bağlanamaz). Defosforilizasyon reaksiyonu üretici firmanın önerdiği protokole göre aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

Su (bidistile, steril)	: 38 μ l
Tampon (10X)	: 5 μ l
pHM6 DNA (~400 ng/ μ l)	: 5 μ l
CIAP (1 U/ μ l)	: 2 μ l
Toplam	: 50 μl

- Reaksiyon karışımı vortekslenir, santrifüjlenir, 37 °C'de 45 dakika inkübe edilir, 85 °C'de 15 dak. tutularak da CIAP ile inaktive edilir ve 'DNA Extraction Kit' ile reaksiyon komponentlerinden arıtılır.
- Bu şekilde hazırlanan pHM6 vektörü ile IL-2 ve Lizozim genleri **Çizelge 3.5'**de verilen protokolle ligasyon reaksiyonuna alınır (kontrol ligasyonları da dahil).
- Ligasyon reaksiyonu sonunda (pBS'e klonlamada olduğu gibi) transformasyon yapılarak insört analizleri aynı şekilde tekrarlanır. Buradaki koloniler beyaz renkli olacaktır (çünkü pHM6'nın MCS bölgesi pBS'de olduğu gibi LacZ geni içinde değil, ökaryotik hücrelerdeki transfeksiyon kontrolü için ayrıca rekombinant halde - pHM6/lacZ- var) ve tamamı rekombinant olarak düşünülebilir. Protokol 3'deki uygulama ile koloniler insörtler açısından taranır ve uygun olanlardan plazmit izolasyonları yapılır. İnsörtlerin IL-2/Lys genlerine ait olduğundan emin olmak için de tekrar PCR ve RFLP analizleri yapılır.

3.2.1.7. RFLP ve Dizi Analizi

Bu aşamada elde edilen rekombinant plazmitleri taşıyan bakteri kolonileri stoklanarak bundan sonraki bütün uygulamalarda bunlardan elde edilen rekombinant plazmitler (pHM6mIL-2 ve pHM6mLys) kullanılacağı için plazmitler insörtler açısından mümkün olan en güvenilir yöntemlerle analiz edildi. Bu noktaya gelinceye kadar her aşamada gen kaynağının doğruluğunu saptamak için önceki uygulanan insört analizleri (moleküler büyüklüğün uygunluğu ve 5 ayrı restriksiyon endonükleazla RFLP) aynı şekilde bu plazmitlere de uygulanmıştır. Ayrıca, bu rekombinant plazmitlerin (pHM6mIL-2 ve pHM6mLys) dizi analizleri Chicago Illinois üniversitesinde bulunan M. Bertan YILMAZ tarafından yaptırılmıştır.

3.2.1.8. Endotoksinsiz Plazmit İzolasyonu

In vitro ve *in vivo* transfeksiyon işlemlerinde kullanılacak plazmit DNA'nın yüksek saflıkta ve endotoksin-free olması gerekmektedir. Rutin işlemlerde normal izolasyon protokolü ile izole edilen plasmid DNA kullanılırken, transfeksiyonlarda 'Gene Elute™ Endotoxin-free Plazmit Midiprep Kit' (PLED-35, Sigma) ile elde edilen plazmit DNA kullanılmıştır. 'Gereç' bölümünde bu Kit'in izolasyon prensibinden bahsedilirken de değinildiği gibi, burada elde edilecek plazmit DNA'nın bakteriyel endotoksin içermemesi ve büyük çoğunluğunun süper-koil formda olması beklenmektedir.

Hücre kültürüne ve farelere uygulama aşamasında gerekli olan pHM6, pHM6mL-2, pHM6mLys ve pHM6LacZ (pHM6 plazmidinin transfeksiyon ve ekspresyon kontrolleri için bu plazmitle birlikte satın alınmıştır) plazmitleri ile transforme bakteriler (kontaminasyon ve karışıklık olmaması için her izolasyonda yalnız birinden) daha önce bahsedilen izolasyon protokollerindeki kültür koşullarına göre ancak daha büyük hacimlerde (her seferinde 50 µg/ml ampisilin içeren 1 litre LB kullanılarak) üretilir ve yine benzer şekilde santrifüjlenerek bakteri peleti elde edilir. Pelet elde edildikten sonra ise kit bileşenleri içinde bulunan solüsyonlar ve kit protokolü kullanılarak izolasyona devam edilir.

İzole edilen plazmit DNA %0.8'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak hangi formlarda izole edilmiş olduğu kontrol edilir. Süper-koil form oranı düşük bulunduğu, kit'in teknik bültenindeki öneriler doğrultusunda bu oran artırılabilir. Transfeksiyon için ideal olarak istenen form süper-koil formdaki plazmit DNA'dır.

Plazmit DNA izolasyon koşullarına bağlı olarak farklı formlarda bulunabilir (açık halkasal, lineer ve süper-koil). Bu üç formun jeldeki hareketi de farklıdır, genellikle; süper-koil en önde, lineer arada, açık halkasal form ise en geride bant oluşturur (bu hareket jel konsantrasyonuna, tampon pH'sına ve diğer elektroforez koşullarına göre de değişebilmektedir)^{67, 68, 71, 72}.

Bu şekilde izolasyonları yapılan plazmit DNA'lar hepsi birer tüpte biriktirilir (homojeniteyi sağlamak için), spektrofotometrik ölçümleri yapılarak her

birinin konsantrasyonu 3 µg/µl olacak şekilde ayarlanır, porsiyonlara ayrılır, etiketlenir ve kullanım zamanına kadar +4°C'de saklanır.

Not: Bu plazmitleri içeren rekombinant bakterilerin stokları bulunmakla birlikte, ayrıca plazmitlerin de her birinden stoklar oluşturularak -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. Hücre Kültürü

Hazırlanan rekombinant vektörlerde klonlu genlerin anti-tümöral etkilerinin değerlendirilmesinde konakçı olarak kullanılacak olan B-16V veya B16-FO melanoma hücre hatlarının kültür, pasajlama, hasat ve kriyobanklarını oluşturma işlemleri aynı koşullarda yapılmıştır (zaten her iki hücrede C57 fare ırkında gelişmiş olan B16 melanomundan köken almaktadır). Hücrelerin kültürü üretici firma tarafından önerilen kültür koşullarında, diğer uygulamalar ise değişik kaynaklarda mevcut hücre kültür teknikleri ve protokollerden faydalanılarak yapılmıştır^{79, 80, 81}.

Benzer özelliklere sahip olan bu hücre hatlarından B-16V'nin (ileride seçim için yapılan işlemlerde bahsedilecektir) kullanılmasına karar verilmiştir. B16-FO hücreleri ise kriyoprezervasyonları yapılarak stoklanmıştır.

Kültür ve Pasajlama İşlemlerinde Gereken Malzemeler

- Kültür flaskaları (25 cm²'lik)
- 10 ml'lik tüpler
- Enjektörler (2, 5 ve 10 ml'lik)
- Pamuk tıkaçlı pastör pipetleri (fırınlanmış)
- RPMI 1640
- FBS
- L-Glutamin
- Gentamisin (son konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde)
- Tripsin-EDTA (%0.25)
- 0.2 µm'lik filtreler
- Atık kapları (fırınlanmış)

Hücre Hatları laboratuara ilk getirildiğinde uygulanan işlemler:

Not: Aşağıdaki bütün işlemlerde, flasklara ilave edilen her solüsyon 0.22 mikronluk filtreden geçirilmiştir.

B16-F0 hücre hattı

Gazi Üniversitesi İmmünoloji laboratuvarında pasajlandıktan bir gün sonra flask üreme medyumu (%90 RPMI 1640, %10 FBS) ile tamamen doldurularak laboratuvarımıza getirilmiştir.

Laboratuara ulaştığında;

- Flaskın bütün yüzeyi %70'lik alkolden geçirildikten sonra kabin içine alınarak medyum boşaltıldı,
- Flask içine 0.5 ml Tripsin-EDTA (%0.25'lik) ilave edildi ve 37 °C yaklaşık 5 dakika bekletildi,
- Flaska parmak darbeleriyle hafifçe vurularak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı,
- Toplanan hücreler içinde 4'er ml üreme medyumu bulunan üç ayrı flaska paylaştırılıp 37 °C ve %5'lik CO₂'li ortamda üremeye bırakıldı.

B-16V hücre hattı

Bu hücre hattı firma tarafından soğuk zincirde ve kriyoprotektan madde içinde gönderilmiştir.

Laboratuara ulaştığında;

- Hücrelerinin bulunduğu ampul 37 °C'de 1 dakika tutularak çözünmesi sağlandı ve ampul yüzeyi %70'lik alkolle yıkandıktan sonra kabin içine alındı,
- Ampul içeriğinin tamamı, içinde 10 ml (yaklaşık 10 katı) üreme medyumu bulunan steril bir tüpe aktarılarak 800 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatant dikkatli bir şekilde alınarak atıldı, hücre peleti 1 ml medyum ile nazik bir şekilde pipetlenerek çözüldü ve içinde 4'er ml üreme medyumu bulunan 2 ayrı flaska paylaştırılarak 37 °C ve %5'lik CO₂'li ortamda üremeye bırakıldı.

3.2.2.1. Pasajlama

Kültür flaskları invert mikroskoba alınarak hücrelerin üreme durumu kontrol edilir. Yeterli hücre yoğunluğunun oluşması (hücreler flask yüzeyini kaplamışsa) pasajlama zamanının gelmiş olduğunu gösterir.

Protokol 4: hücrelerin pasajlanması

1. Tripsin-EDTA solüsyonu ve kültür vasatları 37 °C'lik etüve alınarak ısıtılır.
2. Her defasında bütün çalışma yüzeyi ve vasat şişeleri %70'lik alkolle temizlenerek kabin içine alınır.
3. Steril bir şişe içinde üreme medyumunu (%10 FBS, %90 RPMI 1640 ve 0.5 mg/ml Gentamisin) hazırlanır.
4. Hücre kültür flaskları kabin içine alınır ve üreme ortamları steril bir atık kabına boşaltılır.
5. Flasklara 0.5'şer ml %0.25 Tripsin-EDTA solüsyonu ilave edilir 37 °C'ye alınarak ~5 dakika inkübe edilir. Hücreler flask yüzeyinden sökülmeye başladığında parmak darbeleriyle hafifçe vurularak iyice sökülmesi sağlanır.
6. Flasklara 2'şer ml üreme medyumunu ilave edilerek hücreler toplanır.
7. Hücre yoğunluğuna göre, her flask içindeki hücreler 3-7 adet yeni flasklara paylaştırılır ve her birine 2.5 ml üreme medyumunu ilave edilir.
8. Hücrelerin flask içinde homojen bir şekilde dağılması sağlanarak 37 °C ve %5'lik CO₂'li ortamda üremeye bırakılır.
9. Flasklar her gün kontrol edilir ve üreme ortamını pH'sı düştüğünde (renk sarıya dönmeye başlar) medyum değiştirilir.

3.2.2.2. Kriyoprezervasyon (dondurarak saklama)

Hücre hatlarının kullanım zamanları dışında sürekli olarak kültüre edilmesi hem kontaminasyon riskini arttıracak hem de malzeme israfına ve zaman kaybına neden olacaktır. Bu nedenle, hücrelerin kriyoprotektan maddeler varlığında sıvı azot tankları içinde (yada - 80 °C'de) stoklanarak

korunması gerekmektedir. İhtiyaç duyulduğunda buradan bir tüp alınarak (yukarıda anlatıldığı şekilde) çözülür ve hücre kültürü yapılarak çalışmalarda kullanılır. Ayrıca stok sayısı azaldıkça yeni kültürlerden takviye stoklar hazırlanır.

Kriyoprezervasyon için gerekli olan malzemeler;

- Vialler (dondurma tüpleri)
- DMSO
- İnaktive edilmiş Serum (FBS/FCS)
- Buz kalıbı (-20'den)

Protokol 5: hücrelerin dondurulması (kriyoprezervasyon)

1. Serum 56 °C'de 40 dakika tutularak inaktive edilir,
2. Kriyoprezervasyon solüsyonu (%90 inaktive serum, %10 DMSO) hazırlanır ve filtreden geçirilerek +4 °C'ye kaldırılır.
3. Kriyoprezervasyonu yapılacak hücrelerin yukarıda anlatıldığı şekilde kültürü yapılır ve hasatlanır,
4. Kültür tüplerinde toplanan hücreler 800 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir, süpernatant atılır ve pellet 5 ml inaktive serum ile süspanse edilir.
5. 0.5 ml'si hücre sayımı için alınır ve kalan kısım 800 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir.
6. Hücre pelleti, üzerine 2 milyon hücre/ml olacak şekilde kriyoprezervasyon sıvısı ilave edilerek steril pastör pipeti yardımıyla dikkatli bir şekilde homojenize edilir.
7. Hücre süspanسیونları buz kalıbı üzerindeki her bir vialde, 1.5 ml (~ 3 milyon hücre) olacak şekilde dikkatli ve steril bir şekilde paylaşılır.
8. Vialler, içi 2-3 cm kalınlığında pamukla döşenmiş olan köpük içine alınarak -80 °C'de bir gece bekletilir ve daha sonra sıvı azota alınır.

Not: Esas olan, viallerin özel soğutucu sistemlerde tedrici olarak soğutulması ve dondurulmasıdır fakat böyle sistemler olmadığında, içi pamuk döşeli köpükte de hücrelerin dengeli bir şekilde soğuması ve donması sağlanabilmektedir.

3.2.3. Lipozomal Transfeksiyon

Kontrol transfeksiyonu, pHM6 vektörü ile birlikte gönderilmiş olan *Lac Z* geni klonlu pHM6 (pHM6/*lacZ*) vektörü ve DOTAP (lipozom oluşturma özelliğinde olan katyonik bir bileşik) kullanılarak lipozomal yolla yapılmıştır. DOTAP (Sigma), negatif yüklü DNA molekülleri ile karıştırıldığında lipit vezikülleri (lipozom) oluşturmakta ve hücre membranı ile birleşerek bağladığı DNA molekülünü hücre içine taşımaktadır.

DOTAP/DNA kompleksinde kullanılan DNA'nın saf, endotoksinsiz ve büyük oranda süper-koil formda olması önerilmektedir. Buradaki işlemde kullanılacak olan pHM6/*lacZ* plazmiti daha önce kit ile izole edilmiş ve kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Kültürü devam eden B-16V hücreleri transfeksiyon deneyi için üç flaska pasajlanır. Transfeksiyon için hücrelerin yaklaşık %60-80 üreme yoğunluğunda olması önerilmektedir (Bu değer B-16V hücreleri için pasajdan yaklaşık 8 saat sonradır).

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda ve benzer protokoller incelenerek aşağıdaki yöntemle DOTAP/DNA kompleksi (1 µg DNA için 5-10 µg DOTAP) hazırlanmıştır.

Protokol 6: lipozomal transfeksiyon

1. Öncelikle plazmit DNA solüsyonu, DOTAP ve HBS'nin oda ısısına gelmesi sağlanır (bütün uygulamalar oda ısısında yapılır).
2. Steril bir cam tüpe 25 µl DOTAP (1 µg/µl'den) alınır ve 75 µl HBS (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) ilave edilerek nazikçe pipetaj yapılır (toplam 100 µl).
3. Başka bir tüpe 10 µl (0.5 µg/µl'den) (yaklaşık 5 µg) pHM6LacZ DNA alınır ve 40 µl HBS ilave edilerek nazikçe pipetajlanır (toplam 50 µl).
4. DNA solüsyonu DOTAP solüsyonu üzerine ilave edilerek nazik bir şekilde birkaç defa pipetajlanır.
5. Bu işlemler sırasında kesinlikle vorteks ve santrifüj önerilmemektedir.

6. Karışım oda ısısında 15-20 dakika bekletilir (bu aşamada dikkatli bir şekilde bakıldığında solüsyon hafif bir şekilde bulanıklaşmış olmalıdır).
7. Flasklara alınmış olan hücreler antibiyotiksiz (serumlu/serumsuz) medyumla birkaç defa yıkanır (ortamda antibiyotik varlığının transfeksiyonu engellediği bildirilmektedir).
8. Flaska 1.5 ml antibiyotiksiz medyum ilave edilir ve DOTAP/DNA kompleksi medyum içine insülin enjektörü ile ilave edilir ve homojenliği sağlamak için flask dikkatli bir şekilde sağa sola sallanır.
9. Flask etüve alınarak yaklaşık 6 saat süreyle inkübe edildikten sonra flasktaki hücrelerin medyumunu alınarak yerine 3 ml antibiyotikli medyum ilave edilir ve 24 saat sonra hücreler β -galaktozidaz aktivitesi açısından aşağıdaki protokolle⁸²⁻⁸⁴ analiz edilir.

3.2.3.1. Beta Galaktozidaz Aktivite Analizi

pHM6/*lacZ* vektöründeki *Lac Z* geni P_{CMV} promotoru aracılığı ile ökaryotik hücrelerde eksprese edilmektedir. *Lac Z* tarafından kodlanan β -galaktozidaz ortamdaki bir tür laktoz analogu olan X-gal'i D-galaktoz ve indoxyl'e (çözünür bir molekül) parçalamaktadır. Indoxyl, ortamdaki oksidize edici iyonlar (boya solüsyonundaki Fe iyonları) tarafından oksitlenerek indigo olarak bilinen koyu mavi renkli (suda çözünmeyen) bir maddeye dönüştürülür. Indigo ışık mikroskobu ile görülebildiğinden β -galaktozidaz aktivitesi gösteren hücreler tespit edilebilmektedir⁸²⁻⁸⁴.

Solüsyonlar

PBS Tamponu (pH 7.2 ve 6.0 olarak 100'er ml hazırlandı)

200 ml için;

- NaCl : 1.6 gr
- KCl : 0.04 gr
- Na₂HPO₄ : 0.23 gr
- K_H2PO₄ : 0.04 gr

Hücre fiksasyon tamponu

PBS (pH 7.2) içinde 10 ml hazırlamak yeterlidir.

- %2 formaldehit,
- %0.2 Gluteraldehit

Histokimyasal boya

PBS (pH 6.0) içinde 10 ml hazırlamak yeterlidir.

- 3-5 mM potasyum ferrisiyanid ($K_3Fe [CN]_6$),
- 5mM potasyum ferrosiyanid ($K_4Fe [CN]_6$),
- 1-2 mM $MgCl_2$,
- %1 NP-40,
- 1 mg/ml X-gal.

Solüsyon taze hazırlanmalı ve kullanıncaya dek +4 °C'de saklanmalıdır.

Protokol 7: β -galaktozidaz aktivitesi için histokimyasal boyama

1. Transfekte hücreler 2-3 ml PBS (pH 7.2) ile 2 defa yıkanır.
2. Flaska 5 ml fiksatif solüsyonu ilave edilerek 15-20 sn bekletilir.
3. Hücreler PBS (pH 7.2) ile yıkanır.
4. 2.5 ml histokimyasal boya (filtreden geçirilerek) ilave edilir.
5. 37 °C'de 14-24 saat bekletilir.
6. Hücreler PBS ile birkaç defa yıkandıktan sonra tekrar 1-2 ml PBS ilave edilerek invert mikroskopta koyu mavi olarak boyanması beklenen hücreler açısından incelenir.

Lizozim Aktivite Analizi

pHM6 ve pHM6mLys plazmitleri yukarıdaki protokol uygulanarak B-16V hücrelerine transfekte edilir. Ortamın lizozim içeriği bakımından seyreltik olmaması için transfeksiyon medyumu alındıktan sonra ilave edilen üreme medyumu hücrelerin yüzeyini kaplayacak kadar az (1 ml) ilave edilir. Transfeksiyondan bir gün önce lizozime çok hassas olduğu bilinen *Micrococcus luteus* bakterisi de LB besi ortamında üretilir. Yaklaşık bir gün sonra (en ideal olanı log evre) lizozim aktivitesi için hücre kültürlerinden (B-16V ve pHM6 ve

pHM6mLys ile transfekte edilmiş kültürler) insülin enjektörleriyle 300-400 µl sıvı alınır (B-16V ve pHM6 ile transfekte kültürden alınan sıvılar kontrol olarak kullanılmıştır). Bu arada, *M. luteus* bakterisi de LB-Agar plağı üzerine cam bagetle iyice yayılır ve üç ayrı yerine steril kağıt diskler yerleştirilir. Hücre kültürlerinden alınan sıvılar da bu kağıt diskler üzerine yavaş yavaş damlatılarak iyice emilmesi sağlanır. Plak 37°C'ye alınarak bir gece inkübasyona bırakılır ve süre sonunda disklerin etrafında bakteri üremesi olup olmadığı kontrol edilir.

3.2.3.2. Transfekte Hücre Hatlarının Geliştirilmesi

B-16V hücrelerinin kültürü ve pasajlanması ve bu hücrelere uygulanan kontrol transfeksiyonları ile ilgili protokoller bundan önceki bölümlerde verilmiştir.

- B-16V hücreleri yine aynı protokoller (**Protokol 4, 6 ve 7**) kullanılarak bu defa da pHM6, pHM6mIL-2 ve pHM6mLys plazmitleri ile transfekte edilir.
- Transfekte hücrelerin seçimi amacıyla da kültür ortamına 0.5mg/ml olacak şekilde Genetisin (G 418) ilave edilir.
- Yaklaşık 20 günlük kültür süresi sonunda plaklarda oluşan hücre odakları pasajlanır ve üreme ortamlarına devamlı olarak 0.5mg/ml Genetisin ilave edilir.
- Seçimi bu şekilde yapılan transfekte hücreler B-16VpHM6, B-16VpHM6mIL-2 ve B-16VpHM6mLys olarak adlandırılmıştır.

3.2.4. Fare Denemeleri

Deney gruplarında kullanılan 'inbred' C57BL/6 ırkı fareler Ç.Ü. Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma Merkezinde (TIBDAM) yetiştirilmediğinden Fizyoloji Anabilim Dalından sağlanmış, üretim, bakım ve her türlü uygulamalar da buradaki laboratuarda yapılmıştır. Daha önce de belirtildiği gibi B-16V hücreleri C57BL/6 ırkı farelerde oluşan melanomdan köken almaktadır. balb/c farelerinde B-16V melanomu ile oluşturulacak tümör özgün olmayacağından deney

sonuçlarını da etkileyeceği düşünülerek TIBDAM'da bulunan balb/c ırkı fare yerine C57BL/6 ırkı fareler kullanılmıştır.

3.2.4.1. Tümör Oluşturma

Elimizdeki iki hücre hattı (B-16V ve B16-FO) aynı özelliklere sahip olmasına karşın çalışmaların tutarlılığı ve (Bölüm 3.2.4'de ön bir bilgi olarak bahsedildiği gibi) fazla zaman ve malzeme kaybını önlemek açısından hangisinin kullanılacağına başta karar verilmesi gerektiği düşünülmüş ve bunun için pratik olarak hücrelerin tümör oluşturmadaki özgünlüğü denenmiştir.

Bu amaçla;

Her iki hücre hattı da daha önce belirlenen koşullarda üretilerek hasadı yapılmış ve aşağıda verilen uygulama ile enjeksiyona hazır hale getirilerek C57BL/6 ve balb/c fare ırklarının deri altına aynı miktarlarda enjekte edilmiştir.

Protokol 8: hücrelerin enjeksiyon için hazırlanması

1. Hasatları yapılarak iki ayrı kültür tüpünde toplanan hücreler 800 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir.
2. Süpernatant atılır ve hücre pelletleri kalıntı sıvı (yaklaşık 0.5 ml) ile pastör pipeti kullanılarak dikkatli bir şekilde süspanse edilir.
3. Tüplerin üzerine 10 ml fizyolojik solüsyon ilave edilir ve 800 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir.
4. Süpernatant atılır ve hücreler kalıntı sıvı ile dikkatli bir şekilde tekrar süspanse edilir.
5. Hücrelerin kültür medyumu kalıntılarından arıtılmasını sağlamak için 2-4. işlemler 3 defa tekrarlanır.
6. Tüplere 3'er ml fizyolojik solüsyon ilave edilerek hücreler dikkatli bir şekilde süspanse edilir.

Hücre Sayımı

- Yukarıda hazırlanmış olan hücre süspansiyonu homojenize edilerek 0.5 ml'si alınır ve 0.5 ml Trypan Blue solüsyonu ile karıştırılır.

- Oda ısısında yaklaşık olarak 5 dakika bekletilir
- Karışım Thoma lamına yüklenir, 20X objektif kullanılarak boyanan (ölü) ve boyanmayan (canlı) hücreler ayrı ayrı sayılır.
- Mililitredeki hücre sayısı ve canlılık oranlarının hesaplanması aşağıda verilen örnekteki gibi yapılmıştır.

Not: Sayım işlemi 15 dakika içinde yapılmalıdır, çünkü daha sonra canlı hücreler de boya almaya başlayacaktır.

Thoma lamının iki ayrı bölgesinin toplam 10 karesinde (her bir bölgede 5 kare) ölü ve canlı hücreler sayılır.

Hücre sayımı ve hesaplaması şu şekilde yapılır:

A bölgesi (ölü/canlı): $1/30 \ 2/27 \ 4/35 \ 2/29 \ 1/25 = 10/146$

B bölgesi (ölü/canlı): $2/35 \ 2/33 \ 3/28 \ 1/22 \ 1/27 = 9/155$

Toplam = 19/301

Sayılan toplam hücre: 320

Canlılık oranı(%): %94

Seyreltme faktörü (Örnek hacmi+Seyreltici sol/Örnek hacmi): $0.5+0.5/0.5=2$

Hücre sayısı/ml: $320 \times 1000 \times 2 = 6.4 \times 10^5$

Süspansiyondaki hücre sayısı: $4 \text{ (ml)} \times 6.4 \times 10^5 = 2.56 \times 10^6$

Farelere Enjeksiyon

- Hesaplama işlemi yapıldıktan sonra hücreler 4×10^6 hücre/ml olacak şekilde yeniden ayarlanır (hücreler santrifüjlenir ve pelet fizyolojik solüsyon ile toplam 640 μ l olacak şekilde çözülür).
- Her bir hayvanın deri altına (sol arka sırt bölgesinde) insülin iğnesi (26 G) ile 125 μ l ($\sim 5 \times 10^5$ hücre/fare) hücre solüsyonu enjekte edilir.

Not: Bir grup fareye değişik konsantrasyonlarda ($\sim 2.5 \times 10^5$, $\sim 1 \times 10^5$ ve $\sim 0.5 \times 10^5$ hücre/fare) hücreler enjekte edilerek de daha düşük sayıda hücre kullanarak tümör oluşturma çalışmaları yapılmıştır.

- Hayvanlar kafeslerine alınır, normal yem ve su ile beslenerek bir ay süreyle takip edilir (özel bir uygulama yapılmadı).

- Hücre enjekte edilen fareler deney başlangıcında ve takiben her hafta tartılır ve tümör gelişimi açısından kontrol edilir.

Bu bir ön çalışma olduğundan her hücre hattı için iki fare (1 adet balb/c, 1 adet C57BL/6) kullanılmıştır. Fare ırkı ve hücre hattına karar verildikten sonra asıl denemelere geçildiğinde (**Bölüm 3.2.4.4**) yine benzer uygulamalar yapılmıştır.

3.2.4.2. Farelerin Diseksiyonu ve Patolojik İncelemeler

Not: Aşağıdaki işlemler Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi, sayın Prof. Dr. İlhan TUNCER'in gözetiminde yapılmış olup tümör kitlelerinin patolojik durumu ve metastatik özelliklerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Diseksiyon seti, parça koymak için kaplar, %10'luk formaldehit ve fotoğraflamak için gerekli hazırlıklar yapılır. Tümör kitlesi hayvanın hareketlerini zorlaştıracak büyüklüğe ulaştığında (yaklaşık bir ay sonra), fareler eterle bayıltılır ve sakrifiye edilir. Fare dikkatli bir şekilde disekte edilerek beyin, böbrek, timüs, dalak, kalp, akciğer, karaciğer, testis, ince ve kalın barsak ve mide çıkartılır. Karın boşluğunda asit sıvısı oluşup/oluşmadığı kontrol edilir ve periton fizyolojik solüsyonla yıkanır. Yıkama sıvısı tüplere alınır ve lamlara yayılarak giemsa ve hematoksilen-eosin ile boyanır. Tümör kitleleri ve açılan vücut boşluklarındaki bütün organlar %10'luk formaldehit içine alınarak etiketlenir. Alınan organ/organ-doku parçalarından preparat hazırlama (kasetlere yerleştirme, fiksasyon, parafin blokları oluşturma, kesit alma ve hematoksilen-eosin ile boyama) ve mikroskopik inceleme-değerlendirme işlemleri Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapılmıştır.

3.2.4.3. Denemeler ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Deney gruplarında kullanılmasına karar verilen 'inbred' C57BL/6 ırkı farelerin üretimi ve her türlü uygulamalar Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapılmıştır. Denemelerde 5-8 haftalık dişi ve erkek fareler kullanılmış olup gruplara ayırım rasgele yapılmış ancak dişi ve erkek dağılımının mümkün

olduğu kadar eşit olmasına da dikkat edilmiştir. **Çizelge 3.6**'da planlanan denemeler ve grupları görölmektedir. Bu denemelerde (deneme 4 hariç) kontrolleriyle birlikte toplam 15 (hücre kontrol -grup 1- her üç denemede de ortak olarak kullanıldığı için **Çizelge 3.6**'da toplam 17 grup olarak görölmektedir) grup bulunmaktadır. 1, 2 ve 3 numaralı gruplar kontrol olarak değerlendirilmiştir. İstatistiklerin tutarlı olabilmesi için her grupta 10-15 fare (ölümler dikkate alınarak) olacak şekilde planlandığından 150-225 adet fareye ihtiyaç duyulmuştur. Fareler üreme ve deneme kafesleri olarak iki ayrı grup kafeste tutulmuştur. Deneme kafesleri, her bir kafeste (doğumdan üç hafta sonra) aynı cinsiyette kardeşler bulunacak şekilde oluşturulmuş ve numaralandırılmıştır. **şekil 3.7A ve B**'de üretim ve deneme kafeslerinden örnekler görölmektedir. Uygulamaların yapılacağı gün fareler tartılarak kuyruk işaretlemesi ile numaralandırılmış ve her kafese fare bilgilerinin yazılı olduğu bir kart yerleştirilmiştir. Bütün fareler normal su ve pelet yemle beslenmiş olup özel bir uygulama yapılmamıştır. Deneme gruplarında kullanılan fare sayıları **Çizelge 3.7**'de verilmiştir. Bu sayılara yalnızca bir defa ölçüm alınabilmiş olan fareler ve başka herhangi bir nedenle deney dışı bırakılmış/ölmüş olanlar (47 adet) dahil edilmemiştir.

Çizelge 3.6. Planlanan denemeler ve deney grupları.

DENEMELER ve GRUPLARI	
DENEMELER	
1. Farelerin sol arka sırt bölgesinde B-16V melanoma hücreleri ile deri altı tümörü oluşturulduktan sonra kitle içine plazmit enjeksiyonu yapılan deneme (kitle içi plazmit enjeksiyonları tümör çapı yaklaşık 5-7 mm olduğunda yapılır).	
GRUPLARI	
1. Hücre Kontrol: Yalnızca B-16V enjeksiyonu (hiçbir işlem yapılmaz).	
2. PHM6 Kontrol: Yalnızca pHM6 plazmiti enjekte edilir.	
3. Lipozom Kontrol: Aynı hacim PBS içinde yalnızca DOTAP enjekte edilir.	
4. PHM6mIL-2: Yalnızca pHM6mIL-2 plazmiti enjekte edilir.	
5. PHM6mLys: Yalnızca pHM6mys plazmiti enjekte edilir.	
6. PHM6mIL-2 + pHM6mLys: Bu iki plazmit eşit miktarda (her birinden 25µg) Karıştırılarak enjekte edilir	
2. Farelerin deri altına plazmit uygulamaları yapıldıktan 2 gün sonra aynı yere yalnızca B-16V hücreleri enjekte edilen deneme.	
GRUPLARI	
1. Hücre Kontrol: Yalnızca B-16V enjeksiyonu (hiçbir işlem yapılmaz).	
2. PHM6 Kontrol: Yalnızca pHM6 plazmiti enjekte edilir.	
3. Lipozom Kontrol: Aynı hacim PBS içinde yalnızca DOTAP enjekte edilir.	
4. PHM6mIL-2: Yalnızca pHM6mIL-2 plazmiti enjekte edilir.	
5. PHM6mLys: Yalnızca pHM6mys plazmiti enjekte edilir.	
6. PHM6mIL-2 + pHM6mLys: Bu iki plazmit eşit miktarda (her birinden 25µg) Karıştırılarak enjekte edilir.	
3. Farelerin deri altına (arka sırt bölgesinde) yalnızca transfekte B-16V hücreleri enjekte edilen deneme.	
GRUPLARI	
1. Hücre Kontrol: Yalnızca B-16V enjeksiyonu (hiçbir işlem yapılmaz).	
2. B-16VpHM6: pHM6 plazmiti ile transfekte hücre hattı enjekte edilir (plazmit kontrol).	
4. B-16VpHM6mIL-2: pHM6mIL-2 ile transfekte hücre hattı enjekte edilir.	
5. B-16VpHM6mLys: pHM6mLys ile transfekte hücre hattı enjekte edilir.	
6. B-16VpHM6mIL-2 + B-16VpHM6mLys: pHM6mIL-2 ve pHM6mLys plazmitleri ile transfekte hücre hatları eşit miktarlarda (her birinden yaklaşık 5×10^4 adet hücre alınarak) enjekte edilir.	
5. Challenge (deneme 3'de tümör geliştirmeyen farelere tekrar B-16V hücresi Enjekte edilen uygulama)	

Çizelge 3.7. Denemeler ve deney gruplarında kullanılan fare sayıları (Kontrol dahil 230 fare).

Denemeler	Gruplar						Toplam Fare sayısı
	1	2	3	4	5	6	
1	8	9	5	20	21	23	78
2	(Ortak Kontrol)	8	4	7	7	7	33
3		28	Yok	26	29	28	111
4 (Deneme 3'den kalanlar) sayılmadı				2	7	6	
Toplam	8	45	9	53	57	58	222 +8=230



Şekil 3.7. Üreme ve deneme kafeslerinden görüntüler.

A) Üreme kafeslerinden biri, **B)** deneme gruplarındaki kafeslerden bazıları

3.2.4.4. Hücrelerin Hazırlanması ve Farelere Enjeksiyon

Üreme kafeslerindeki yavru sayıları (her seferinde 10-15 kafeste yaklaşık 30-50 fare), cinsiyetleri ve yaşları kayıt altında olduğundan, uygulama zamanı yaklaştığında ayrılacakları deneme ve grupları belirlenmiş ve ona göre de uygulamada kullanılacak hücre hat/hatlarının üretimi yapılmıştır. İlgili hücre hattı uygulamaya yetecek miktarda (her flaskdaki hücreler iki fareye uygulamaya yetmektedir) çoğaltılıp hasadı yapıldıktan sonra hücrelerin sayımı ve canlılık oranları **Protokol 8**'deki gibi belirlenerek farelere enjekte edilecek konsantrasyona ayarlanmıştır (1×10^5 hücre/50 μ l/fare). **Şekil 3.8A ve B**'de hücrelerin hazırlanması, **Şekil 3.8C ve D**'de ise plazmit DNA-Lipozom komplekslerinin hazırlanması sırasındaki laboratuvar çalışmalarına ait örnek görüntüler verilmiştir.

Denemeler bitinceye dek dört tip transfekte hücre hattı da (B-16V, B-16VpHM6, B-16VpHM6mIL-2 ve B-16VpHM6mLys) sürekli olarak pasajlanarak kültürlerin devamlılığı sağlanmıştır.



Şekil 3.8. Laboratuvar çalışmalarından görüntüler.

A ve B) B-16V hücre hatlarının üretimi, **C)** enjeksiyona hazırlanması ve **D)** Plazmit DNA/lipozom komplekslerinin hazırlanması ile ilgili çalışmalardan görüntüler.

Bütün uygulamalarda deney hayvanı kullanım ilkeleri dikkate alınmıştır. Uygulamalar sırasında öncelikle farelerin kafeslerinde sakinleşmesi beklenmiş ve dikkatli bir şekilde (hayvana zarar vermeden), kuyruk ve ensesinden tutularak hareketi engellenmiştir. Hücreler, farelerin sol (deneme 4'de sağ) arka sırt bölgelerine 50 µl hacim içinde 1×10^5 hücre/fare olacak şekilde insülin iğneleriyle enjekte edilmiştir.

Her bir fare için ayrı bir form (**Ek 2.2**) kullanılmış, bu forma fare ile ilgili bilgiler, alındığı deneme ve grup numarası, yapılan uygulamalar ve takiplerde elde edilen veriler ve varsa diğer detaylar kaydedilmiştir.

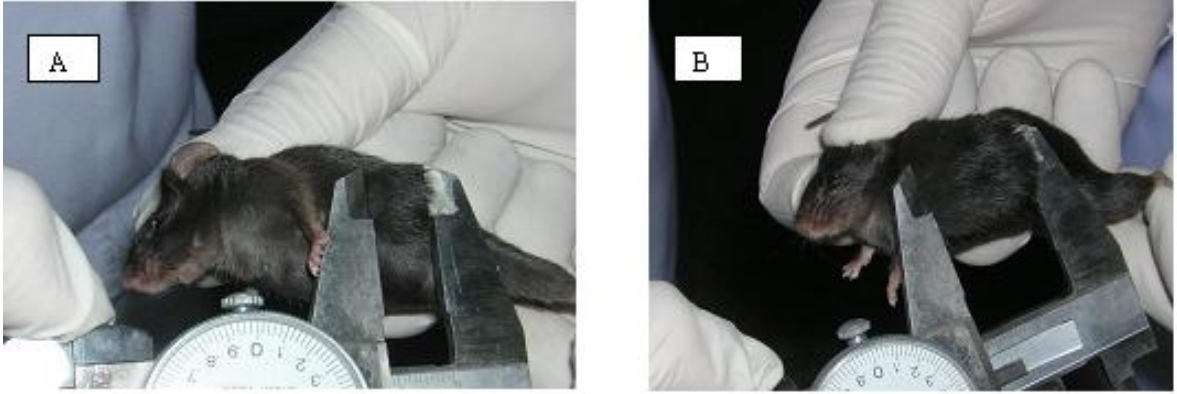
3.2.4.5. Tümör Kitleleri içine Plazmit Enjeksiyonu

Tümör kitlesi içine plazmit enjeksiyonu uygulaması (**3.2.3**'de verilen protokolle plazmit DNA/lipozom kompleksi oluşturulduktan sonra) yalnızca

deneme 1'de 2, 3, 4, 5 ve 6 numaralı gruplara yapılmıştır. Tümör çapı yaklaşık olarak 5-7 mm'ye ulaştığında (uygulamanın hemen öncesinde tümörün yaklaşık en küçük ve en büyük çapları kumpasla ölçülerek kaydedilir) 100 µl hacim içinde ~50 µg plazmit DNA/lipozom kompleksi tümör içine (mümkün olduğunca kitlenin ortasına) yavaş ve dikkatli bir şekilde enjekte edilmiştir.

3.2.5. Verilerin Alınması ve Analizi

Farelerin takipleri ve verilerin alınması 2-4 gün aralıklarla, tümör oluşup oluşmadığı ve oluşan (ve büyümeye devam eden) tümörlerin en büyük ve en küçük çaplarının kumpasla ölçülüp kaydedilmesi şekliyle yapılmıştır. Bütün uygulamalar ve ölçümler en az bir kişinin yardımıyla yapılmış ancak tümör çaplarının ölçümleri her zaman aynı kişi tarafından alınmıştır. **Şekil 3.9A ve B**'de tümör çapının kumpasla ölçülmesi sırasındaki görüntüler yer almaktadır. Tümör çapı 20 mm'yi geçmiş olan fareler deney hayvanları kullanım ilkeleri gereği (beslenme ve hareket zorluğu çekeceği için) eterle bayıltılıp sakrifiye edilmiştir.



Şekil 3.9. Tümör ölçümlerinden görüntüler.

A) Tümör çaplarının kumpasla ölçülmesi,

B) tümörü aşırı büyümüş bir fare

Farelerin takipler sırasında alınan verileri her bir fare için ayrı bir izlem formuna (**Ek 2.2**) kaydedilmiştir. Her bir deneme için kullanılan analiz

yöntemi/yöntemleri aşağıda verilmiştir. Tümör hacmi $LxS^2/2$ (L: en büyük, S: en küçük çap) formülü ile hesaplanmış ve mm^3 olarak kaydedilmiştir.

Deneme 1'de

- Tümör içine enjeksiyon yapıldığı andaki tümör hacim ortalaması alınmış ve daha sonraki ölçümlerin hacim ortalamalarında (bu ilk hacme göre) oluşan % değişim belirlenmiştir.
- Ölçümün yapıldığı her gün için önce Kruskal-Wallis (K-W) (gruplar arası genel farkın olup olmadığını görmek için) daha sonra da Mann-Whitney (M-W) (her grubun kontrole göre farkını saptamak için) testleri uygulanarak analizleri yapılmıştır.

Deneme 2'de

- Gruplara ait tümör hacimlerinin ölçümlerin yapıldığı her gün için ortalaması alınıp, K-W ve M-W testleri kullanılarak analizleri yapılmıştır.

Deneme 3'de

- Farelerin tümör geliştirme % oranları hesaplanarak oranlar arasındaki kontrollere (grup 1 ve 2) göre farkların anlamlılığı ki-kare testi ile analiz edilmiştir.
- Gruplara ait tümör hacimlerinin ölçümlerin yapıldığı her gün için ortalaması alınıp yine aynı şekilde K-W ve M-W testleri kullanılarak analizleri yapılmıştır.

Deneme 4'de

Grupların tümör geliştirme % oranları hesaplanmıştır.

Denemelerdeki grupların deneyler süresinceki yaşam analizleri ayrıca, Kaplan-Meier (K-M) Log Rang testi ile yapılmıştır.

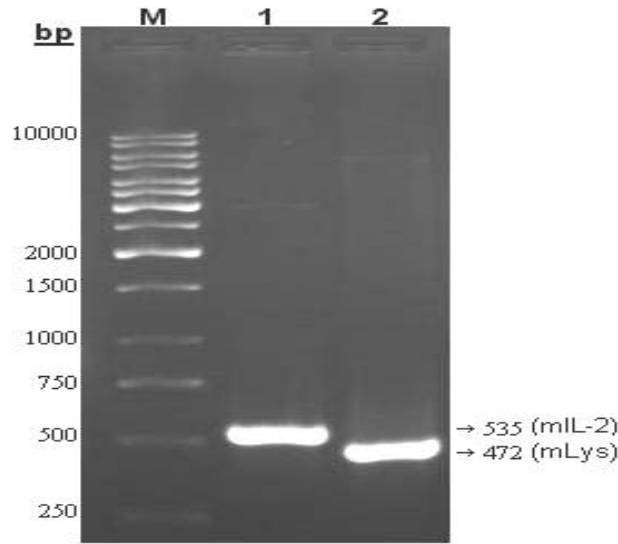
Not: Verileri mümkün olduğunca homojen hale getirmek için birbirini takip eden her üç günün ortalaması alınarak hesaplamalar yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Gen Klonlama

4.1.1. Total cDNA Eldesi ve RT-PCR/PCR Amplifikasyonları

mRNA izolasyon Kiti ve cDNA sentez kitlerinin kullanılmasıyla elde edilen lizozim genine ait cDNA'nın ve pUMVC3mIL-2 plazmidinin (mIL-2 geni için) kalıp olarak kullanılmasıyla elde edilen RT-PCR ve PCR ürünlerinin jel görüntüleri **Şekil 4.1**'de verilmiştir. Oluşan ürünler, genlere ait referans cDNA dizileri üzerinden hesaplanan ORF büyüklükleriyle uyumludur.



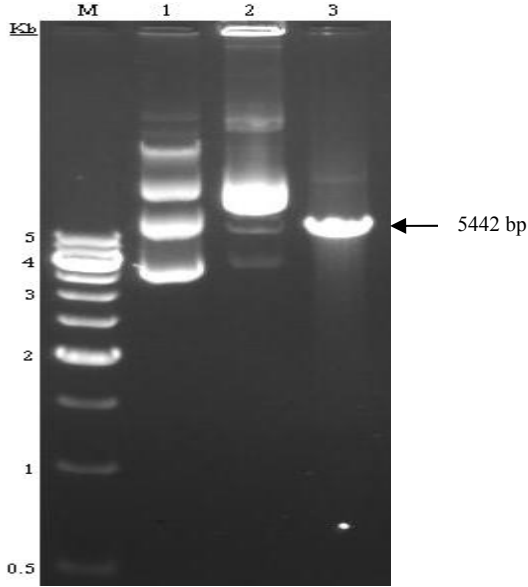
Şekil 4.1. IL-2 ve Lizozim genleri (ORF) amplifikasyonlarına ait jel görüntüsü.

M: (Marker, Fermentas Gene Ruler 1 Kb DNA ladder), **1:** mIL-2 (pUMVC3mIL-2'den amplifiye), **2:** mLys (fare total cDNA'sından amplifiye)

4.1.2. Plazmitlerin *E. coli*'ye Transformasyonu

pHM6, pBS ve pUC18 plazmit vektörlerin *E. coli*'ye transforme edilerek rekombinant bakterilerin gliserol stokları oluşturulmuştur. Hangi plazmide ihtiyaç duyulursa ilgili bakteri stoktan çıkartılıp kültüre alınarak plazmit izolasyonu yapılmıştır. Bu şekilde izole edilmiş pHM6 plazmit DNA'sına ait bir agaroz jel görüntüsü **Şekil 4.2**'de görülmektedir. 1. ve 2. sütunlarda birden fazla bant görülmesinin nedeni plazmit DNA'ların lineer, açık halkasal (open circle) ve süper sarmal (super coil) gibi değişik konformasyonel yapılarda

bulunmalarından dolayıdır. Bu gibi yapısal formlar plazmit DNA'nın jeldeki hareketini etkilemekte ve farklı yerlerde bantlar oluşturmaktadır. Jel konsantrasyonuna bağlı olarak bantların yerleri değişebilmektedir^{67, 68, 70, 71}. Lineer form (5442 bp) okla (←) gösterilmiştir.

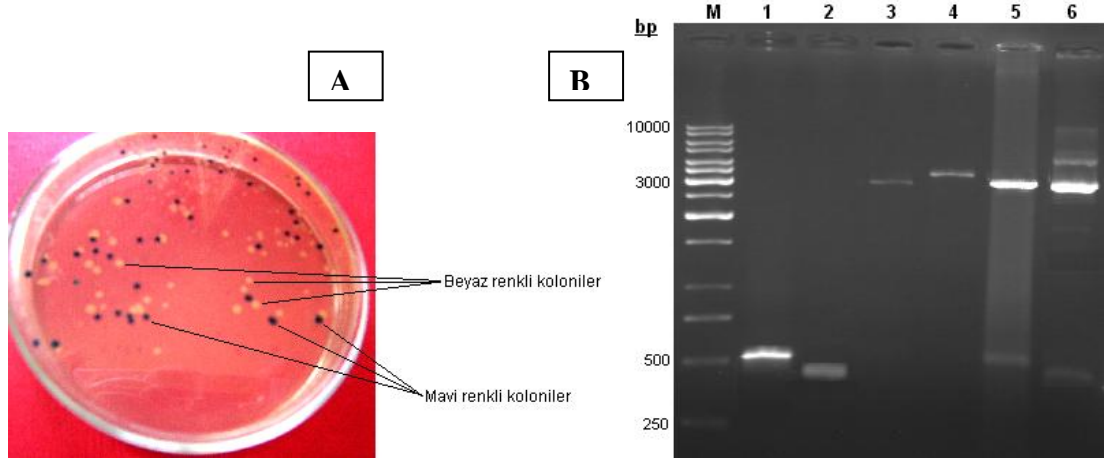


Şekil 4.2. pHM6 plazmit DNA'sına ait jel görüntüsü.

M: 500 bp'lik marker (Roche'dan), **1.** sütun: orjinal pHM6 plazmit DNA, **2.** sütun: transformasyondan sonra izole edilen plazmit DNA, **3.** sütun: pHM6/Hind III kesimi.

4.1.3. pBluescrit (pBS) Vektörüne Klonlama

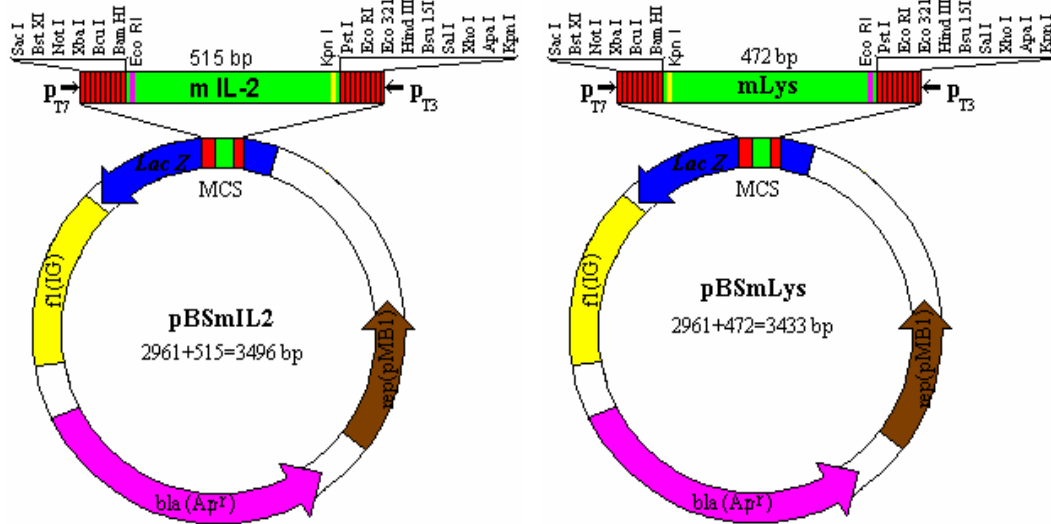
Bu vektöre klonlamada izlenen genel strateji **Şekil 3.5'**de özetlenmişti. **Şekil 4.3.A'**da transformasyon sonrası LB-agar/X-gal/Amp plaklarından biri görülmektedir. Rekombinant (beyaz) kolonilerden izole edilen plazmitlerin kalıp olarak kullanılmasıyla elde edilen PCR ürünlerinin ve bu plazmitlerin *Eco* RI + *Kpn* I kesimleri sonucu açığa çıkan insört (mIL-2 ve mLys genlerine ait DNA parçaları) bantlarının gösterildiği jel görüntüsü de **Şekil 4.3.B'**de verilmiştir. **Şekil 4.4'**de ise, oluşturulan rekombinant pBS plazmitlerinin (pBSmIL-2 ve pBSmLys olarak adlandırılmıştır) diyagramları görülmektedir.



Şekil 4.3. pBS vektörüne klonlama.

A) pBS transformasyonu sonucu gelişen mavi ve beyaz koloniler

B) Rekombinant pBS'lere ait jel görüntüsü. M: Marker, 1: pBSmIL-2 ile PCR, 2: pBSmLys ile PCR, 3: pBS (lineer), 4: pBSmIL-2 (lineer), 5: pBSmIL-2 Eco RI ve Kpn I kesimi (IL-2 insörtü önde), 6: pBSmLys Eco RI ve Kpn I kesimi (Lys insörtü önde)

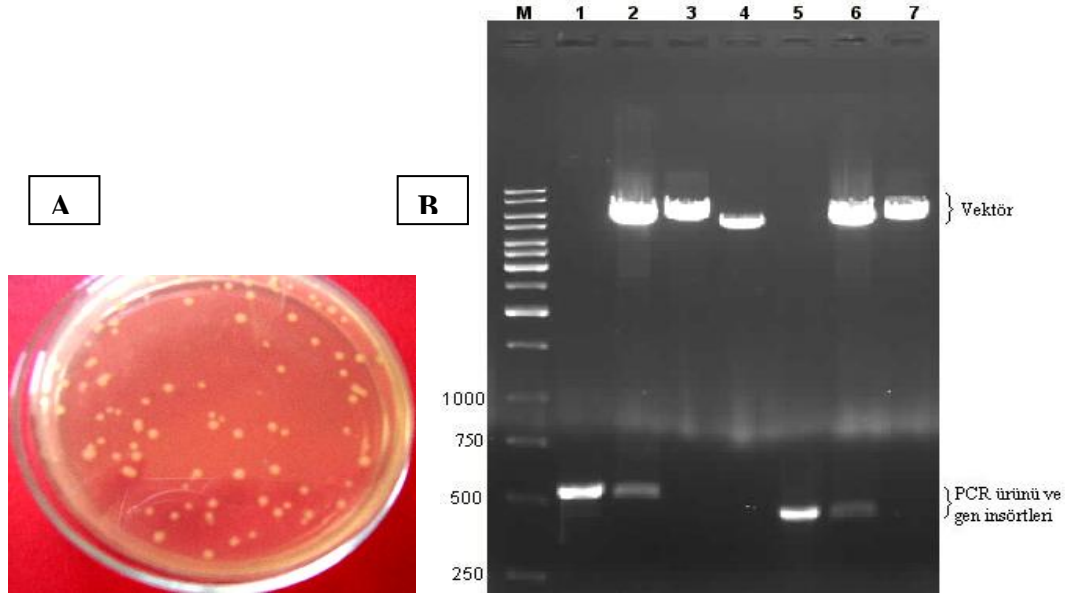


Şekil 4.4. pBSmIL-2 ve pBSmLys vektörlerine ait diyagramlar.

(mIL-2 ve mLys insörtlerin yerleşim şekli plazmitlerin *Eco RI* ve *Kpn I* enzimleri ile ayrı ayrı kesimleri ve agaroz jel elektroforezi sonrası yapılan analizlere göre belirlenmiştir).

4.1.4. pHM6 Vektörüne Klonlama

mIL-2 ve mLys genlerine ait ORF dizilerinin rekombinant pBS'lerden pHM6 vektörüne aktarılmasındaki strateji **Şekil 3.6**'da özetlemiştir. **Şekil 4.5**'de pHM6'ya klonlama sonrası bir transformasyon plağı ve rekombinant pHM6'lara (pHM6mIL-2 ve pHM6mLys) ait insört analizinin yer aldığı bir agaroz jel görüntüsü verilmiştir. pHM6 plazmitleri hem birbiriyle uyumlu uçlar oluşturmayan iki enzimle (*Eco* RI + *Kpn* I) kesildiği hem de alkalen fosfataz ile 5' fosfat grupları uzaklaştırıldığı için kendi içlerinde ligasyon oluşturamazlar. Ancak araya bir insört DNA girdikten sonra transformasyona uygun olan halkasal yapıyı kazanabilirler, bu nedenle de teorik olarak bütün kolonilerin insört taşıdığı kabul edilmektedir.



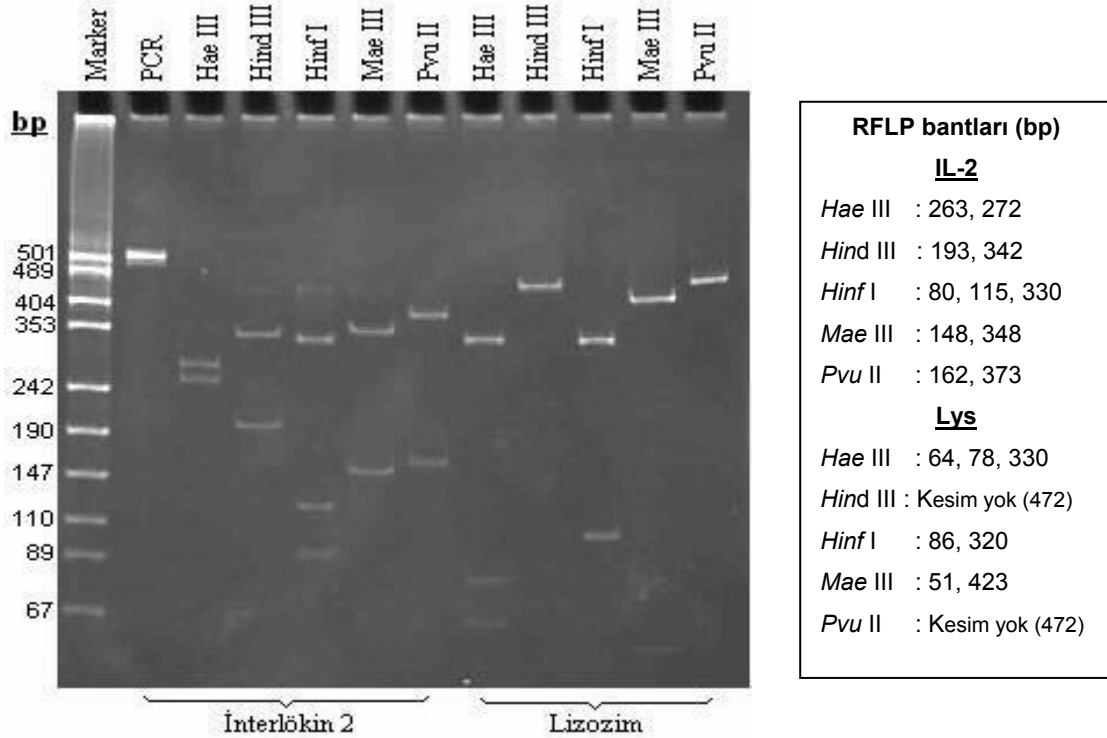
Şekil 4.5. pHM6 vektörüne klonlama.

A) Rekombinant pHM6'ya ait bir LB-agar/Amp plağı. **B)** Rekombinant pHM6'ların insört analizlerini gösteren bir agaroz jel. **M:** Marker, **1:**pHM6mIL-2 ile PCR, **2:** pHM6mIL-2 (*Eco* RI + *Kpn* I kesimi, insört önde), **3:** pHM6mIL-2 (lineer -*Not* I kesimi-), **4:** pHM6 (lineer, *Not* I kesimi), **5:** pHM6mLys ile PCR, **6:** pHM6mLys (*Eco* RI + *Kpn* I kesimi, insört önde), **7:** pHM6mLys (lineer -*Not* I kesimi-)

Teorik olarak vektör ve insört DNA moleküllerinin sayıları eşit olmakla birlikte jelde görülen bantların parlaklıkları arasındaki fark moleküler büyüklüklerin farklı oluşundan ileri gelmektedir. Moleküler büyüklüğü fazla olan daha parlak görülmektedir.

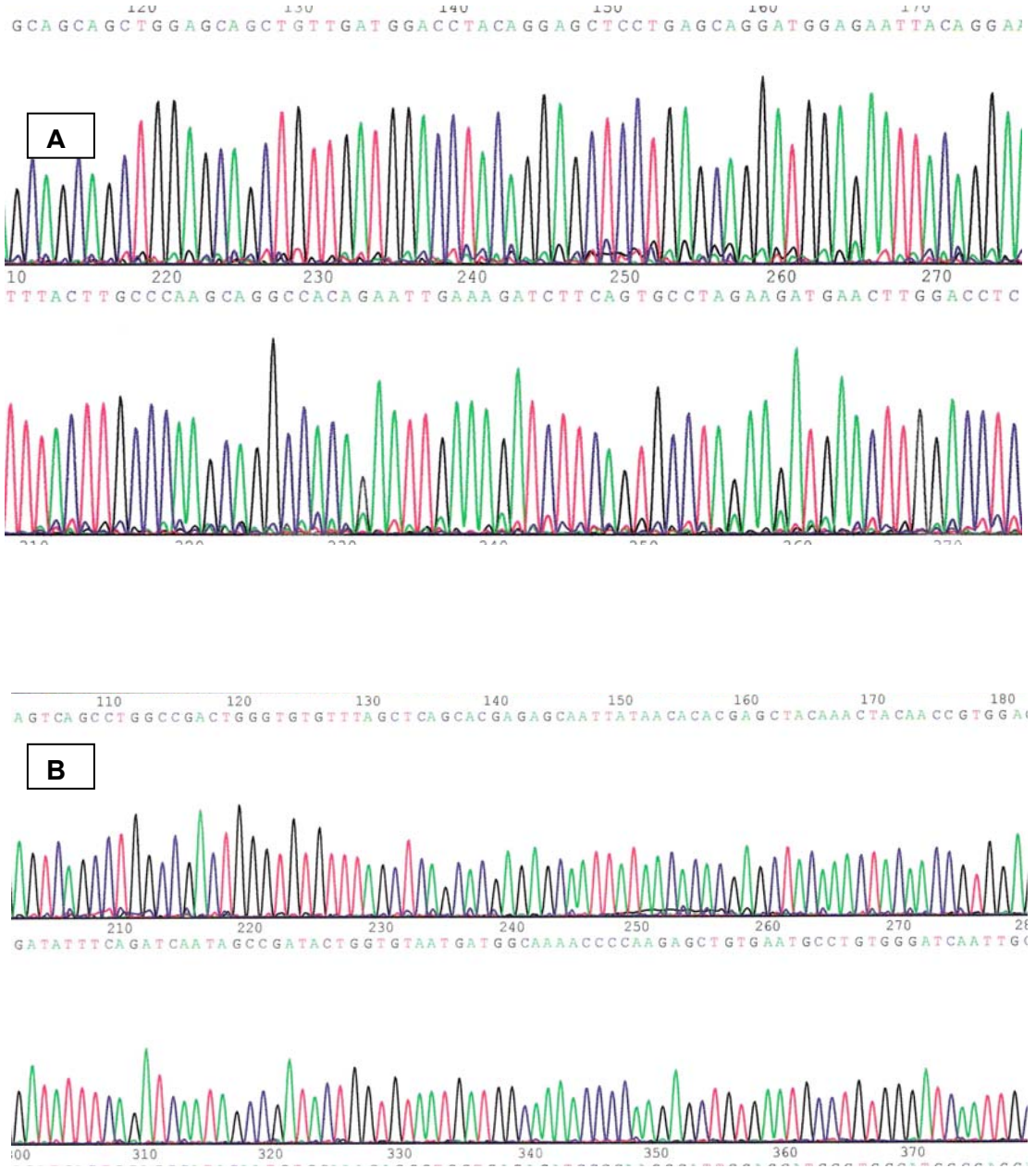
4.1.5. RFLP ve Dizi Analizi

Rekombinant pHM6 vektörlerinin kalıp olarak kullanılmasıyla yapılan PCR ürünlerinin 5 ayrı endonükleazla kesimi ve %12'lik poliakrilamid jel elektroforezi sonucu elde edilen RFLP analiz görüntüsü **Şekil 4.6**'da verilmiştir. Burada oluşan parça uzunlukları LabWork programında marker DNA referans alınarak değerlendirildiğinde, genlere ait ORF dizilerinin Generunner programıyla analizi sonucu elde edilen parça uzunluklarıyla (**Bölüm 3.2.1.2**) uyumlu olduğu görülmüştür. Klonlamaların her aşamasında RFLP analizi yapılmış ve aynı sonuçlar alınmıştır ancak jel görüntüleri verilmemiştir.



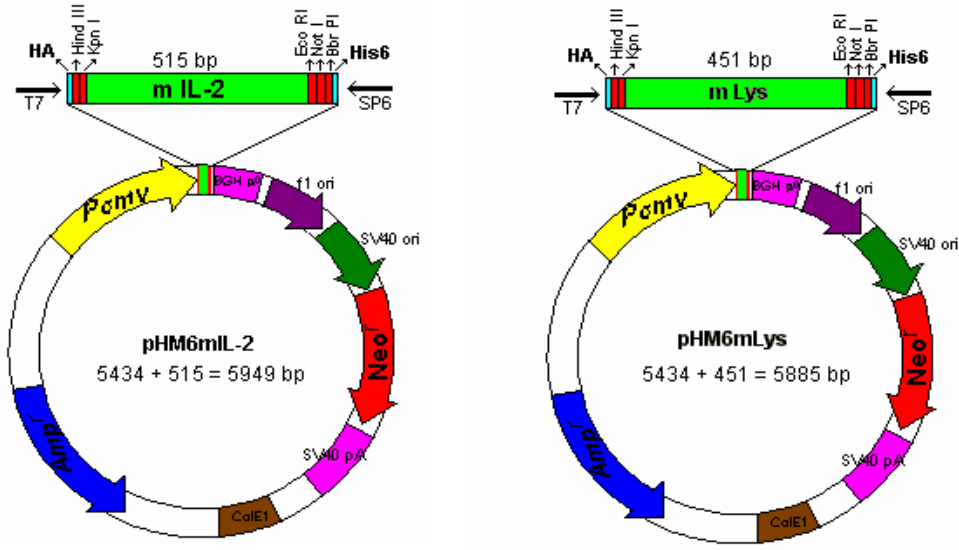
Şekil 4.6. pHM6mIL-2 ve pHM6mLys vektörleri ile yapılan PCR ürününün 5 ayrı enzimle kesim profili (IL-2/ *Mae* III kesimindeki 39 ve Lys/ *Hinf* I kesimindeki 8, 11, 18 ve 20 bp'lik parçalar jelde görünmemektedir).

pHM6mIL-2 ve pHM6mLys plazmit DNA'ların dizi analizi kromotogramlarına ait bazı bölümler **Şekil 4.7**'de verilmiştir. Elde edilen dizilerin tamamının genlere ait referans dizilerle uyumlu olduğu 'generunner' programıyla yapılan örtüştürme (alignment) analiziyle belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Rekombinant pHM6 plazmit DNA'ların dizi analiz kromatogramlarına ait bazı bölümler.
A) MpHM6mIL-2, **B)** pHM6mLys
 Pikler için anahtar: **Yeşil** = A, **Kırmızı** = T, **Siyah** = G ve **Mavi** = C

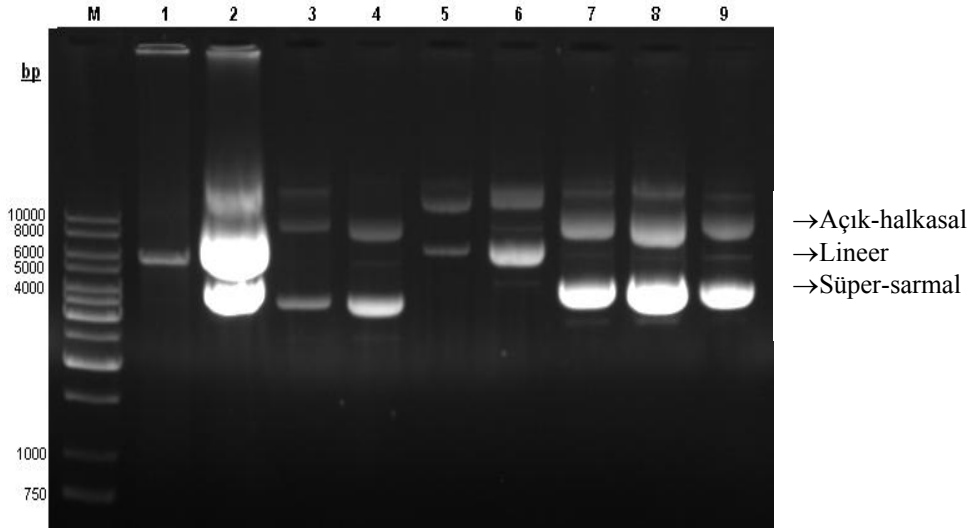
Genlerin klonlandığı rekombinant pHM6 vektörlerine ait diyagramlar **Şekil 4.8'**de yer almaktadır. İnsörtlerin okuma çerçevesine doğru bir şekilde (*Kpn* I → *Eco* RI yönünde) yerleştiği bu enzimlerle yapılan kesimler ve agaroz jel analizleriyle doğrulanmıştır.



Şekil 4.8. pHM6mIL-2 ve pHM6mLys rekombinant vektörlerine ait diyagramlar.

4.1.6. Endotoksinsiz Plazmit DNA İzolasyonu

Rutin protokolle ve Gene Elute™ Endotoksin-free Plazmit Midiprep Kit' (PLED-35, Sigma) ile izole edilmiş plazmitler ve değişik formları Şekil 4.9'da görülmektedir. Verimli bir transfeksiyon için, kullanılan plazmit DNA'nın süper sarmal formda olması gerekmektedir. Şekil 4.9'daki agaroz jel görüntüsünde her sütun kendi içinde değerlendirildiğinde, süper sarmal formun fazla olduğu sütunlardaki (3, 4, 7, 8 ve 9. sütunlar) DNA'ların kitle yapılan izolasyonlara ait olduğu görülmektedir. Sütun 6'daki izolasyon da kitle yapılmıştır ancak bu 8477 bp büyüklüğündeki pHM6LacZ plazmidine ait olduğundan öndeki süper sarmal form pHM6mIL-2 (5949 bp) ve pHM6mLys (5885 bp) plazmitlerine göre daha geridedir. Rutin yöntemle yapılmış olan Sütun 2'deki izolasyonda ise lineer form oranının daha fazla olduğu görülmektedir.



Şekil 4.9. Rutin protokol ve Kitle izole edilen plazmitlere (ve formlarına) ait jel görüntüleri.
M: marker, 1: pHM6 Eco RI kesimi (lineer), 2: pHM6 (rutin izolasyon), 3: pHM6 (kit ile izolasyon), 4: pHM6 (kit ile izolasyon), 5: pHM6LacZ (rutin izolasyon), 6: pHM6LacZ (kit ile izolasyon), 7: pHM6mIL-2, 8,9: pHM6mLys (kit ile izolasyon)

4.2. Hücre Kültürü

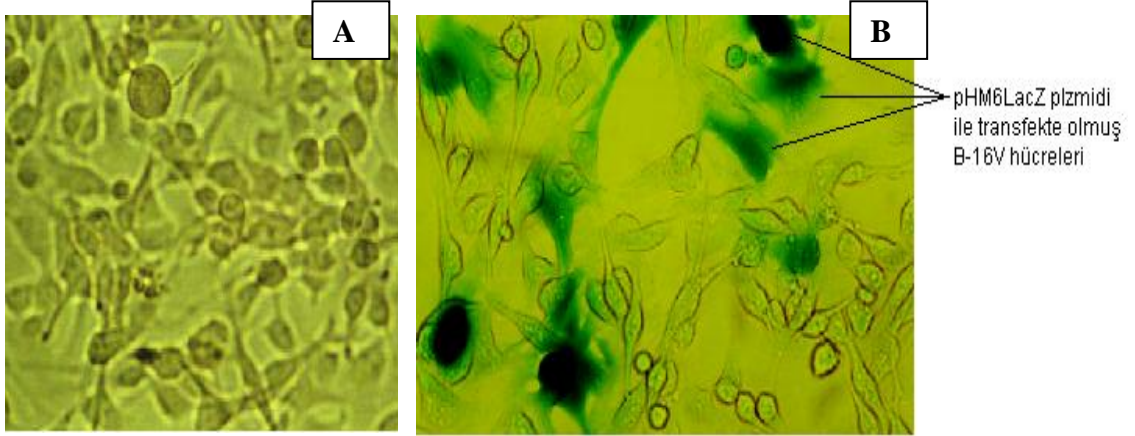
Mevcut her iki hücre hattı da (B-16V ve B16-FO melanoma hücre hatları), RPMI 1640 içinde %10 FBS/FCS ve 50µg/ml Gentamisin içeren kültür medyumunda, 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş etüvde üretilerek **Bölüm 3.2.1 ve 2'**deki yöntemlerle pasajlanmış ve kriyobankları oluşturulmuştur. Her iki hücre hattının da bu koşullarda aynı hızda ürettiği ve ortama melanin salgıladığı (üreme ortamının açık kahverengi görünmesi) gözlenmiştir. İleride de bahsedileceği gibi bu çalışmada B-16V hücre hattının kullanılmasına karar verilmiş ve bundan sonraki bütün kültürlerde bu hücreler kullanılmıştır. B16-FO hücre hattı ise kriyoprezervasyonu yapılarak sıvı azot içinde stoklanmıştır.

4.3. Lipozomal Transfeksiyon

4.3.1. β-galaktozidaz ve Lizozim Aktivite Analizleri

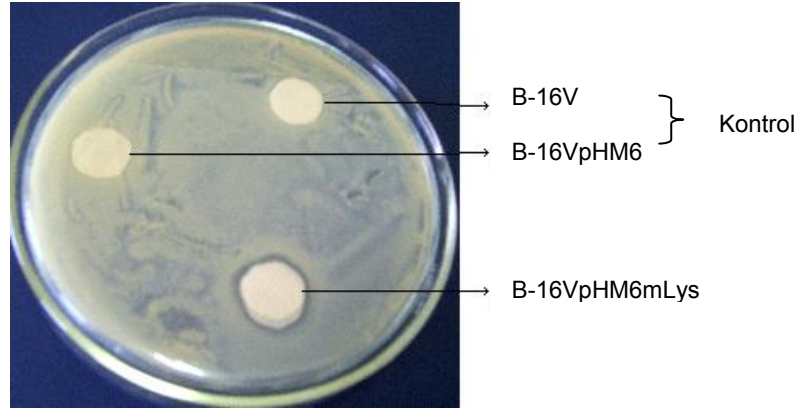
B-16V melanoma hücrelerine yapılan pHM6LacZ plazmidi transfeksiyonu sonunda β-galaktozidaz enzim aktivitesini göstermek için yapılan histokimyasal

boyamada (**Şekil 4.10**) kontrol olarak kullanılan B-16V hücreleri hiç boyanmadığı halde (**Şekil 4.10 A**) transfekte hücrelerin belli oranda boyandığı saptanmıştır (**Şekil 4.10 B**). Plak yüzeyindeki farklı bölgelerde boyanan ve boyanmayan hücre sayımlarında boyanan hücrelerin oranı ortalama %3-4 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. β-galaktosidaz enzim aktivitesinin tespiti için yapılan histokimyasal boyama. **A)** B-16V hücreleri (kontrol) ve **B)** pHM6LacZ plazmiti ile transfekte B-16V hücreleri

pHM6mLys plazmitleri ile de transfeksiyon yapılarak lizozim aktivitesi gösterilmeye çalışılmıştır. Lizozim aktivitesine ait bir örnek sonuç **Şekil 4.11**'de gösterilmiştir. pHM6mLys ile transfekte hücrelerin üreme ortamına salgıladıkları lizozimin kağıt disk etrafında *M. luteus* üremesine engel olduğu (halka şeklindeki açıklık) görülmektedir (*M. luteus*, lizozime karşı çok duyarlı bir bakteri olup lizozim aktivite deneylerinde kullanılmaktadır). Kontrol amacıyla kullanılan B-16V ve B-16VpHM6 hücrelerine ait sıvıların damlatıldığı disklerin etrafında üremenin engellenmediği görülmektedir. Yapılan tekrar çalışmalarında, büyük olasılıkla aktivitenin çok zayıf olarak gözlenmesinden ötürü, bu bulgu aynı etkiyi gösterecek şekilde ortaya çıkmamıştır.



Şekil 4.11. B-16V ve plazmitlerle (pHM6 ve PHM6mLys) transfekte B-16V hücrelerine ait kültür sıvılarının lizozim aktivitesi açısından kontrolü. Plak yüzeyinde yaygın olarak üremiş olan bakteri *M. luteus*'tur. pHM6mLys ile transfekte kültür sıvısının damlatılmış olduğu kağıt disk etrafındaki halka lizozim aktivitesinden dolayı *M. luteus* üremesinin engellendiğini göstermektedir.

4.3.2. Transfekte Hücre Hatlarının Geliştirilmesi

B-16V hücrelerinin pHM6, pHM6mIL-2 ve pHM6mLys plazmitleri ile *in vitro* transfeksiyonundan yaklaşık 20 gün sonra plaklarda yalnızca bu plazmitlerle transfekte hücreler (küçük üreme odakları şeklinde) kalmış ve bunların pasajlarıyla da B-16VpHM6, B-16VpHM6mIL-2 ve B-16VpHM6mLys olarak adlandırdığımız transfekte hücre hatları geliştirilmiştir. Bu hücrelerin morfolojik yapılarında, üreme şekillerinde ve çoğalma hızlarında B-16V'den farklı bir durum gözlenmemiştir. B-16V hücre kültüründen farklı, bunların ortamına seçicilik için 0.5 mg/ml Genetisin (G 418) ilave edilmiş olmasıdır. Bu ortamda B-16V'nin protein sentezi bloke olmakta ve çoğalması durmaktadır.

Bu şekilde pasajlanıp çoğaltılan transfekte hücrelerin hem kriyoprezervasyonları yapılmış hem de çalışma bitene kadar kültürlerinin devamlılığı sağlanmıştır.

4.4. Fare Denemeleri

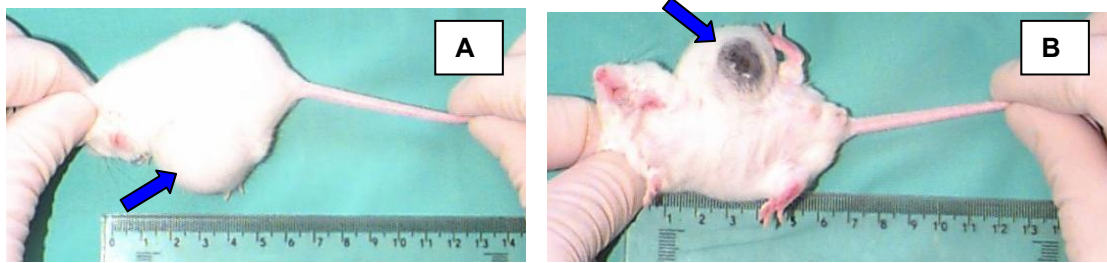
4.4.1. Tümör Oluşturma

B16-F0 ve B-16V melanoma hücre hatlarının deneme amaçlı olarak 4 adet fareye (2 adet balb/c, 2 adet C57BL/6) enjeksiyonundan bir hafta sonra,

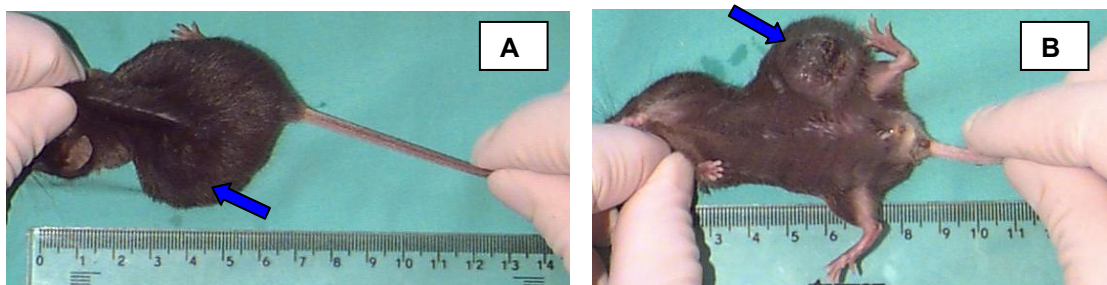
enjeksiyon bölgelerinde nohut büyüklüğünde birer kitle tespit edilmiştir. B-16V enjekte edilen balb/c'de bu kitle 13. günde kaybolurken diğer farelerde büyümeye devam etmiş ve 15 gün içinde yaklaşık 1.5 cm'lik çapa ulaştığı yapılan ölçümlerle belirlenmiştir. Her iki hücre hattının oluşturduğu tümör kitleleri, her iki fare ırkında da hemen aynı zamanlarda gelişmeye başlayıp bir ay içinde yaklaşık aynı büyüklüklere (~ 2.5 cm çaplı) ulaşmıştır (**Şekil 4.12 ve 13**). Farelerde (deney başlangıcı ve sonu arasında) kayda değer bir kilo kaybı/kazanımı tespit edilmemiştir (ancak tümör kitlerinin ağırlıkları dikkate alındığında her hayvanda yaklaşık 6-8 gr'lık kilo kaybı mevcuttur) (**Çizelge 4.1**).

Çizelge 4.1. Hücre enjekte edilen fareler ve 4 hafta süreyle yapılan tartım değerleri (gr).

	Fareler	Başlangıç Ağırlık (gr)	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta	Tümör kitlesi alındıktan sonra
B16-F0 enjeksi	1. Balb/c	33	33.5	33	33	32.5	24.5
	2. C57BL/6	28	28	27.3	27.5	27	24
B-16V enjek	3. Balb/c	32	32	31.5	33	33	33 (tümörü yok)
	4. C57BL/6	28	28.3	28.5	28	28	22



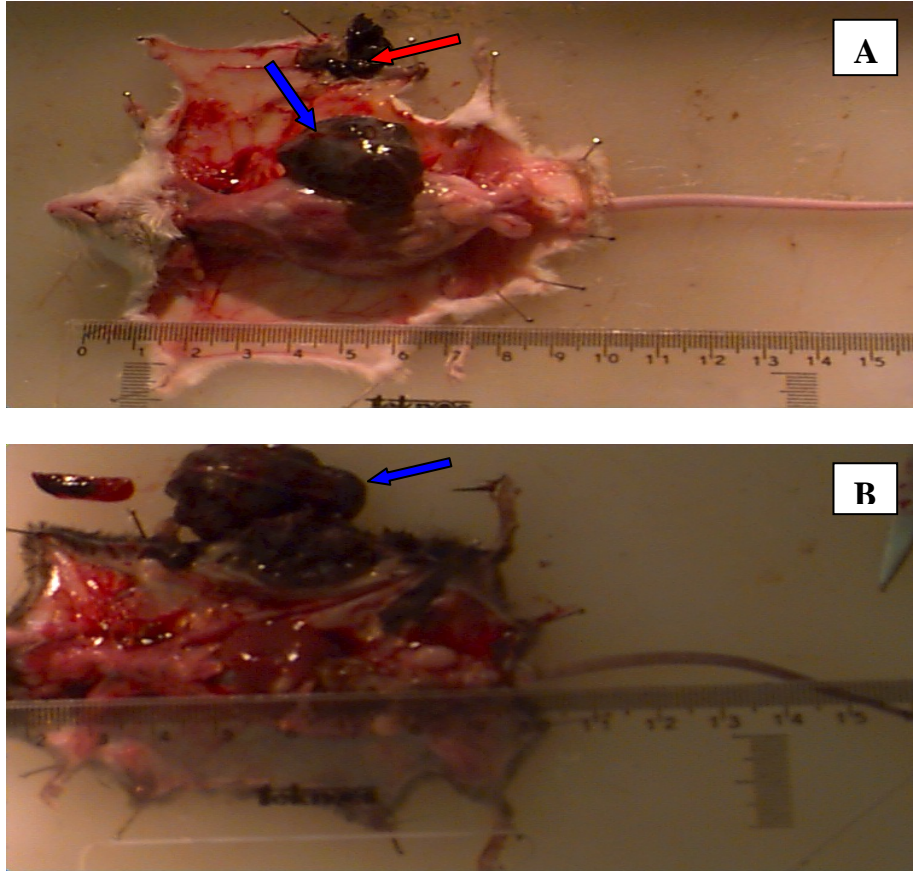
Şekil 4.12. B16-F0 hücre hattı enjeksiyonu ile balb/c'de gelişmiş olan tümör kitlesi. Aynı farenin; **A**: sırt, **B**: karın taraftan çekilmiş görüntüleri.



Şekil 4.13. B-16V hücre hattı enjeksiyonu ile C57BL/6'de gelişmiş olan tümör kitlesi. Aynı farenin; **A**: sırt, **B**: karın taraftan çekilmiş görüntüleri.

4.4.2 Farelerin Diseksiyonu ve Patolojik İncelemeler

Fareler melanoma hücrelerinin enjeksiyonundan 30 gün sonra disekte edildiğinde tümör kitlelerinin deri altında siyah renkli (salgıladıkları melaninden dolayı) katı kitleler şeklinde gelişmiş olduğu ve peritonda asit sıvısı oluşmadığı belirlenmiştir (**Şekil 4.14 A ve B**). B16-F0 enjekte edilen balb/c'de deri içine metastaz tespit edilmiştir (**Şekil 4.14 A**'da kırmızı okla gösterilmektedir).

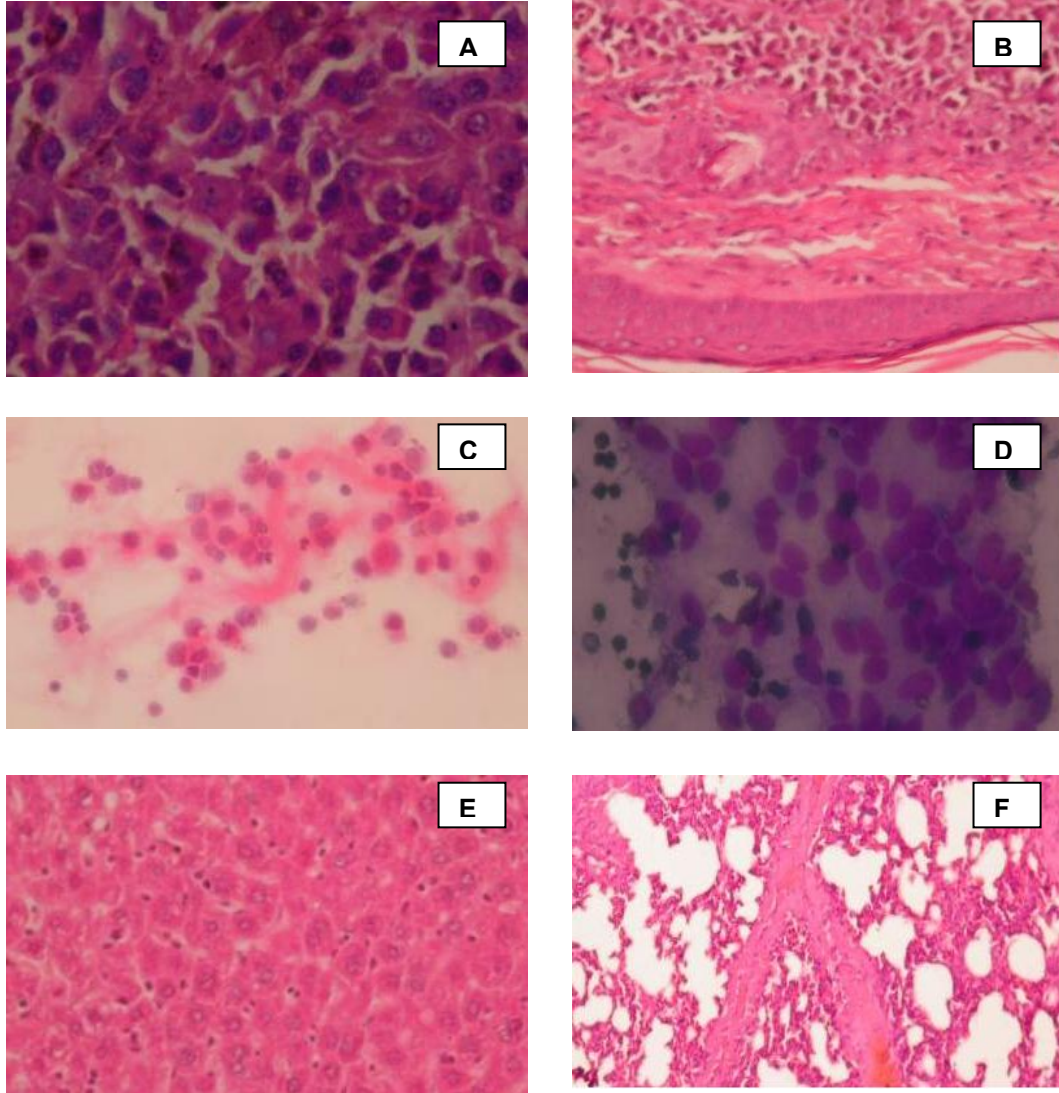


Şekil 4.14. Disekte edilmiş fareler.

- A)** B16-F0 hücre hattı enjekte edilen balb/c ırkı farede gelişmiş olan tümör kitlesi.
B) B-16V hücre hattı enjekte edilen C57BL/6 ırkı farede gelişmiş olan tümör kitlesi

Üç farede; balb/c ve C57BL/6 (B16-F0 enjeksiyonundan) ve diğer (4. fare) C57BL/6'da (B-16V enjeksiyonundan) gelişmiş olan tümör kitlerinin ağırlıkları sırasıyla 8, 7 ve 6 gr, hacimleri ise, su taşıma yöntemiyle; 8, 6.7 ve 5.6 cm³, $V=L \times S^2/2$ (L = en büyük çap, S= en küçük çap) formülü ile de; 8.4, 6.6 ve 6.34 cm³ olarak hesaplanmıştır.

Disekte edilen farelerden alınan tümör kitleleri, dokular ve organların patolojik incelemeleri sonucu; oluşan tümörün malign melanoma olduğu, organlarda ve periton yıkama sıvısında ise metastaza rastlanmadığı tespit edilmiştir. Tümör kitleleri, periton sıvısı, karaciğer ve akciğere ait ışık mikroskobu ile alınan örnek görüntüler **Şekil 4.15**'de topluca verilmiştir.



Şekil 4.15. Tümör kitesi, asit sıvısı ve iki organa ait ışık mikroskobu görüntüleri (400 X).

A ve **B**: balb/c'de gelişen tümör kitesi ve deri metastazı, **C** ve **D** (giemsa); periton yıkama sıvısı yaymaları, **E**: karaciğer, **F**: akciğer (hematoksilen-eosin boyalı)

B16-F0 ve B-16V melanoma hücre hatlarının kültürü yapıp farelere enjekte edildiğinde de tümör oluşturdukları gözlemlenmiştir. Kullanılan her iki hücre hattı da C57BL/6 fare ırkına ait olduğundan benzer özelliklere sahip olup

aynı genetik özelliklerdeki fare ırklarında tümör geliştirebilmektedirler (tümörjenik). Yapılan bu ön deneme çalışmasında, B16-F0'ın hem balb/c hem de C57BL/6 fare ırklarında tümör geliştirirken, B-16V hücre hattının başlangıçta her iki fare ırkında da tümör geliştirdiği fakat balb/c'de bunun 13. günde kaybolduğu, C57BL/6'de ise büyümeye devam ettiği gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, B-16V hücre hattının C57BL/6 fare ırkına daha özgün olduğuna ve bu nedenle de ilerdeki deney gruplarının C57BL/6 fare ırklarından oluşturulmasına ve hücre hattı olarak da bundan sonraki bütün çalışmalarda B-16V'nin kullanılmasına karar verilmiştir.

4.4.3. Planlanan Denemeler ve Grupları

Bu çalışmanın amacına uygun olacak şekilde planlanmış olan denemeler ve bu denemeler içinde oluşturulan gruplar **Çizelge 3.6**'da verilmiştir. Denemelerin başlangıcında her bir gruba cinsiyetler de eşit olacak şekilde yaklaşık 10-15 fare alınmıştır (Deneme 3'de elde edilen verilerin doğrulanması amacıyla bu deneme tekrar edilmiş bu nedenle de her bir gruptaki fare sayısı yaklaşık olarak 30'a ulaşmıştır).

Deneme 2 ve 3'de hücre enjeksiyonları yapıldıktan sonra yalnızca tümör gelişip gelişmediği kontrol edilmiş ve gelişen tümörlerin çapları belirlenen zamanlarda kumpasla ölçülerek değerler kaydedilmiştir.

Tümör kitleleri içine enjeksiyonların yapıldığı Deneme 1'de ise daha özel uygulamalar yapılmıştır.

Bölüm 3.2.4.4'deki yöntemlerle B-16V hücre hattı kültürleri hazırlanmış, deneme grubuna ayrılmış olan farelerin deri altına enjekte edilmiştir. Enjeksiyonu takiben ortalama 8. günde tümör kitleleri 3-4 mm'lik çaplarda gözle görülebilir büyüklüklere ulaşmıştır. Bu aşamadan sonra fareler daha yakın takibe alınmış ve kitleler 5-7 mm'lik çaplara (ideal olarak 150-250 mm³ arası) ulaştığında da (9-12. günler) kitle içine **Bölüm 3.2.4.5**'deki yöntemle plazmit DNA-lipozom kompleksi enjekte edilmiştir.

4.5. Elde Edilen Veriler ve Analizleri

Fare takip formuna kaydedilen veriler SPSS (versiyon 12.0) programında veri giriş sayfasına **Ek 2.3**'deki gibi girilmiştir. Üç ayrı denemede 6 farklı grubun ayrı ayrı ve grup ortalamaları ile birlikteki tümör hacmi ölçümlerine ve istatistiksel analizlerine ait değerleri içeren çizelge (**Çizelge 4.2 – 4.4**) ve grafikler (**Şekil 4.16 - 4.37**) aşağıda verilmiştir. Çizelgelerde tanımlayıcı istatistik değerleri ve yalnızca grup karşılaştırmalarına (K-W testi) ve anlamlı bulunanların ($p \leq 0.05$) ikili karşılaştırmalarına (M-W testi) ait p değerleri verilmiştir. Deneme gruplarında incelenen farelerin bireysel tümör geliştirme hızlarını görebilmek için her farenin tümör gelişim grafiği ayrı verilmiştir.

Deneme 1 sonuçları

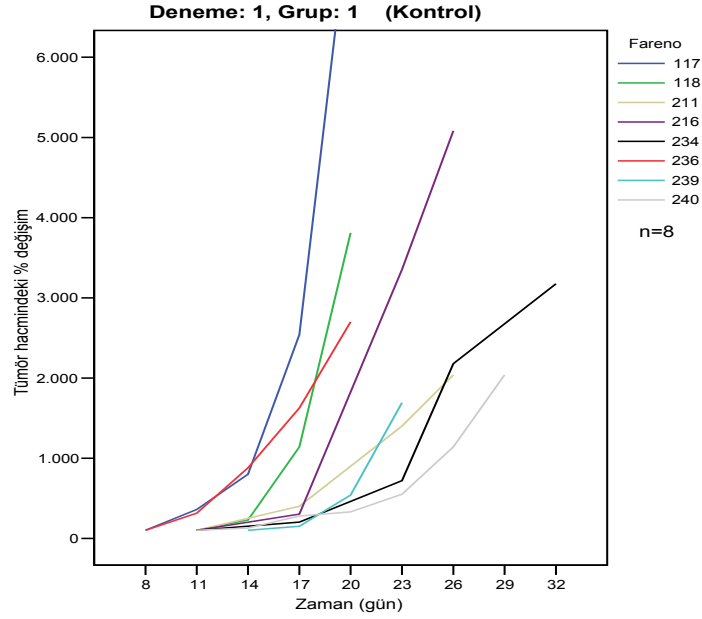
Tümör içine plazmit (pHM6, pHM6mIL-2 ve pHM6mLys) enjeksiyonlarının yapıldığı Deneme 1'de tümör hacimlerdeki değişim, tümör içi enjeksiyonun yapıldığı (başlangıç) gün sonrası tümör hacimlerdeki % değişim oranları ile belirtilmiştir (**Çizelge 4.2**). 17-26. günler arasında hem genel (K-W: P_{1-6} , $p \leq 0.05$) hem de her grubun kontrole göre karşılaştırmalarında (M-W: $P_{1-2} - P_{1-6}$, $p \leq 0.05$) istatistiksel olarak anlamlı farklar görülmekle birlikte tümör gelişim sürecindeki diğer günlerde farklar anlamlı bulunamamıştır.

Çizelge 4.2. Deneme 1'den elde edilen veriler ve analizleri.

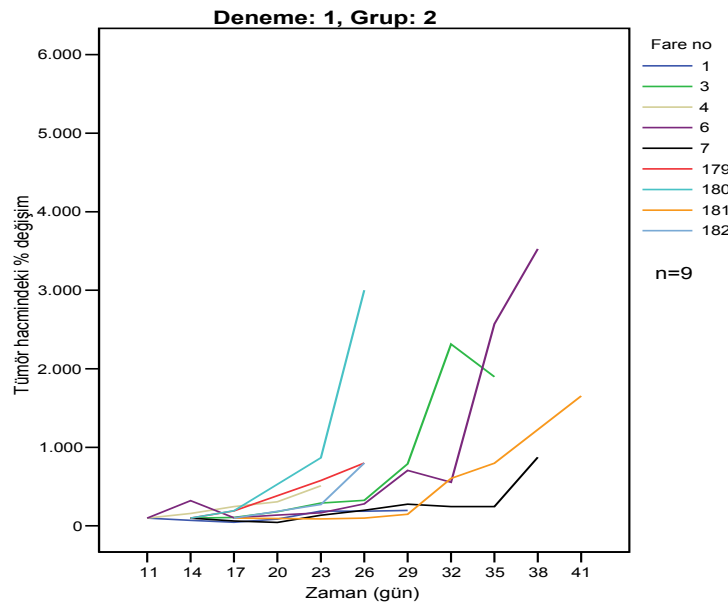
Gruplara ait 8-41. günlerdeki (tümör içi enjeksiyonun yapıldığı ilk hacme göre tümör hacmindeki yüzde değişim ortalamaları ve diğer tanımlayıcı istatistiksel değerler) grupların genel (K-W) ve kontrole göre (M-W) karşılaştırmaları.

DENEME 1		Zaman (gün)										
		8	11	14	17	20	23	26	29	32	35	
GRUPLAR	1	Or.T. H. ±sd min-max	0 0-260	67.8±116.6 0-260	327.6±380.5 0-780	730.4±867.8 51-2440	2966±3098 230-7848	2671±3168 451-8810	4688.2±5090.5 1040-13400			
	2	Or.T. H. ±sd min-max	0±0 0-0	35.6±86 -30- 221.4	27.17±66.8 -55.5-145.2	50.9±101 55.9-206	243.9±257 -12.2-766.7	610.9±963.8 0-2900	322.7±301.5 46.9-689.1	829.6±936.7 145-2214.2	1277.7±1051.3 144.9-2471.4	
	3	Or.T. H. ±sd min-max	0±0 0-0	0±0 0-0	129±195 0-0		814.2±855.9 103-2319	505.7±310.9 127-812	1991.4±1886.6 336.5-5455			
	4	Or.T. H. ±sd min-max	0±0 0-0	20.3±60.8 0-182.5	114.8±253.6 -5.5-860	164.6±231.4 -14.29-766.6	321.4±319.4 0-860.3	882±1492.2 0-6197.6	412.7±408.5 -53.91-1148	923.3±959.6 -17.70-2862.96	904.8±921.2 2.88-2450.7	751.6±484 107.4-1448.2
	5	Or.T. H. ±sd min-max	0±0 0-0	16.6±30.8 0-84.09	42.6±74.99 -19-231	166.9±187.3 -70.75-550	504±323.7 -85.8-1052	786.8±644.8 -92.9-1906.9	576.8±571.2 -96.84-1468	2390.3±2348.4 -96.84-7307		
	6	Or.T. H. ±sd min-max	0±0 0-0	68.5±104 0-277.78	249.7±566.5 -67.33-2375	237.5±364 -38.8-1420	623.5±1045 14.3-3915	1014±1322 0-5525	1162.5±1299.3 0-4318.2	4354±6739.5 16.67-19900		
ÖNEMLİLİK	K-W	P_{1-6}	1,00	0,646	0,191	0,055	0,019	0,055	0,023	0,151	0,390	0,397
	M-W	P_{1-2} / P_{1-3} P_{1-4} / P_{1-5} P_{1-6}				,002/ ,023/,053 ,043	,009/ ,088/,127 ,052	,005/ ,027/,053 ,068	,013/,008 ,003/,008 ,689			

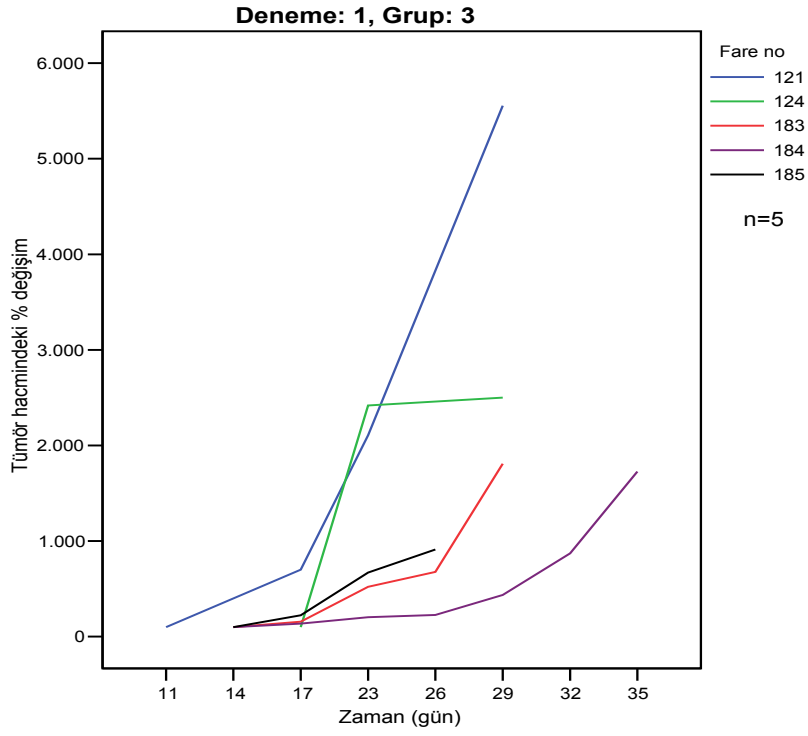
Her bir gruptaki farelerin bireysel tümör geliştirme grafikleri (ilk hacmin % artış değişimlerine göre) **Şekil 4.16 – 4.21**'de, grup ortalamalarını gösteren grafikler ise **Şekil 4.22 ve 4.23**'de verilmiştir. Deneme 1'de grafikler genel olarak incelendiğinde 26. güne kadar kontrole göre tüm gruplarda tümör gelişim hızının belirgin bir şekilde yavaşladığı görülmektedir.



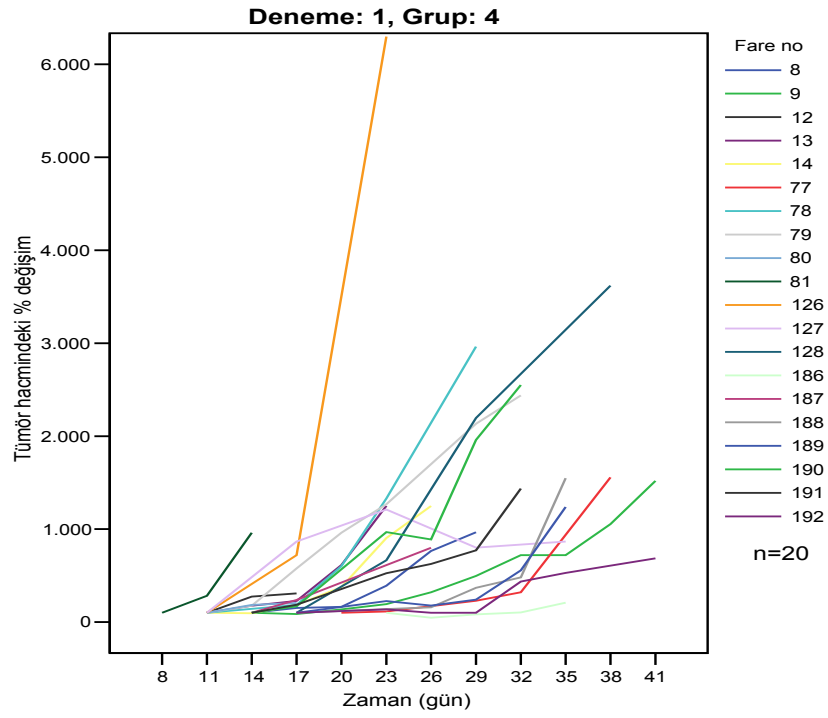
Şekil 4.16. B-16V enjekte edilen farelerdeki tümör gelişim grafiği.
Bu gruba başka bir uygulama yapılmamıştır (kontrol grubu).



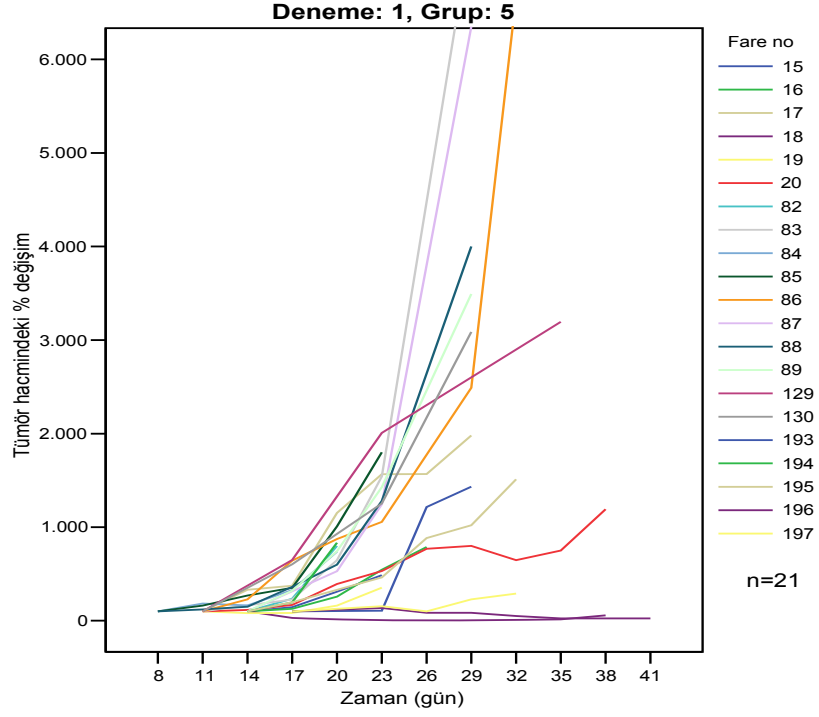
Şekil 4.17. Tümör kitlesi içine pHM6 enjekte edilen farelerdeki tümör gelişim grafiği.



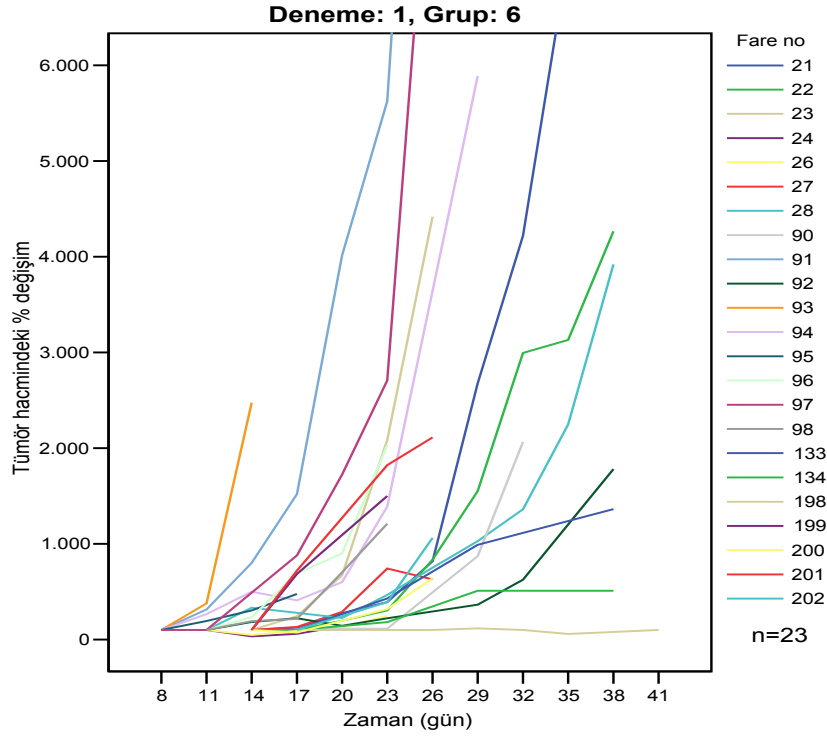
Şekil 4.18. Tümör kitlesi içine PBS-DOTAP enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi.



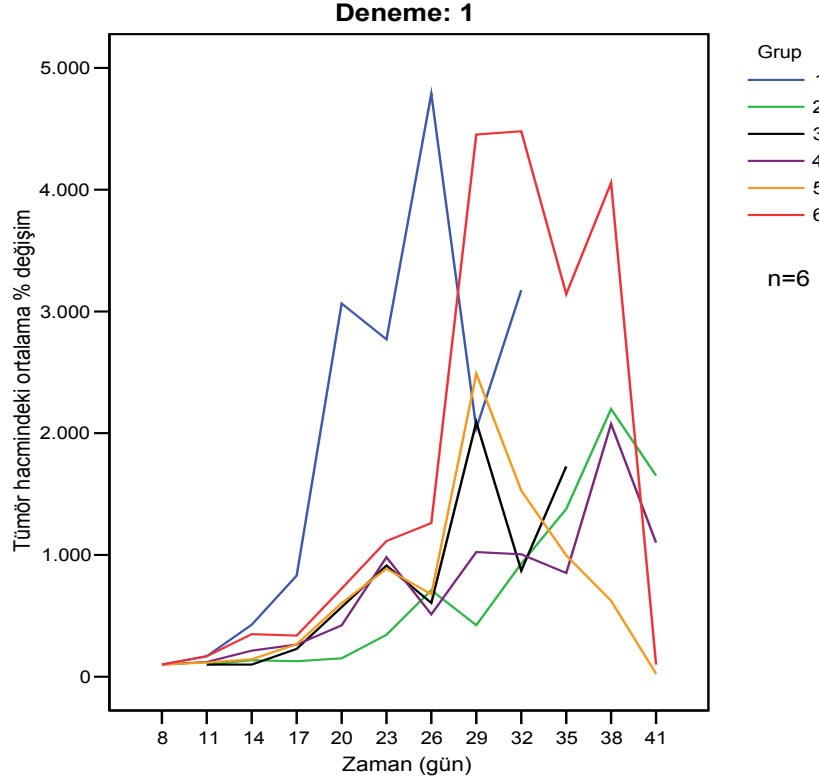
Şekil 4.19. Tümör kitlesi içine pHM6mIL-2 enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi.



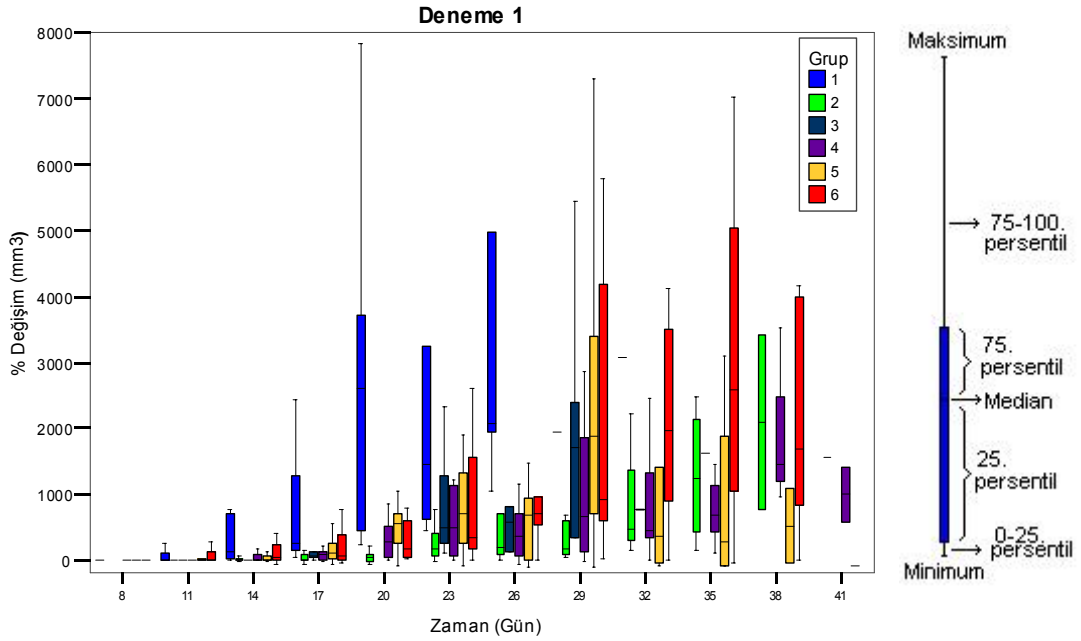
Şekil 4.20. Tümör kitlesi içine pHM6mLys enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi.



Şekil 4.21. Tümör kitlesi içine pHM6mIL-2+pHM6mLys enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi.



Şekil 4.22. Deneme 1'deki grupların karşılaştırması.
(Her ölçüm zamanı için her grubun % hacim değişim ortalaması alınmıştır)



Şekil 4.23. Deneme 1'deki grupların karşılaştırması (box plot).
(grupların minimum ve maksimum tümör hacimleri)

Deneme 2 sonuçları

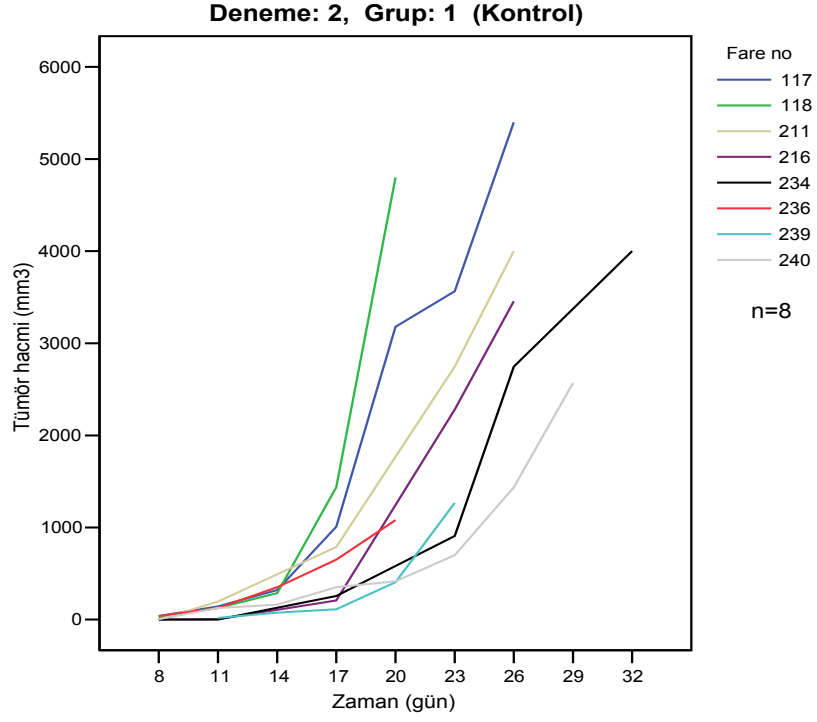
Deri altına plazmit (pHM6, pHM6mL-2 ve pHM6mLys) enjeksiyonlarının yapılmasından 2 gün sonra aynı yere B-16V hücrelerinin enjekte edildiği bu denemede tümör hacimlerdeki değişim **Çizelge 4.3**'de belirtilmiştir. Bu denemede grup karşılaştırmalarına bakıldığında; 8, 11, 17 ve 23. günlerde grup karşılaştırmaları (K-W) anlamlı ($p \leq 0.05$), her grubun kontrole göre karşılaştırmalarında (M-W) ise farklar bazılarında (P_{1-2} , P_{1-4} P_{1-5}) anlamlı iken diğer günlerde anlamlı bir fark görülmemektedir.

Çizelge 4.3. Deneme 2'den elde edilen veriler ve analizleri.

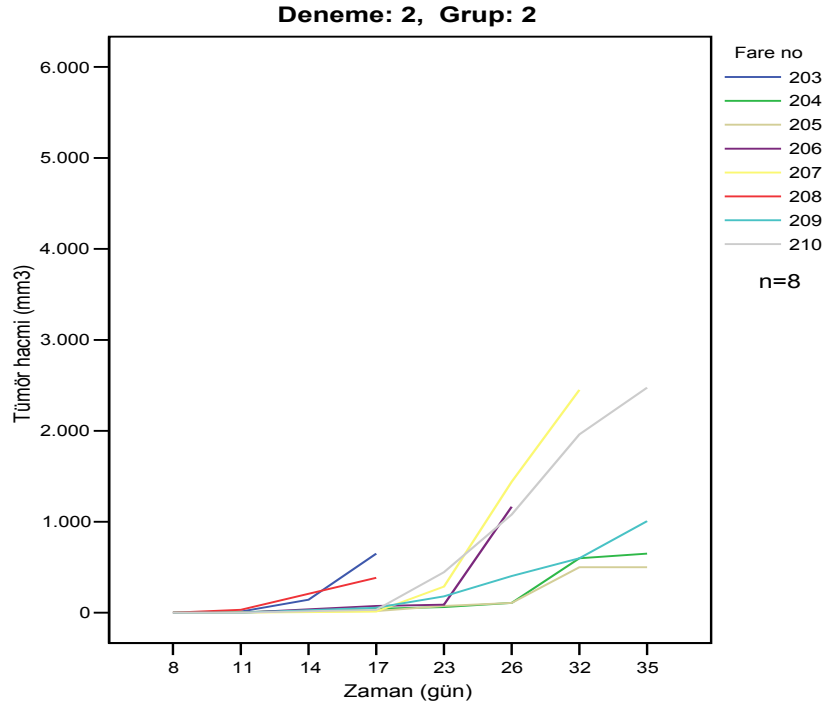
Gruplara ait 8-41. günlerdeki ortalama tümör hacimleri (mm^3), tanımlayıcı istatistiksel değerleri, grupların genel (K-W) ve kontrole göre (M-W) karşılaştırması.

DENEME 2		Zaman (gün)										
		8	11	14	17	20	23	26	29	32	35	
GRUPLAR	1	Or.T. H. \pm sd min-max	15.29 \pm 18.8 0-40	92.50 \pm 74.3 0-196	239.4 \pm 116.8 75-352	601.3 \pm 459.2 113-1437		1911 \pm 1135.9 700-3564	3407.6 \pm 1470.4 1436-5400		1222 \pm 914.8 500-2450	
	2	Or.T. H. \pm sd min-max	0 \pm 0 0-0	7.25 \pm 11.2 0-32	144 \pm 144-144	175.6 \pm 246.5 14-650		190 \pm 151.6 63-446	717.83 \pm 582.27 108-1440		1222 \pm 914.8 500-2450	1158.3 \pm 903 500-2475
	3	Or.T. H. \pm sd min-max	0 \pm 0 0-0	49 \pm 98 0-196		243.7 \pm 367.1 0-787		1170.5 \pm 1181.2 40-2746	1718.3 \pm 2026.9 126-4000			
	4	Or.T. H. \pm sd min-max	0 \pm 0 0-0	16.57 \pm 19.6 0-40		177 \pm 155.60 0-392		1173.3 \pm 1446.3 0-3902	1275.8 \pm 1629.8 0-3456			
	5	Or.T. H. \pm sd min-max	0 \pm 0 0-0	42 \pm 50.8 0-144		170.3 \pm 220.6 0-600		853.5 \pm 1155.4 6-3179	920.4 \pm 910.6 75-2475		735 \pm 378.7 196-1080	1070 \pm 836 196-1862
	6	Or.T. H. \pm sd min-max	0 \pm 0 0-0	0 \pm 0 0-0		56.7 \pm 92.44 0-256		366.3 \pm 318.2 40-908	1105 \pm 965.6 75-2746		2256 \pm 1566 126-4000	
ÖNEMLİLİ	K-W	P_{1-6}	0,001	0,014	0,380	0,036		0,052	0,114		0,126	0,339
	M-W	P_{1-2} / P_{1-3} P_{1-4} / P_{1-5} P_{1-6}	,0177/,079 ,025/,025	,025/,222 ,060/,268 ,002		,024/,106 ,042/,021 ,003		,004/,336 ,224/,037 ,008				

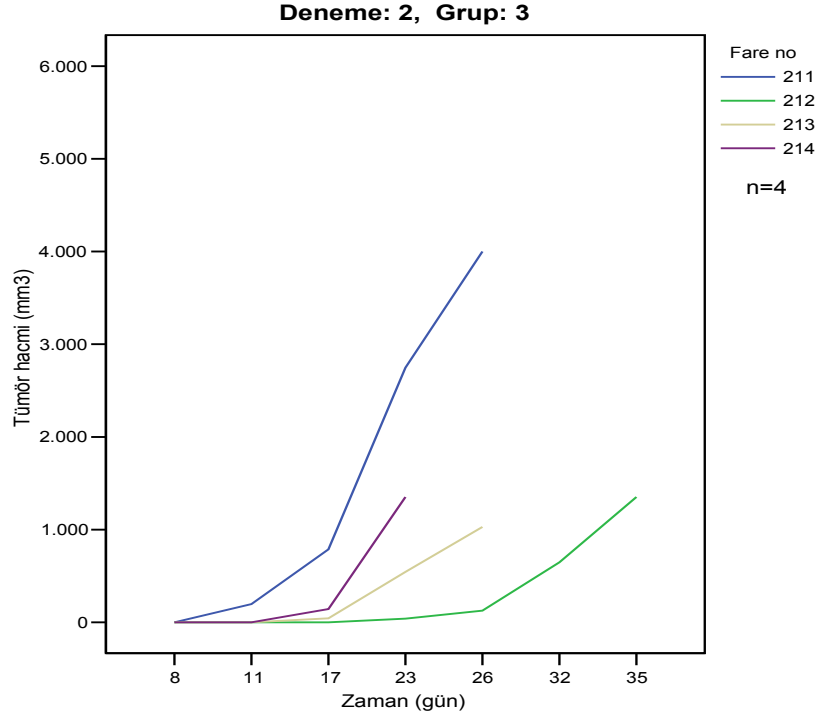
Bu denemeyi oluşturan her bir gruptaki farelerin bireysel tümör geliştirme grafikleri **Şekil 4.24 – 4.29**'da, grup ortalamalarına ait grafikler ise **Şekil 4.30 ve 4.31**'de verilmiştir. Bu grafikler genel olarak incelendiğinde; grup 2, 4, 5 ve 6'da (grup 1 ve 2'ye göre) tümörün çıkış zamanında gecikme, gelişim hızlarında da yavaşlama olduğu görülmektedir. Tümör gelişim ortalamaları tüm gruplarda grup 1'e göre kısmen farklı gibi görünse de sonuçta bütün farelerde tümör gelişmiştir.



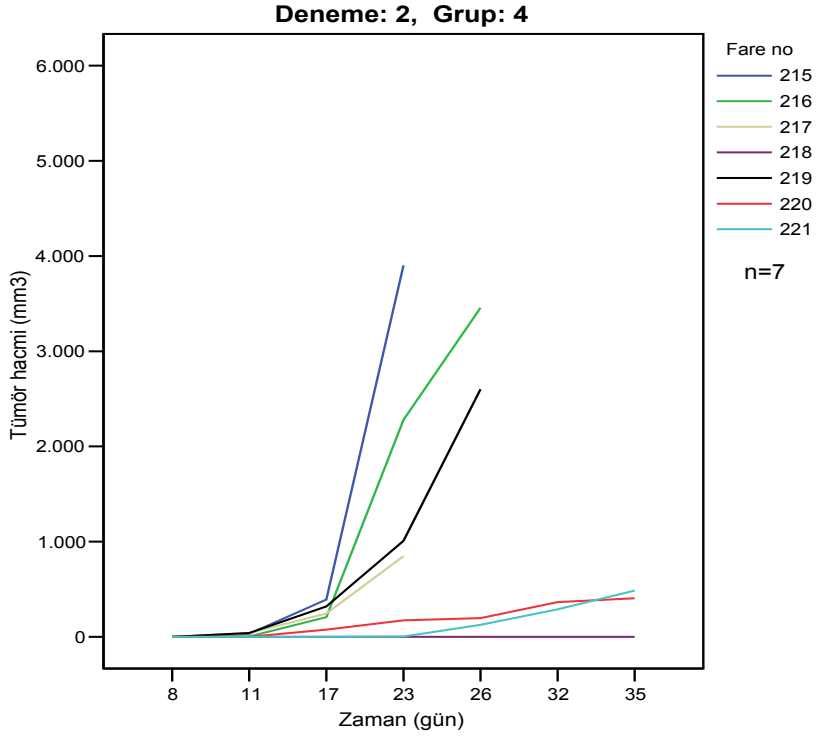
Şekil 4.24. B-16V enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi (kontrol grubu).



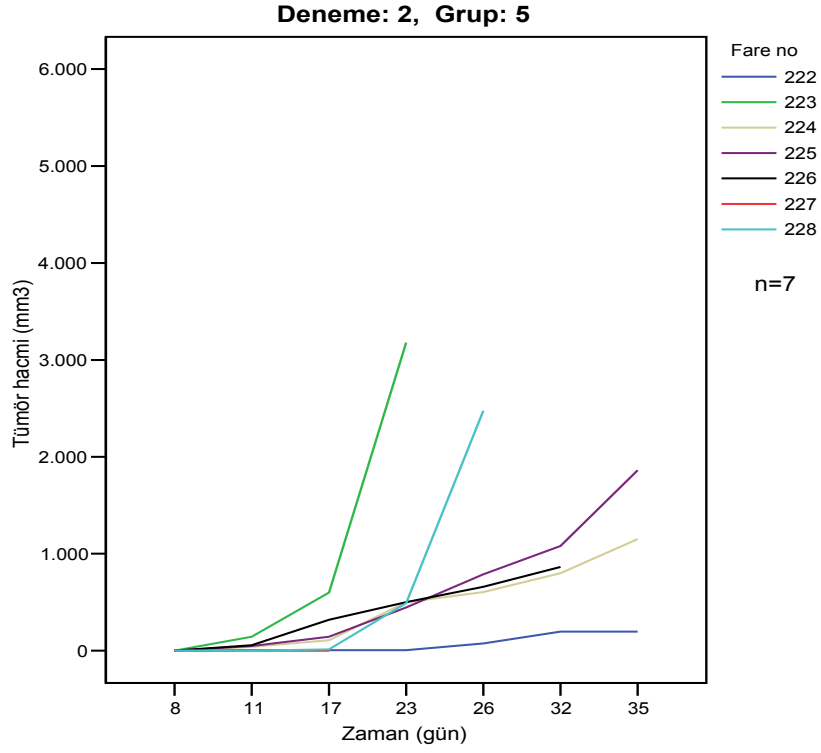
Şekil 4.25. pHM6 enjeksiyonundan 2 gün sonra B-16V enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi.



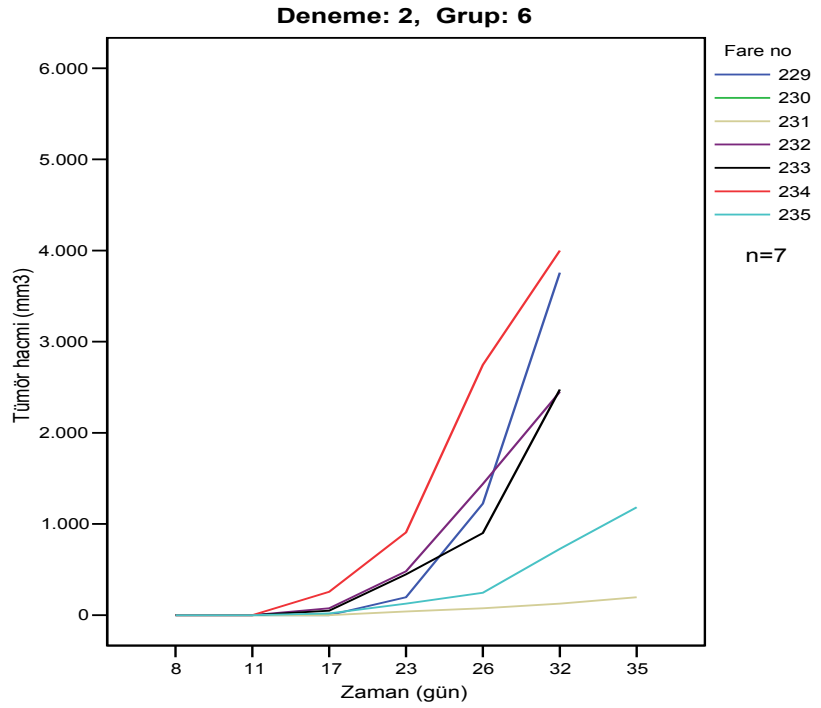
Şekil 4.26. PBS-DOTAP enjeksiyonundan 2 gün sonra B-16V enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi.



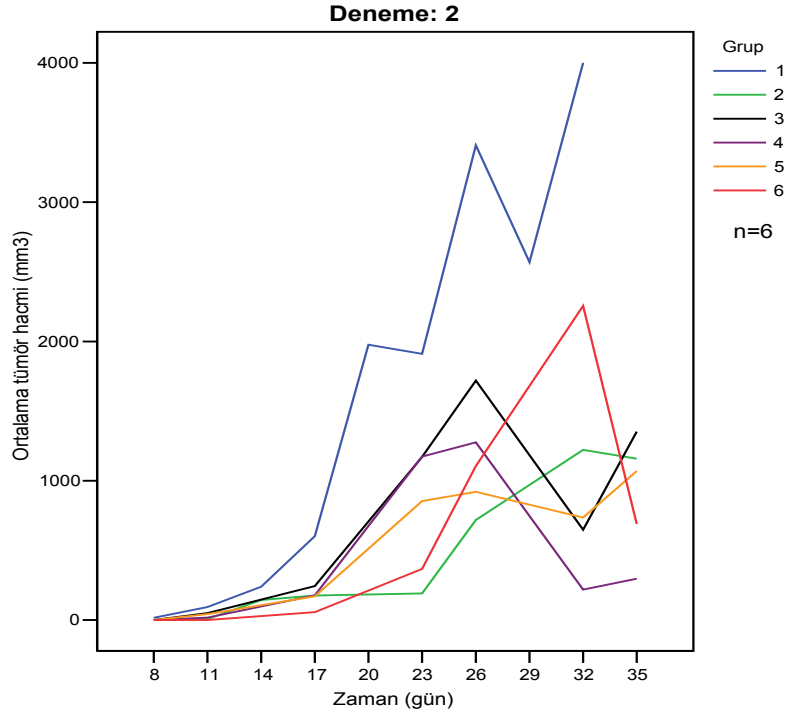
Şekil 4.27. pHM6mIL-2 enjeksiyonundan 2 gün sonra B-16V enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi.



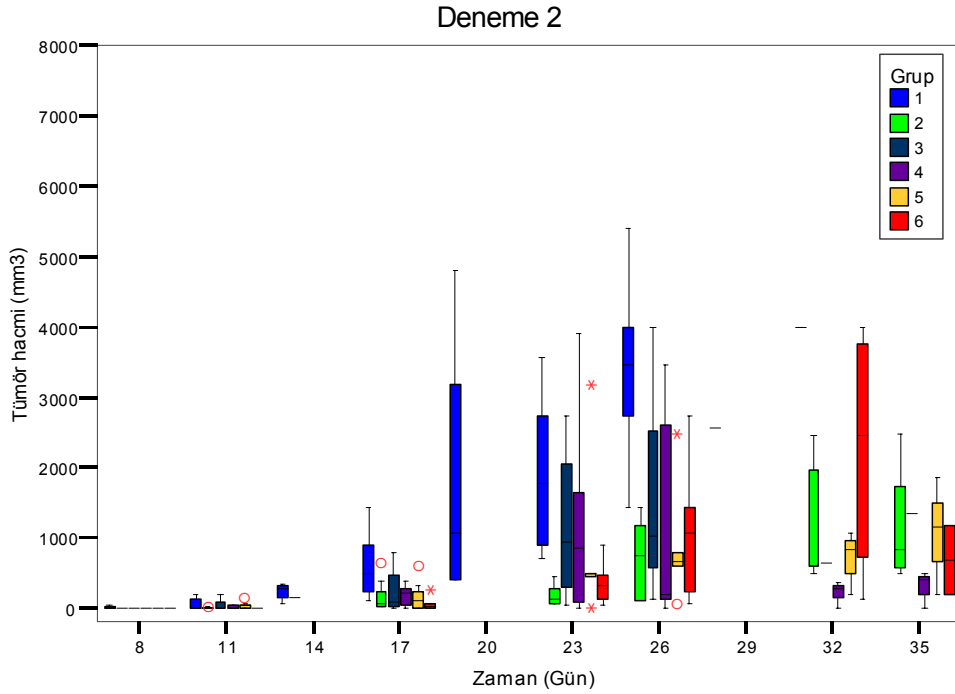
Şekil 4.28. pHM6mLys enjeksiyonundan 2 gün sonra B-16V enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi.



Şekil 4.29. pHM6mIL-2 + pHM6mLys enjeksiyonundan 2 gün sonra B-16V enjekte edilen farelerdeki tümör gelişimi.



Şekil 4.30. Deneme 2'deki grupların karşılaştırması.
(Her ölçüm zamanı için her grubun hacim ortalaması alınmıştır)



Şekil 4.31. Deneme 2'in grup karşılaştırması (box plot).

Deneme 3 sonuçları;

Deri altına transfekte B-16V hücrelerinin (B-16VpHM6, B-16VpHM6mIL-2 ve B-16VpHM6mLys) enjekte edilmiş olduğu bu deneme de tümör hacimlerindeki değişim **Çizelge 4.4**'de, bu değişimlere ait grafikler ise Şekil 4.31 - 4.37'de verilmiştir. Tablo incelendiğinde, 29. ve 35. günler hariç grup karşılaştırmalarının (K-W) oldukça anlamlı (K-W testi, $p \leq 0.03$) olduğu görülmektedir. Her grubun kontrole göre karşılaştırmaları da (M-W) benzer şekilde anlamlı olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.4. Deneme 3'den elde edilen veriler ve analizleri.

Gruplara ait 8-41. günlerdeki ortalama tümör hacimleri (mm^3), tanımlayıcı istatistiksel değerleri ve grupların genel (K-W) ve kontrole göre (M-W) karşılaştırması.

DENEME 3		Zaman (gün)										
		8	11	14	17	20	23	26	29	32	35	
GRUPLAR	1	Or.T. H. \pm sd min-max	15.3 \pm 18.7 0-40	92.5 \pm 74.3 0-196	239.4 \pm 116.8 75-352	601.3 \pm 459.2 113-1437	1976 \pm 194540 5-4800	1911 \pm 1136 700-3564	3407.6 \pm 1470 1436-5400	2569 \pm 2569-2569	4000 \pm 4000-4000	
	2	Or.T. H. \pm sd min-max	3.4 \pm 7.7 0-40	106.4 \pm 131.4 0-464	415.2 \pm 641.6 0-2813	207.4 \pm 179.5 0-550	763.7 \pm 1061 0-4860	1098 \pm 1461 0-6000	695.8 \pm 764.8 0-2250	429.5 \pm 484.82 0-1372	703.6 \pm 1316 0-3610	410.4 \pm 759 0-1764
	4	Or.T. H. \pm sd min-max	0 \pm 0 0-0	14.9 \pm 51.3 0-257	66.8 \pm 172.7 0-750	159.6 \pm 336.6 0-1495	314.3 \pm 576.7 0-2250	303.4 \pm 4444 0-1584	625.2 \pm 1178 0-3945	570.9 \pm 1152.35 0-4800	306.5 \pm 497.2 0-1690	564.4 \pm 1087 0-3613
	5	Or.T. H. \pm sd min-max	0 \pm 0 0-0	0.2 \pm 0.8 0-4	4.9 \pm 23.5 0-126	10.5 \pm 35.23 0-180	69.3 \pm 151.2 0-600	116.7 \pm 235 0-968	162.6 \pm 406.9 0-1368	417.2 \pm 765.6 0-2475	268.2 \pm 688.5 0-2601	160.8 \pm 496 0-2025
	6	Or.T. H. \pm sd min-max	0 \pm 0 0-0	4.3 \pm 15.4 0-73	28 \pm 40.4 0-567	83.7 \pm 299.4 0-1467	48.7 \pm 121 0-500	91.3 \pm 188 0-726	64.24 \pm 144.9 0-588	209.2 \pm 409.8 0-1568	212 \pm 527.1 0-2176	63.4 \pm 181.3 0-700
	ÖNEMLİLİK	K-W	P ₁₋₆	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,116	0,039	0,073
M-W		P ₁₋₂ /P ₁₋₄ P ₁₋₅ /P ₁₋₆	.229/00 .00/00	.808/001 .000/000	.787/003 .000/001	.083/002 .000/000	.089/006 .000/000	.044/001 .000/000	.002/004 .000/000			

Bu denemeyi oluşturan her bir gruptaki farelerin bireysel tümör geliştirme grafikleri **Şekil 4.32 – 4.36**'de, gruplardaki ortalama tümör gelişimleri ise **Şekil 4.37 ve 4.38**'de verilmiştir. Gruplar genel olarak incelendiğinde, farelerin büyük bir çoğunluğunda kontrole göre tümör çıkış zamanında gecikmeler ve gelişim hızlarında da yavaşlama olduğu ve bazılarının ise hiç tümör geliştirmediği görülmektedir.

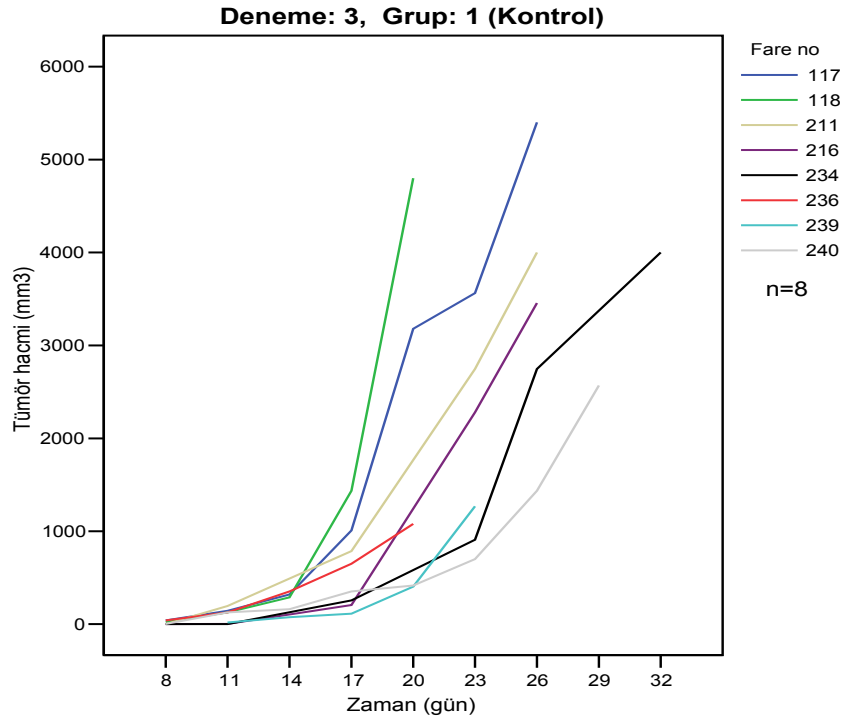
Ayrıca, bu denemedeki gruplara enjekte edilen tümör hücre hatları, tümör geliştiren ve geliştirmeyen fare sayıları, tümör geliştirme % oranları ve bu verilerin anlamlılık analizleri **Çizelge 4.5**'de verilmiştir. B-16V ve B-16VpHM6 hücreleri kontrol kabul edilerek yapılan ikili karşılaştırmalarda tüm gruplar arasındaki farkın (P₁₋₄, P₁₋₅, P₁₋₆, P₂₋₄, P₂₋₅ ve P₂₋₆) çok anlamlı olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.5. Deneme 3'deki grupların tümör geliştirme oranları.

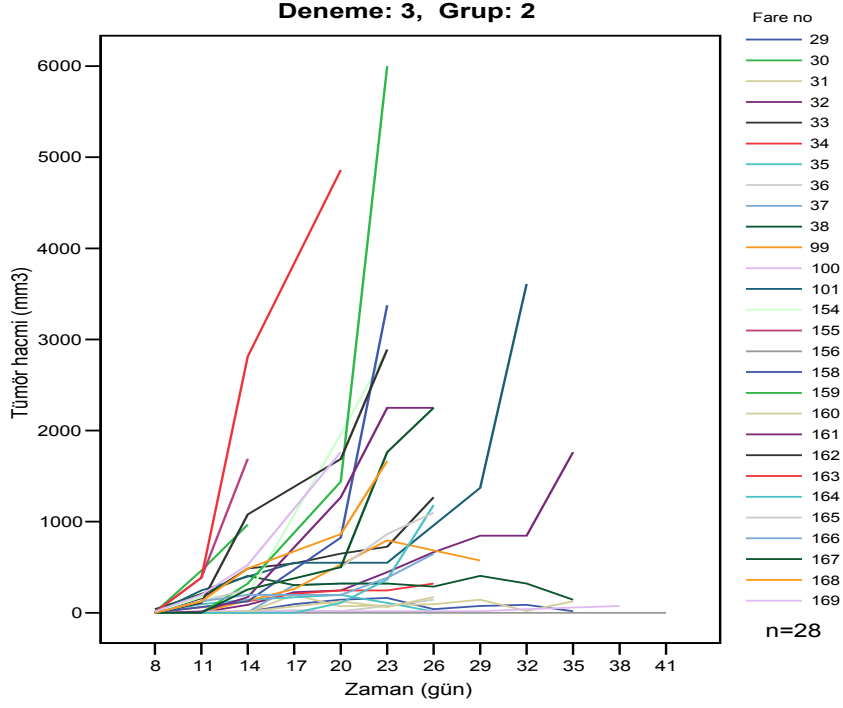
Enjekte edilen hücre hattı	Fare sayısı		Tümör geliştirme % oranı	Önemlilik (ki-kare testi)
	Denemeye alınan	Tümürlü/tümörsüz		
1. B-16V	90	90 / 0	100	$P_{1-2} = 1$
2. B-16VpHM6	30	30 / 0	100	$P_{1-4} < 0,0001$
4. B-16VpHM6mIL-2	25	17 / 8	68	$P_{1-5} < 0,0001$
5. B-16VpHM6mLys	29	14 / 15	48	$P_{1-6} < 0,0001$
6. B-16V pHM6mIL-2 + B-16VpHM6mLys	27	14 / 13	51	$P_{2-4} < 0,0008$ $P_{2-5} < 0,0001$ $P_{2-6} < 0,0001$

Deneme 4 sonuçları;

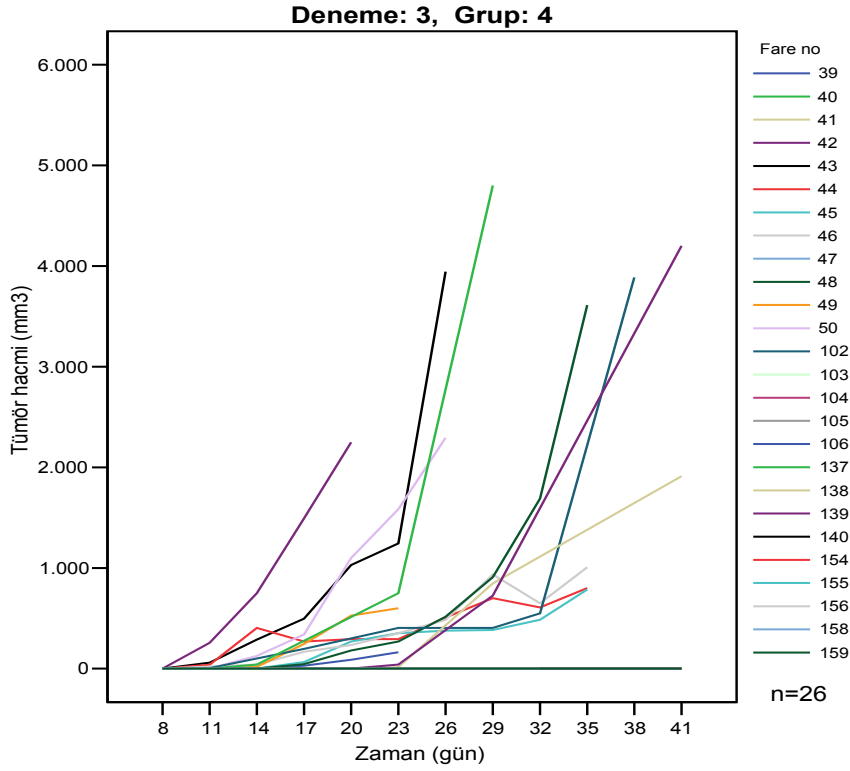
Deneme 3'de tümör geliştirmeyen farelere tekrar B-16V hücrelerinin enjekte edilmiş olduğu bu grupta (challenge), 65 günlük takip süresince sağ kalan farelerin hiç birinde tümör gelişmediği saptanmıştır. Bu sonuç, farelerde koruyucu immünite geliştiğini de göstermektedir.



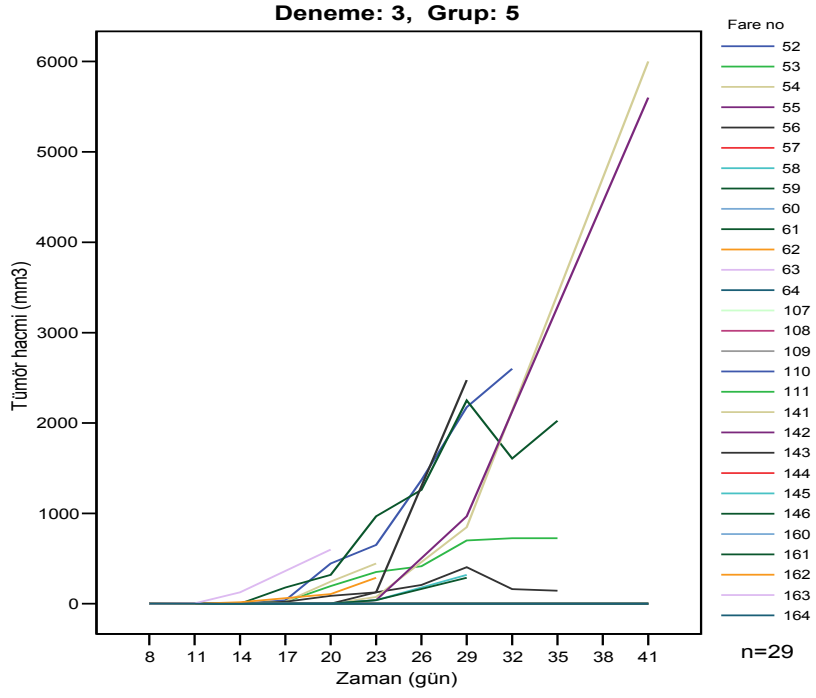
Şekil 4.32. B-16V enjekte edilen farelerdeki tümör gelişim grafiği (kontrol grubu)



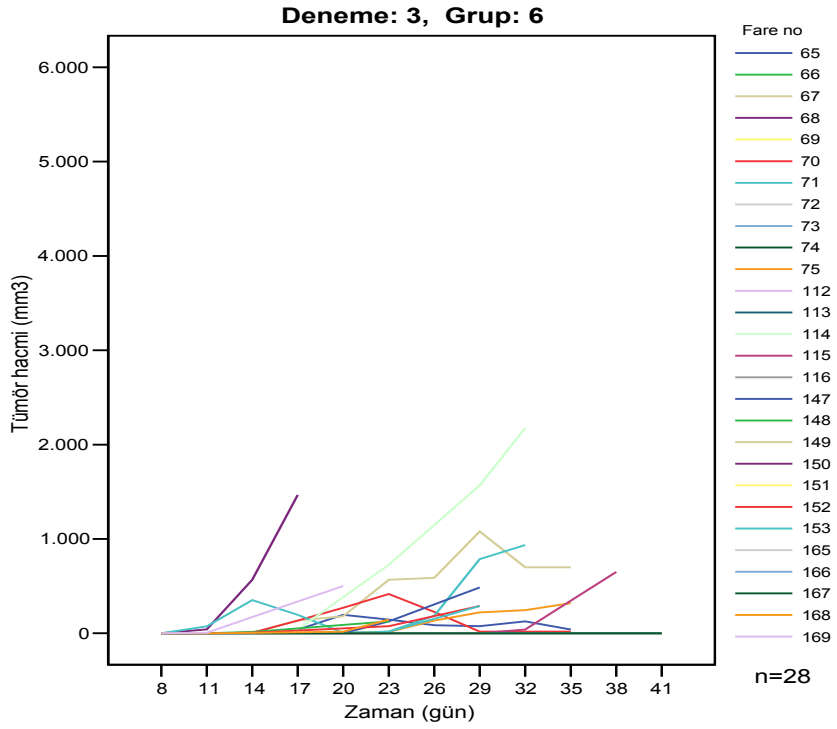
Şekil 4.33. B-16VpHM6 enjekte edilen farelerdeki tümör gelişim grafiği.



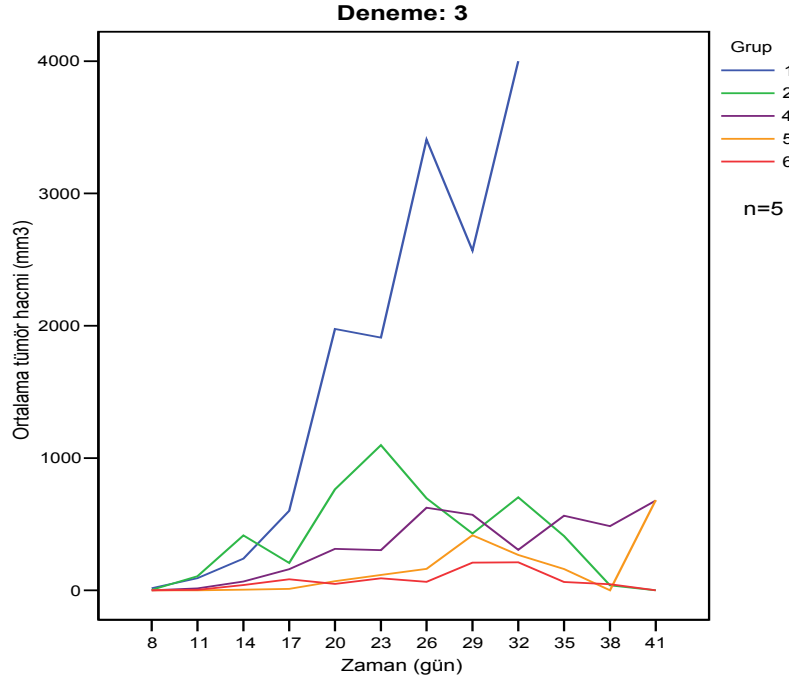
Şekil 4.34. B-16VpHM6mIL-2 enjekte edilen farelerdeki tümör gelişim grafiği.



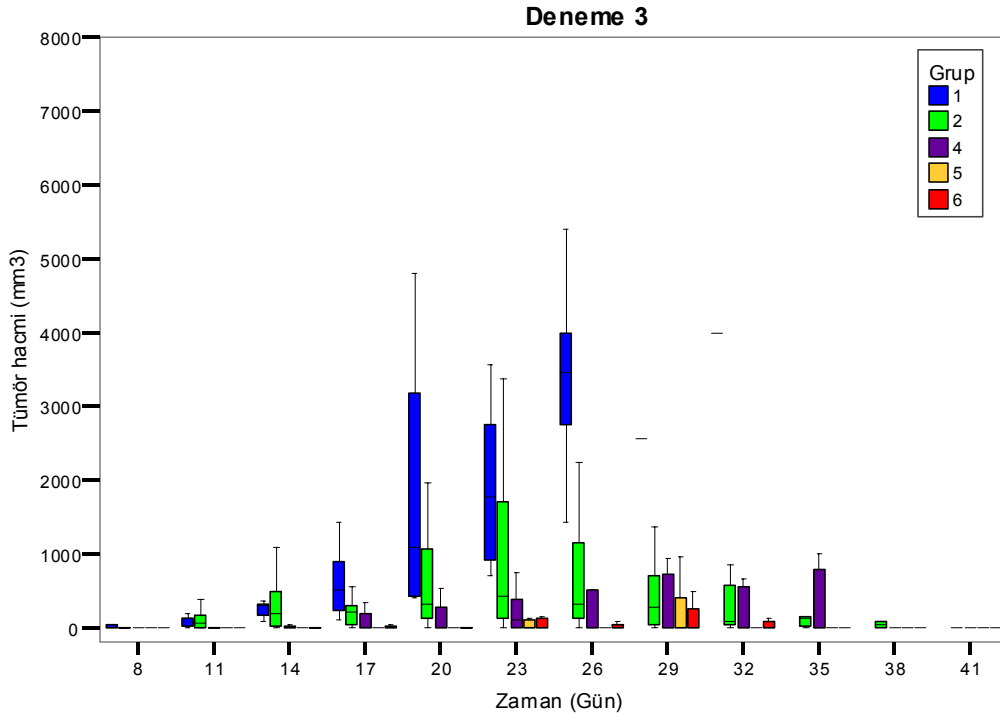
Şekil 4.35. B-16VpHM6mLys enjekte edilen farelerdeki tümör gelişim grafiği.



Şekil 4.36. B-16VpHM6mIL-2+B-16VpHM6mLys enjekte edilen farelerdeki tümör gelişim grafiği.



Şekil 4.37. Deneme 3'ün grup karşılaştırmalarına ait grafik. (her bir zaman aralığında ortalama hacimler alınarak)



Şekil 4.38. Deneme 3'ün grup karşılaştırmaları (box plot)

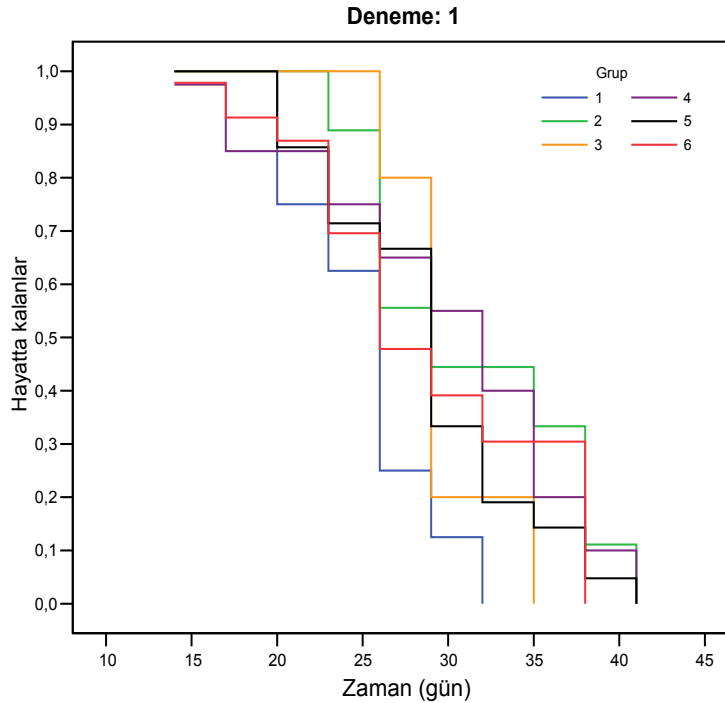
Yaşam Analizlerine ait sonuçlar

Her bir denemenin grupları arasındaki Kaplan Meier (K-M) log rang yaşam analiz sonuçları **Çizelge 4.6 – 4.8**'de, yaşam fonksiyon grafikleri ise **Şekil 4.39 - 42**'de verilmiştir. Grupların kontrole (grup 1) göre karşılaştırmalarında $p \leq 0.05$ bulunanlar anlamlı kabul edilmiştir

Deneme 1'deki grup karşılaştırmalarının yer aldığı **Çizelge 4.6** ve **Şekil 4.39** genel olarak incelendiğinde grup 3 ve 6 hariç farklarının anlamlı olduğu görülmektedir (K-M: P_{1-2} , P_{1-4} , P_{1-5} , $P \leq 0.06$). Kontrol hariç diğer gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise yaşam uzunlukları bakımından fark olmadığı görülmektedir.

Çizelge 4.6. Deneme 1'in yaşam analizine ait p değerleri tablosu.

Deneme 1		Gruplar				
		1	2	3	4	5
Gruplar	2	0,0337				
	3	0,0873	0,4894			
	4	0,0266	0,7230	0,4419		
	5	0,0648	0,3901	0,8635	0,3789	
	6	0,1121	0,4029	0,7391	0,6446	0,8425

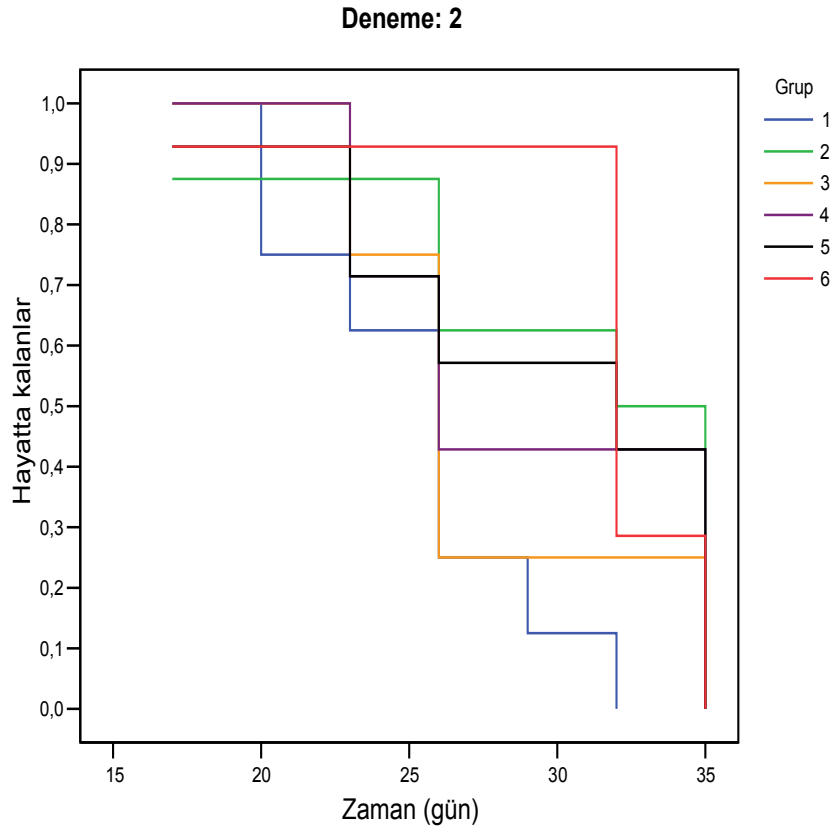


Şekil 4.39. Deneme 1'deki grupların yaşam-fonksiyon grafiği.

Deneme 2'deki grup karşılaştırmalarının yer aldığı **Çizelge 4.7** ve **Şekil 4.40** genel olarak incelendiğinde grup 2 ve 6'nın kontrole (grup 1) göre farklarının anlamlı olduğu görülmektedir (K-M: P_{1-2} , P_{1-6} , $P \leq 0.05$). Kontrolün diğer gruplarla ve diğer grupların kendi aralarındaki karşılaştırmalarında ise yaşam uzunları bakımından fark olmadığı görülmektedir.

Çizelge 4.7. Deneme 2'in yaşam analizine ait p değerleri tablosu.

Deneme 2		Gruplar				
		1	2	3	4	5
Gruplar	2	0,0536				
	3	0,3818	0,4985			
	4	0,1063	0,8493	0,6953		
	5	0,0865	0,8203	0,6563	0,9731	
	6	0,0120	0,7706	0,3423	0,8900	0,9716

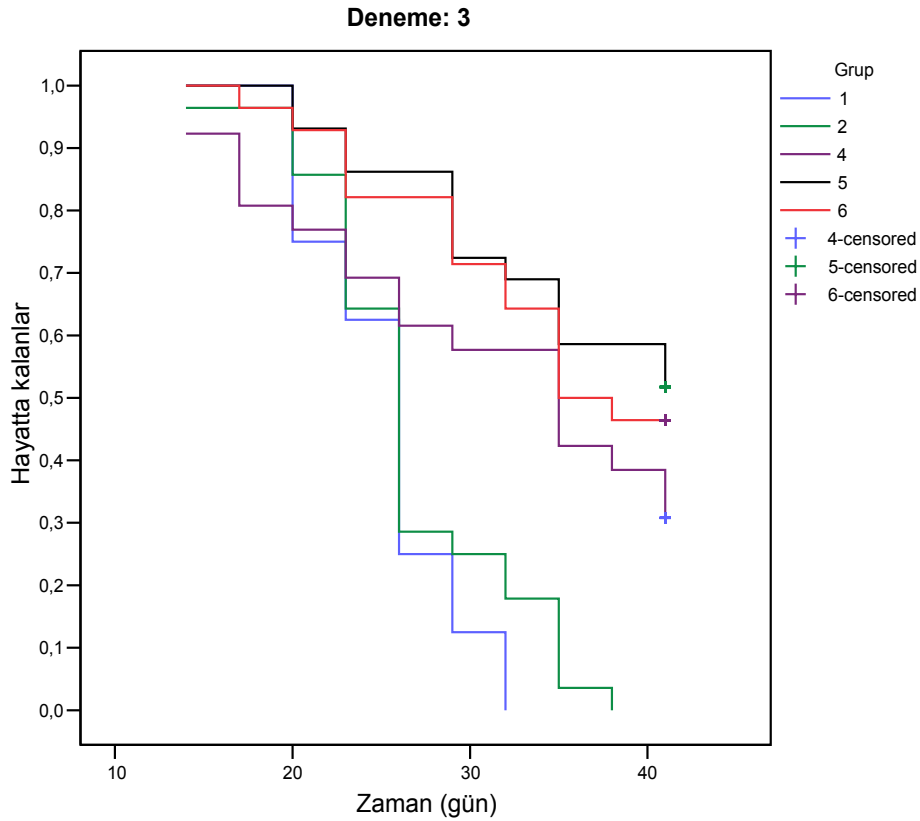


Şekil 4.40. Deneme 2'deki grupların yaşam-fonksiyon grafiği.

Deneme 3'deki grup karşılaştırmalarının yer aldığı **Çizelge 4.8** ve **Şekil 4.41** genel olarak incelendiğinde ise bütün grupların kontrol gruplarına (grup 1 ve 2) göre yaşam uzunlukları arasındaki farklar oldukça anlamlı olarak bulunmuştur (K-M: P_{1-4} , P_{1-5} , P_{1-6} ve P_{2-4} , P_{2-5} , P_{2-6} , $P \leq 0.02$). Kontroller hariç diğer gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise yaşam uzunlukları arasında fark olmadığı görülmektedir.

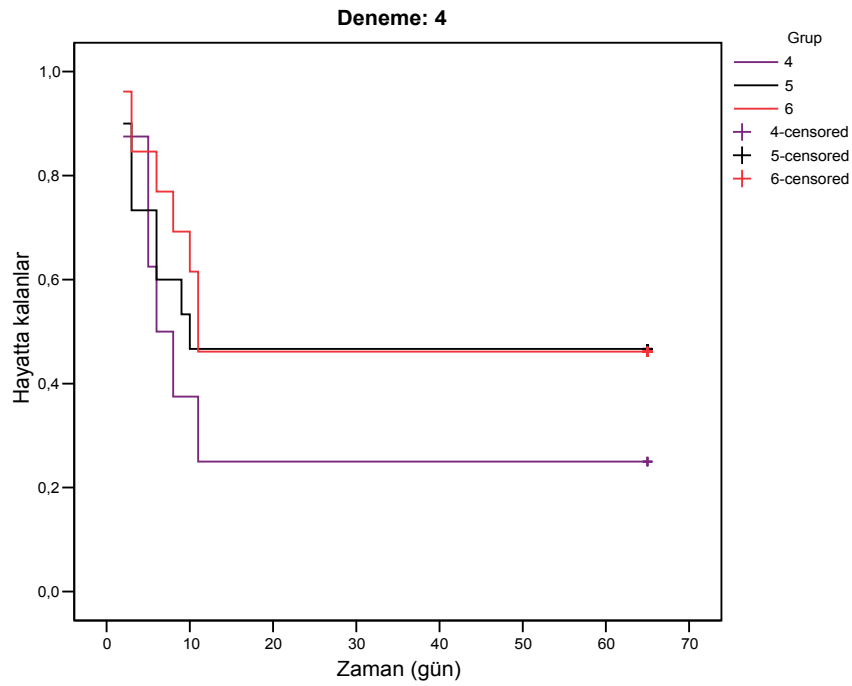
Çizelge 4.8. Deneme 3'in yaşam analizine ait p değerleri tablosu

Deneme 3		Gruplar			
		1	2	4	5
Gruplar	2	0,3818			
	4	0,0206	0,0017		
	5	0,000	0,000	0,0812	
	6	0,0002	0,0000	0,2125	0,6509



Şekil 4.41. Deneme 3'deki grupların yaşam-fonksiyon grafiği.

Deneme 3'ün 4, 5 ve 6. gruplarında tümör geliştirmemiş olan farelere B-16V enjeksiyonu yapılmasıyla deneme 4 oluşturulmuş ve 65 gün süreyle takip edilmiştir. **Şekil 4.42**'de, bu takip süresince farelerin yaşam fonksiyon grafiği yer almaktadır. Grafik genel olarak incelendiğinde enjeksiyondan sonraki ilk 10 gün içinde her üç grupta da ölümler olduğu ancak, deney sonlandırılana kadar geriye kalan bütün fareler yaşadığı için ömür uzunlukları arasında fark olmadığı görülmektedir.



Şekil 4.41. Deneme 4'e alınan (challenge) Deneme 3 gruplarının yaşam-fonksiyon grafiği.

5. TARTIŞMA

Savunma sistemi tarafından özelliği değişmiş ve organizmadaki yapıların uyumunu bozma eğilimine girmiş olan hücrelerin tanınıp zarar vermeden ortadan kaldırılmasına ve bir çok patojen ve neoplastik hücrelere karşı koruma sağlanmasına rağmen bu sistemin denetiminden kurtulan istenmeyen hücre tipleri de ortaya çıkabilmektedir. İmmünolojik çalışmaların, çoğu savunma sisteminden kaçmış olan bu hücrelerin uygun immün uyarımlarla tanınıp yok edilmesini (immünotedavi) amaçlamış ve yapılan çok sayıdaki çalışma ile de tümör hücrelerinin immün sistem elemanları tarafından ortadan kaldırılabilirdiği gösterilmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalar için literatürlerde kanser immünotedavisi, kanser gen tedavisi veya kanser DNA aşısı gibi tanımlamalar kullanılmaktadır. Daha önce de bahsedildiği gibi IL-2 hem DNA aşısı hem de protein formunda, lizozim ise yalnızca protein formunda hayvan modelleri üzerinde kanser tedavisi amacıyla kullanılmıştır. Güçlü immünstimülatör olan sitokinlerin protein formlarının yüksek dozda verilmesi gerektiğinden ciddi toksik etkiler oluşturduğu bildirilmektedir. Halbuki sitokin genlerinin gen tedavi yaklaşımlarıyla kullanılması durumunda üretimin lokal kaldığı ve sistemik toksisiteyi azalttığı ayrıca etkisinin de daha uzun süreli olduğu tespit edilmiştir. Sitokin genlerinin IL-2 dahil 10 kadarının fare modellerinde ve insan kanser tedavisinde kullanıldığı da bildirilmektedir¹⁻⁹.

Bu tez çalışmasında, B-16V melanoma hücrelerine karşı immün yanıt oluşturabilmek amacıyla IL-2 ve lizozim genleri pHM6 ekspresyon vektörüne klonlanmış ve elde edilen rekombinant plazmit DNA'lar B-16V melanoma hücrelerine karşı üç değişik şekilde uygulanmıştır. Daha önce lizozimle yapılan çalışmalar arasında DNA aşısı şeklinde uygulamalara rastlanmadığı için, lizozim geninin immünotedavi amacıyla DNA aşısı formunda kullanılması bu çalışmada ayrı bir öneme sahip olmuştur. IL-2'nin kullanılma amacı ise, daha önce de belirtildiği gibi, hem lizozimle birlikte oluşturabilecekleri bir anti-tümöral etkiyi değerlendirmek hem de lizozim çalışmalarına referans oluşturmak olmuştur.

Çalışmanın IL-2 ve lizozim genlerine ait cDNA'ların elde edilmesi aşamasında lizozimde herhangi bir sorun yaşanmazken, IL-2 cDNA'sı değişik alternatiflerde denenmesine rağmen elde edilememiştir (RT-PCR amplifikasyonu olmamıştır). IL-2 cDNA'sı elde etmekteki güçlüğü izole edilen total mRNA içinde IL-2 mRNA'sı bulunmadığından kaynaklandığı düşünülmüştür. IL-2 geninin her zaman aktif olmadığı, ancak bazı uyarımlarla aktive olduğu ve özellikle fetal dönemin 14-17. günlerinde çok kısa bir süreyle aktif olduğu⁸²⁻⁸⁵ bilgileri de bu düşüncemizi güçlendirmiştir. Bu durumda IL-2 mRNA'sını izole etmek çok daha özel bir deneyim gerektireceği için IL-2 cDNA'sının klonlu olduğu bir plazmit (pUMVCmIL-2) satın alınması tercih edilmiş ve PCR amplifikasyonunda kalıp DNA olarak bu plazmit kullanılmıştır.

Bir diğer sorun da genlere ait PCR ürünlerinin (ORF dizilerinin) pHM6 vektörüne ligasyonunda yaşanmıştır; pHM6 ve PCR ürünleri *Kpn* I ve *Eco* RI enzimleriyle kesim reaksiyonuna alınıp reaksiyon sonrası gerekli arıtmalar yapıldıktan sonra ligasyon reaksiyonuna alındığı (ve değişik alternatifler de denendiği) halde ligasyon gerçekleşmemiştir. Yapılan kontrollü çalışmalar sonunda bu sorunun genlere ait PCR ürünlerinin *Kpn* I ve *Eco* RI restriksiyon enzimleriyle kesilmemiş/tam kesilmemiş olduğundan kaynaklandığı anlaşılmıştır. Hatırlanacağı gibi, klonlama işleminin vektör molekülüne doğru yönde yerleştirilmesini sağlamak için, hazırlanan primer dizilerinin 5' uçlarına bu iki enzime ait tanıma dizileri de ilave edilmişti. Katalog bilgilerinde *Kpn* I ve *Eco* RI enzimlerine ait tanıma dizilerinin DNA parçalarının uçlarında olmasının sorun olmayacağı yönünde bilgi yer almış olsa da⁶¹, bazı faktörlerin etkin bir kesim yapılmasını engelliyor olabileceği anlaşılmıştır. Ancak, alternatif bir yol denenerek (önce pBluescript plazmidine sonra pHM6'ya klonlama) bu sorun çözümlenmiştir (PCR, *pfu* DNA polimerazla yapıldığı için ürün küt uçlu olduğundan, pBS'e küt uçlu olarak klonlama ve daha sonra da *Kpn* I ve *Eco* RI kesimlerinin elde edilen bu rekombinant vektör üzerinden yapılmasıyla sonunda ligasyonlar beklendiği gibi gerçekleşmiştir.

Rekombinant plazmitler üzerinden yapılan PCR amplifikasyonlarında elde edilen ürünlerin 5 ayrı enzimle kesilerek yapılan RFLP analizleri ve ayrıca rekombinant plazmitler üzerinden yapılan dizi analizlerinin referans dizilerle

(‘ncbi’in Gene bank’ veri tabanından alınan fare IL-2 ve Lys gen dizileri ile) kıyaslanması klonlanan gen dizilerinin doğru olduğunu göstermiştir. Diğer taraftan klonlanan gen dizilerinin vektör molekülü üzerindeki promotörün önüne doğru bir şekilde yerleşmiş olduğunun gösterilmesi de gerekmektedir. Rekombinant vektörün *Kpn* I ve *Eco* RI kesimlerinin agaroz jel elektroforezleri genlerin doğru bir şekilde yerleşmiş olduğunu da (*Kpn* I tanıma dizisi genlerin 5,’ *Eco* RI ise 3’ ucunda olduğunu) göstermiştir.

Transfeksiyon ve kitle içi enjeksiyon uygulamalarında kullanılacak olan plazmit DNA’nın endotoksinsiz, büyük oranda süper-sarmal formda ve saf ($OD_{260/280} = 1.8$) olması gerekmektedir. Bakteriyel endotoksin veya diğer kontaminantları içeren plazmit DNA transfeksiyon verimini düşürmekte ve hücrede toksik etki oluşturabilmektedir^{62, 63, 68, 69}. Bahsedilen kalitede plazmit DNA izolasyonu için geliştirilmiş olan özel kitlerden biri (GeneElute, Sigma) kullanılarak; pHM6, pHM6mIL-2 ve pHM6mLys plazmitleri ilgili konakçı bakteri kültürlerinden elde edilmiştir. Rutin olarak kullanılmakta olan izolasyon yöntemi ve kitle yapılmış olan izolasyonlara ait Şekil 4.9’da verilmiş olan agaroz jel görüntüsü incelendiğinde, kitle yapılan izolasyonlarda süper-sarmal plazmit formu oranının oldukça fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca kit içeriğinde bulunan ‘Endotoxin removal’ solüsyonu ile bakteriyel endotoksinler arıtılmaktadır. İzole edilen plazmitlerin $OD_{260/280 \text{ nm}}$ ’deki spektrofotometrik değerlerinin de ($OD_{260/280} = 1.8 \pm 0.02$) standart değerler ($OD_{260/280} = 1.8$) civarında olması DNA’ların transfeksiyon kalitesinde olduğunu göstermektedir (data bulgularında verilmemiştir).

Yöntem ve bulgularda da bahsedildiği gibi (Bölüm 3.4.1 ve 4.4.1), mevcut iki hücre hattından B-16V’nin tercih edilmesinin nedeni; B16-F0’ın her iki fare ırkında da aynı şekilde tümör geliştirmiş olmasıdır. Halbuki her iki hücre hattı da C57BL/6 ırkı fareden elde edildiği için sadece bu ırka özgün olması yani balb/c’de tümör geliştirmemesi beklenmekteydi. B-16V için durum beklendiği gibi olmuş ve balb/c’de oluşan tümör 13. günde kaybolurken diğerlerinde büyümeye devam etmiştir. Bu sonuçlar B-16V’nin ırka spesifik olduğuna işaret ettiğinden tez çalışmasının amacına daha uygun olacağı düşünülmüş ve hücre hattı olarak B-16V, fare ırkı olarak da C57BL/6’nin kullanılmasına karar

verilmiştir. Diğer taraftan B16-F0 hattının olması gereken ırka özgünlüğünün neden kaybolduğu hakkında bir yorum yapabilmek için ise detaylı immünolojik çalışmalar gerekmektedir.

Hücre kültürlerine pHM6LacZ plazmidi kullanılarak yapılan lipozomal transfeksiyon ve β -galaktozidaz aktivitesi açısından histokimyasal boyama çalışmalarında transfeksiyon veriminin, literatür ve föylerdeki bulgulara (%1-10)⁸⁶ uygun olduğu (%3-4) saptanmıştır. Ancak pHM6LacZ plazmidi ile transfekte (B-16VpHM6LacZ) hücre hattında β -galaktozidaz aktivitesi tespit edilememesi (bu hücrelerin hepsi teorik olarak pHM6LacZ plazmidini taşıyor olması gerektiği halde) transfeksiyon verimi daha yüksek olsa bile ekspresyonun hücre içinde olmasının (dolayısıyla her bir hücreye geçmiş olan plazmit sayısının) boyama sonucuna yansımış olabileceğini düşündürmüştür. Bu düşünceyi B-16VpHM6mLys hücre hattında lizozim aktivitesi tespit çalışmasında karşılaşılan durum da desteklemektedir. Şöyle ki; bu hücre hattının lizozim aktivitesini tespit etmek için üreme sıvısının *M. luteus* yayılmış olan plaklara damlatıldığı çalışmalarda her zaman benzer aktivite tespit edilememiş, edilse bile ekspresyon düzeyine (yani hücre içinde bulunan plazmit sayısına) bağlı olarak sonucun da (kağıt disk etrafında *M. luteus* üremesinin engellenmesine bağlı açıklığın) çok zayıf olduğu gözlenmiştir. Çünkü ne kadar ürün varsa o kadar da aktivite gözlenmesi beklenmektedir. pHM6 plazmidi hücre içinde epizomal (replikasyonu kromozomal DNA ile eşzamanlı ancak bağımsız) olarak bulunmakta ve kopya sayısı birden fazla olmakla birlikte kaç adet olduğu da tam olarak bilinmemektedir. Bu bağlamda şöyle bir yorum da yapılabilir; mevcut plazmidin sentromeri olmadığından ve B-16V gibi çok hızlı bir şekilde bölünen hücrelerde oğul hücrelere geçerken kopya sayısı azalmış veya bazı hücrelere hiç aktarılmamış da olabilecektir. Seçici ajanın (Genetisin) bulunduğu kültür ortamlarında bu hücreler bir müddet sonra ölecek olmasına karşın yine de o anki hücre popülasyonunda belli bir oranda bulunacaktır. Ortam sıvısının enzimatik aktivitesinin (lizozim açısından) farklı denemelerde farklı olması pHM6mLys plazmidini içermeyen hücre popülasyonunun varlığına bağlı bir durumdan da kaynaklanıyor olabilir.

Tümör içine lipozom-DNA kompleksi enjeksiyonlarının yapılmış olduğu 'Deneme 1' sonuçlarının beklenen şekilde gerçekleşmemesi (bilindiği gibi, bu çalışmanın amacı oluşan tümör kitlesini pHM6mIL-2, pHM6mLys ve bunların kombine kullanımlarıyla regrasyona uğratmaktı) yukarıda bahsedilen transfeksiyon azlığı, plazmit dağılımı ve kopya sayısına bağlı nedenlerden olabileceği düşünülmektedir. pHM6LacZ plazmidinin tümör kitlesi içine yapılan enjeksiyonundan bir gün sonra tümör kitlesinin çıkartılıp 'frozen' kesitlerinin alınarak histokimyasal boyamasının yapıldığı bir denemede β -galaktozidaz aktivitesi tespit edilememesi transfeksiyon veriminin doku içinde düşmüş olduğunu göstermektedir. Tümör içi enjeksiyonlarda karşılaşılan diğer bir sorun da enjeksiyon uygulanan tümör dokularının çoğunluğunda (plazmit türüne bağlı olmaksızın) iğne batırılan yerde tümörün yaralanması ve zamanla buralarda delinmelerin oluşmasıdır. Bu deneme gruplarının bireysel tümör gelişim grafikeri ve istatistiksel analiz sonuçlarına bakıldığında grup 2, 4, 5 ve 6'daki farelerin tümör gelişimlerinde kontrole göre kitle içi enjeksiyonun 26. gününe kadar belirgin farklar olduğu ancak bu farkın daha sonra ortadan kalktığı görülmektedir. Bu sonucun enjekte edilen plazmitlerin transfeksiyon verimlerinin çok düşük olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Diğer taraftan bu gruptaki bazı farelerin tümör gelişimlerinin kontrole göre oldukça yavaş seyrettiği de görülmektedir. Bu durum enjekte edilen plazmitlerin etkisinden olabileceği gibi tümördeki yaralanmalardan dolayı da tümör küçülmüş olabilir, çünkü fare izlem formlarına bakıldığında tümör yaralanmalarının çoğu tümör hacimleri küçük olan bu farelerde görülmektedir. Ancak, 41 günlük gözlem sonunda bu gruptaki farelerde tümör kaybolması olmamakta ve yaşam süreleri de kontrole göre farklı olmaktadır (**Şekil 4.37**). IL-2'nin adenovirüs ve plazmit tabanlı vektörler ve farklı transfeksiyon yöntemlerinin kullanıldığı değişik çalışmalarda %42-%80'e varan oranlarda tümör regrasyonu gözlemlendiği bildirilmektedir⁶⁻¹¹. Bu denemede muhtemelen yukarıda bahsedilen nedenlere bağlı olarak literatür bulgularına yakın bir sonuç elde edilememiştir.

Melanoma hücreleri enjeksiyonu öncesi farelerin deri altına plazmit DNA'ların (pHM6, pHM6mIL-2, pHM6mLys ve kombinasyonu) enjekte edilmesiyle plazmitlerin taşıdığı genlerin bu bölgede eksprese olması ve etkin

bir immün yanıt için hazır hale gelmesi planlanmıştır. Bu denemeden elde edilen sonuçlar ve tümör gelişim grafikleri, tümör çıkış zamanı ve gelişiminin kontrole göre kısmen farklı olduğuna işaret etmektedir. Bu farklılık beklentilere uymakla birlikte sonuçta bütün farelerde tümör gelişmiş olması yine transfeksiyon veriminin ve dolayısıyla da ekspresyonların zayıf olmasına bağlı olabileceğini düşündürmektedir. **Şekil 4.24**'e bakıldığında pHM6 enjekte edilmiş olan 8 fareden 5'inde tümör çıkış zamanının enjeksiyondan sonraki 20. güne kadar uzadığı görülmektedir (tümör oluşumu genelde 8-11. günlerde olmaktadır). Bunun nedeni kullanılan plazmidin bakteriyel kaynaklı olmasına bağlı olabilir, çünkü bakteriyel DNA dizileri immüniteyi bir dereceye kadar uyarabilmektedir⁸⁷⁻⁹⁰. Diğer plazmit enjeksiyonlarında pHM6'ya göre farklı bir durum gözlenmemesi rekombinant plazmitlerdeki IL-2 ve Lys genlerine bağlı ilave bir etkinin oluşmadığına da işaret edebilir.

Transfekte hücre hatlarının kullanıldığı deneme 3 ve 4'den elde edilen sonuçların her yönüyle anlamlı ve beklentilerle ve de literatür bulgularıyla kısmen uyumlu olduğu saptanmıştır. Bu denemeden elde edilen veriler ve analizlerine ait bulgular bütün gruplarda (grup 2'de kısmen) kontrole göre oldukça anlamlı farklar göstermiştir. Bu gruptaki en anlamlı bulgu ise IL-2 ve Lys genlerini taşıyan plazmitlerle transfekte hücre hatlarının belli oranlarda (Çizelge 4.5) hiç tümör geliştirmemiş olmasıdır. Halbuki hem hücre kontrol (B-16V) hem de plazmit kontrol (B-16VpHM6) olarak kullanılan hücreler %100 oranında tümör oluşturmuştur. Diğer taraftan bu grupta tümör geliştirmeyen farelere 41 gün sonra B-16V hücreleri enjekte edilmesi (deneme 4) ve 65 günlük takip süresince yine tümör oluşmaması ve yaşam analiz sonuçlarının da kontrollerine göre anlamlı şekilde farklı olması bu farelerde koruyucu immünitenin gelişmiş olduğunu göstermesi açısından ayrı bir öneme sahiptir.

Denemelerin tamamında olmasa da 3. ve 4. denemelerden elde edilen sonuçlar lizozimin DNA aşısı formunda tümör immünotedavisinde kullanılabilir bir molekül olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, insan tümör hücreleriyle yapılacak bir çalışmada bu sonuçların daha da anlamlı olacağını düşünebiliriz çünkü kullanılan pHM6 vektöründeki CMV promotorunun fare hücrelerinde 50-100 kat daha yavaş çalıştığı bildirilmektedir¹⁸. Lizozimin

tümör hücrelerinde daha yüksek düzeyde sentezlenmesi tümörijenitesini arttırabildiği gibi normal hücrelerde yüksek düzeylerde eksprese ettirilmesi ile de hücredeki olası bir özellik değişiminin immün sistem tarafından daha kolay tanınabilmesini sağlayabilecektir. Ayrıca canlıda sistemik lizozim miktarındaki artış immün sistemi uyarımda tutacağından³⁴⁻³⁷ anormal hücrelere karşı daha etkin bir savunma yapabilmesini sağlayabilecektir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Fare interlökin-2 ve lizozim genlerinin (aşı formunda) immünotedavi amaçlı kullanmak üzere pHM6 memeli plazmit vektörüne klonlanarak B-16V melanoma hücrelerine aktarılması ile ilgili bu tez çalışmasında şu sonuçlar elde edilmiştir:

1. Fare interlökin-2 ve lizozim genleri pHM6 memeli ekspresyon vektörüne klonlanmış ve rekombinant plazmitler pHM6mIL-2 ve pHM6mLys olarak isimlendirilmiştir.
2. Plazmitler *E. coli*'ye aktarılmış, gliserol stokları oluşturulmuş, ve bakteriyel kültürlerden endotoksinsiz plazmit DNA izolasyonları yapılmıştır.
3. B-16V melanoma hücre hattının kültürü yapılmış ve kriyo bankları oluşturulmuştur.
4. pHM6/*lacZ* plazmitleri kullanılarak B-16V hücrelerine *in vitro* kontrol transfeksiyonları yapılmış ve histokimyasal boyama yöntemi ile β -galaktozidaz aktivitesi belirlenmiştir.
5. Plazmit DNA'lar (pHM6, pHM6mIL-2 ve pHM6mLys) B-16V hücrelerine *in vitro* lipozomal transfeksiyonla (ayrı ayrı) aktarılmış ve G418 içeren ortamda yaklaşık 20 gün süreyle üretilerek transfekte hücrelerin seçilimi sağlanmış ve elde edilen transfekte hücre hatları B-16VpHM6, B-16VpHM6mIL-2 ve B-16VpHM6mLys olarak isimlendirilmiştir.
6. B-16V hücreleriyle C-57BL/6 fare ırklarının deri altında solit tümör kitleleri oluşturulmuş ve bu kitleler içine plazmit DNA-lipozom komplekslerinin enjeksiyonu yapılmıştır.
7. B-16V hücreleri enjekte edilen farelerde tümör gelişme oranı %100 olarak tespit edilmiştir (90/90).

8. Anti-tümöral etkinin değerlendirilebilmesi için, toplam 277 farenin kullanıldığı ve 15 gruptan oluşan dört ayrı deneme planlanmış olup denemelere ait genel sonuçlar şu şekildedir (denemeler ve gruplarına ait detaylar **Çizelge 3.6**'da verilmiştir);

I. C57BL/6 inbred farelerinin deri altında B-16V melanoma hücreleriyle oluşturulmuş olan tümör kitleleri içine, IL-2 ve Lys genleri klonlanmış olan rekombinant pHM6 plazmitleri (pHM6mIL-2 ve pHM6mLys) lipozomla kompleks oluşturularak enjekte edilmiştir.

Sonuç: Tümör gelişiminde kontrole göre yavaşlama olmakla birlikte tümör regrasyonu gözlenmemiştir.

II. Rekombinant plazmit-lipozom komplekslerinin C57BL/6 farelerinin deri altına enjeksiyonundan iki gün sonra aynı bölgeye B-16V hücreleri enjekte edilmiş ve tümör oluşum ve gelişimleri değerlendirilmiştir.

Sonuç: Tümör çıkış zamanında 17. güne kadar gecikmeler olmasına rağmen bütün farelerde tümör oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca tümör büyüme sürecinin de kontrole göre daha yavaş seyrettiği tespit edilmiştir.

III. Rekombinant plazmit vektörlerin B-16V hücrelerine *in vitro* transfeksiyonu sonucu geliştirilmiş olan transfekte tümör hücreleri (B-16VpHM6mIL-2 ve B-16VpHM6mLys) C57BL/6 farelerinin deri altına enjekte edilmiş ve tümörijeniteleri değerlendirilmiştir.

Sonuç: B-16V (hücre kontrol) enjekte edilen farelerin hepsinde (%100) 8-10. günlerde tümör oluşmuştur. B-16VpHM6 (plazmit kontrol) enjekte edilen farelerin de hepsinde tümör oluşmuş ancak tümör çıkış zamanında gecikmeler gözlenmiştir. IL-2 ve Lizozimle transfekte hücrelerin tümör geliştirme oranları ise, B-16VpHM6mIL-2 için %68 ($p<0.0001$), B-16VpHM6mLys için %48.3 ($p<0.0001$), B-16VpHM6mLys + B-16VpHM6mIL-2 için ise %50.8 ($p<0.0001$) olarak tespit edilmiştir (tümörijenitelerinde önemli derecelerde azalma gözlenmiştir).

IV. ilk uygulamadan sonraki 40 gün içinde tümör geliştirmeyen farelere tekrar B-16V hücreleri uygulanmış ve tümör oluşum ve gelişimi takip edilmiştir.

Sonuç: Sağ kalan farelerin hiçbirinde tümör oluşmamıştır (koruyucu immünite gelişmiştir).

Deneme III ve IV'den elde edilen sonuçlara göre, lizozimin tümör hücrelerinde (plazmit yada viral tabanlı bir vektör aracılığı ile veya herhangi ajanla ekspresyon düzeyinin artırılması ile) yüksek düzeyde salgılanması durumunda tümör immünotedavisinde kullanılabileceği anlaşılmıştır.

6.2. Öneriler

Gerek maddi yetersizlikler nedeniyle (kullanılan materyallerin pahalı, bütçe ve zamanın sınırlı olması) çalışmaya dahil edilemeyen gerekse çalışma sırasında oluşan öneri ve düşünceler doğrultusunda ileride yapılması planlanan çalışmalar aşağıda sıralanmıştır:

1. İn vitro kontrol transfeksiyonundaki histokimyasal boyama sonuçlarına bakıldığında ve literatür bilgileri dikkate alındığında DOTAP'ın transfeksiyon veriminin oldukça düşük olduğu görülmektedir (%3-5 gibi). Transfeksiyon verimini yükseltmek için alternatif ürünler denenebilir.
2. B-16VpHM6LacZ hücre hattında β -galaktozidaz enzim aktivitesi gözlenemiyor. Bunun nedeni plazmit kopya sayısının ve dolayısıyla da sentezlenen β -galaktozidaz miktarının azalmış olmasına bağlı olabilir. Bu durumu açıklayabilmek için da yine yüksek kopya sayısına sahip farklı vektörler denenebilir.
3. Kullanılan vektör molekülü hücrede epizomal olarak çoğalmakta ve hücre bölünmeleri sırasında sentromeri olmadığı için oğul hücrelere rasgele geçtiğinden bazılarında hiç geçmemiş olabilir. Bu durumda *in vivo* koşullarda plazmit içermeyen hücre klonları da çoğalmakta ve ortama hakim duruma gelebilmektedir (IL-2 ve lizozim ile transfekte

hücre hatları enjekte edilen farelerde tümör gelişmesi bu duruma bağlı olabilir). Bu sorunu çözmek için, son zamanlarda sentromer dizilerini de içerecek şekilde geliştirilmiş olan ve ayrıca hücre içinde daha yüksek kopya sayısına ulaşabilecek olan vektör molekülleri kullanılabilir.

4. Bu bulgular doğrultusunda, çalışmaların daha da anlamlı olabilmesi için insan lizozim geni ve insan tümör hücrelerinin kullanıldığı deney modelleri üzerinde çalışılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Plautz GE, Yang ZY, Wu BY, Gao X, Huang L and Nabel GJ.** Immunotherapy of malignancy by in vivo gene transfer into tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, **1993**:4645-4649.
2. **Becer JC, Varki N, Gillies SD, Furukava K and Reisfeld RA.** Long-lived and transferable tumor immunity in mice after targeted interleukin-2 therapy. *J. Clin. Invest.*, 98 (12), **1996**: 2801-2804.
3. **Peron JM, Shurin MR and Lotze MT.** Cytokine Gene Therapy of Cancer. Lattime EC and Gerson SL. *Gene Therapy of Cancer.* Academic Press, USA. **1999**
4. **Dalgleish A G and Browning M.** *Tumor Immunology. Immunotherapy and Cancer Vaccines.* Cambridge University Press. **1996**
5. **Abbas AK, Lichtman AH.** *Cellular and Molecular Immunology.* W.B. Saunders Company, 5th Edd. **2003**; 391-410.
6. **Krauss JC, Shu S and Chang AE.** Genetically modified tumor cells as tumor vaccines. Hubber BE and Magrath I. *Gene Therapy in the Treatment of Cancer, Progress and Prospects*, **1998** :108-120
7. **Kuiper M, Sanches R, Bignon YJ and Farzaneh F.** B7.1 and Cytokines. Habib NA. *Cancer Gene Therapy. Past Achievements and Future Callenges.* **2000**: 381-390
8. **Emtage PCR, Wan Y, Bramson JL, Graham FL and Gauldie J.** A double Recombinant Adenovirus Expressing the Costimulatory Molecule B7-1 (murine) and Human IL-2 Induces Complete Tumor Regression in a Murine Breast Adenocarcinoma Model. *The Journal of Immunology.*, **1998**; 160:2531-2538.
9. **Roth JA and Cristiano RJ.** Gene Therapy for Cancer: What Have We Done and Where Are We Going. *Journal of the National Cancer Institute.* **1997**; 89(1):1-13.
10. **Lode H, Xiang R, Pertl U, Förster E, Schoenberg S, Gillies S, Reisfeld R.** Melonoma immunotherapy IL-2 depends on CD4 T-cell help mediated by CD40/CD40L interaction. *The Journal of Clinical Investigation*, **2000**, 105 (11):1623-1630.
11. **Sun WH, Burkholder JK, Sun J, Culp J, Turner J and Lu XG.** In Vivo Cytokine Gene Transfer by Gene Gun Reduces Tumor Growth in Mice. *PNAS*, **1995**; 92: 2889-2893.
12. **Whelan M, Whelan J, Russell N and Dalgleish A.** Cancer Immunotherapy: an ambarrasment of riches? *DDT*, **2003**; 8(6): 253-258.
13. **Mohammadi SA and Lotze MT.** Immunomodulation of Cancer: potential use of selectively replicating agents. *The Journal of Clinical Investigation*, , 15 (9), **2000**: 1173-1176.
14. **Schmidt W, Schweighoffer T, Herbst E, Maass G, Berger M, Schilcher F, Schaffner G and Birnstiel ML.** Cancer vaccines: The interleukin-2 dosage effect. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, **1995**:4711-4714.

15. **Straten PT, Guldborg P, Seremet P, Reisfeld RA, Zeuthen J and Becker JC.** Activation of preexisting T cell clones by targeted interleukin-2 therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, 95:8785-8790.
16. **Schneeberger A, F, Schmidt W, Kutil R and Stingl G.** The tumorigenicity of IL-2 gene-transfected murine M-3D melanoma cells is determined by the magnitude and quality of the host defense reaction: NK cells play a major role. *The Journal of Immunology*, **1999**, 162: 6650-6657.
17. **Lohr F, Lo DY, Zaharoff DA, Hu K, Zhang X, Li Y, Zhao Y Dewhirst M W, Yuan F, and Li C Y.** Effective Tumor Therapy with Plasmid-Encoded Cytokines Combined with *in Vivo* Electroporation. *Cancer Research*, **2001**; 61: 3281-3284.
18. **Addison CA, Braciak T, Raltson R, Muller WJ, Gauldie J and Graham FL.** Intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin-2 induces regression and immunity in a murine breast cancer model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**;92:8522-8526.
19. **Gansbacher B, Zier K, Daniels B, Cronin K, Bannerji R and Gilboa E.** Interleukin 2 Gene Transfer into Tumor Cells Abrogates Tumorigenicity and Induces Protective Immunity. *Journal of Experimental Medicine*, **1990**; 172:1217-1224.
20. **Sampath P, Hanes J, DiMeco F, Tyler BM, Brat D, Pardoll DM and Brem H.** Paracrine Immunotherapy with Interleukin-2 and Local Chemotherapy Is Synergistic in the Treatment of Experimental Brain Tumors. *Cancer research*, **1999**;59:2107-2114.
21. **Zhang R, Minemura K and De Groot LJ.** Immunotherapy for Medullary Thyroid Carcinoma by a Replication-Defective Adenovirus Transducing Murine IL-2. *Endocrinology*, **1998**;139(2): 601-608.
22. **Fakhrai H, Shawler DL, Gjerset R, Naviaux RK, Koziol J, Royston I and Sobol RE.** Cytokine Gene Therapy with IL-2 Transduced Fibroblasts: Effects of IL-2 Dose on Anti-tumor Immunity. *Hum Gene Ther*, **1995**; 6(5): 591-601.
23. **Bathe OF, Herman ND and Malek TR.** IL-2 During *in Vitro* Priming Promotes Subsequent Engraftment and Successful Adoptive Immunotherapy by Persistent Memory Phenotypic CD8⁺ T Cells. *The Journal of Immunology*, **2001**; 167: 4511-4517.
24. **Kjaergaard J, Peng L, Cohen PA, Drazba JA, Weinberg AD and Shu S.** Augmentation Versus Inhibition: Effects of Conjunctive OX-40 Receptor Monoclonal Antibody and IL-2 Treatment on Adoptive Immunotherapy of Advanced Tumor. *The Journal of Immunology*, **2001**; 167:6669-6677.
25. **Hung B K, Hayashi R, Walker A L, Lowenstein C, Pardoll D, and Levitsky H.** The Central Role of CD4⁺ T Cells in the Antitumor Immune Response. *J. Exp. Med*, **1998**; 188: 2357-2368.
26. **Sharon J.** *Basic Immunology*. Williams & Wilkins, **1998**: 226-232.
27. **Bailey JE and Ollis DF.** *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2nd Ed. Singapore, **1986**: 178.
28. **Bianchi C.** Is Fleming's Lysozyme an Analgesic Agent? *Eur J Pharmacol*, **1981**; 71: 211.
29. **Sava G, Benetti A, Ceshia V and Pacor S.** Lysozyme and Cancer: Role of Exogenous Lysozyme as Anticancer Agent (Review). *Anticancer Research*, **1989**; 9: 583-592.

30. **Sava G, Benetti A, Ceshia V, Pacor S and Zabucchi G.** Observation on the Antimetastatic Action of Lysozyme in Mice Bearing Lewis Lung Carcinoma. *Anticancer Research*, **1991**; 11: 1109-1114.
31. **Gordon LI, Douglas SD, Kay NE, Yamada O, Osserman EF and Jacob HS.** Modulation of neutrophil function by lysozyme. Potential negative feedback system of inflammation. *J Clin Invest*, **1979**; 64: 226-232.
32. **Proctor VA and Cunningham FE.** The Chemistry of Lysozyme and its Use as a Food Preservative and a Pharmaceutical. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **1988**; 26 (4): 359-395.
33. **Ibrahim HR, Thomas U, and Pellegrini A.** A Helix Loop-Helix Peptide at the Upper Lip of the Active Site Cleft of Lysozyme Confers Potent Antimicrobial Activity with Membrane Permeabilization Action. *The Journal of Biological Chemistry*, **2001**; 276 (47): 43767-43774.
34. **Sava G.** Pharmacological Aspects and Therapeutic Applications of Lysozymes. *EXS*, **1996**; 75: 433-449.
35. **LeMarbre P, Rinehart JJ, Kay NE, Vesella R and Jacob HS.** Lysozyme Enhances Monocyte-Mediated Tumoricidal Activity: A Potential Amplifying Mechanism of Tumor Killing. *Blood*, **1981**; 58 (5): 994-999.
36. **Murakami F, Sasaki T, Sugahara T.** Lysozyme Stimulates Immunoglobulin production by Human-Human Hybridoma and Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Cytotechnology*, **1997**; 24 (2): 177-182.
37. **Warren JS, Rinehart JJ, Zwilling BS and Neidhart JA.** Lysozyme Enhancement of Tumor Cell Immunoprotection in a Murine Fibrosarcoma. *Cancer Research*, **1981**; 41 (5): 1642-1645.
38. **Fox PF.** Exogenous enzymes in dairy technology. *Journal of Food Biochemistry*, **1992**; 17: 173-179.
39. **Ralph P, Moore MAS and Nilsson K.** Lysozyme Synthesis by Established Human and Murine Histiocytic Lymphoma Cell Lines. *The Journal of Experimental Medicine*, **1976**; 143:1528-1533.
40. **Balboa MA, Saez Y and Balsinde J.** Calcium-Independent Phospholipase A2 is required for Lysozyme Secretion in U937 Promonocytes. *The Journal of Immunology*, **2003**; 170: 5276-5280.
41. **Ralph P and Nakoinz I.** Direct toxic Effects of immunopotentiators on Monocytic, Myelomonocytic, and Histiocytic or macrophage tumor Cells in Culture. *Cancer Research*, **1977**; 37(2): 546-550.
42. **Mantur M, Matowicka-Karna J, Darewicz B, Kemonia H, Dymicka-piekarska V, Prokopowicz J, Darewicz J.** Embolization and Serum Lysozyme Activity in renal Cancer. *Neoplasma*, **1998**; 45 (3): 148-150.
43. **Yuen ST, Wong MP, Chung LP, Chan SY, Cheung N, Ho J, Leung SY.** Up Regulation of Lysozyme Production in Colonic Adenomas and Adenocarcinomas. *Histopathology*, **1998**; 32 (2): 126-132.
44. **Uvdut VV, Naumov SA, Karpo AB, Savina EV and Suslova TE.** Salivary Lysozyme in the Screening of Stomach Cancer. *Voprosy Onkologii*. **1992**; 38 (2): 177-181.

45. **Tichy M, Bures J, Jandik P.** Importance of Determining Lysozyme in Colorectal Cancer. *Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove*, 1990;33(3):345-9.
46. **Takahashi T, Akihama T, Yamagucchi A, Yoshida K, Miura AB, Uesaka Y, Tsuburaya T.** Lysozyme Secreting Tumor: A Case of Gastric Cancer Associated with Myelofibrosis due to Disseminated Bone Marrow Metastasis. *Japanese Journal of Medicine*. 1987; 26 (1): 58-64.
47. **Okushin H, Yamada G, Nagashima H.** Immunohistochemical Study of Fibronectin, Lysozyme, and Alpha-Fetoprotein (AFP) in Human Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterologia Japonica*. 1987; 22 (1): 44-54
48. **Lotfi AS, Djalali M.** Possible Correlation Between Urinary Muramidase (E.C. 3.2.1.27) and Oesophageal Cancer. *Cancer Letters*, 2000; 158: 113-117.
49. **Steele RJ, Eremin O, Brown M.** Blood Monocytes and Tumor-infiltrating Makrophages in Human Breast Cancer: Differences in Activation Level as Assessed by Lysozyme Content. *Journal of the National Cancer Institue*. 1983; 71 (5): 941-943.
50. **Corberand J, Benchekroun S, Nguyen F, Laharrague P and Pris J.** Polymorphonuclear Functions in Hodgkin's Disease Patients at Diagnosis in Remission and in Relapse. *Cancer Research*, 1982; 42(4): 1595-1599.
51. **Cooper GM.** *The Cell, A Molecular Approach*. Printed in U.S.A. 1997: 599-600.
52. **Berlyn KA, Ponniah S, Stass SA, Malone JG, and et all.** Developing Dentrict Cell Polynucleotide vaccination for Prostate Cancer Immunotherapy. *Journal of Biotechnology*. 1999; 73 (2-3): 155-179.
53. **Donnelly J J, Ulmer J B, Shiver J W, and Liu M A.** DNA Vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15: 617-648.
54. **Cheu C H, Wang T L, Hung C F, Yang Y, Young R A, Pardoll D M, and W T C.** Enhancement of DNA Vaccine Potency by Linkage of Antigen Gene to an HSP70 Gene. *Cancer Research*, 2000; 60: 1035-1042.
55. **Cooper MJ.** Non-Infectious Gene Transfer and Expression Systems for Cancer Gene Therapy. Lattime EC and Gerson SL. *Gene Therapy of Cancer*. Academic Press, USA. 1999
56. **Garmory HS, Brown KA and Titball RW.** DNA Vaccines: improving expression of antigens. *Genetic Vaccines and Therapy*, 2003; 1:2
57. **Reimer DL, Kong S, Monck M, Wyles J, Tam P, Wasan EK and Bally MB.** Liposomal Lipid and Plasmid DNA Delivery to B16/BL6 Tumors After Intraperitoneal Administration of Cationic Liposome DNA Aggregates. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1999; 289(2); 807-815.
58. **Weithoff CM and Middaugh CR.** Barriers to Nonviral Gene Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003; 92(2): 203-211.
59. **Singh M, Briones M, Ott B and O'Hagan D.** Cationic Microparticles: A potent delivery system for DNA vaccines. *PNAS*, 2000; 97(2): 811-816.
60. **Hung B K, Hayashi R, Walker A L, Lowenstein C, Pardoll D, and Levitsky H.** The Central Role of CD4⁺ T Cells in the Antitumor Immune Responce. *J. Exp. Med*, 1998; 188: 2357-2368.

61. www.fermentas.com Erişim: 13.10.2003
62. www.roche-applide-science.com/pack-insert/1811177a.pdf Erişim: 17.04.2004
63. www.sigma-aldrich.com (in vivo Liposome transfection reagent) Erişim: 20.04.2004
64. <http://www.dsmz.de> (B-16V cell line) Erişim: 23.02.2003
65. <http://www.atcc.org> (B16-F0 cell line) Erişim: 16.01.2003
66. www.stratagene.com Erişim: 2.03.2004
67. **Brown TA** . *Gene Cloning, An Introduction*. Third Ed.,UMIST, Manchester ,UK: Chapman & Hall, **1995** : 27-77.
68. **Sambrook J and Russell DW**. *Molecular cloning, A Laboratory Manual*. Third Edition. CSHL Press. **2001**: 16.13
69. www.biontexas.com (DOTAP, Established Transfection reagent for mammalian Cells) Erişim: 26.04.2004
70. **Burden DW and Whitney D**. *Biotechnology: Proteins to PCR. A course in Strategies and Lab Techniques*. Avenue, Cambridge. **1995**: 7-28
71. **Wu W, Welsh MJ, Kaufman PB and Zhang HH**. *Method in Gene Biotechnology*, CRC Press**1997**: 16-21, 283
72. **Brown TA**. *Essential Molecular Biology, Volume I, II, A Practical Approach*. Oxford University Press. **1995**:
73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html> Erişim: 4.05.2003
74. [www. GeneRunner.com](http://www.GeneRunner.com) (Hasting Software, Version 3.03) 18.08.2003
75. **Hanahan D**. Studies on Transformation of *E. coli* with Plasmids. *J Mol Biol*, **1983**; 166:557-580.
76. **Birnboim HC and Doly J**. *Nucl Acid Res*, **1979**; 7: 1513-1523.
77. **UVIDoc version 98.01 for windows UVI Tech St John's Innovation CenterCawley Road CAMBRIDGE CB4 4WS UK**
78. www.cimmyt.org/english/docs/manual/protocols/abc_amgl.pdf (PCR Amplification of Inserts from bacterial Cultures). Erişim: 10.03.2004
79. **Davis J.M**. Basic Cell Culture, A Practical Approach. **1994**
80. **Freshney R. I**. Culture of Animal Cells. A manual of Basic Technique. 2nd Edition. **1987**
81. www.atcc.org (Technical Bulletin No:4 Guide to Subculturing Cell Lines) Erişim: 16.01.2003
82. **Yegorov YE, Akimov SS, Hass R, Zelenin AV and Prudovsky IA**. Endogenous β -galactosidase activity in continuously nonproliferating cells. *Experimental Cell Research*, **1998**, 243: 207-211.

83. **Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ.** Is β -Galactosidase Staining a Marker of Senescence in Vitro and in Vivo. *Experimental Cell Research*, **2000**; 257: 162-171.
84. **Ma W, Rogers K, Zbar B and Schmidt L.** Effects of Different Fixatives on β -Galactosidase Activity. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **2002**; 50(10): 1421-1424.
85. **Montgomery RA, and Dalman MJ.** Semi-quantitative polymerase Chain Reaction Analysis of Cytokine and Cytokine Receptor Gene Expression During Tymic Ontogeny. *Cytokine*, 9 (10), **1997**: 717-726
86. **Aitken MA, Raguz S and Antoniou M.** Gene Transfer and Expression in tissue Culture Cells of Higher Eukaryotes. Rapley R and Walker JM. *Molecular Biotechnology Handbook*: Humana Press, **1998**: 245.
87. **Tokunaga T, Yamamoto H, et al.** Antitumor activity of DNA fraction from Mycobacterium bovis BCG. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1984**; 72:955-1002.
88. **Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Kuramoto E, Shimada S, Yano O, Tokunaga T.** Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and agument IFN-mediated NK activity. *J. Immunol.*, **1992**; 148:4072-4076.
89. **Sato Y, Roman M, et al.** Immunostimulatory DNA sequences are necessary for effective intradermal gene immunization. *Science*, **1996**; 273:352-354.
90. **Klinman DM, Yamshikov G, Ishgatsubo Y.** Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J. Immunol.*, **1997**; 158:3635-3659
91. **Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K.** *Short Protocols in Molecular Biology. Appendix 3F: Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture.* 5th Edition. John Wiley and Sons Inc, **2002**, p:A3-22.

EKLER

EK-1

Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması

Aşağıda verilen kimyasal ve solüsyonların hazırlanmasında kaynak olarak 'Molecular Cloning'⁶⁸ ve 'Short protocols in Molecular Biology'⁹¹ esas alınmıştır.

Hazırlanan solüsyonlar çoğunlukla konsantre stoklar halindedir. Çalışma konsantrasyonlarına ulaştırmak için $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ formülünden yararlanılarak stoklardan hesaplanan miktarlarda alınır ve genelde bidistile su ile seyreltilir.

M_1 = Hazırlanan stok konsantrasyonu (M, N veya %).

V_1 = Stoktan alınması gereken miktar (v).

M_2 = Çalışma (son) konsantrasyonu (M, N veya %).

V_2 = Hazırlanacak olan çözelti (çalışma çözeltisi) miktarı (v).

Yüzde hesaplamalarında ise; gr/ml veya ml/ml (Toplam 100 ml solüsyon içinde içinde X gr veya 100-X ml içinde X ml) değerleri dikkate alınır.

1.1. Eritrosit Lizis Tampon

Sukroz	: 0.32 M
EDTA (pH: 7.4)	: 10 mM
MgCl	: 5 mM
Triton X-100	: %1

Gerekli miktarda hazırlanır ve 4°C'de saklanır.

1.2. Agaroz Jel

Agaroz pahalı bir madde olduğu için öncelikle jel döküm tablasının boyutları (jel kalınlığı da dikkate alınarak) ölçülür ve hacmi belirlenir. Hazırlanmak istenen yüzde konsantrasyona göre (örn. %1'lik), belirlenen hacim için gereken miktar agaroz dikkatli bir şekilde tartılır ve erlen içine konur. Üzerine hesaplanan hacimde 1X TBE tamponu (**Ek 1.15**) (1 hacim 5X TBE

üzerine 4 hacim saf su ilave edilerek hazırlanır) konarak ateş üzerine alınır ve eritilir (3-5 saniye kaynaması yeterlidir). Ateşden alınan jel üzerine son konsantrasyon 0.5µg/ml olacak şekilde stok EtBr (**Ek 1.16**)solüsyonundan ilave edilir. Jel sıcaklığı 45-50 °C'ye (el sıcaklığı) geldiğinde hazırlanan jel kabına dikkatli bir şekilde, hava kabarcığı oluşturmadan dökülür ve yaklaşık 40 dakika beklenerek donması sağlanır. Jel elektroforez tankına alınır ve üzeri örtülene kadar 1X TBE tamponu ilave edilir. Kuyucuk oluşturmak için yerleştirilen tarak dikkatli bir şekilde çıkartılır. Jel, örneklerin yüklenmesine ve elektroforeze hazırdır.

1.3. LB (Leuria Bertani) Besi Ortamı

<u>1 litre için</u>	
Yeast extract	: 5 gr
Bacto tryptone	: 10 gr
NaCl	: 10 gr

Yukarıda verilen miktarlar 1 litre içindir. Hazırlanacak olan hacim için gereken miktar içerik orantılanarak tartılır. Manyetik karıştırıcı üzerinde toplam hacimden biraz az saf su ile çözülür ve pH'sı NaOH ile 7.5'e ayarlanır. Hacim saf su ile tamamlanır ve erlenlere (erlen hacminin 1/10'u oranında) paylaşılır. Erlenlerin ağzı pamukla sıkıca kapatılır ve alüminyum folyo sarılarak otoklavlanır. Oda sıcaklığında uzun süre saklanabilir. Kontaminasyon belirtisi olanlar dökülür.

1.4. LB-Agar Besi Ortamı

Hazırlanan sıvı besi yerine %1.5 oranında agar katılır ve aynı şekilde otoklavlanır. Kullanılacak petri kutuları da kağıda sarılarak otoklavlanır. Besi yeri steril kabin içinde petri kutularına paylaşılır ve donduktan sonra streç filmle sarılarak +4 °C'de saklanır. Saklama süresi iki haftayı geçmemelidir. Antibiyotik veya X-gal ilave edileceği zaman, son konsantrasyonlar dikkate alınarak besi yeri sıcaklığı yaklaşık 48°C'ye geldiğinde ilave edilir ve zaman geçirmeden petri kutularına paylaşılır. Plakların üzerine ilgili bilgiler yazılarak etiketlenir.

1.5. Antibiyotikler

a) Ampisilin (25 mg/ml)

İstenen hacim için gereken miktar ampisilin dikkatli bir şekilde tartılır, saf suda çözülür, bakteriyel filtreden (0.2 μm) geçirilerek steril bir şekilde ependorf tüplere paylaştırılır ve -20°C ' de saklanır. Besi ortamlarına 35-50 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde ilave edilir.

Ampisilin, penisilin türevi bir madde olup hücre duvarı sentezlenmesine engel olarak bakterinin ölümüne neden olur. Dirençli bakteriler tarafından sentezlenen β -lactamase, antibiyotiğin β -lactam halkasını kopartarak inaktive eder.

b) Tetrasiklin (12.5 mg/ml)

Etanol/saf su (1/2 v/v) karışımında 12.5 mg/ml olacak şekilde tetrasiklin hidroklorid çözülür, ve ependorflara paylaştırılarak -20°C 'de saklanır. Tetrasiklin ışığa hassas olduğu için karanlık bir ortamda veya alüminyum folyoya sarılarak saklanmalıdır. Besi ortamlarına 12.5-15 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde ilave edilir. Magnezyum iyonları tetrasiklin için kuvvetli bir inhibitör madde olduğundan, tetrasiklin dirençli bakteri seçimlerinde magnezyum içermeyen besi ortamları (örn. LB) kullanılmalıdır.

Tetrasiklin, ribozomların 30S'lik birimlerine bağlanarak bakteriyel protein sentezini önler. Dirençli bakterilerin ürettiği bir protein hücre zarını modifiye ederek antibiyotiğin hücre içine alınmasını önler.

1.6. X-gal Hazırlanması (20 mg/ml)

İstenen hacim için gereken miktar X-gal dikkatli bir şekilde tartılır ve N-N-N Dimetil formamid içinde çözülür, filtreden geçirilmese de olur. Koyu renkli veya folyo ile sarılı şişelerde -20°C ' de saklanır. Hazırlanan katı besi yeri 48°C ' ye kadar soğuduğunda son konsantrasyon 40 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde stokdan ilave edilir.

1.7. TNE Tamponu

10 mM Tris pH 7.5 (**Ek 1.17**)

100 mM NaCl

1 mM EDTA pH 7.5 (**Ek 1.18**)

İstenen hacme göre gerekli Tris ve EDTA hesaplanarak stoklardan alınır, gerekli miktar NaCl tartılır üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve 4°C' de saklanır.

1.8. Lizozim Solüsyonu (5 mg/ml)

50 mM Glikoz

50 mM Tris-HCl pH 8.0 (**Ek 1.17**)

50 mM EDTA pH 8.0 (**Ek 1.18**)

Önce, 25 ml 1 M Glikoz hazırlanır ve filtreden geçirilerek stok olarak saklanır. İstenilen hacimdeki solüsyon için gerekli Tris, EDTA ve Glikoz hesaplanır stoklardan alınır ve üzeri steril saf su ile tamamlanır, otoklavlanmaz, buz dolabında saklanır. Kullanılacağı zaman istenen hacimde solüsyon alınır, 5 mg/ml olacak şekilde liyofilize lizozim tartılır iyice vortekslenir ve kullanıncaya kadar buz üzerinde tutulur. Bu solüsyonun her zaman taze olarak hazırlanması gerektiğinden, varsa fazlası atılır.

1.9. SDS Solüsyonu

% 1 SDS

0.2 M NaOH

10 ml için; 0.1 gr SDS ve 0.08 gr NaOH pelleti tartılır üzerine 10 ml steril saf su ilave edilir ve iyice (pellet eriyinceye kadar) vortekslenir. Kullanıncaya kadar buz üzerinde tutulur ve fazlası atılır.

1.10. 3 M Na-Asetat (pH 4.8)

Hazırlanmak istenen hacimde 3M olacak şekilde Na-asetat tartılır ve magnetik karıştırıcı üzerinde bir miktar suda çözülür. Glacial asetik asit ile pH 4.8'e ayarlanır ve hacim su ile tamamlanır. Otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında saklanır.

1.11. Fenol Hazırlanması

Fenol, fosfodiester bağlarını kıran ve DNA-RNA arasında çapraz bağlar oluşumuna neden olan oksidan ürünlerden (örn. quinonlar gibi) arındırılmış olmalıdır. Bu işlem 160 °C'de distilasyonla yapılır. Satın alınan katı fenol distile edilmiş olmalıdır. Katı fenol aşağıda verilen uygulama ile kullanıma hazır hale getirilir:

- 1- Katı haldeki (distile edilmiş) fenolden hazırlanacak miktar kadar tartılır ve su banyosunda 68°C'de tamamen eriyinceye dek bekletilir. Not: Fenolün görünüşü parlak ve renksiz olmalıdır. Pembe veya sarı renkli görünüm almış fenol kullanılmamalıdır.
- 2- Fenol üzerine %0.1 oranında 8-hidroksikinolin (renklendirmek için) ilave edilir ve iyice karıştırılır.
- 3- Eşit hacimde (1:1) 1M tris (pH 8.0) ilave edilir, şişenin ağzı kapatılır ve kuvvetlice çalkalanır. İki faz oluşuncaya kadar oda sıcaklığında bekletilir.
- 4- Üst faz atılır ve bir önceki işlem tekrar edilir (en az iki defa).
- 5- Fenol üzerine eşit hacimde 0.1 M tris (pH 8.0) ilave edilir ve karıştırılır. Bu işlem üst fazın pH'sı 7.8-8.0 oluncaya dek tekrarlanır.
- 6- Fenol içine birkaç parça β-merkaptotanol ilave edilir ve üzerine 1/10 oranında 0.1 M tris (pH 8.0) eklenerek +4 °C'de saklanır.

Kullanılacağı zaman pipetle gereği kadar fenol (alt faz) alınır ve kullanılır. Folyo ile sarılarak ışıktan korunmalıdır.

Fenol organik bir çözücüdür, proteinleri denatüre ederek presipite olmasını sağlar. Yukarıdaki şekilde hazırlanan fenol DNA ve RNA'ya zarar

vermez, ancak kullanım sırasında şiddetli ve tekrar tekrar muamele yine de DNA'da kırılmalara neden olur.

1.12. TE Tamponu, pH 8.0

10 mM Tris pH 8.0

0.1 mM EDTA pH 8.0

Hazırlanacak hacim için gerekli Tris ve EDTA hesaplanarak stoklardan alınır, üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve kontamine etmeden kullanılır.

1.13. RNaz (10 mg/ml)

Hazırlanmak istenen hacim için gereken miktar RNaz dikkatli bir şekilde tartılır ve 10 mM Tris.Cl (pH 7.5) ve 15 mM NaCl içeren RNaz solüsyonunda çözülür. Daha sonra su banyosunda 100 °C'de 15 dakika tutulur (DNaz aktivitesini gidermek için), oda sıcaklığında soğutulur ve ependorflara paylaştırılarak -20°C'de saklanır.

1.14. Poliakrilamit Jel Elektroforezi (PAGE)

Stok solüsyonlar

Poliakrilamit (PA)	: %30 (29:1)
APS	: %25
TBE	: 10X
Su	: Bi-distile (bd)
TEMED	

Aparatın hazırlanması

- Cam plakalar önce saf su ile sonra da %70'lik alkolle iyice temizlenir ve üzerine %95'lik alkol dökülerek dik bir şekilde 1-2 dakika kuruması beklenir.
- Plakanın biri temiz bir bez üzerine alınarak kenarlarına 0.75 mm'lik spacer'lar konur ve diğer plaka da bunun üzerine yerleştirilir (cam

plakaların yalnızca kenar kısımlarından tutulur, üzerinde toz, tüy, yağ lekeli vs artıklar olmamasına dikkat edilir).

- Cam plakalar jel dökme aparatına sabitlenir ve taraklar dikkatli bir Şekilde yerleştirilir.

%10'luk PA Jelin hazırlanması

- İki yönlü mini boy jel aparatı plakaları için 15 ml solüsyon yeterli olmaktadır. Bunun için aşağıda verilen miktarlardaki bileşenler temiz bir cam Şişe içinde karıştırılır ve vakum pompası ile havası alınır.

Su	: 8.5 ml
Poliakrilamid	: 5 ml
TBE	: 1.5 ml
APS	: 50 �l

- Bir mikrosantrifüj tüpüne yukarıdaki karıŐımdan 1 ml alınarak üzerine 1 l TEMED ilave edilir ve hızlı bir Şekilde her bir plaka arasına 0.5ml olarak paylaştırılır (bu işlemin amacı tabandan jel sızmasını önlemek içindir).
- Jel polimerize olduğunda geride kalan karıŐımın üzerine 5  l TEMED ilave edilir ve homojen bir Şekilde dağılması sağlanır.
- Yine mümkün olduğu kadar hızlı bir Şekilde karışım enjektöre çekilir ve plakalar arası boŐluđa doldurulur.
- Solüsyon taraklara yaklaŐtıđı sırada tarak diŐleri altında hava kabarcığı kalmaması için jel dökme kabı bir tarafa yaklaşık 30  bir açı ile eğilir.
- Daha sonra tekrar düz bir Şekilde konarak polimerize olması beklenir.
- Kalan solüsyon (yaklaşık 1 ml'dir) mikrosantrifüj tüpüne alınarak jelin donup donmadığı zaman zaman buradan kontrol edilir.
- YakalaŐık 30 dakika sonra tarak dikkatli bir Şekilde çıkarılarak yükleme tamponu (**Ek 1.19**) ile 5:1 oranında (5  rnek, 1 6X yükleme tamponu) karıŐtırılmıŐ örneklerden her bir kuyuya 5'er  l yüklenir.

- 1X TBE tamponu varlığında 100V, 80 mA'de 1,5 saat süreyle elektroforez yapıldıktan sonra jel EtBr ile boyanarak görüntülenir ve UviSoft programı ile de oluşan bantların analizi yapılır.

1.15. 5X TBE Tamponu (pH 8.0)

Bir litre için;

Tris baz : 54 gr

Borik asit : 27.5 gr

EDTA (pH 8.0) : 0.01 M

Hazırlanmak istenen miktar için gereken bileşenler yukarıdaki değerlere göre orantılanarak alınır. Manyetik karıştırıcı üzerinde çözülür, NaOH ile pH 8.0'a ayarlanır ve otoklavlanır.

1X yapmak için 1 hacim 5X'lik TBE üzerine 4 hacim saf su ilave edilir.

1.16. EtBr (10 mg/ml)

Hazırlanmak istenen hacim için gereken miktar Ethidium Bromid (EtBr) dikkatli bir şekilde tartılır ve suda iyice vortekslenerek çözülür. Işığa hassas olduğu için renkli bir cam şişede veya alüminyum folyo ile sarılarak +4°C'de saklanır. Jele son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde ilave edilir.

EtBr, floresan bir boyadır ve DNA ve RNA bazları arasına girerek kuvvetlice bağlanır. UV ile parlayarak görüntü verir ve jeldeki nükleik asitlerin yerinin belirlenmesini sağlar.

Dikkat !: EtBr son derece mutajen bir maddedir. Tartım ve kullanım sırasında mutlaka eldiven ve maske giyilmelidir ve çevreyi de kontamine etmeden dikkatli bir şekilde kullanılmalıdır.

1.17. 0.5 M Tris-HCl, (pH 7.5 ve 8.0)

İstenen hacimlerde 0.5 M olacak şekilde gerekli Tris baz tartılır bir miktar

su ile çözülür, HCl ile pH'lar ayarlandıktan sonra gerekli hacme tamamlanır, otoklavlanır ve 4°C'de saklanır.

1.18. 0.5 M EDTA (pH 7.5 ve 8.0)

İstenen hacimlerde 0.5 M olacak şekilde gerekli EDTA tartılır, bir miktar su ile çözülür, NaOH ile pH'lar ayarlandıktan sonra gerekli hacme tamamlanır, otoklavlanır (121 °C'de 15-20 dakika) ve 4°C'de saklanır.

1.19. Yükleme Tamponu (6X)

%40 sukroz (w/v), (suda çözülür)

%0.25 bromfenol mavisi

Yukarıda verilen oranlara göre, istenen hacim için gereken miktarda sukroz ve boya tartılır, vorteksle iyice karıştırılır ve ependorfl tüplere paylaştırılarak 4°C'de saklanır. DNA solüsyonu ile 1/5 oranında (1 hacim boya 5 hacim DNA solüsyonu) karıştırılır.

EK-2

2.1. Laboratuvar Çalışma İlkeleri

Burada önemli olanlardan bazıları sıralanmıştır (detaylar referanslarda mevcuttur)^{68, 70, 71, 72, 91}.

- Laboratuvarında mutlaka önlük giyilmeli ve eldiven (gerektiği zaman da maske ve bone) takılmalıdır.
- Laboratuvar içinde hiçbir şey yenmemeli ve sigara içilmemelidir.
- Solüsyonlar ağızla pipetlenmemelidir.
- Patojen mikroorganizma ile çalışılmamalı ve biyolojik olarak zararlı olabilecek her türlü kimyasal (Fenol, kloroform, alkoller, asitler, DEPC, EtBr, Gümüş vs gibi) uygun bir şekilde saklanmalı, kullanımları sırasında gereken özen gösterilmelidir.

Bunlardan;

- *EtBr* mutajendir.
- *Kloroform* deriden kolaylıkla emilir ve karsinojendir (buharından da uzak durulmalıdır).
- *DEPC* karsinojendir.
- *Asetik asit* ve *HCl* ciddi yanıklar oluşturur (buharından da uzak durulmalıdır).
- *Fenol* zehirlidir, ciddi kimyasal yanıklara neden olur (proteinleri denatüre eder).
- *Etanol* yanıcı ve zehirleyicidir.
- Zararlı olan laboratuvar artıkları uygun kaplarda biriktirilmeli ve kanalizasyondan uzak yerlerde açılan çukurlara gömülmelidir.
- UV ışığına gözlüksüz veya uygun korunma önlemleri alınmaksızın bakılmamalıdır (göz retinasına zarar verir ve ciddi yanıklar oluşturabilir).
- Çalışma alanları ve yüzeyler, çalışma öncesi ve sonrasında %70'lik etanolle silinmelidir.
- Kimyasal ve enzimler föylerinde belirtilen uygun koşullarda depolanmalıdır.

- Plastik malzemeler uygunsa otoklavlanarak veya gazla/ışınla sterilize edilmelidir.
- Cam malzemeler uygun deterjanla temizlenmeli ve fırınlanarak sterilize edilmelidir.
- Hazırlanan solüsyonlar ve üreme ortamları otoklavlanmalı veya filtrasyonla (0.22 µm por çaplı filtre ile) sterilize edilmelidir.
- RNA çalışmalarında kullanılan sarf malzemeleri ve solüsyonların RNaz içermemesine (RNase free) dikkat edilmelidir.
- Çalışma alanlarına yalnızca kullanılacak malzemeler getirilmeli kullanılan malzemeler de ortamdan uzaklaştırılmalıdır.
- Hazırlanan her solüsyon bilgilendirici şekilde (cins, molarite, pH, hazırlanış tarihi ve kime ait olduğu belirtilerek) etiketlenmelidir.
- Temizliğinden, içeriğinden veya kullanım süresinden şüphe duyulan hiçbir kimyasal madde/solüsyon kullanılmamalı ve saklanmamalıdır.
- Bakteri ve hücre kültür çalışmaları ayrı ayrı alanlarda ve lamin air flow kabini içinde ve alkol alevi/bünzen beki önünde yapılmalı ve kontaminasyonlara karşı son derece dikkatli olunmalıdır.
- Her türlü canlı atıklar otoklavlandıktan sonra atılmalıdır.

2.2. Örnek bir 'Fare İzlem formu'

FARE İZLEM FORMU (Örnek olarak doldurulmuştur)									
DENEME: 1 GRUP : 2 FARE NO: 3.2 (3 numaralı kafes, 2. fare) Dişi: O / Erkek: ⊗			IRKI: C57BL/6 Deney Başlangıcı YAŞ (Gün): 38 ve AĞIRLIK (gr): 23 Deney Sonu YAŞ (Gün): 53 ve AĞIRLIK (gr): 23.5						
UYGULAMA									
HÜCRE					PLAZMİT				
Türü ve miktarı		B-16V, (1x10 ⁵ hücre/50 µl)			Türü ve miktarı		pHM6, (50 µg / 100 µl)		
Uyg. Tarihi		01.05.2005			Uyg. Tarihi		12.05.2005		
Uyg. Yeri		Sol arka sırt bölgesinde deri altına			Uyg. Yeri/Yerleri		Tümör içi		
TÜMÖR ÖLÇÜMLERİ									
	TARİH	S: En küçük çap (mm)	L: En büyük çap (mm)	HACİM V=LxS ² /2 (mm ³)		TARİH	S: En küçük çap (mm)	L: En büyük çap (mm)	HACİM V=LxS ² /2 (mm ³)
1	09.05.05	4	5	40	15				
2	12.05.05	6	7	126	16				
3	15.05.05	7	8	196	17				
4	18.05.05	10	12	600	18				
5	21.05.05	12	15	1080	19				
6	14.05.05	13	17	1436.5	20				
7					21				
8					22				
9					23				
10					24				
11					25				
12					26				
13					27				
14					28				
DEĞERLENDİRME									
					<u>Tarih</u>				
Farenin durumu iyi değil					: <input type="checkbox"/>				
Tümör karına yayılmış					: <input type="checkbox"/>				
Tümörde delinme/yaralanma var					: <input type="checkbox"/>				
Ölü olarak bulundu					: <input checked="" type="checkbox"/>				
Sakrifiye edildi (Aşırı tümör büyümesi/deney sonu)					: <input type="checkbox"/>				
Varsa diğer açıklamalar					: <input type="checkbox"/>				

2.3. Verilerin SPSS Sayfasına Giriş Şekli

Fare No	Deneme	Grup	Cinsiyet (1=E, 2=D)	Yaş (gün)	Ağırlık (gr)	Zaman (gün)	Tümör hacmi (mm ³)	İlk hacim (mm ³)	Değişim (%)
1	1	2	2	33	16	11	1.000	1.000	100
1	1	2	2	33	16	14	700	1.000	70
1	1	2	2	33	16	17	445	1.000	45
1	1	2	2	33	16	20	864	1.000	86
1	1	2	2	33	16	23	1.892	1.000	189
1	1	2	2	33	16	26	1.862	1.000	186
1	1	2	2	33	16	29	1.960	1.000	196
3	1	2	1	29	19	14	208	207	100
3	1	2	1	29	19	17	221	207	106
3	1	2	1	29	19	20	376	207	181
3	1	2	1	29	19	23	602	207	290
3	1	2	1	29	19	26	672	207	324
3	1	2	1	29	19	29	1.638	207	789
3	1	2	1	29	19	32	4.802	207	2.314
3	1	2	1	29	19	35	3.938	207	1.898
4	1	2	1	29	17	11	1.568	1.568	100
4	1	2	1	29	17	14	2.475	1.568	158
4	1	2	1	29	17	17	3.845	1.568	245
4	1	2	1	29	17	20	4.800	1.568	306
4	1	2	1	29	17	23	8.000	1.568	510
29	3	2	1	43	24	8	0	.	.
29	3	2	1	43	24	11	5	.	.
29	3	2	1	43	24	14	14	.	.
29	3	2	1	43	24	17	95	.	.
29	3	2	1	43	24	20	144	.	.
29	3	2	1	43	24	23	162	.	.
29	3	2	1	43	24	26	40	.	.
29	3	2	1	43	24	29	75	.	.
29	3	2	1	43	24	32	88	.	.
29	3	2	1	43	24	35	18	.	.
240	2	1	2	48	20	8	4	.	.
240	2	1	2	48	20	11	126	.	.
240	2	1	2	48	20	14	162	.	.
240	2	1	2	48	20	17	352	.	.
240	2	1	2	48	20	20	416	.	.
240	2	1	2	48	20	23	700	.	.
240	2	1	2	48	20	26	1.436	.	.
240	2	1	2	48	20	29	2.569	.	.

ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında K. Maraş'ın Göksun ilçesine bağlı Bozhüyük kasabasında doğdu. İlk öğrenimini Bozhüyük'de, orta ve lise öğrenimini de Kayseri'de tamamladı. 1986 yılında Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliğini kazandı ve buradan 1992 Şubat döneminde mezun oldu. 1992-1996 yılları arasında Tunceli ve Çorum Anadolu Liselerinde Fen Bilgisi ve Biyoloji öğretmeni olarak görev yaptı. 1996 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programını kazandı. Öğrenimini bir yarıyıl dondurdu ve 1997 yılı bahar döneminde yüksek lisansa ve Enstitü kadrosunda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Ocak 2000'de yüksek lisansını tamamladı ve aynı yılın bahar döneminde Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında doktora programını kazandı. Aralık 2005'de Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Öğretim Görevlisi kadrosuna atandı ve halen bu görevi yürütmektedir.

Evli ve üç çocuk babasıdır.